



# **Dimorphisme sexuel dans la réponse hypertrophique cardiaque à une surcharge hémodynamique chronique**

**Mémoire**

**Catherine Beaumont**

**Maîtrise en sciences cliniques et biomédicales - avec mémoire**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

# **Dimorphisme sexuel dans la réponse hypertrophique cardiaque à une surcharge hémodynamique chronique**

**Mémoire**

**Catherine Beaumont**

Sous la direction de :

Jacques Couët, directeur de recherche  
Marie Arsenault, codirectrice de recherche

## Résumé

L'hypertrophie cardiaque (HC) constitue un remodelage du myocarde lors d'un stress hémodynamique chronique. Dans des circonstances pathologiques, elle peut mener à l'insuffisance cardiaque (IC). L'IC, un syndrome incurable, a un taux de mortalité à 5 ans de près de 50%. Deux catégories d'HC sont possibles : **concentrique**, où un épaissement des parois ventriculaires se produit et **excentrique**, où la cavité ventriculaire s'élargit tout en épaisissant proportionnellement ou non ses parois. Une phase terminale de l'HC est la forme dilatée ou décompensée : la cavité s'élargit et les parois s'amincissent. Le remodelage cardiaque diffère selon le sexe et la présence d'hormones sexuelles. Généralement, les hommes développent une HC dilatée progressant rapidement vers l'IC, alors que les femmes ont une HC concentrique progressant plus lentement vers l'IC. La **régurgitation de la valve aortique (AR)** entraîne une **surcharge de volume (SV)** au ventricule gauche (VG) causant une hypertrophie excentrique. Pour étudier l'influence du sexe et des hormones sexuelles dans l'HC en SV, nous avons induit une AR chez des rats mâles et femelles, avec ou sans gonadectomie et les avons suivis 26 semaines. L'hypothèse était que les femelles développeraient une HC compensée, c'est-à-dire sans perte de fonction cardiaque, alors que les mâles développeraient une HC dilatée associée à une perte de fonction cardiaque. Ce dimorphisme s'expliquerait en partie par les hormones sexuelles. Des analyses échocardiographiques et tissulaires ont montré que la masse indexée des cœurs des femelles AR était plus importante que celle des mâles AR (4.4 mg/g vs 2.5 mg/g respectivement,  $p < 0,05$ ), mais que ces derniers développaient davantage de changements transcriptionnels en lien avec le métabolisme énergétique. L'orchidectomie a induit une diminution du gain de masse cardiaque lors de l'AR et une potentielle amélioration de la survie, en plus d'une stabilisation du profil transcriptionnel comparable aux femelles AR. L'ovariectomie a quant à elle diminué le gain de masse cardiaque en AR, sans affecter l'expression génique. Bref, les œstrogènes influenceraient le gain de masse cardiaque chez les femelles, alors que les androgènes défavoriseraient une HC compensée chez les mâles et induiraient un profil transcriptionnel associé à une altération du métabolisme énergétique myocardique.

## Abstract

Heart remodeling during chronic hemodynamic stress is called cardiac hypertrophy (CH). CH frequently precedes heart failure (HF), a disease with a mortality rate of approximately 50% at five years. There are two main types of CH: **concentric**, which is characterized by thickening of ventricular walls and **eccentric**, where there is an enlargement of the ventricular cavity and proportional (or not) thickening of ventricular walls. CH can evolve toward a dilated form where enlargement of ventricular cavity is not compensated by a thickening of chamber walls. CH differs between the sexes and is influenced by gonadal hormones. In general, men develop dilated CH evolving more rapidly towards HF. CH in women is more concentric and gradually evolve towards HF. **Aortic valve regurgitation** (AR) causes a **volume overload** (VO) in the left ventricle (LV) and precipitates its hypertrophy. We induced an AR in male and female rats, which were gonadectomized or not, in order to study the influence of biological sex and gonadal hormones in CH development during VO. Animals were followed for 26 weeks. Our first hypothesis was that CH would be more compensatory in females than in males. Males would lose cardiac function and develop dilated HC. Our second hypothesis was that steroid hormones could explain a part of CH sexual dimorphism. Echocardiographic and ventricular tissue analysis showed that indexed heart mass of AR females was more important than in males (4.4 mg/g vs. 2.5 mg/g respectively,  $p < 0,05$ ). However, AR males developed more transcriptional changes than AR females, especially in genes implicated in energy metabolism, extracellular matrix remodeling and mitochondrial function and biogenesis. Orchiectomy, which suppresses androgen secretion in male rats, decreased heart gain of mass in response to AR, stabilized the transcriptional profile, which became similar to AR females, and tended to increase survival. Ovariectomy, which suppresses estrogen secretion in female rats, also decreases CH in response to AR, without affecting gene expression. This leads us to conclude estrogens would essentially promote hypertrophy in females, whereas androgens would disadvantage males by inducing CH with poor compensatory properties and changes in the transcriptional profile resulting in an altered energy metabolism.

# Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières .....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations .....	xi
Remerciements.....	xv
Avant-propos .....	xvi
Introduction .....	1
I.1 Survol des maladies cardiaques chez les hommes et les femmes .....	1
I.2 Anatomie et physiologie cardiaque .....	2
I.3 Le calcium et la contractilité cardiaque .....	4
I.3.1 Cycle du calcium.....	4
I.3.2 Appareil contractile du cardiomyocyte .....	5
I.3.3 Régulation de la contractilité cardiaque .....	7
I.4 Métabolisme énergétique du cœur.....	9
I.4.1 Voies métaboliques et substrats.....	9
I.4.2 Mécanismes de régulation .....	13
I.5 Hypertrophie cardiaque .....	14
I.5.1 Mécanismes de compensation au stress myocardique .....	14
I.5.2 Étiologies de l'hypertrophie cardiaque pathologique.....	18
I.5.3 Physiopathologie de l'hypertrophie cardiaque pathologique.....	20
I.5.4 Évaluation de la morphologie, de la fonction et des changements cellulaires du myocarde lors de l'hypertrophie cardiaque .....	33
I.5.5 Modèle d'hypertrophie cardiaque étudié.....	37
I.5.6 Évolution vers l'insuffisance cardiaque.....	38
I.6 Dimorphisme sexuel cardiaque .....	41
I.6.1 Dimorphisme sexuel cardiaque physiologique .....	41
I.6.2 Dimorphisme sexuel dans l'hypertrophie cardiaque .....	42
I.6.3 Rôle des hormones sexuelles au niveau du cœur .....	44
I.7 Problématique à l'étude.....	52
I.8 Hypothèses et objectifs de la recherche .....	53
Chapitre 1 - Female rats with severe left ventricle volume overload exhibit more cardiac hypertrophy but fewer myocardial transcriptional changes than males.....	55
1.1 Résumé .....	55
1.2 Abstract .....	56

1.3 Page titre .....	57
1.4 Introduction.....	58
1.5 Results .....	59
1.5.1 Cardiac hypertrophy .....	59
1.5.2 Echocardiographic data.....	59
1.5.3 Hemodynamic measurements .....	60
1.5.4 Evolution of LV remodelling and function during the course of the study .....	60
1.5.5 Tissue analysis.....	61
1.5.6 Markers of hypertrophy and extracellular matrix remodelling .....	61
1.5.7 LV energy metabolism and markers.....	61
1.5.8 Markers of mitochondrial function .....	62
1.6 Discussion .....	62
1.6.1 Study limitations .....	65
1.7 Conclusion.....	66
1.8 Methods.....	66
1.8.1 Animals.....	66
1.8.2 Cardiomyocyte cross-sectional area .....	67
1.8.3 Staining for capillary density measurement .....	67
1.8.4 Analysis of mRNA accumulation by quantitative RT-PCR.....	67
1.8.5 Enzymatic activity determination .....	68
1.8.6 Statistical analysis .....	68
1.9 Author contribution statement and Acknowledgements .....	68
1.10 References .....	69
1.11 Tables.....	71
1.12 Figure legends.....	74
1.13 Figures .....	76
1.14 Supplemental tables and figures .....	82
Chapitre 2 - Testosterone deficiency reduces cardiac hypertrophy in a rat model of severe volume overload.	88
2.1 Résumé .....	88
2.2 Abstract .....	89
2.3 Page titre .....	90
2.4 Introduction.....	91
2.5 Methods.....	92
2.5.1 Animals.....	92
2.5.2 Echocardiography and Sacrifice .....	92
2.5.3 Gene Expression Analysis by RT-PCR.....	93
2.5.4 Enzymatic Activity .....	93
2.5.5 Immunoblotting .....	94
2.5.6 Histology .....	95

2.5.7 Statistical Analysis .....	95
2.6 Results .....	95
2.6.1 Cardiac Hypertrophy .....	95
2.6.2 Echocardiographic Data .....	96
2.6.3 Markers of Hypertrophy and Extracellular Matrix Remodeling .....	96
2.6.4 LV energy metabolism and markers.....	97
2.6.5 Oxidative Stress Markers .....	99
2.6.6 Cell signaling .....	99
2.7 Discussion and conclusion .....	100
2.8 References .....	105
2.9 Tables.....	108
2.10 Figure Legends .....	110
2.11 Figures .....	113
2.12 Supplemental tables and figures .....	122
Chapitre 3 - Effets de la présence d'œstrogènes sur l'hypertrophie cardiaque chez les femelles soumises à une surcharge de volume chronique .....	128
3.1 Présentation de l'étude.....	128
3.2 Résultats .....	129
3.2.1 Hypertrophie cardiaque.....	129
3.2.2 Fonction cardiaque .....	131
3.2.3 Marqueurs hypertrophiques et fibrotiques .....	132
3.2.4 Métabolisme énergétique.....	134
3.3 Discussion et conclusion .....	136
Conclusion .....	139
C.1 Discussion .....	139
C.2 Limitations.....	141
C.3 Perspective – Le Rôle du sexe chromosomique .....	145
C.4 Retombées et conclusion .....	148
Bibliographie .....	149

# Liste des tableaux

Tableau I.1. Classes fonctionnelles de la New York Heart Association. ....	41
Table 1.1. Animal characteristics at the end of the study. ....	71
Table 1.2. Echocardiography data. ....	72
Table 1.3. Haemodynamic values. ....	73
Table 1.S1. Primer Assays used in qPCR analysis of gene expression. ....	82
Table 2.1. Animal characteristics at the end of the protocol. ....	108
Table 2.2. Echocardiographic and hemodynamic parameters at the end of the protocol. ....	109
Table 2.S1. Name and abbreviation of all primers used for gene expression analysis ....	122
Tableau 3.1. Mesures et masses des animaux à la fin du protocole. ....	130
Tableau 3.2. Mesures et calculs échocardiographiques en fin de protocole. ....	132
Tableau C.1. Type de gonade associé aux quatre génotypes du modèle Y* ....	147

# Liste des figures

Figure I.1. Anatomie du cœur .....	3
Figure I.2. Schéma de l'influx et de l'efflux de calcium pour la contraction cardiaque.....	5
Figure I.3. Le sarcomère.....	6
Figure I.4. Schématisation du métabolisme énergétique dans le cardiomyocyte.....	12
Figure I.5. Remodelage ventriculaire hypertrophique en réponse à une surcharge hémodynamique .....	17
Figure 1.1. Progression of different LV parameters as evaluated by echocardiography .....	76
Figure 1.2. Impact of LV dilation and hypertrophy caused by severe aortic regurgitation on cardiomyocyte cross-sectional area and on myocardial capillary density.....	77
Figure 1.3. mRNA levels of various hypertrophy and extracellular matrix remodelling markers .....	78
Figure 1.4. LV myocardial activity levels of enzymes implicated in fatty acid $\beta$ -oxydation, glucose metabolism and mitochondrial energy production in male and female .....	79
Figure 1.5. mRNA levels of gene encoding for enzymes implicated in fatty acid oxidation, glycolysis and for transcription factors related to bioenergetics control .....	80
Figure 1.6. mRNA levels of genes encoding for markers of mitochondrial biogenesis and function .....	81
Figure 1.S1. Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of various hypertrophy (top two graphs) and extracellular matrix remodeling (bottom) markers.....	84
Figure 1.S2. Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for enzymes implicated in fatty acid oxidation (left panels), glycolysis (top right panel) and or for transcription factors related to bioenergetics control.....	85
Figure 1.S3: Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for markers of mitochondrial biogenesis and function.....	86
Figure 1.S4: Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for adrenergic receptors.....	87
Figure 2.1. Survival of animals with aortic regurgitation during the protocol, mid left ventricle histological short-axis sections and variations of heart weight and LV weight .....	113
Figure 2.2. Echocardiographic parameters on LV diastolic diameter, systolic function and compliance.....	114
Figure 2.3. Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy and extracellular matrix remodeling markers.....	115
Figure 2.4. mRNA levels of genes encoding for proteins related to fatty acid uptake and oxidation, for proteins relevant to glucose metabolism, for transcription factors related to fatty acid metabolism and mitochondrial function and biogenesis .....	116
Figure 2.5. LV myocardial activity levels of enzymes implicated in myocardial energy metabolism.....	117
Figure 2.6. LV myocardial oxidative stress .....	118
Figure 2.7. Evaluation by Western Blot of LV protein contents of Erk1/2, p38 and Jnk .....	119
Figure 2.8. Evaluation by Western Blot of the LV protein levels of Pten, Akt and Gsk3.....	120
Figure 2.S1. Comparison of SOcx with S with real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy (A) extracellular matrix remodeling (B) markers .....	125
Figure 2.S2. Comparison of SOcx with S with real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for glucose uptake and glycolysis (A), fatty acid oxidation (B) and transcription factor (C) markers. ....	126
Figure 2.S3. Comparison of SOcx with S with real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for mitochondrial function and biogenesis (A) and oxidative stress (B) markers. ....	127

Figure 3.1. Masses cardiaques et mesures échocardiographiques du ventricule gauche des animaux à la fin du protocole .....	130
Figure 3.2. Mesures et calculs échocardiographiques de fonctions cardiaques systolique et diastolique .....	131
Figure 3.3. Mesure de l'ARN messenger en lien avec l'hypertrophie cardiaque et le remodelage de la matrice extracellulaire.....	133
Figure 3.4. Mesure de l'ARN messenger en lien avec le métabolisme énergétique et la fonction mitochondriale .....	135
Figure 3.5. Activité d'enzymes du métabolisme énergétique mesurés au VG. ....	136

# Liste des abréviations

ADP : adénosine diphosphate

ACC : acétyl-CoA carboxylase

AKT : protéine kinase B

AMPK : protéine kinase active par l'AMP

AngII : angiotensine II

ANP : facteur natriurétique de l'oreillette

AR : régurgitation de la valve aortique

ARf: rate femelle avec une régurgitation aortique

ARm : rat mâle avec une régurgitation aortique

ARNm : acide ribonucléique messenger

AROCx : mâles orchidectomisés avec une régurgitation aortique

AROVx : femelles ovariectomisées avec une régurgitation aortique

ATP : adénosine triphosphate

AT<sub>1</sub>R : récepteur à l'angiotensine II de type 1

AT<sub>2</sub>R : récepteur à l'angiotensine II de type 2

AU : *arbitrary units* (unités arbitraires)

AVF : arteriovenous fistula (fistule artérioveineuse)

BDH :  $\beta$ -hydroxybutyrate déshydrogénase

BNP : facteur cérébral natriurétique

CH : *cardiac hypertrophy* (hypertrophie cardiaque)

CaMKII : Ca<sup>2+</sup> /calmoduline-dépendante protéine kinase II

CK : créatine kinase

CnA : calcineurine A

CO : *cardiac output* (débit cardiaque)

CPT1 : carnitine palmitoyl transférase 1

CPT2 : carnitine palmitoyl transférase 2

CS : citrate synthase

CSA : *cross-sectional area*

DAG : 1,2-diacylglycérol

DHT : dihydrotestostérone

ECM : *extracellular matrix* (matrice extracellulaire)

EDD : *end-diastolic diameter* (diamètre en fin de diastole)

EDP: *end-diastolic pressure* (pression en fin de diastole)

ELITE : *Early Versus Late Intervention Trial with Estradiol*

ENO : enolase

ER : récepteur aux œstrogènes  
 $\alpha$ ERKO : souris n'exprimant plus le récepteur aux œstrogènes  $\alpha$   
 $\beta$ ERKO: souris n'exprimant plus le récepteur aux œstrogènes  $\beta$   
ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2  
ESD: *end-systolic diameter* (diamètre en fin de systole)  
FAK : focal adhesion kinase  
FAO: *fatty-acid oxidation* (oxydation des acides gras)  
FAT/CD36 : fatty acid translocase  
FC : fréquence cardiaque  
FCG: *four core genotype*  
FÉ : fraction d'éjection  
FS : fraction de raccourcissement  
GDP : guanosine diphosphate  
GLUT1 : transporteur de glucose 1  
GLUT4 : transporteur de glucose 2  
GMPc : guanosine monophosphate cyclique  
GPCR : récepteurs membranaires couplés à une protéine G  
GPER : récepteur aux œstrogènes couplé à une protéine G  
GPx : glutathione peroxydase  
GSK3 : Glycogen synthase kinase 3  
GTP : guanosine triphosphate  
HADH : hydroxyacyl-Coenzyme A déshydrogénase  
HC : hypertrophie cardiaque  
HDAC : histone désacétylase  
HERS : *Heart and Estrogen/progestin Replacement Study*  
HF: *heart failure* (insuffisance cardiaque)  
HFpEF: HF with preserved ejection fraction (insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection conservée)  
HK : hexokinase  
HTA : hypertension artérielle  
IC : insuffisance cardiaque  
IM : insuffisance de la valve mitrale  
IP<sub>3</sub>: inositol 1,4,5-triphosphate  
IP3R : récepteur à inositol 1,4,5-triphosphate  
IRM : imagerie par résonance magnétique  
IT : insuffisance de la valve tricuspide  
JNK : c-Jun N-terminal kinase

KLF15: Kruppel-like factor 15  
LTCC : canaux calciques de type L  
LV : *left ventricle* (ventricule gauche)  
MAPK : mitogen-activated protein kinase  
MCD : malonyl-CoA décarboxylase  
MEC : matrice extracellulaire  
MEF2c : myocyte enhancer factor 2c  
MHC: chaînes lourdes de myosines  
mTORC1: mechanistic target of rapamycin complex 1  
NA : noradrénaline  
NCX : Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger  
NOX : NADPH oxydase  
NRF : nuclear Respiratory Factor 1  
NYHA : *New York Heart Association*  
OD : Oreillette droite  
Ocx : orchidectomie  
OG : oreillette gauche  
PDK : pyruvate déshydrogénase kinase  
PDH : pyruvate déshydrogénase  
PET : tomographie par émission de positrons  
PFK : phosphofructokinase  
P<sub>i</sub> : phosphate  
PI3K: phosphoinositide 3-kinase  
PIP3: phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate  
PKA : protéine kinase A  
PKC: protéine kinase C  
PKD : protéine kinase D  
PLC: phospholipase C  
PO : *pressure overload* (surcharge de pression)  
PPAR $\alpha$  : peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$   
PPRE: peroxisome proliferator hormone response element  
PTEN : phosphatase and tensin homolog  
PW : *posterior wall thickness* (épaisseur de la paroi postérieure du ventricule gauche)  
RAA: rhumatisme articulaire aigu  
ROS : *reactive oxygen species* (dérivés réactifs de l'oxygène)  
RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction  
RV : *right ventricle* (ventricule droit)

RWT : *relative wall thickness* (épaisseur relative des parois)  
RXR: retinoid X receptor  
RYR2 : récepteurs à ryanodine de type 2  
S : animaux sham non-gonadectomisés  
SA : sténose de la valve aortique  
SEM : *standard error of the mean* (erreur-type)  
SERCA : sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase  
SDH: Succinate déshydrogénase  
ShF: femelles sham  
ShM: mâles sham  
SOcx: mâles sham orchidectomisés  
SOvx: femelles sham ovariectomisées  
SOD: superoxide dismutase  
SOPK: syndrome des ovaires polykystiques  
SP: sténose de la valve pulmonaire  
SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone  
SRY : Sex-determining Region of Y chromosome  
SW : *septum wall thickness* (épaisseur du septum interventriculaire)  
TAC : constriction transaortique  
TAK1 : TGF $\beta$  activating kinase 1  
TAVI : *transcatheter aortic valve implantation* (remplacement percutané de la valve aortique)  
TGF $\beta$  : transforming growth factor  $\beta$   
TnC: troponine C  
TnT: troponine T  
TnI: troponine I  
TRPC: Transient receptor potential channels  
VD : ventricule droit  
VG : ventricule gauche  
V<sub>max</sub> : activité enzymatique maximale  
VO : *volume overload* (surcharge de volume)  
VTI: *time-velocity integral* (intégrale de la vitesse par le temps)  
WHI : *Women's Health Initiative*  
WVI: *LV mid-wall velocity* (vitesse de la paroi mid-ventriculaire)

## Remerciements

J'aimerais en premier lieu remercier mon directeur de recherche, Dr Jacques Couët, ma codirectrice Dre Marie Arsenault, de m'avoir initiée à la recherche biomédicale. Merci de m'avoir permis de découvrir ce fascinant domaine que je souhaitais explorer depuis plusieurs années, et de m'avoir accompagnée dans mes apprentissages, moi qui commençais mon projet sans grande expérience en recherche. Merci aussi pour votre compréhension et votre disponibilité face à la complexité organisationnelle de ma maîtrise en parallèle à mes études en médecine.

Je tiens aussi à remercier Marie-Claude Drolet et Élise Roussel, deux professionnelles de recherche dynamiques sans qui mon projet n'aurait pas été possible. Élise, ta patience en m'initiant aux techniques de laboratoire m'a permis d'apprécier d'autant plus mon passage dans l'équipe du laboratoire. Marie-Claude, merci de t'être occupée des animaux, des chirurgies et des échocardiographies, qui étaient à la base même de mon projet. D'ailleurs, j'en profite pour remercier Dr Jonathan Beaudoin d'avoir assisté Marie-Claude dans la plupart des chirurgies.

Un grand merci à ma collègue et amie Élisabeth Walsh-Wilkinson, avec qui j'ai autant pu réfléchir à nos résultats de recherche que décompresser en nageant au PEPS. Merci d'avoir rendu mes journées de laboratoire encore plus divertissantes!

Un merci particulier à mes excellentes amies Florence et Marie-Hélène; vous avez toujours été là pour moi et vos encouragements m'ont aidée à réaliser ma maîtrise et mon mémoire. À tous ceux qui m'ont encouragée à poursuivre le projet un peu fou de compléter une maîtrise de recherche en parallèle à mes études en médecine, merci.

Enfin, merci à mes parents et à ma famille, mes plus fidèles supporteurs. Votre confiance et votre amour étaient essentiels à la réalisation de ce mémoire.

## Avant-propos

Ce mémoire contient deux articles et un chapitre de résultats préliminaires présentant les fruits du travail de mon équipe de recherche et moi-même sur le dimorphisme sexuel lors d'hypertrophie cardiaque. Le premier article présenté au Chapitre 1 expose les différences dans la réponse hypertrophique entre les animaux mâles et femelles. Nous avons étudié dans un deuxième temps l'influence de l'absence des hormones sexuelles dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. Comme des différences intéressantes ont été remarquées entre les mâles intacts et orchidectomisés, nous avons rédigé un article sur l'influence des androgènes dans la réponse hypertrophique lors d'une surcharge de volume chez les rats mâles. Cet article est présenté au Chapitre 2. La comparaison de la réponse hypertrophique entre les femelles intacts et ovariectomisées est présentée au Chapitre 3.

L'article *Female rats with severe left ventricle volume overload exhibit more cardiac hypertrophy but fewer myocardial transcriptional changes than males* (Chapitre 1) a été publié dans la revue Scientific Reports le 7 avril 2017. Élisabeth Walsh-Wilkinson et moi sommes les deux co-premières auteurs de cet article. Ma contribution a été l'analyse de l'expression génique, la réalisation de plusieurs figures et la rédaction de l'article. Jacques Couët et Marie Arsenault ont conçu le projet. Marie-Claude Drolet a réalisé les chirurgies et échocardiographies. Élise Roussel a réalisé l'analyse histologique du tissu cardiaque.

Pour le deuxième article, *Testosterone deficiency reduces cardiac hypertrophy in a rat model of severe volume overload*, (Chapitre 2), celui-ci est en révision au journal *Physiological Reports*. Jacques Couët et Marie Arsenault ont conçu le projet et ont révisé le manuscrit, Marie-Claude Drolet et Jonathan Beaudoin ont effectué les chirurgies et les échocardiographies sur les animaux, Nicolas Melançon a analysé une partie de l'expression génique, Élisabeth Walsh-Wilkinson a réalisé l'analyse du stress oxydatif et une partie de l'analyse des données échocardiographiques et Élise Roussel a réalisé les Western Blot. J'ai contribué à une partie des chirurgies chez les animaux, à l'analyse de l'expression génique, à l'analyse de l'activité enzymatique, à l'analyse des données échocardiographiques, à la création des figures et à la rédaction du manuscrit.

Finalemment, le Chapitre 3 présente des résultats préliminaires de l'étude de femelles intactes et ovariectomisées faisant face à un stress hypertrophique d'insuffisance aortique. Les rôles des membres de l'équipe de recherche étaient sensiblement les mêmes que pour la recherche présentée au Chapitre 2. Plus spécifiquement, j'ai participé à une partie des chirurgies, à l'analyse de l'expression génique, à l'analyse de l'activité enzymatique et à l'analyse des données échocardiographiques, en plus de rédiger le chapitre et concevoir les figures.

# Introduction

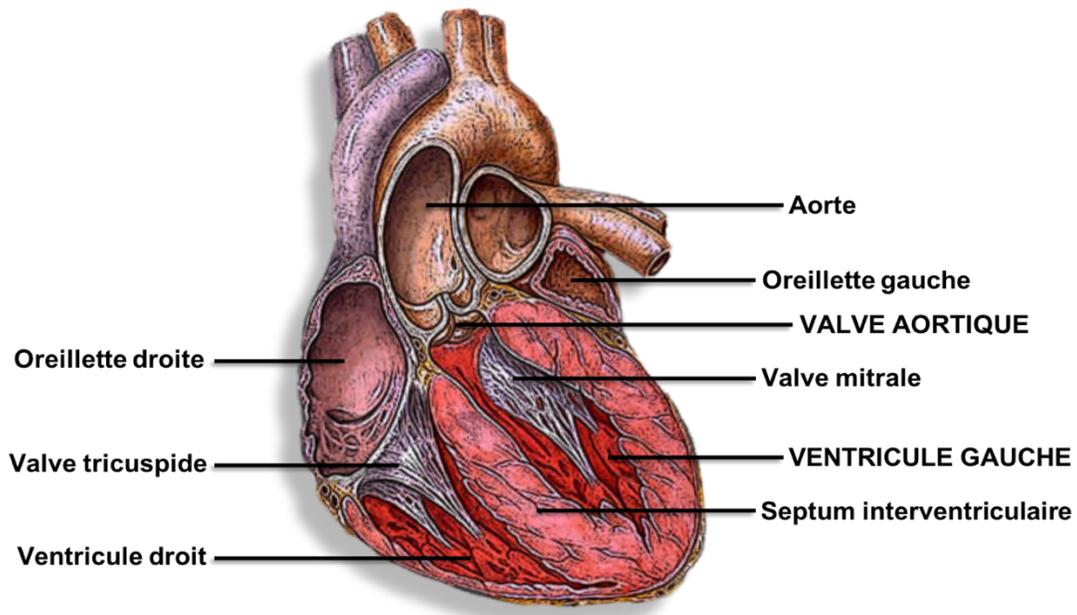
## I.1 Survol des maladies cardiaques chez les hommes et les femmes

Les maladies cardiovasculaires sont la deuxième cause de mortalité au Canada et la première cause aux États-Unis [1, 2]. Malgré la croyance populaire que les femmes sont moins sujettes aux maladies cardiovasculaires, celles-ci sont autant affectées par ces maladies que les hommes. La différence est qu'en plus d'avoir une plus longue espérance de vie, les femmes souffrent de maladies cardiovasculaires dix ans plus tard que les hommes et que la nature des maladies diffère entre les sexes; les hommes sont plutôt atteints de maladies ischémiques, alors que les femmes souffrent plus d'accidents vasculaires cérébraux [1, 2]. Selon une étude découlant de la Framingham Heart Study, un projet phare dans la recherche épidémiologique sur les maladies cardiovasculaires, un homme de 50 ans sans maladie cardiovasculaire a un risque à vie de développer ce genre de maladie de 51,7%, alors qu'il est de 39,2% chez la femme [3]. Pour l'insuffisance cardiaque, ce risque est toutefois semblable entre les hommes et les femmes, soit d'environ 14,9% et 17,5%, respectivement [4], mais les hommes ont un moins bon pronostic [5]. Bref, le cœur des femmes est aussi sujet à la pathologie, ce qui est parfois négligé en clinique. En effet, les jeunes femmes souffrant de maladies cardiovasculaires ont un taux de mortalité plus élevé que les hommes du même âge puisqu'elles sont souvent moins bien diagnostiquées et prises en charge [6]. Lorsqu'elles sont traitées, les femmes développent plus d'effets secondaires néfastes que les hommes, notamment en raison d'interactions avec certaines comorbidités à prédominance féminine (la dépression par exemple) et en raison des doses pharmacologiques moins adaptées [7]. En outre, les femmes sont moins sujettes à obtenir une prise en charge adéquate de leur diabète, et ce, même si le diabète représente un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires plus important chez les femmes que chez les hommes (risque relatif de 3,57 chez les femmes et de 1,93 chez les hommes) [8]. À cela s'ajoute le peu d'études, cliniques ou fondamentales, sur les individus féminins qui se sont faites par le passé [8], accroissant ainsi le manque de connaissances sur ce sujet et sur les possibilités de traitements spécifiques. Ainsi, il est justifié d'étudier le dimorphisme sexuel dans le développement des maladies cardiaques pour clarifier notre compréhension de ces pathologies et être plus efficace pour les prévenir, les diagnostiquer et les traiter, tant chez les hommes que chez les femmes.

## I.2 Anatomie et physiologie cardiaque

Le cœur est un organe musculaire vital qui sert à pomper le sang oxygéné à travers tout l'organisme. Il est localisé dans le médiastin, soit l'espace entre les deux poumons au niveau du thorax. En antérieur, la cage thoracique le protège et en postérieur, on retrouve l'aorte descendante, l'œsophage et la colonne vertébrale. Finalement, en inférieur, le cœur repose sur le diaphragme, principal muscle de la respiration. Le cœur se divise en cœur « droit » et cœur « gauche » et chacun de ces côtés du cœur se divise à son tour en deux cavités, l'oreillette et le ventricule, ce qui totalise quatre cavités cardiaques principales. Le sang veineux, dont la concentration en oxygène est réduite, arrive de tout l'organisme depuis les veines caves inférieures et supérieures pour se jeter dans l'oreillette droite (OD). Le sang passe ensuite au travers de la valve tricuspide pour remplir le ventricule droit (VD). Ce remplissage ventriculaire où la cavité doit « se détendre » pour accueillir le sang se nomme la **diastole**. Lors de la **systole** du VD, soit lors de sa contraction, le sang est éjecté par la valve pulmonaire pour aller dans le tronc pulmonaire, puis dans les artères pulmonaires pour être oxygéné par les poumons. Après son passage dans la circulation pulmonaire, le sang revient au cœur gauche, plus précisément à l'oreillette gauche (OG), grâce aux veines pulmonaires. À l'ouverture de la valve mitrale, lors de la diastole, le sang passe de l'OG vers le ventricule gauche (VG) et à la systole, le sang est éjecté du cœur. Le sang oxygéné passe alors par la valve aortique pour se rendre dans l'aorte qui permet la perfusion du corps en entier, dont le cœur (Figure I.1). Les ostiums coronaires gauche et droit, qui sont les ouvertures des artères coronaires permettant l'apport d'oxygène et d'éléments nutritifs au cœur, trouvent leur origine dans la paroi de la racine aortique, au niveau des feuillets gauche et droit de la valve aortique [9].

La valve aortique est l'une des valves semi-lunaires du cœur et est constituée de trois feuillets, aussi appelés « cuspidés ». Son ouverture se produit lors de la systole ventriculaire, lorsque le VG rempli de sang se contracte pour générer une pression surpassant la **post-charge**, c'est-à-dire la force qui s'oppose à l'éjection du sang majoritairement constituée de la pression artérielle dans l'aorte. Cette pression, lorsque plus élevée dans le VG que dans l'aorte permet l'ouverture de la valve aortique et l'éjection du sang dans la circulation systémique. Le VG doit donc générer d'importantes pressions afin de bien perfuser tout l'organisme. Cette caractéristique explique pourquoi les parois du VG



**Figure I.1. Anatomie du cœur**, adaptée de : *Heart* par H. Heikenwaelder sous licence Creative Commons Attribution-Share Alike 2.5 Generic.

sont normalement plus épaisses que celles du VD, ce dernier ayant peu de pression à générer puisque les pressions pulmonaires physiologiques sont faibles [9]. Pour permettre une bonne perfusion systémique et éviter un retour de sang dans le VG, la valve aortique se ferme lorsque la pression dans l'aorte redevient plus élevée que celle générée par le VG. La diastole débute ensuite, alors que le VG se détend, ce qui optimise son remplissage et la précharge pour permettre un autre cycle cardiaque. Ce concept de **précharge** consiste à la force d'étirement de la cavité cardiaque, ici le VG, et dépend du volume sanguin qu'elle reçoit lors de la diastole. Une augmentation de la précharge permet d'optimiser la contractilité cardiaque et permet d'éjecter adéquatement le sang malgré une augmentation des volumes sanguins jusqu'à un certain maximum [10]. C'est le mécanisme de Frank-Starling qui sera abordé plus loin. Le nœud sinusal, contrôleur électrique du myocarde qui se trouve au niveau de l'OD, dicte la fréquence cardiaque (FC) en se dépolarisant à un rythme régulier, ajustant sa fréquence de dépolarisation selon la demande en oxygène de l'organisme. Sa dépolarisation se propage de manière organisée à tout le myocarde, ce qui entraîne séquentiellement la contraction auriculaire en fin de diastole suivie de la contraction ventriculaire pour la systole. Lors de la systole, un VG sain devrait éjecter entre 55 à 65% du sang qu'il contient, sa fraction d'éjection (FÉ) [11]. Un cœur normal devrait aussi pouvoir s'adapter à une augmentation de la post-charge en augmentant sa contractilité et, à une

augmentation de la précharge en augmentant sa compliance, soit sa capacité à accueillir un volume de sang croissant qui dépend entre autres, de la souplesse du myocarde.

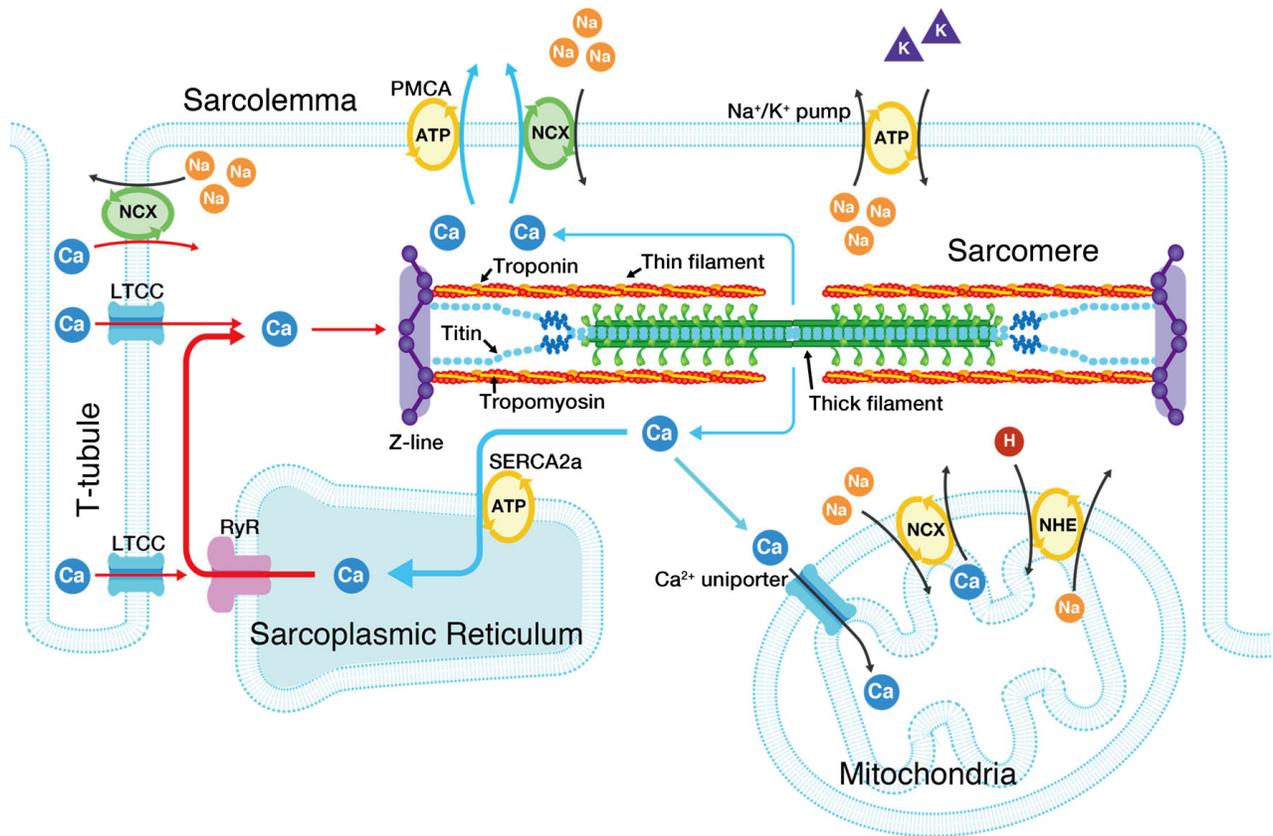
Bref, le cœur est soumis physiologiquement à diverses contraintes et un bon fonctionnement de ses mécanismes d'adaptation est essentiel pour permettre l'oxygénation appropriée de tout l'organisme. Ces mécanismes d'adaptation sont dépendants des cardiomyocytes, les cellules constituant le myocarde qui abrite les fibres contractiles grâce auxquelles le cœur peut jouer un rôle de pompe.

## **I.3 Le calcium et la contractilité cardiaque**

### **I.3.1 Cycle du calcium**

La contractilité cardiaque est dépendante de l'augmentation rapide des concentrations cytosoliques en calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) lors de la systole. Les niveaux calciques intracellulaires sont bas dans une cellule au repos, alors qu'ils sont élevés dans le milieu extracellulaire. L'influx électrique initié par le nœud sinusal se propage de cellule en cellule, ce qui entraîne la dépolarisation de la membrane cellulaire des cardiomyocytes par entrée de sodium. Cette dépolarisation favorise l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage membranaire, les canaux calciques de type L (LTCC). Ceux-ci permettent une entrée passive de  $\text{Ca}^{2+}$  depuis l'espace extracellulaire vers le cytosol. Cette entrée localisée de  $\text{Ca}^{2+}$  déclenche une autre libération calcique dans le cytosol, mais cette fois, depuis le réticulum sarcoplasmique (Figure I.2). C'est ce que l'on nomme le mécanisme de *Calcium-induced calcium release* (libération de calcium induite par le calcium) [12]. Comme les LTCC sont surtout présents dans les tubules-T des cardiomyocytes, ils sont à proximité du réticulum sarcoplasmique où l'on retrouve les récepteurs à ryanodine de type 2 (RyR2), qui sont aussi des canaux calciques. Lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  se lie à RyR2, il entraîne son ouverture et la libération d'importantes quantités d'ions calcium dans le cytosol [13]. C'est ce  $\text{Ca}^{2+}$  qui se lie aux fibres contractiles du cardiomyocyte pour entraîner sa contraction, la systole. Des mécanismes de recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  se mettent ensuite en marche pour diminuer les concentrations cytosoliques en  $\text{Ca}^{2+}$ . Au niveau du réticulum sarcoplasmique, le calcium est repris via la pompe *sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase* (SERCA). Ce mécanisme actif de recapture permet d'importantes baisses de concentrations. Dans une moindre

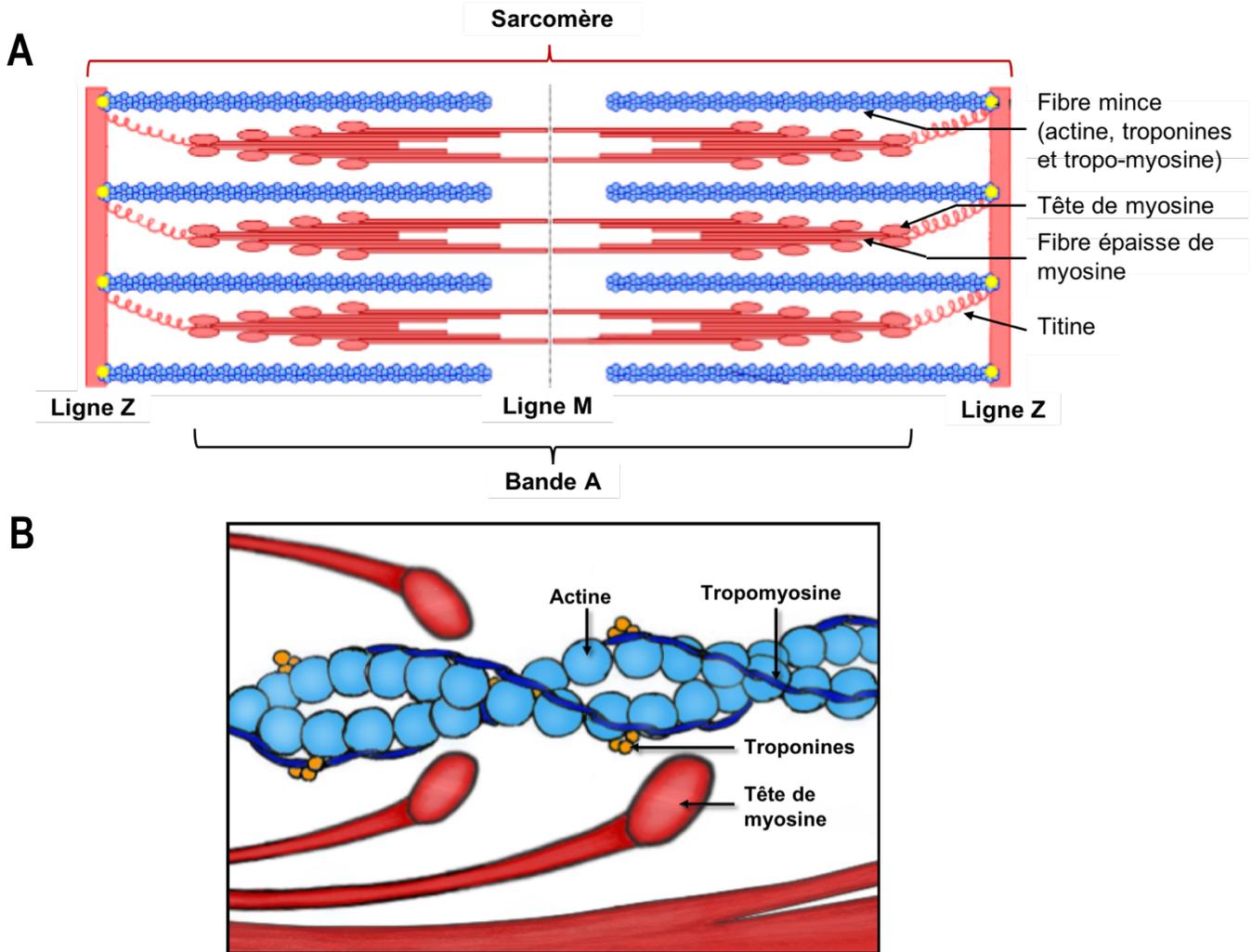
mesure, le  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX) de la membrane cytoplasmique permet d'expulser du  $\text{Ca}^{2+}$  hors de la cellule et cela nécessite aussi de l'ATP [12].



**Figure I.2. Schéma de l'influx et de l'efflux de calcium pour la contraction cardiaque.** Ca : calcium, LTCC : canaux calciques de type L, NCX :  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, RyR : récepteurs à ryanodine, SERCA2a : sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Tirée de « Kobirumaki-Shimozawa, F., et al., *Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism*. J Physiol Sci, 2014. **64**(4): p. 221-32. Open Access.»

### I.3.2 Appareil contractile du cardiomyocyte

Le sarcomère est l'unité contractile du cardiomyocyte. On y retrouve les fibres d'actine et de myosine, les myofibrilles, qui, en interagissant, induisent le raccourcissement du sarcomère. Le sarcomère est principalement constitué des fibres minces et des fibres épaisses, parallèles, se chevauchant et s'alternant l'une et l'autre (Figure I.3).



**Figure 1.3. Le sarcomère.** (A) Représentation de l'organisation d'un sarcomère et de ses composantes. (B) Schéma de l'organisation d'un fibre mince et de son interaction avec les têtes de myosine. Adaptée de *Sarcomere* par David Richfield sous licence Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sarcomere.svg> (consulté le 24 novembre 2018) et de *Thin filament* par Rama sous licence Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thin\\_filament.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thin_filament.jpg) (consulté le 24 novembre 2018).

Les fibres épaisses sont plutôt centrales aux sarcomères et sont constituées de myosine. Ce filament de myosine est retenu en position centrale du sarcomère de part et d'autre par la titine, une protéine ayant d'importantes capacités élastiques qui influencent la force de contraction [14]. La titine permet de relier le filament de myosine aux lignes Z délimitant le sarcomère de chaque côté. Les fibres minces sont quant à elles constituées des protéines d'actine, de tropomyosine et de troponine et ne sont reliées que d'un côté à

une ligne Z. Un autre filament mince lui fait face attaché à la ligne Z adjacente. Trois types de troponines viennent se fixer sur les fibres minces : la troponine C (TnC), la troponine T (TnT) et la troponine I (TnI). Ce sont ces troponines qui seront influencées par l'arrivée rapide de  $\text{Ca}^{2+}$  et qui induiront le changement de conformation de l'actine permettant son interaction avec les têtes de myosine, ces dernières se repliant sur l'actine pour « avancer ». Le raccourcissement sarcomérique est initié par l'augmentation rapide du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, les tubules-T et le réticulum sarcoplasmique étant à proximité des sarcomères. Le  $\text{Ca}^{2+}$  se lie à une molécule de TnC, ce qui supprime l'inhibition par la TnI et occasionne un changement de conformation de la tropomyosine, laissant place à une interaction entre l'actine et les têtes de myosine [15].

Lors de la diastole, l'ATP vient se fixer aux têtes de myosines et est hydrolysée en ADP et phosphate ( $\text{P}_i$ ) qui restent fixés sur la myosine. Lors de la dépolarisation cellulaire pour l'initiation de la systole, le changement de conformation de la fibre mince grâce à l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire permet l'interaction entre l'actine et les têtes de myosine, en plus de la libération du  $\text{P}_i$  de la tête de myosine. L'ADP est ensuite libérée, ce qui libère assez d'énergie pour permettre un repliement des têtes de myosine sur l'actine et induire la contraction du sarcomère. La tête de myosine étant libre des produits d'hydrolyse de l'ATP, elle accueille alors une nouvelle molécule d'ATP, ce qui réduit l'affinité de la myosine pour l'actine et cause leur détachement. Lors d'une même systole, cette séquence d'hydrolyse de l'ATP et de liaison d'ATP à la myosine peut se répéter et permet à la tête de myosine de plus en plus « avancer » sur les filaments d'actine, ce qui permet une contraction plus importante [10]. C'est par la diminution du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique que la systole prend fin. Lorsque les niveaux calciques diminuent, le  $\text{Ca}^{2+}$  se détache de la TnC, la tropomyosine reprend une configuration bloquant l'interaction actine-myosine et la TnI redevient inhibitrice [15]. Cela permet un arrêt de la contraction et une relaxation des sarcomères.

### I.3.3 Régulation de la contractilité cardiaque

Le calcium et l'état des fibres contractiles influencent l'inotropisme, soit la contractilité cardiaque [12]. Au niveau du  $\text{Ca}^{2+}$ , ce sont les variations d'amplitudes dans ses concentrations intracellulaires qui modulent l'efficacité de la contraction. Lors d'une

demande contractile accrue, comme lors d'exercice physique, les LTCC peuvent être phosphorylés par la protéine kinase A (PKA) ou la  $\text{Ca}^{2+}$  /calmoduline-dépendant protéine kinase II (CaMKII), ce qui augmente la probabilité d'ouverture des LTCC lors de la dépolarisation, prolonge leur durée d'ouverture et permet donc une entrée accrue de  $\text{Ca}^{2+}$  [10, 16]. Ainsi, plus de  $\text{Ca}^{2+}$  peuvent être repris par le réticulum sarcoplasmique, ce qui permet d'en augmenter la libération lors des prochaines systoles. En accroissant les concentrations cytoplasmiques systoliques de  $\text{Ca}^{2+}$ , cela permet un recrutement d'un plus grand nombre de fibres d'actine pouvant se lier à la myosine. Des mécanismes permettent d'améliorer l'efficacité de SERCA pour augmenter la recharge en  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique. Le système nerveux sympathique, qui est notamment activé lors d'exercice physique, stimule les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, ce qui active la PKA et la CaMKII [17]. Ces deux kinases (qui seront abordées plus en détail dans les sections suivantes) peuvent phosphoryler le phospholamban, une protéine inhibitrice de SERCA. Cette phosphorylation inactive le phospholamban, ce qui permet une pleine activité de SERCA [18]. Comme les mécanismes de diminution des concentrations calciques sont actifs (SERCA, NCX), ils nécessitent de l'énergie sous forme d'ATP. L'augmentation des concentrations de calcium se répercute jusqu'aux mitochondries, organelles responsables de la production énergétique, pour que celles-ci s'adaptent à la demande accrue. L'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial, dans certaines limites physiologiques, pourrait activer des enzymes du métabolisme énergétique, comme la pyruvate déshydrogénase et ainsi favoriser la production d'ATP [19]. La sensibilité des myofilaments pour le  $\text{Ca}^{2+}$  peut aussi être influencée pour augmenter la fonction cardiaque. Encore une fois, PKA peut phosphoryler la troponine I, ce qui diminue la sensibilité des myofibrilles au  $\text{Ca}^{2+}$ . Bien que cette perte de sensibilité diminue la conformation active des fibres minces, elle permet néanmoins d'améliorer la relaxation cardiaque pour maximiser le remplissage, ce qui se répercute ensuite positivement sur la fonction cardiaque [10, 15].

Pour ce qui est de l'état des fibres contractiles, plus elles sont étirées lors de la diastole, plus leur contraction est forte ; c'est le **mécanisme de Frank-Starling**. Ainsi, plus le ventricule accueille un important volume sanguin lors de la diastole, plus ses sarcomères sont étirés, ce qui entraîne une plus forte contraction pour éjecter le surplus de sang. Cela peut notamment s'expliquer par les propriétés élastiques et la position des fibres de titine. Celles-ci relient les fibres de myosine à la ligne Z, mais de manière oblique, vers les fibres minces. C'est ainsi dire que plus la titine est allongée, plus la fibre épaisse se rapproche de

la fibre mince, ce qui facilite leur interaction et accroît la force de contraction possible selon une même sensibilité calcique. Néanmoins, lorsque les sarcomères ne sont pas assez étirés ou le sont trop, la force contractile diminue [15]. Si l'élongation est trop importante, les fibres épaisses et minces ne se chevauchent plus, alors que si l'étirement est minime, les fibres contractiles ne pourront pas générer une force adéquate [10].

Ces changements au niveau du métabolisme du  $\text{Ca}^{2+}$  et de l'état des fibres contractiles sont donc deux mécanismes d'adaptation physiologique permettant d'améliorer la contractilité cardiaque lors d'une demande accrue. À l'inverse, lorsque la demande contractile diminue après l'exercice, les NCX permettent d'expulser, grâce à une entrée de sodium et une utilisation d'ATP, le surplus de  $\text{Ca}^{2+}$  hors du cardiomyocyte [12]. Ces mécanismes actifs d'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  et du cycle contraction-relaxation font ressortir l'importance du métabolisme énergétique au cœur, plus spécifiquement de la production d'ATP.

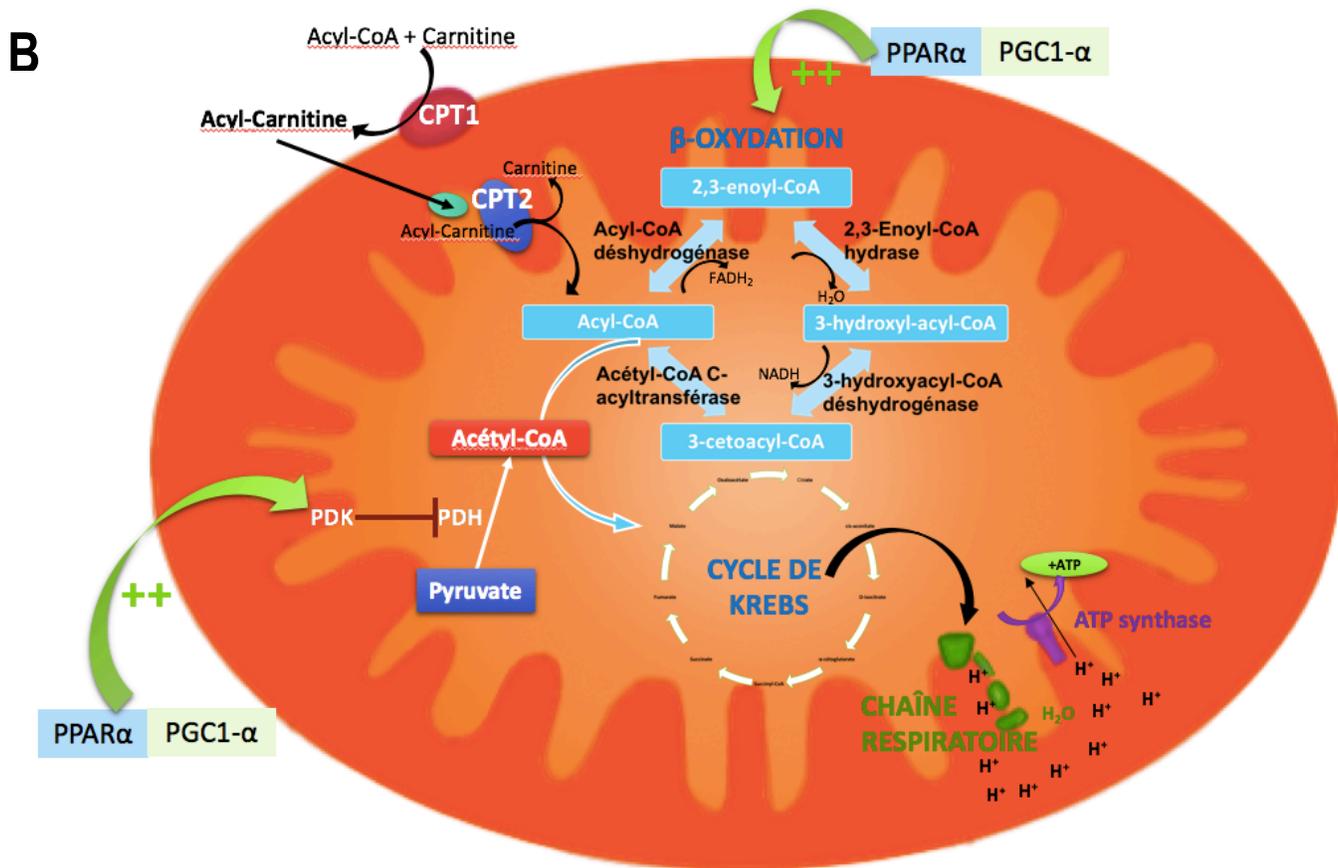
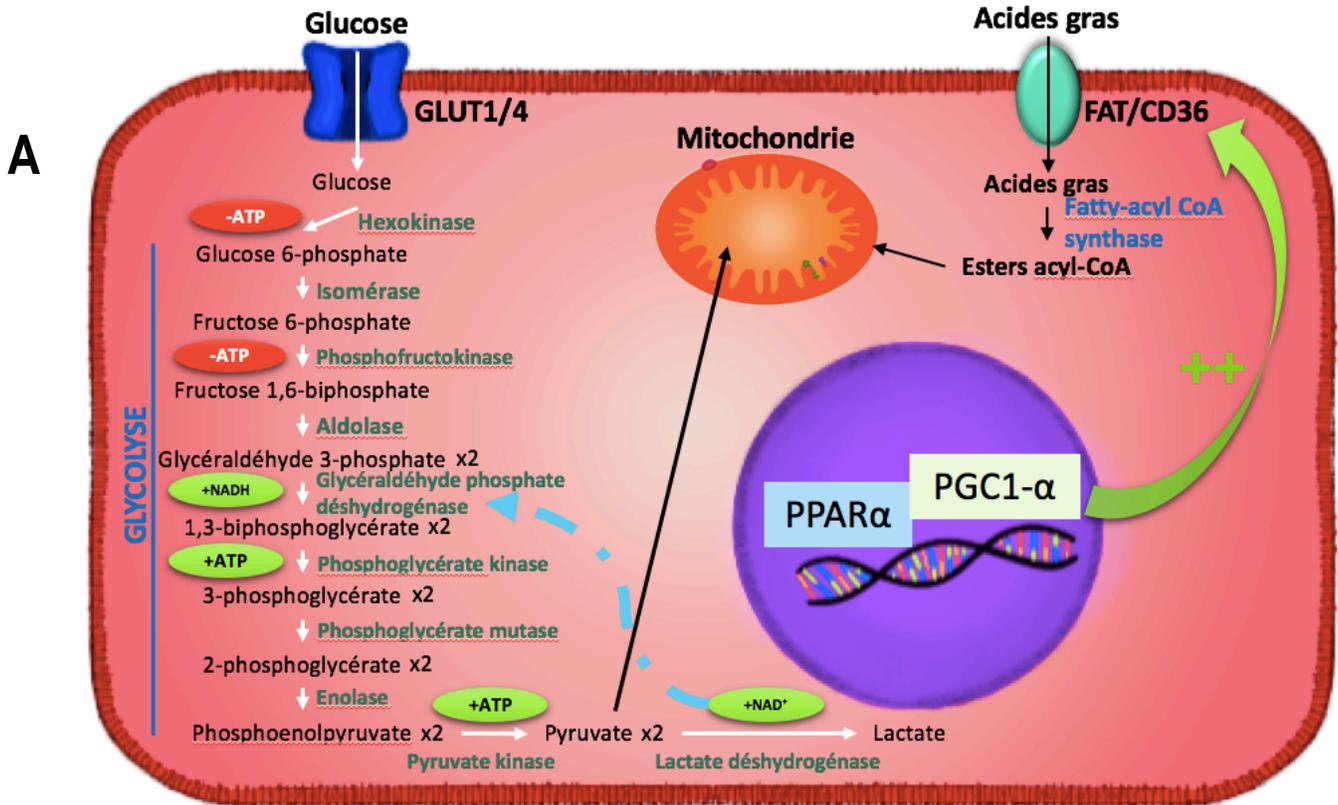
## **I.4 Métabolisme énergétique du cœur**

### **I.4.1 Voies métaboliques et substrats**

Pour assurer l'efficacité de ses contractions et permettre une perfusion systémique adéquate, le myocarde doit être approvisionné en oxygène et en nutriments en permanence et avoir un métabolisme énergétique performant. Contrairement au muscle strié squelettique qui utilise préférentiellement les glucides comme substrat énergétique, le myocarde favorise les acides gras [20]. Peu importe le substrat métabolisé par la cellule, cette dernière produit de l'adénosine triphosphate (ATP), une molécule renfermant un haut niveau d'énergie potentielle qui est utilisée lors de l'hydrolyse d'un groupement phosphate. Plus de 50% de l'ATP d'un cardiomyocyte provient de l'utilisation des acides gras grâce à la  $\beta$ -oxydation [21]. Dans un cœur en santé, l'entrée d'acides gras dans le cardiomyocyte est plus importante que celle de glucose, mais selon les conditions environnantes, le cœur s'adapte aux substrats disponibles. La  $\beta$ -oxydation, processus métabolique se déroulant dans la mitochondrie pour l'utilisation des acides gras, est plus active que la glycolyse, une chaîne de réactions enzymatiques ayant lieu dans le cytosol permettant l'utilisation du glucose. La préférence du myocarde pour les acides gras s'explique par une production d'ATP plus

importante par molécule d'acide gras que par molécule de glucose. Ainsi, 105 molécules d'ATP sont formées à partir d'une molécule d'acide palmitique alors que seulement 31 ATP sont formées avec une molécule de glucose. Néanmoins, l'utilisation d'acides gras nécessite de plus grandes quantités d'oxygène : 46 atomes d'oxygène sont nécessaires pour oxyder une molécule de palmitate, alors que le besoin n'est que de 12 pour une molécule de glucose [21]. Cela illustre l'importance d'un bon apport myocardique en oxygène et les répercussions potentielles d'une baisse de perfusion cardiaque.

Au moins 50% des acides gras entrent dans la cellule via le transporteur FAT/CD36 (Figure I.4A) [20]. L'enzyme *fatty-acyl-CoA* synthase au niveau du cytosol transforme les acides gras en esters acyl-CoA à longue chaîne. L'enzyme carnitine palmitoyl transférase 1 (CPT1) permet la fusion de l'acyl-CoA à longue chaîne à la carnitine et cet acylcarnitine est envoyé dans la mitochondrie en échange de carnitine via la carnitine-acylcarnitine translocase. Une fois dans la mitochondrie, l'enzyme carnitine palmitoyl transférase 2 (CPT2) reforme de l'acyl-CoA à longue chaîne [22]. Cette dernière molécule entre dans la  $\beta$ -oxydation où elle est métabolisée successivement par les acyl-CoA déshydrogénases (codée entre autres par le gène *Acadvl*), l'enoil-CoA hydratase (codée par *Echs1*), la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (codée par *Hadh*) et l'enzyme acétyl-CoA C-acyltransférase (codée par *Acaa2*). L'acide gras continue ce cycle d'oxydation jusqu'à ce qu'il ne lui reste que deux carbones. À chaque passage par ces quatre enzymes, il y a formation de FADH<sub>2</sub>, d'eau, de NADH et d'une molécule d'acétyl-CoA, ce qui fait perdre deux carbones à l'acide gras [21]. L'acétyl-CoA est utilisé pour le cycle de Krebs (Figure I.4B). Ce cycle se déroule dans la mitochondrie et permet la formation de NADH, FADH<sub>2</sub>, de CO<sub>2</sub> et de GTP. La dernière étape pour la production d'ATP consiste en la chaîne respiratoire (Figure I.4B). Celle-ci est constituée de quatre complexes situés dans la membrane mitochondriale interne et utilise l'énergie potentielle du NADH et du FADH<sub>2</sub> formés dans les processus métaboliques mentionnés plus haut pour pomper des protons (H<sup>+</sup>) vers l'espace intermembranaire mitochondriale, contre le gradient électrochimique de H<sup>+</sup>. Ces protons reviennent dans la matrice mitochondriale en passant par l'ATP-synthase. Grâce au gradient électrochimique, l'énergie potentielle de ces H<sup>+</sup> active la phosphorylation oxydative par l'ATP-synthase pour la formation d'ATP à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique [23]. Ainsi, d'importantes quantités d'ATP sont produites grâce au métabolisme des acides gras et à la phosphorylation oxydative.



**Figure 1.4. Schématisation du métabolisme énergétique dans le cardiomyocyte.** A : schématisation de l'entrée de glucose et d'acides gras dans le cardiomyocyte et de la glycolyse, B : schématisation d'une mitochondrie avec l'entrée de l'acylcarnitine, la  $\beta$ -oxydation, l'oxydation du pyruvate, le cycle de Krebs et l'utilisation des produits du cycle de Krebs pour la chaîne respiratoire. FAT : fatty acid translocase, ATP : adénosine triphosphate, NADH : nicotinamide adénine dinucléotide, PPAR $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ : PPAR gamma coactivator-1 $\alpha$ , CPT1/2: carnitine palmitoyltransferase 1/2, PDH: pyruvate déshydrogénase, PDK : pyruvate déshydrogénase kinase. Inspiré de *Glycolysis-2* par YassineMrabet sous licence Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glycolysis-2.gif> (consulté le 2 décembre 2018) et de *LCHAD deficiency* par Samir sous licence Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported. [https://en.wikipedia.org/wiki/File:LCHAD\\_deficiency.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:LCHAD_deficiency.jpg) (consulté le 2 décembre 2018).

Les premières étapes du métabolisme du glucose diffèrent de celui des acides gras (Figure 1.4A). Le glucose entre dans le cardiomyocyte grâce aux transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4. GLUT1 est le transporteur membranaire présent à l'état basal, peu influencé par l'insuline, alors que GLUT4 se trouve dans des vésicules intracellulaires et sa translocation peut être stimulée par la présence d'insuline ou la contraction cardiaque [24, 25]. Une fois dans le cytosol, le glucose est phosphorylé par l'enzyme hexokinase (HK), la première enzyme de la glycolyse. Le glucose phosphorylé ne peut plus sortir de la cellule et est métabolisé successivement par les différentes enzymes de la glycolyse, notamment la phosphofructokinase (PFK) et l'énolase (ENO). Le passage du glucose dans la glycolyse entraîne la formation de pyruvate, d'ATP et de NADH. Le pyruvate ainsi formé est métabolisé par deux enzymes : la lactate déshydrogénase et la pyruvate déshydrogénase (PDH). La première enzyme sera favorisée lors d'une situation d'anoxie ou d'ischémie puisqu'elle permet la formation d'ATP par la glycolyse, sans oxygène. Par contre, elle mène rapidement à une accumulation d'acide lactique toxique pour les cardiomyocytes. La PDH quant à elle forme de l'acétyl-CoA à partir du pyruvate. Comme pour l'acétyl-CoA formé grâce à la  $\beta$ -oxydation, cette molécule entre dans le cycle de Krebs pour former des produits utilisés par la chaîne respiratoire, ce qui permet la formation d'ATP par phosphorylation oxydative. Peu importe le substrat de départ, la phosphorylation oxydative forme 95% de l'ATP du cardiomyocyte, le restant provenant de l'ATP formée par la glycolyse ou du GTP produit par le cycle de Krebs [21].

## I.4.2 Mécanismes de régulation

Différents mécanismes existent pour réguler le métabolisme énergétique dans le cœur. Certains permettent une réponse immédiate à une rapide hausse dans la demande énergétique, alors que d'autres agissent à plus long terme. Il y en a aussi pour balancer l'utilisation des acides gras avec celle du glucose. Une hausse de la contractilité cardiaque stimule la translocation de FAT/CD36 à la membrane cytoplasmique pour accroître l'entrée d'acides gras dans la cellule. La hausse de contractilité augmente également la translocation de GLUT1 et surtout de GLUT4 à la membrane [26]. Ces augmentations des transporteurs d'acides gras et de glucose corroborent les observations lors d'exercice physique où il y a une augmentation de l'entrée de ces substrats énergétiques dans les cardiomyocytes [21]. L'activité de la PDH, l'enzyme permettant la transformation du pyruvate de la glycolyse en acétyl-CoA, est étroitement régulée par la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK). La PDK peut phosphoryler la PDH, ce qui l'inhibe. Cette phosphorylation inhibitrice bloque la voie métabolique du glucose. Lorsque la demande métabolique du cœur est accrue, soit lorsque les ratios acétyl-CoA/CoA et NADH/NAD<sup>+</sup> sont bas et que le pyruvate augmente, PDK est inhibée, ce qui permet une pleine activité de la PDH [27]. L'entrée des acides gras à la mitochondrie est aussi régulée par le malonyl-CoA., cette molécule inhibant CPT1 et CPT2. Le malonyl-CoA est synthétisé par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) à partir d'acétyl-CoA. La malonyl-CoA décarboxylase (MCD) permet de dégrader le malonyl-CoA. L'ACC peut être inhibée par la phosphorylation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK). Cette dernière sérine-thréonine kinase est activée lorsque le ratio AMP/ATP diminue, soit lorsque la demande énergétique est augmentée. Dans ce contexte, l'AMPK s'active et inhibe l'ACC pour éviter la formation de malonyl-CoA, ce qui résulte en une pleine activité des CPT pour maximiser l'oxydation des acides gras comme source énergétique [21].

L'équilibre entre l'utilisation des acides gras et du glucose se nomme le Cycle de Randle [21, 28]. Le myocarde favorise l'entrée d'acides gras dans le cardiomyocyte, ce qui entraîne une hausse de leur oxydation, mais aussi une baisse du métabolisme du glucose par une réduction de l'activité de la PDH, cette dernière étant inhibée par la PDK et par la hausse de l'acétyl-CoA provenant de la  $\beta$ -oxydation. Une diminution de l'entrée du glucose est aussi observée et la PFK est inhibée par le citrate produit par le cycle de Krebs alimenté par l'acétyl-CoA de la  $\beta$ -oxydation. Lorsque la demande énergétique augmente, les acides

gras n'ont plus d'effet inhibiteur sur l'utilisation du glucose et ce découplage dans l'utilisation des deux substrats énergétiques serait médié par l'AMPK pour optimiser la formation d'ATP à partir de glucose et d'acides gras [28].

Un acteur important dans la régulation à plus long terme du métabolisme des acides gras au cœur est le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ). Les ligands de ce récepteur sont des acides gras et lorsque la disponibilité de ces derniers est augmentée, ils lient et activent PPAR $\alpha$  qui agit alors comme un facteur de transcription et favorise sa translocation vers le noyau. PPAR $\alpha$  s'hétérodimérise avec RXR (Retinoid X receptor, un autre récepteur nucléaire) [29] et recrute son co-activateur PGC-1 $\alpha$  [30], ce qui encourage la fixation du complexe à un PPRE (peroxisome proliferator hormone response elements). Ce PPRE se trouve à proximité d'une séquence promotrice d'un gène cible de PPAR $\alpha$  et la liaison du dimère encourage la transcription du gène cible. Les gènes régulés par PPAR $\alpha$  sont, entre autres, *Fat/Cd36*, *Cpt1*, *Acaa2*, *Acadvl*, *Acadl*, *Mcad* (ces quatre derniers codant pour les enzymes du de la  $\beta$ -oxydation), *Mcd* (codant pour la malonyl-CoA décarboxylase) et *Pdk4* [31]. Une augmentation de l'expression de ces gènes, en se répercutant sur les niveaux protéiques de ces enzymes, pourrait augmenter l'entrée d'acides gras dans le cardiomyocyte, augmenter la  $\beta$ -oxydation et diminuer l'utilisation du glucose (via la PDK). PGC-1 $\alpha$  est aussi un co-activateur du facteur de transcription Nuclear Respiratory Factor 1 (NRF-1) qui active la transcription de régulateurs de l'expression génétique mitochondriale, de médiateurs de la biogenèse de ces organelles et de gènes assurant la phosphorylation oxydative. PGC-1 $\alpha$  augmenterait d'ailleurs lors de l'entraînement physique pour assurer l'efficacité du métabolisme énergétique mitochondrial [30].

## **I.5 Hypertrophie cardiaque**

### **I.5.1 Mécanismes de compensation au stress myocardique**

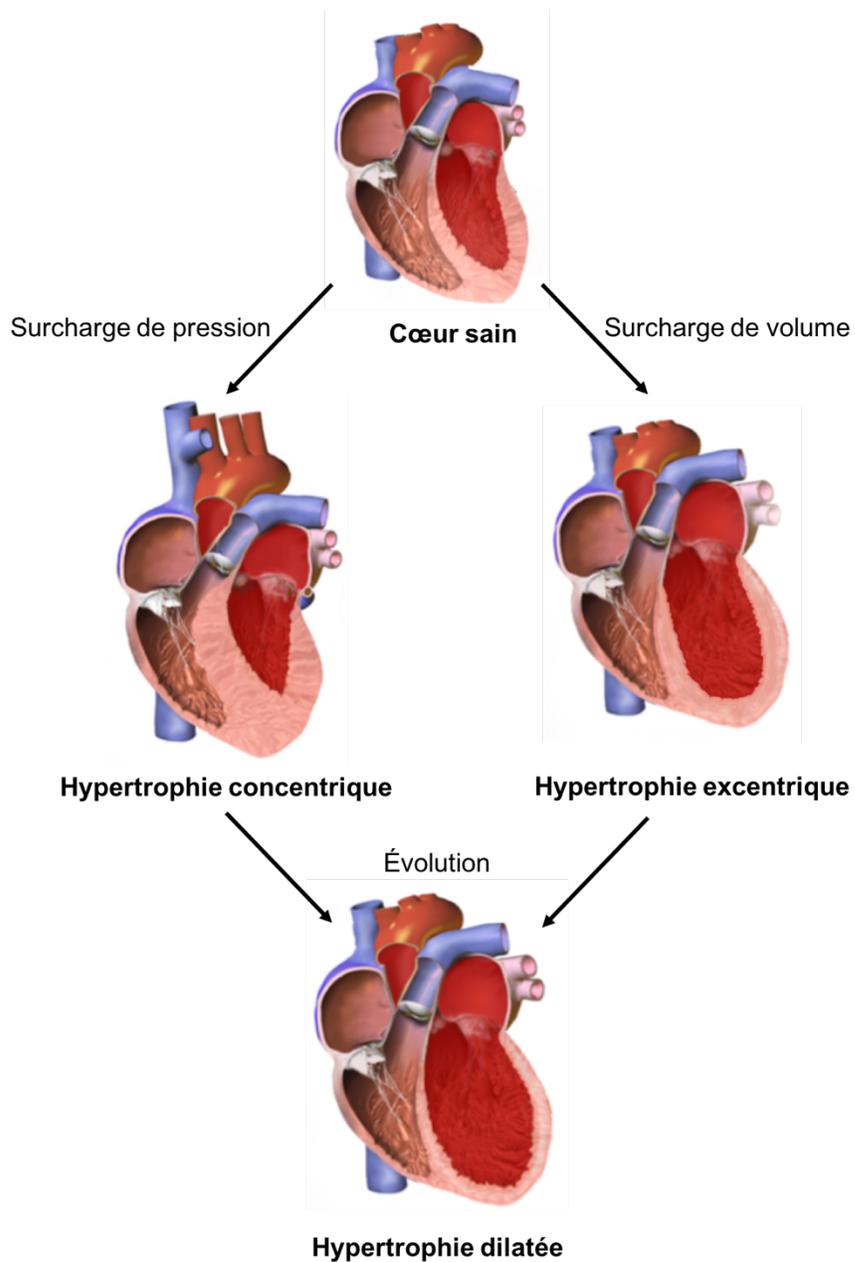
Lorsqu'un cœur sain est soumis à une augmentation de pré- ou de post-charge de manière aiguë, soit rapidement et sur une courte période de temps, il peut répondre à ce « stress » en augmentant sa fréquence cardiaque et sa contractilité [10]. Lorsque le stress perdure, le cœur déclenche des mécanismes d'adaptation à plus long terme, ce qui aboutit

bien souvent en l'hypertrophie cardiaque (HC). L'HC consiste en un grossissement du cœur qui se veut initialement une réponse adaptée et compensatrice à une surcharge hémodynamique au cœur. Ce remodelage a des répercussions morphologiques grossières sur les diamètres des cavités cardiaques et de l'épaisseur des parois. Ces changements sont associés à des modifications cellulaires qui influencent la taille des cardiomyocytes, leur métabolisme énergétique et leur expression génétique. La majorité des cardiomyocytes adultes sont dans la phase post-mitotique du cycle cellulaire et ne peuvent donc plus se diviser. L'hyperplasie des cardiomyocytes est habituellement un phénomène minime, quoique certaines études lui accordent une certaine importance en conditions pathologiques [10]. L'hypertrophie des cardiomyocytes, soit l'augmentation de leur volume cellulaire, est souvent le principal mécanisme responsable du gain de masse du cœur. Des changements de la matrice extracellulaire, soit la structure de tissu conjonctif entourant les cardiomyocytes, peuvent aussi survenir lors d'HC. Ces changements sont médiés par les fibroblastes cardiaques qui synthétisent différentes protéines structurales comme le collagène ou la fibronectine [32]. L'HC peut être enclenchée par des stress physiologiques, comme l'entraînement physique d'endurance ou la grossesse [33], ou par des stress pathologiques, comme une perte de muscle cardiaque après un infarctus, l'hypertension artérielle non contrôlée ou un dysfonctionnement d'une valve cardiaque. L'HC de cause physiologique est habituellement réversible et n'entraîne pas de changement permanent dans la matrice extracellulaire ou de perte de fonction cardiaque, contrairement à l'HC d'origine pathologique. Dans ce dernier type d'HC, elle est souvent irréversible à long terme (selon le mécanisme causal) et entraîne fréquemment une perte de fonction cardiaque, deux caractéristiques qui s'expliquent par des changements cellulaires devenant non compensateurs et néfastes au long cours [34].

On distingue deux types de surcharge à l'origine de l'HC : la surcharge de pression et la surcharge de volume. La surcharge de pression consiste en une augmentation de la post-charge cardiaque. Le cœur doit alors générer des pressions de plus en plus importantes pour vaincre la résistance à l'éjection du sang. L'hypertrophie est surtout de forme « concentrique », où il y a un épaississement des parois cavitaires se faisant aux dépens d'un rétrécissement des diamètres internes ventriculaires (Figure 1.5) [35]. Les sarcomères s'additionnent en parallèle pour pouvoir générer d'importantes forces, ce qui explique l'épaississement des parois [34]. Pour la surcharge de volume, elle se produit lorsqu'il y a une augmentation de la pré-charge cardiaque, soit une augmentation du volume

sanguin arrivant dans la cavité cardiaque. Le cœur doit augmenter sa « compliance », sa réceptivité à recevoir d'importants volumes sanguins. Les cavités cardiaques touchées s'hypertrophient de manière excentrée, ce qui occasionne une augmentation des diamètres des cavités et une augmentation proportionnelle de l'épaisseur des parois (Figure I.5) [35]. Dans les cas plus sévères d'HC, une dilatation survient, c'est-à-dire qu'en plus de l'augmentation des diamètres internes des cavités, il y a un amincissement des parois. En surcharge de volume, les sarcomères s'additionnent en série, soit « bout à bout », pour permettre une élongation des cardiomyocytes et éventuellement, une augmentation du volume de la cavité cardiaque [34].

Ces deux patrons hypertrophiques sont influencés par la **loi de Laplace** qui stipule que le stress pariétal systolique est directement proportionnel au rayon de la cavité cardiaque et à la pression exercée sur les parois et inversement proportionnel à l'épaisseur des parois [10]. Un stress pariétal systolique élevé peut induire des changements cellulaires néfastes au long cours, comme en stimulant l'apoptose, la mort cellulaire programmée. Il s'en suit un cercle vicieux de réduction du nombre de cardiomyocytes et de stress pariétal moins bien compensé menant à une perte de fonction. L'HC permet donc de normaliser le stress pariétal. En surcharge de pression, la force exercée perpendiculairement sur les parois ventriculaires est élevée. L'augmentation de l'épaisseur des parois permet de réduire le stress pariétal au ventricule. Une surcharge de volume s'accompagne néanmoins d'une augmentation du rayon cavitaire. Si cette augmentation de rayon n'est pas contrée par un épaississement proportionnel des parois (comme dans les formes d'HC dilatée plutôt qu'excentrée), le myocarde est soumis à un stress pariétal important menaçant éventuellement sa fonction [34].



**Figure 1.5. Remodelage ventriculaire hypertrophique en réponse à une surcharge hémodynamique**, adaptée de : Major categories of cardiomyopathy par Npatchett et Bruce Blaus sous licence Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International.

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Major\\_categories\\_of\\_cardiomyopathy.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Major_categories_of_cardiomyopathy.png) (consultée le 16 novembre 2018) et de Progression of Cardiomyopathy par BruceBlaus sous licence Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International.

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Progression\\_of\\_Cardiomyopathy.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Progression_of_Cardiomyopathy.png) (consultée le 16 novembre 2018).

## I.5.2 Étiologies de l'hypertrophie cardiaque pathologique

Différents processus pathologiques peuvent induire une HC. Les principaux sont d'origine ischémique, hypertensive, valvulaire ou génétique. L'HC de cause ischémique se développe après un infarctus du myocarde. La perte de cardiomyocytes induit alors un remodelage du myocarde puisque moins de cardiomyocytes sont disponibles pour générer une force contractile adéquate, ce qui constitue une augmentation de la pré-charge. L'HC se développe donc de manière dilatée et mène fréquemment à une perte de fonction cardiaque [36].

Une autre cause d'HC est l'hypertension artérielle (HTA) qui augmente la post-charge du VG, causant une surcharge de pression. Malgré cette post-charge accrue, des patrons hypertrophiques concentriques et excentriques sont possibles en raison de certaines comorbidités (obésité et diabète par exemple), de l'origine ethnique et des durées et sévérités de l'HTA qui influencent le remodelage ventriculaire. Selon l'étude de Framingham, le patron hypertrophique serait généralement concentrique chez les femmes lors de l'HTA, alors qu'une forme dilatée se développerait chez les hommes [37]. À l'inverse, soulignons qu'une revue de littérature plus récente a montré une légère tendance ( $p = 0,13$ ) vers une hypertrophie excentrée plus fréquente chez les femmes que chez les hommes [38].

Les cardiomyopathies hypertrophiques et dilatées sont causées par des anomalies génétiques menant à la dysfonction de certaines protéines qui entraînent un remodelage cardiaque. Des anomalies dans les gènes codant pour la myosine, la titine, les troponines ou l'actine en sont des exemples. Certaines mènent à une HC concentrique, alors que d'autres mènent vers une HC dilatée [39].

Les valves cardiaques, lorsqu'elles deviennent trop rigides ou fuient, sont d'autres causes de surcharge de pression ou de volume. Les pathologies valvulaires induisent un remodelage cardiaque lorsqu'elles ne sont pas traitées par remplacement valvulaire chirurgical ou percutané. Une sténose de la valve aortique (SA) crée une augmentation de la post-charge. Le VG doit générer une importante force pour ouvrir une valve aortique devenue rigide et dont la lumière est rétrécie [35]. La SA est la pathologie valvulaire la plus fréquente dans les pays occidentaux [40]. L'insuffisance mitrale (IM) occasionne une

augmentation de la pré-charge au VG. En systole, le VG éjecte du sang vers l'aorte, mais aussi vers l'OG, ce qui augmente le volume sanguin arrivant depuis l'OG lors de la diastole [41]. La régurgitation aortique (AR, aussi appelée insuffisance aortique) quant à elle induit une surcharge de volume au VG, en plus d'une légère augmentation de la post-charge. L'AR consiste en une fuite de la valve aortique, ce qui occasionne un retour de sang dans le VG depuis l'aorte lors de la diastole. Cette pathologie entraîne d'importants volumes sanguins dans le VG puisque celui-ci doit accommoder le sang revenant de l'aorte, en plus du sang arrivant depuis l'OG [35, 42]. La hausse de la post-charge en AR est induite par l'augmentation du volume sanguin à éjecter en systole au travers d'un seul orifice, la valve aortique (en comparaison avec l'IM où la surcharge sanguine est éjectée vers l'aorte et l'OG) [43]. Les valves du cœur droit sont plus rarement touchées, mais leur anomalie peut aussi entraîner un remodelage du ventricule droit (VD). Les mêmes mécanismes qu'au cœur gauche s'appliquent; une sténose de la valve pulmonaire (SP) occasionne une augmentation de la post-charge du VD, alors qu'une insuffisance de la valve tricuspide (IT) entraîne une augmentation de la pré-charge du VD. La SP est habituellement secondaire à une malformation congénitale. L'IT est plutôt secondaire à la dilatation du VD qui survient lors de maladies pulmonaires augmentant la post-charge [41]. Plus rarement, la SP et l'IT se développent lors de la maladie cardiaque carcinoïde [41]. Cela survient lorsqu'une tumeur carcinoïde hors du cœur sécrète certains facteurs de croissance qui favorisent la formation de plaques carcinoïdes sur les valves du cœur droit et nuisent à leur bon fonctionnement [44].

Les maladies valvulaires touchent 2,5% de la population américaine, mais les taux peuvent atteindre 13,3% chez les plus de 75 ans [1]. Dans les pays occidentaux, la AR est surtout d'origine dégénérative, lorsqu'avec l'âge, la valve perd ses propriétés de souplesse ou d'étanchéité [1]. Cette étiologie dégénérative était auparavant aussi considérée comme la principale cause de la SA. Des études récentes ont montré que cette pathologie n'est pas seulement d'origine dégénérative. Le développement de la SA serait encouragé par la présence d'un syndrome métabolique (HTA, diabète, dyslipidémie), des facteurs génétiques et d'un âge avancé. Il y aurait une inflammation chronique de la valve, comparable à celle lors d'athérosclérose, qui entraînerait la calcification de celle-ci [45, 46]. La bicuspidie aortique, une valve aortique ne comportant que deux feuillets, est aussi un facteur prédisposant aux maladies de la valve aortique. Dans les pays en voie de développement, ce sont les complications du rhumatisme articulaire aigu (RAA) qui causent les maladies

valvulaires. Le RAA est une complication inflammatoire d'une infection streptococcique  $\beta$ -hémolytique du groupe A qui peut survenir après l'infection initiale si aucun traitement antibiotique n'est donné. Près de 60% des infections par ce pathogène non traitées peuvent entraîner des complications cardiaques [47], notamment la sténose mitrale, l'AR et dans une moindre mesure, la sténose tricuspidiennne [41]. L'atteinte cardiaque secondaire au RAA toucherait plus de 15 millions de personnes dans le monde [48]. Selon l'Euro Heart Survey, une étude épidémiologique du début des années 2000 sur les maladies valvulaires dans la population européenne, l'AR représente 15% des maladies valvulaires chez les hommes, alors que ce taux n'est que de 5,5% chez les femmes [47]. Cette maladie valvulaire survient aussi au moins dix ans plus tôt que la SA [40]. De plus, l'augmentation de l'utilisation du remplacement percutané de la valve aortique (TAVI) a amené une hausse d'incidence de la AR. En effet, une des complications du TAVI est la régurgitation de la valve aortique, notamment lorsqu'il y a un mauvais déploiement ou un déplacement de la nouvelle valve, ce qui occasionne une fuite para-valvulaire [49]. On estime que l'incidence d'une AR modérée à sévère post-TAVI pourrait atteindre 11,7% et augmenterait significativement la mortalité après 30 jours et même un an [50].

### 1.5.3 Physiopathologie de l'hypertrophie cardiaque pathologique

#### *1.5.3.1 Activation de mécanismes compensateurs et voies de signalisation*

Le stress myocardique active différents mécanismes cellulaires et moléculaires qui mènent au développement de l'HC. C'est une réponse dynamique évoluant dans le temps, selon la durée et la nature du stress. Ces mécanismes se veulent d'abord compensatoires pour répondre à la surcharge, mais leur activation chronique peut mener à des changements néfastes pour la fonction cardiaque. La réponse aiguë se fait par modification protéique, alors que la réponse chronique implique des changements d'expression génétique. Les mécanismes activés comprennent ceux de croissance cellulaire et de survie, mais aussi ceux de fibrose et d'apoptose lorsque l'adaptation est compromise [51]. Lors du stress cardiaque, des stimuli physiques et biochimiques activent divers récepteurs cellulaires et réseaux intracellulaires ayant des répercussions pro et anti-hypertrophiques. Ces principaux médiateurs sont le système adrénergique avec les catécholamines, le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), l'endothéline et les peptides natriurétiques. Le stress mécanique peut aussi être perçu par l'étirement des cardiomyocytes et les récepteurs

responsables de l'adhérence. La nature de l'HC résulte donc de l'interaction de ces différents mécanismes.

#### *1.5.3.1.1 Activation du système adrénérgique*

La surcharge myocardique induit une diminution de la perfusion systémique qui active le système nerveux sympathique. La stimulation adrénérgique se veut compensatoire pour augmenter la fréquence cardiaque et la contractilité et améliorer la perfusion. Il y a libération de noradrénaline (NA) par les neurones adrénérgiques, en plus d'une sécrétion d'adrénaline aux surrénales. Ces catécholamines agissent via les récepteurs  $\alpha$  ou  $\beta$  adrénérgiques, des récepteurs membranaires couplés à une protéine G (GPCR). Au myocarde, l'activation des récepteurs  $\beta_1$  permet d'augmenter la fréquence cardiaque et la contractilité, alors que les  $\alpha_1$  induisent une vasoconstriction périphérique [52]. La protéine G est constituée des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  et est liée au récepteur à son extrémité intracellulaire. La sous-unité  $\alpha$ , lorsqu'associée au récepteur, est liée à un guanosine diphosphate (GDP) et après la liaison du ligand à son récepteur, le changement de conformation provoque l'échange du GDP pour du guanosine triphosphate (GTP) au niveau de la sous-unité  $\alpha$ . Cette dernière se dissocie des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  pour la transmission du signal. Le type de sous-unité  $\alpha$  influence la nature du signal; la protéine  $G_{\alpha s}$  permet la formation d'AMPc par l'adénylate cyclase, la  $G_{\alpha i}$  inhibe l'adénylate cyclase et la  $G_{\alpha q/11}$  active la phospholipase C (PLC) par exemple [23]. Les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénérgiques sont associés avec l'isoforme  $G_{\alpha q}$ , les  $\beta_1$ -adrénérgiques avec la  $G_{\alpha s}$  et les  $\beta_2$ -adrénérgiques la  $G_{\alpha i}$  et la  $G_{\alpha s}$ . Physiologiquement, le myocarde contient majoritairement des récepteurs  $\beta_1$ -adrénérgiques et une minorité de  $\beta_2$ -adrénérgiques et d' $\alpha_1$ -adrénérgiques, mais ces proportions changent lors d'états pathologiques [52]. L'AMPc formée active entre autres la PKA alors que la PLC hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (4,5-PIP<sub>2</sub>) de la membrane plasmique pour former de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et du 1,2-diacylglycérol (DAG) [53]. Les effets de l'activation de la PKA et de la formation des seconds messagers IP<sub>3</sub> et DAG concernent principalement le métabolisme du calcium et l'activation de kinases et leurs rôles dans le développement de l'HC seront abordés plus loin.

#### *1.5.3.1.2 Activation du système rénine-angiotensine-aldostérone*

L'angiotensine II (AngII) est une molécule jouant un rôle important dans le développement de l'HC. Sa synthèse découle du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). La diminution de la perfusion rénale et l'activation du système nerveux sympathique activent le SRAA. Les cellules juxtaglomérulaires du rein répondent à ce changement hémodynamique par la sécrétion de rénine, une protéase. L'angiotensinogène est sécrétée par le foie et la rénine transforme cette molécule en angiotensine I. L'AngII est ensuite formée à partir d'angiotensine I grâce à l'enzyme de conversion de l'angiotensine qui est exprimée dans divers tissus, dont le myocarde [54]. En aigu, l'AngII augmente la contractilité cardiaque, mais de manière chronique, l'AngII encourage le remodelage du cœur en surcharge [52]. L'AngII stimule aussi la libération d'aldostérone par les surrénales, ce qui entraîne une réabsorption sodique pour augmenter le volume circulant et ainsi assurer la perfusion systémique. Au long cours, l'aldostérone induit une HC, une activité accrue des fibroblastes cardiaques et de l'inflammation au cœur [55]. Comme pour les catécholamines, les récepteurs à l'AngII sont des GPCR, AT1 et AT2. AT1 est majoritairement présent au niveau vasculaire et dans une moindre mesure au myocarde. AT2 est plutôt présent dans le cœur. C'est néanmoins AT1 qui stimule la croissance cellulaire menant à l'HC, en plus d'induire une vasoconstriction en périphérie [56]. AT2 favoriserait des effets inverses [57]. Le type de protéine G des récepteurs à l'AngII est  $G_{\alpha q/11}$ , ce qui induit une production de DAG et d'IP<sub>3</sub>.

L'activation du SRAA et la libération accrue de NA par le système adrénergique stimulent la sécrétion d'endothéline par les cellules endothéliales et dans une moindre mesure par les cardiomyocytes [52]. L'endothéline lie un GPCR, ce qui induit la formation de DAG et d'IP<sub>3</sub>. Elle permet une vasoconstriction et une meilleure contractilité en aigu, mais stimule aussi l'HC, l'inflammation et la fibrose de manière chronique [58].

#### *1.5.3.1.3 Sécrétion des facteurs natriurétiques*

À l'inverse du système sympathique et du SRAA, les facteurs natriurétiques ont des effets antihypertrophiques sur le myocarde. Le facteur natriurétique de l'oreillette (ANP) est majoritairement synthétisé par cette cavité, alors que les ventricules synthétisent majoritairement le facteur natriurétique du cerveau (BNP). Ces deux molécules sont les

facteurs natriurétiques les plus étudiés sur le myocarde. Leur sécrétion est stimulée par un stress mécanique d'augmentation de la tension sur les parois cardiaques, mais aussi par des signaux biochimiques tels que l'AngII et l'endothéline [54]. Les récepteurs de l'ANP et du BNP, Natriuretic peptide receptors-A/B (NPR-A et NPR-B), sont des récepteurs guanylate cyclase [10]. La liaison de ces récepteurs active son activité enzymatique guanylate cyclase pour la formation de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) qui agit comme second messager. Selon la cellule cible, l'ANP et le BNP inhibent les effets prohypertrophiques du SRAA, inhibent la fibrose, améliorent la relaxation myocardique, stimulent une vasorelaxation, augmentent la natriurèse et pourraient être bénéfiques pour le métabolisme énergétique [52, 59]. Ces facteurs ne sont toutefois pas assez puissants pour inhiber entièrement l'HC, du moins au long cours.

#### *1.5.3.1.4 Activation des voies dépendantes du calcium*

La PKA et l'IP<sub>3</sub> présentés dans les paragraphes précédents influencent l'homéostasie du calcium. À court terme, comme mentionné dans les paragraphes sur le calcium et la contractilité cardiaque, la PKA peut phosphoryler les LTCC pour augmenter les probabilités qu'ils s'ouvrent lors de la dépolarisation et le phospholamban pour permettre une pleine fonction de SERCA [52]. La PKA peut aussi phosphoryler certaines fibres contractiles pour diminuer leur sensibilité au calcium et permettre une meilleure relaxation, mais aussi pour accroître la force contractile [52, 60]. Le tout entraîne en une meilleure fonction diastolique et en d'importantes variations calciques pour la systole. Globalement, l'activation de la PKA augmente localement le Ca<sup>2+</sup> cytoplasmique. Lors de l'HC pathologique, il y a des altérations dans la signalisation β-adrénergique, ce qui se répercute sur la PKA et son contrôle du Ca<sup>2+</sup> [52]. Certaines études ont montré que PKA peut phosphoryler RyR2, ce qui causerait des fuites de Ca<sup>2+</sup> depuis le réticulum sarcoplasmique en diastole [61] et qui pourrait contribuer à l'activation de voies pro-hypertrophiques.

L'IP<sub>3</sub> induit une augmentation du Ca<sup>2+</sup> cytoplasmique. Au cœur, l'IP<sub>3</sub> peut se lier aux RyR2 pour une sortie du Ca<sup>2+</sup> depuis le réticulum sarcoplasmique [53]. Lors d'une augmentation cytoplasmique en Ca<sup>2+</sup>, l'IP<sub>3</sub> peut aussi se lier à ses récepteurs (IP3R) se trouvant près de la membrane nucléaire pour stimuler une hausse de Ca<sup>2+</sup> au noyau. Les récepteurs à l'IP<sub>3</sub> périnucléaires sont d'ailleurs augmentés lors d'HC [62]. La hausse de Ca<sup>2+</sup> localisée près du noyau active la kinase dépendante de la calmoduline II (CaMKII) et la

calcineurine, deux protéines influençant à la hausse la transcription de gènes pro-hypertrophiques [53, 63].

Une perturbation dans l'homéostasie du calcium intracellulaire active des mécanismes de remodelage cardiaque. Le  $\text{Ca}^{2+}$  stimule une sérine-thréonine phosphatase, la calmoduline, en s'y liant. Ce complexe est un médiateur de l'HC selon deux mécanismes : en activant la kinase dépendante de la calmoduline II (CaMKII) ou en activant la calcineurine. CaMKII est une kinase pouvant phosphoryler HDAC4, une histone désacétylase. Les HDAC, lorsque présentes au noyau sous forme déphosphorylée, permettent un repliement de l'ADN par désacétylation des histones. La forme compacte de l'ADN bloque la transcription génique. Les HDAC se divisent en deux classes : la classe I a des effets pro-hypertrophiques (HDAC 1, 2, 3, 8) contrairement à la classe II (HDAC 4, 5, 7, 6, 9 et 10) qui est antihypertrophique [64]. Lorsqu'HDAC4, une HDAC de classe II, est phosphorylée par CaMKII, elle sort du noyau et n'exerce plus son inhibition de l'expression de gènes pro-hypertrophiques [65]. La phosphorylation des HDAC de classe II induit donc une activation des gènes hypertrophiques. Parmi les gènes normalement inhibés par les HDAC de classe II se trouve le Myocyte enhancer factor 2c (Mef2c). MEF2c est un facteur de transcription important dans l'HC. Selon un modèle animal de surcharge de pression, il permettrait la transcription de gènes normalement moins exprimés dans un cœur en santé, notamment des gènes foétaux, fibrotiques et du métabolisme énergétique [66]. La calcineurine est une phosphatase qui peut aussi être activée par le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline [67]. Elle permet la déphosphorylation de NFAT au noyau. NFAT, *nuclear factor of activated T-cells*, permet l'expression de gènes pro-hypertrophiques lorsqu'il n'est pas phosphorylé, sa phosphorylation provoquant sa sortie du noyau. En perdant son groupement phosphate grâce à la calcineurine, il migre au noyau, s'associe à d'autres facteurs de transcription tels que MEF2c et active la transcription [33, 68].

Finalement, un autre effet délétère d'une mauvaise homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  est au niveau des mitochondries lorsque le calcium intra-mitochondrial est assez abondant pour diminuer la synthèse d'ATP et même activer les mécanismes d'apoptose. Une hausse transitoire du  $\text{Ca}^{2+}$  intra-mitochondrial permet d'augmenter l'efficacité de la production énergétique, alors que l'inverse est observé lors d'états pathologiques où l'homéostasie du calcium est perturbée [12]. La diminution de la synthèse d'ATP serait attribuable à un découplage de la phosphorylation oxydative; les protons pompés dans l'espace inter-

membranaire grâce à la chaîne respiratoire ne servent plus à la formation d'ATP grâce à l'ATP-synthase, mais à faire entrer le  $\text{Ca}^{2+}$  [12]. Pour l'apoptose, mort cellulaire programmée, la surcharge de  $\text{Ca}^{2+}$  aux mitochondries induirait l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial, ce qui provoquerait la libération du cytochrome C. Cette protéine active ensuite une cascade de protéases toxiques pour les constituants cellulaires, ce qui résulte en la mort contrôlée de la cellule [69].

#### *1.5.3.1.5 Activation des protéines kinases C et D*

L'activation d'un récepteur lié à une protéine  $\text{G}\alpha\text{q}/11$  (par l'angiotensine II, l'endothéline ou un agoniste  $\alpha_1$ -adrénergique) induit une hausse du calcium cytosolique via  $\text{IP}_3$ , ce qui encourage la protéine kinase C (PKC), une sérine-thréonine kinase, à se déplacer à la membrane cellulaire et à interagir avec le DAG [23]. L'activation de la PKC contribuerait à l'HC. Des souris génétiquement modifiées surexprimant PKC développent une HC en comparaison aux animaux contrôles [70, 71]. Selon Braz *et al.*, cette HC induite par la PKC s'expliquerait en partie par une activation de la voie de ERK1/2 [71], un intermédiaire de la signalisation cellulaire qui sera abordé plus loin. Les changements hypertrophiques induits par la PKC pourraient aussi être dépendants des HDAC via la protéine kinase D (PKD) [64]. La PKD, une sérine-thréonine kinase, peut être phosphorylée par la PKC et joue un rôle dans le métabolisme énergétique et la prolifération cellulaire [24, 72]. PKD1, l'isoforme la plus exprimée au cœur, peut phosphoryler HDAC5, ce qui retire l'inhibition d'HDAC5 sur le facteur de transcription MEF2 et provoque la transcription de gènes fœtaux et hypertrophiques [24]. D'ailleurs, l'activation de PKD en HC est elle-même une marque de la réactivation de gènes fœtaux, puisqu'il y en a normalement peu dans un cœur adulte sain [72]. Dans un modèle de souris génétiquement modifiées, PKD1 constitutionnellement actif mènerait à une hypertrophie myocytaire et une dilatation cardiaque [73].

#### *1.5.3.1.6 Perception du stress mécanique*

Le stress mécanique sur les parois cardiaques est un stimulus pro-hypertrophique qui peut agir en synergie avec les mécanismes humoraux présentés plus haut. Différentes protéines impliquées dans le cytosquelette et dans les interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules jouent un rôle dans le développement de l'HC. La *Focal adhesion kinase* (FAK) joue un rôle important dans la perception de l'étirement des

cardiomyocytes et influence la prolifération, la survie et la migration cellulaire [74]. Elle se trouve majoritairement près des bandes A des sarcomères, mais peut se déplacer aux disques Z ou au noyau lorsqu'activée [74]. FAK est influencée par les intégrines. Les intégrines sont des récepteurs cellulaires interagissant avec la matrice extracellulaire. Un changement de conformation entre les intégrines et la matrice extracellulaire se répercute jusqu'au complexe focal d'adhérence et permet une autophosphorylation de FAK pour l'activer. FAK est notamment activée par un stress d'étirement passif, comme lorsque la pression diastolique augmente [75]. FAK serait surtout activée dans les cardiomyocytes dont l'axe est perpendiculaire à l'orientation du stress [76]. FAK permettrait donc d'orienter la direction du stress mécanique. Un modèle de souris surexprimant FAK développe une HC basale par épaissement des cardiomyocytes et cela se ferait via la voie de PI3K-AKT-mTORC1-S6k-S6 (une voie qui sera abordée plus bas) [77]. À l'inverse, des souris n'exprimant pas FAK aux cardiomyocytes, lorsque soumises à une surcharge de pression, développent une HC excentrée avec fibrose et expression de marqueurs pro-hypertrophiques [78]. Ce profil d'HC moins bien compensée en absence de FAK n'est toutefois pas confirmé par d'autres études où l'absence d'expression de FAK est associée à une inhibition de l'HC sans perte de fonction cardiaque ou sans expression de marqueurs pro-hypertrophiques [74]. FAK pourrait aussi activer la voie pro-hypertrophique de ERK1/2 [75]. Lorsque FAK migre au noyau, elle interagirait notamment avec p53, une protéine anti-oncogène pour inhiber son activité et accroître la survie cellulaire [74]. FAK pourrait même avoir des répercussions métaboliques en interagissant avec PGC-1 $\alpha$ , un important intermédiaire dans la biogenèse mitochondriale et la régulation du métabolisme énergétique [74].

En plus de la dynamique aux complexes focaux d'adhérence, le récepteur à l'angiotensine II de type 1 (AT<sub>1</sub>R) peut être activé par l'étirement du cardiomyocyte, en l'absence même de son ligand [79]. Cette activation ouvre des canaux cationiques *Transient receptor potential channels* (TRPC), ce qui permet l'entrée de Ca<sup>2+</sup> dans la cellule et l'activation de la voie pro-hypertrophique calcineurine-NFAT [80]. La suppression de l'expression de *Trpc1* montre une inhibition de l'HC et une préservation de la fonction cardiaque lors d'une surcharge de pression pour huit semaines chez la souris, en comparaison avec les contrôles *Wild type* [80]. Ces TRPC seraient aussi plus exprimés lors de l'HC pathologique [80].

#### 1.5.3.1.7 Activation des voies de MAP kinases

Les voies des MAP kinases (Mitogen-activated protein kinase) sont des voies de signalisation majeure dans le développement de l'HC puisqu'elle régule la croissance cellulaire. De nombreux stimuli peuvent les activer, que ce soit la liaison d'un GPCR par l'angiotensine II ou un agoniste adrénergique, d'un récepteur tyrosine kinase par un facteur de croissance ou la perception d'étirement. Selon le stimulus initial, après une cascade de phosphorylation par des sérines-thréonines kinases, il y a phosphorylation et activation de trois principaux intermédiaires: ERK1/2, p38 et JNK [68]. ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) a des effets généralement pro-hypertrophiques en augmentant les masses cardiaques, alors que p38 et JNK (c-Jun N-terminal kinase) sont aussi activés lors d'un stress cardiaque, mais leur impact sur l'HC est encore nébuleux [64]. Selon des études sur des souris surexprimant ou *knock-out* pour p38, JNK ou des kinases en amont de la voie des MAPK, p38 et JNK réguleraient à la baisse le gain de masse cardiaque et joueraient un rôle dans la fibrose et la perte de fonction cardiaque en situation pro-hypertrophique. Notons cependant que certaines études en arrivent à des résultats inverses, ce qui empêche de tirer des conclusions claires sur les effets de ces deux kinases, celles-ci étant probablement influencées par la nature du stress cardiaque et le modèle utilisé [33]. ERK1/2 peut stimuler l'HC en stimulant l'activité de l'AP-1, un co-activateur de NFAT, en plus de phosphoryler NFAT à son extrémité C-terminale [81]. Cette phosphorylation activatrice est en dehors du domaine de régulation de NFAT, ce qui explique qu'elle ne soit pas inhibitrice. À l'inverse, en réponse à un stress physique ou biochimique, p38 et JNK ont des effets antihypertrophiques en phosphorylant NFAT à son domaine de régulation, ce qui inhibe son activité et bloque en partie les effets de la calcineurine. Dans un modèle de souris modifiées génétiquement, les souris *knock-out* pour JNK1 ou JNK2 développent plus d'HC que les contrôles. Par contre, l'activation de JNK ne parvient pas à entièrement inhiber les effets pro-hypertrophiques de la calcineurine [82]. De plus, l'activation de JNK pourrait mener à un remodelage inapproprié du cœur, nuisant à sa fonction. Dans un modèle de souris ayant MKK7 constitutionnellement active, une kinase en amont de JNK, il y aurait une perte de fonction cardiaque sans HC [64]. Dans un même ordre d'idée, les MKK3/6 peuvent activer p38 et lorsqu'elles sont constitutionnellement actives, une perte de fonction cardiaque sans HC se produit, le tout étant associé à une fibrose myocardique et un amincissement des parois [83]. La provocation chirurgicale d'une régurgitation aortique chez le rat diminue les niveaux de p38 et JNK activés dans les

quelques jours suivants la chirurgie. Une réaugmentation de l'activation de ces protéines pourrait peut-être expliquer la transition vers une forme d'HC non compensatrice à long terme [84]. L'activation des voies des MAPK par les stress cardiaques permet donc le développement de l'HC, mais induirait aussi une perte de fonction cardiaque et une fibrose myocardique.

#### *1.5.3.1.8 Activation de la voie d'AKT*

La voie d'AKT, aussi connue sous le nom de protéine kinase B (PKB) est une voie importante dans la survie et la croissance cellulaire. C'est une des principales voies activées lors d'HC physiologique, comme lors de la grossesse ou de l'entraînement physique soutenu. Elle est néanmoins aussi activée lors d'HC pathologique [33]. L'activation physiologique est médiée par la liaison de facteurs de croissance (comme *l'insulin-like growth factor-1*) aux récepteurs tyrosine kinase, alors que l'activation pathologique se fait via la sous-unité  $\beta/\gamma$  d'un GPCR<sub>q/11</sub> (comme l'angiotensine II, l'endothéline ou la noradrénaline). La liaison de ces récepteurs permet l'activation des PI3 kinases (PI3K), la PI3K p110 $\alpha$  en situation physiologique et la PI3K p110 $\gamma$  en situation pathologique [33]. À la membrane cellulaire, PI3K crée du phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) à partir d'un phospholipide membranaire, le phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate. PIP3 recrute AKT et la phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) à la membrane, PDK1 phosphorylant et activant AKT. La phosphatase and tensin homolog (PTEN) peut déphosphoryler PIP3, ce qui empêche un recrutement et une activation continue d'AKT. AKT activée phosphoryle la sérine-thréonine kinase mTOR pour stimuler la synthèse protéique. mTOR phosphoryle la kinase p70-S6 pour que cette dernière phosphoryle la protéine ribosomale S6, accroissant ainsi la traduction [70]. Certaines études suggèrent même qu'un stimulus pro-hypertrophique activant les MAPK ERK1/2 stimulerait indirectement mTOR en inhibant la protéine TSC2, un inhibiteur de mTOR [70]. Une seconde action d'AKT est l'inhibition de GSK3 $\beta$  via sa phosphorylation. Comme GSK3 $\beta$  phosphoryle (inhibe) NFAT, une phosphorylation inhibitrice de GSK3 $\beta$  se traduit par une hausse de la transcription pro-hypertrophique par NFAT [85]. Bref, AKT permet une croissance cellulaire accrue par une augmentation de la synthèse protéique et de l'expression de gènes hypertrophiques.

#### 1.5.3.1.9 Changements transcriptionnels

L'activation des mécanismes cellulaires venant d'être mentionnés mène à la transcription de gènes favorisant l'HC. Les effets de ces changements d'expression génétique sont plus évidents au long court de la maladie cardiaque. Ils sont responsables de modifications dans le métabolisme énergétique et dans la composition du tissu cardiaque, notamment en ce qui concerne la nature des fibres contractiles et la matrice extracellulaire. Lors d'HC pathologique, il y a une réactivation de gènes normalement exprimés en période fœtale. Lors d'HC physiologique, cette réactivation des gènes fœtaux est absente, ce qui laisse croire que leur réactivation pourrait mener à une mauvaise adaptation [33]. Un des facteurs de transcription important dans la réactivation des gènes fœtaux est MEF2c [66]. Ce dernier peut être activé par diverses voies de signalisation mentionnées plus haut, comme l'inhibition des HDAC de classe II médiée par la CaMKII (voir section 1.5.3.1.4). De même, les facteurs de transcription NFAT et GATA4 sont aussi d'importance capitale dans l'expression de gènes pro-hypertrophiques. Ils favorisent l'expression d'Anp et de Bnp, en plus d'une transition dans les chaînes lourdes de myosines (MHC). Chez les rongeurs et les cœurs fœtaux, la forme  $\alpha$ -MHC, celle avec une hydrolyse rapide de l'ATP, prédomine en raison des fréquences cardiaques plus élevées. Chez l'humain, la forme  $\beta$ -MHC, celle avec une fonction ATPase plus lente, est la plus abondante physiologiquement. Dans un cœur malade hypertrophié, rongeur ou humain, il y a une augmentation de l'expression du gène *Myh7*, codant pour  $\beta$ -MHC et une diminution de l'expression de *Myh6*, codant pour  $\alpha$ -MHC [65]. Cette augmentation du ratio *Myh7/Myh6* est souvent présente lors d'HC pathologique et d'IC [86] et pourrait compromettre la contractilité cardiaque. L' $\alpha$ -MHC, permettant une hydrolyse rapide de l'ATP, accroît le raccourcissement des sarcomères lors de la systole. À l'inverse, la  $\beta$ -MHC est plus lente, ce qui diminue le raccourcissement des sarcomères, mais permet aussi de réduire la demande énergétique en ATP. En comparaison, lors d'entraînement cardiovasculaire soutenu régulier, on retrouverait plutôt une augmentation de l' $\alpha$ -MHC pour permettre une contractilité adéquate [10]. Des gènes en lien avec la fibrose cardiaque peuvent aussi être exprimés par les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques lors d'HC. Dans notre modèle de régurgitation aortique provoquée chez le rat, *Ctgf* et *Tgf $\beta$ 2* sont augmentés lors d'HC, ce qui pourrait éventuellement mener à l'accumulation de tissu fibreux dans la matrice extracellulaire [87]. Finalement, d'importants changements dans l'expression de gènes du métabolisme

énergétique peuvent être observés lors d'HC, ce qui mènerait à une transition de l'utilisation des acides gras vers une utilisation du glucose.

### *1.5.3.2 Modifications métaboliques en hypertrophie cardiaque pathologique*

Un cœur en santé utilise normalement les acides gras comme principale source énergétique. Lorsque la demande en énergie augmente de manière aiguë face à un stress, il y a une hausse du métabolisme du glucose par une activation de la pyruvate déshydrogénase qui permet la formation d'acétyl-CoA pour alimenter le cycle de Krebs. Le métabolisme des acides gras est aussi conservé dans un cœur en santé [33]. Cela améliore l'efficacité énergétique pour en accroître la production temporairement. Le problème survient lorsque le stress devient chronique : une diminution de l'utilisation des acides gras et une augmentation de l'utilisation du glucose se produisent, ce qui amène une transition vers le profil métabolique du cœur fœtal. Cette modification diminue la consommation en oxygène du myocarde. L'augmentation de l'utilisation du glucose est d'ailleurs une piste explorée dans le traitement de l'IC puisqu'elle optimiserait la production énergétique du cœur soumis à une surcharge [88, 89]. Le problème de cette transition métabolique est que la capacité du cœur à utiliser les acides gras est diminuée. Le cœur perd de sa capacité à s'adapter aux substrats environnants pour répondre à une hausse de la demande circulatoire systémique [90]. Un régulateur important de cette transition métabolique est PPAR $\alpha$ , un facteur de transcription de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique des acides gras [31]. PPAR $\alpha$  diminue avec le stress pathologique chronique, ce qui réduit son activité transcriptrice pour les gènes de la  $\beta$ -oxydation mentionnés dans la section 1.4.2 [21]. Un mécanisme expliquant ce changement est l'inhibition de PPAR $\alpha$  par la phosphorylation de ERK1/2, ce dernier étant activé lors du développement de l'HC [91]. Certaines études ont montré que les niveaux protéiques d'enzymes de la  $\beta$ -oxydation sont seulement diminués lors de l'évolution vers l'IC, et non initialement, lors de l'HC compensée [92]. En raison de son action sur la transcription de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, une diminution de PPAR $\alpha$  occasionnerait une baisse de l'entrée des acides gras dans les cardiomyocytes et dans les mitochondries, une diminution de la  $\beta$ -oxydation et une augmentation du métabolisme du glucose par baisse des niveaux de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) [31]. Un co-activateur de PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  serait lui aussi diminué lors d'HC, ce qui nuit au métabolisme des acides gras et à la biogenèse

mitochondriale [30]. La diminution de l'utilisation des acides gras est corrélée avec la dilatation du VG lors de cardiomyopathies dilatées: une dilatation plus importante est associée à une plus faible utilisation des acides gras [93]. Cette corrélation pourrait être secondaire à la progression de la maladie cardiaque qui mène à des changements métaboliques ou encore, les altérations métaboliques pourraient favoriser la dilatation. Selon une étude faite chez des hommes atteints d'IC systolique, moins les gènes cibles du facteur de transcription PGC-1 $\alpha$  et de son co-activateur ERR $\alpha$  sont exprimés, plus la fraction d'éjection du VG est réduite. Cette association pourrait s'expliquer par une dysfonction des mitochondries, dont une diminution de leur capacité oxydative, qui entraînerait éventuellement une perte de fonction cardiaque [94]. En HC physiologique, où il n'y a pas de diminution de la fonction cardiaque, PGC-1 $\alpha$  et ERR $\alpha$  sont plutôt augmentés [30].

La dysfonction mitochondriale en HC pathologique entraîne une diminution du métabolisme oxydatif. L'oxydation des acides gras et du glucose est réduite dans la mitochondrie. Selon certaines études de surcharge de volume, la  $\beta$ -oxydation est diminuée lors de l'HC, mais l'intégrité du cycle de Krebs serait maintenue [21]. Le problème réside dans le fait qu'il y aurait une diminution des substrats disponibles dans la mitochondrie pour entrer dans le cycle de Krebs. À cela s'ajoute une moins grande conversion du pyruvate provenant de la glycolyse en acétyl-CoA en raison d'une diminution de la pyruvate déshydrogénase (PDH). La production d'ATP à partir du glucose est toutefois encore possible grâce à la glycolyse, qui se déroule hors de la mitochondrie [21]. Cela mènerait à un découplage entre la glycolyse et le métabolisme oxydatif du glucose dans la mitochondrie, l'accumulation de pyruvate dans le cytoplasme entraînant la hausse des lactates et la diminution du pH intracellulaire [20]. En effet, le pyruvate peut être transformé en acide lactique grâce à l'enzyme lactate déshydrogénase, une réaction qui libère du NAD<sup>+</sup>. Cette dernière molécule peut être réutilisée dans la glycolyse pour maximiser la production d'ATP provenant de cette voie [95]. C'est le moyen utilisé par la cellule dans les situations d'hypoxie, car la glycolyse ne nécessite pas d'oxygène pour former de l'ATP. L'acide lactique formé devient néanmoins toxique à la longue pour l'homéostasie cellulaire puisqu'il entraîne la libération d'un proton H<sup>+</sup>. La cellule dépense alors son énergie pour expulser ce proton. Cela se fait aux dépens du rétablissement des concentrations ioniques de sodium et de calcium et altère la sensibilité des myofibrilles au calcium [90].

En plus du glucose et des acides gras, le myocarde peut utiliser les corps cétoniques pour produire de l'énergie. Les trois corps cétoniques, soit l'acétoacétate, le  $\beta$ -hydroxybutyrate et l'acétone, sont principalement produits par les cellules hépatiques à partir de l'acétyl-CoA issu de l'oxydation des acides gras. Ils sont normalement produits en période de jeûne. L'acétoacétate et le  $\beta$ -hydroxybutyrate circulent par le sang pour nourrir les organes, soit principalement le cerveau, mais aussi le cœur. L'acétone est plutôt expulsée par les poumons. Le  $\beta$ -hydroxybutyrate peut être transformé en acétoacétate par la  $\beta$ -hydroxybutyrate déshydrogénase (BDH), ce dernier corps cétonique étant métabolisé par la cellule. Il permettra la formation d'acétyl-CoA et de NADH grâce aux enzymes 3-cétoacyl-CoA transférase et thiolase mitochondriale. L'acétyl-CoA est ensuite oxydé dans le cycle de Krebs [96]. En contexte d'HC ou d'IC, le foie produirait davantage de corps cétoniques. Leur utilisation par le cœur serait accrue, potentiellement en raison d'une hausse de l'expression de la BDH au cœur ou encore d'une augmentation de leur disponibilité [96-99]. L'oxydation des corps cétoniques entre en compétition avec l'oxydation des acides gras. En HC pathologique avancée, il y a une diminution de l'utilisation des acides gras et une augmentation de l'utilisation des corps cétoniques. Il n'est par contre pas encore clair lequel de ces phénomènes survient en premier et si l'augmentation de l'utilisation des corps cétoniques est bénéfique pour le cœur. L'utilisation des corps cétoniques serait néanmoins plus efficace que les acides gras au niveau du rendement énergétique [98].

Les protéines kinases A, C et D présentées plus haut ont aussi des effets métaboliques. PKA et PKC peuvent indirectement potentialiser l'activité de la phosphofructokinase (PFK) dans la glycolyse, cette enzyme catalysant une réaction irréversible indispensable pour la régulation du métabolisme du glucose [100]. Leur activation chronique pourrait augmenter cette voie métabolique. Aussi, PKD permettrait la translocation de GLUT4 à la membrane cellulaire, de manière indépendante de l'insuline. Cet effet de PKD serait induit par l'augmentation de la contractilité cardiaque pour répondre à la hausse de la demande énergétique [101]. Selon des études sur des cellules endothéliales, PKD pourrait diminuer l'expression de CD36 [24], ce qui diminuerait l'entrée d'acide gras dans la cellule et leur utilisation comme substrat énergétique. Alors que l'augmentation de l'entrée du glucose via GLUT4 pourrait être aiguë, la diminution de l'utilisation des acides gras dépendante de PKD serait à plus long terme puisqu'elle implique une variation d'expression génétique [24]. Bref, ces voies métaboliques activées lors d'HC

pourraient expliquer en partie la transition métabolique de diminution de l'utilisation des acides gras vers une augmentation de l'utilisation du glucose.

Brièvement, le stress oxydatif entraîne un cercle vicieux pour le métabolisme énergétique. Des altérations du métabolisme énergétique peuvent augmenter le stress oxydatif, mais ce dernier peut diminuer la fonction mitochondriale. La production énergétique du myocarde entraîne la production de dérivés réactifs à l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS), des radicaux libres oxydants toxiques pour les cardiomyocytes. Lors d'un stress de surcharge pathologique, les mécanismes réduisant habituellement les niveaux de ROS sont perturbés et ne peuvent plus compenser la hausse de ROS [33]. La production de ROS peut être stimulée par l'AngII et l'endothéline-1, deux molécules pro-hypertrophiques, qui activent l'enzyme NADPH oxydase (NOX) produisant ainsi des ROS comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le radical superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ). Les enzymes superoxyde dismutase (SOD), catalase et glutathione peroxidase permettent de réduire les niveaux de ROS [102]. Lorsque ces mécanismes de défense contre le stress oxydatif sont dépassés, les ROS peuvent activer les voies des MAPK, ce qui encourage l'HC, ils peuvent déséquilibrer l'homéostasie du calcium et lorsque les niveaux de ROS sont très élevés, ils peuvent endommager les mitochondries et induire l'apoptose des cardiomyocytes [103].

#### 1.5.4 Évaluation de la morphologie, de la fonction et des changements cellulaires du myocarde lors de l'hypertrophie cardiaque

Différentes méthodes existent pour évaluer l'HC. Pour l'analyse des répercussions morphologiques et fonctionnelles de l'HC, l'échocardiographie est une modalité de choix. Pour l'étude des changements cellulaires induits par l'HC, l'analyse en laboratoire d'un échantillon de cœur (biopsie ou spécimen post-mortem) est habituellement nécessaire. L'échocardiographie transthoracique permet d'évaluer la morphologie des différentes cavités cardiaques grâce aux ultrasons. Elle permet de mesurer la dimension des cavités en fin de systole et de diastole, ainsi que l'épaisseur des parois cardiaques. [104]. Elle permet aussi le calcul des volumes des cavités. L'échocardiographie objective la dilatation d'une cavité ou l'épaississement des parois cardiaques, d'où son rôle clé dans l'évaluation de l'HC. Cette technique d'imagerie permet de calculer la masse du VG et de diagnostiquer

l'HC chez l'humain selon des valeurs préétablies ajustées pour le sexe, la taille et la surface corporelle, valeurs tirées de la Framingham Heart Study [34, 105].

De plus, cette modalité d'imagerie permet l'analyse des répercussions fonctionnelles de l'HC, notamment grâce à la fonction Doppler qui permet d'évaluer la direction et la vitesse du flot sanguin. La fonction systolique peut être évaluée selon la *fraction de raccourcissement* (fractional shortening, FS), le *volume d'éjection* (stroke volume, SV) ou la *fraction d'éjection* (FÉ) [106]. La FS est un ratio entre les diamètres systolique et diastolique du VG et nous renseigne sur la capacité de cette cavité à se contracter. Le SV représente le volume de sang éjecté du cœur à chaque systole et est calculé à partir du diamètre de la chambre de chasse du VG et de la vitesse du sang traversant cette chambre. Lors d'une régurgitation aortique, cette mesure doit être prise à la sortie du VG puisque s'il est pris plus loin au niveau de l'aorte, il sera sous-estimé en raison du sang qui revient anormalement au cœur en diastole. Lorsque multiplié par la fréquence cardiaque (FC), le SV permet le calcul du *débit cardiaque*, soit le volume de sang éjecté du cœur par minute. La FÉ est le ratio entre les volumes du VG en fin de systole et en fin de diastole. C'est le paramètre le plus fréquemment utilisé en clinique pour diagnostiquer et suivre l'insuffisance cardiaque (voir la section 1.5.6).

Par ailleurs, la compliance ventriculaire permet d'évaluer la fonction diastolique. La fonctionnalité Doppler permet le calcul de la vitesse du flot passant au travers de la valve mitrale en diastole. La première phase de la diastole implique un remplissage passif du VG et est représentée par la mesure échocardiographique de l'*onde E*. La deuxième phase de la diastole débute avec la contraction de l'OG et le remplissage actif du VG. Cette phase est représentée par la mesure de l'*onde A*. Le *ratio ondes E/A* nous informe sur la compliance ventriculaire. Plus ce ratio est élevé, moins le VG est souple ; le sang arrive rapidement lors de la première phase de la diastole (onde E) et le flot est ralenti lors de la deuxième phase de la diastole (onde A) puisque le VG ne peut plus accueillir de sang supplémentaire en raison de sa perte de compliance [106]. La pente de l'onde E (*slope*) est aussi une mesure de la compliance ventriculaire. Plus cette pente est abrupte, plus la décélération du sang arrivant de la valve mitrale est rapide, ce qui signifie que le sang est freiné par un VG pouvant difficilement accommoder le volume sanguin. En régurgitation aortique (AR), le ratio E/A est moins pertinent que les valeurs individuelles des ondes E et A et de la pente de l'onde E. En effet, comme les ondes E et A augmentent en AR, cela

« normalise » le ratio. Une problématique avec le ratio E/A est qu'il peut être faussement normal, lorsque la hausse des pressions dans l'OG compense pour la perte de compliance ventriculaire. Le VG accueille moins facilement le sang, mais les pressions élevées dans l'OG normalise la vitesse des ondes E et A [107]. En AR, le sang qui revient de l'aorte cause une augmentation rapide des pressions dans le VG; l'équilibre de pression entre le VG et l'OG est donc rapidement atteint. La pente de l'onde E est affectée par ce phénomène qui raccourci le remplissage passif et rend la pente de l'onde E plus abrupte. Avec la dilatation du VG associée à la AR, le VG ne peut s'étirer davantage lorsqu'il a un surplus de sang. Le sang arrive de l'OG plus rapidement, car le VG est élargi, ce qui augmente de l'onde E. Par contre, l'équilibre de pressions s'atteint rapidement en raison du sang qui arrive aussi de l'aorte (d'où une pente de l'onde E abrupte). L'onde E et sa pente sont donc les deux paramètres les plus pertinents pour l'étude de la fonction diastolique lors d'une régurgitation aortique selon notre expérience avec le modèle de rat.

L'échocardiographie permet aussi de s'assurer de l'intégrité des valves cardiaques. La fonction Doppler permet d'évaluer la direction du flot sanguin. La régurgitation d'une valve peut être observée lorsqu'un flot sanguin provenant de la valve est détecté à un moment du cycle cardiaque où la valve est habituellement fermée [41]. Par exemple, une régurgitation aortique cause un retour de sang au VG en diastole. La sévérité de cette régurgitation est mesurée en calculant le pourcentage de la chambre de chasse du VG occupée par le jet régurgitant en diastole. La visualisation de l'aorte thoracique est possible par échocardiographie et en cas de régurgitation aortique, le Doppler montre un flot sanguin rétrograde en diastole. Un autre avantage de l'échocardiographie est l'évaluation de l'évolution morphologique et fonctionnelle de l'HC grâce à des mesures sériées. En clinique, le suivi échocardiographique d'un patient, conjointement à la symptomatologie de celui-ci, permet d'ajuster la prise en charge médicale et chirurgicale. L'échocardiographie transthoracique est une technique d'imagerie non invasive, sans irradiation et facilement accessible. Elle est aussi réalisable sur les petits animaux comme les rats et les souris. Elle permet une imagerie en temps réel lors de manipulations chirurgicales. D'autres modalités d'imagerie cardiaque comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM) fonctionnelle ou la tomodensitométrie existent, mais leur coût élevé et la disponibilité des appareils, notamment ceux destinés aux études animales, réduisent leur accessibilité. Une limitation de l'échocardiographie réside en la difficulté technique d'obtenir des images et des mesures reproductibles. Une bonne formation de l'échocardiographe est nécessaire et un seul

évaluateur doit réaliser les images et prises de mesures pour un même projet pour s'assurer de la comparabilité des résultats. Pour assurer la validité et reproductibilité des échographies dans le projet actuel, une seule et même personne a réalisé les échographies et la prise de mesures. L'appareil était toujours le même et réglé aux mêmes paramètres. De plus, chez un même individu, une même mesure était prise trois fois, soit sur trois battements cardiaques différents et leur moyenne était le résultat retenu.

Les différentes altérations cellulaires mentionnées dans les sections précédentes de ce mémoire sont aussi pertinentes pour mieux caractériser l'HC. L'activation de certaines voies de signalisation menant à des changements de l'homéostasie calcique, de l'expression génique et de l'activité d'enzymes clés du métabolisme peut être étudiée sur des échantillons de myocarde. Les changements d'expression de certains gènes peuvent être mesurés par *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) quantitative, les changements dans les niveaux protéiques et leur état de phosphorylation peuvent être étudiés par Western Blot et l'activité d'enzymes peut être mesurée par essais enzymatiques. La RT-PCR quantitative permet de mesurer le niveau d'expression de gènes transcrits en ARN messager (ARNm) [108]. Cette technique permet de déterminer les variations d'expression génique en contexte d'HC. L'analyse de groupes de gènes donne une idée globale de ceux plus ou moins exprimés lors d'HC et oriente vers les changements présents au long cours lors de cette maladie. Une limitation de la RT-PCR est qu'elle ne nous renseigne pas sur le contenu protéique, mais seulement sur l'ARNm. Un gène surexprimé en ARNm ne l'est pas nécessairement au niveau protéique.

Une deuxième technique d'analyse est le Western Blot qui nous renseigne sur l'abondance relative d'une protéine d'intérêt et permet de savoir si son abondance augmente ou diminue lors de l'HC [109]. L'analyse des formes phosphorylées de la protéine est aussi possible permettant le calcul de la quantité relative d'une protéine phosphorylée par rapport à sa forme totale ou non phosphorylée. Selon les protéines et leurs formes étudiées, le Western Blot renseigne sur les voies de signalisation activées ou inhibées dans la cellule. Comme ces voies de signalisation sont responsables des changements cellulaires observés en HC, leur étude par Western Blot est justifiée. Bien que cette technique permette une quantification relative de protéines, dont l'abondance de certaines enzymes, elle ne permet pas l'analyse de l'activité de ces enzymes, d'où la nécessité des essais enzymatiques surtout pour étudier le métabolisme énergétique.

L'activité enzymatique renseigne sur le niveau d'activation réel et l'abondance des protéines à activité catalytique. Cette information est intéressante notamment pour les enzymes des grandes voies du métabolisme énergétique, comme la  $\beta$ -oxydation, la glycolyse ou le cycle de Krebs. La mesure de l'activité enzymatique est donc très pertinente dans le cœur hypertrophié en raison des changements du métabolisme énergétique qui y surviennent. Une limitation des essais enzymatiques est la grande sensibilité aux variations de conditions de manipulations des échantillons et de la réalisation des essais, d'où une variabilité de résultats parfois plus importante. De même, ces activités enzymatiques ne sont pas mesurées *in vivo*, ni sur des tissus frais. Des techniques plus coûteuses, telles que la tomographie par émission de positrons (PET scan) ou l'IRM [89], permettraient de mesurer *in vivo* l'utilisation de substrats énergétiques radiomarqués spécifiques par le myocarde. L'analyse de tissus cardiaques frais serait aussi intéressante pour éviter la perte d'activité enzymatique lors de l'entreposage à  $-80^{\circ}\text{C}$  des tissus cardiaques. En raison de contraintes de temps imposées par l'utilisation de tissus frais, cette technique serait difficile à réaliser lorsque différentes enzymes et de nombreux échantillons doivent être analysés.

Bref, le Western Blot permet l'étude des voies activées ou inactivées en situation d'HC, la RT-PCR permet d'analyser les répercussions de l'activation ou de l'inactivation de ces voies et l'essai enzymatique permet de mesurer concrètement les variations d'expression enzymatique et de l'activité de ces enzymes, notamment en lien avec le métabolisme énergétique. La combinaison de ces techniques permet donc de dresser un portrait global des changements cellulaires se produisant dans le cœur soumis à un stress pro-hypertrophique.

### 1.5.5 Modèle d'hypertrophie cardiaque étudié

Mon projet de maîtrise s'intéresse à l'HC développée secondairement à une surcharge de volume par régurgitation aortique. Le laboratoire où j'ai réalisé ma maîtrise utilise un modèle de régurgitation (ou insuffisance) de la valve aortique induite chez le rat Wistar. Ce modèle majoritairement de surcharge de volume d'abord isolée au ventricule gauche permet le développement de l'HC et est utilisé depuis plusieurs années par l'équipe de recherche [42, 84, 87, 110-116]. Le rat est l'animal privilégié puisqu'il est assez petit pour réduire les coûts associés à son acquisition et son hébergement. Le rat étant grandement

étudié en recherche fondamentale, plusieurs produits de laboratoire lui sont adaptés (exemple des amorces pour les gènes étudiés par RT-PCR ou des anticorps utilisés pour l'immunobuvardage). De plus, c'est un animal plus gros que la souris, ce qui facilite la procédure chirurgicale et permet d'obtenir assez de tissu cardiaque à analyser.

L'induction de la régurgitation aortique consiste à une chirurgie sous guidage échocardiographique où un cathéter est inséré dans la carotide droite du rat et descendu jusqu'à la valve aortique. Un ou deux feuillets de la valve sont perforés pour induire le retour de sang vers le VG. Le cathéter est ensuite retiré et la carotide, ligaturée. Les animaux contrôles, « Sham », n'ont seulement que leur carotide droite ligaturée, la valve aortique restant intacte. Cela reproduit le stress de l'anesthésie et d'une partie de la chirurgie. Ce modèle de régurgitation aortique sévère, où l'on a généralement plus de 60% du volume sanguin expulsé qui revient au cœur, permet le développement de l'HC pathologique, mais une lente progression vers l'IC [87]. Peu de fibrose de collagène infiltrant le myocarde est observée dans ce modèle [117], quoiqu'une dynamique de remodelage de la matrice extracellulaire est présente et qu'une certaine fibrose péri-vasculaire puisse être objectivée. L'accumulation marquée de fibrose surviendrait autour de 9 à 12 mois [87, 111]. De plus, contrairement aux modèles de fistule artério-veineuse qui induisent une surcharge de volume à toutes les cavités cardiaques, le modèle d'HC que nous étudions permet une meilleure reproduction d'une surcharge de volume associée, dans une moindre mesure, à une surcharge de pression spécifique au VG telles qu'observées lors de régurgitation aortique. C'est donc un modèle qui nous permet d'étudier les conséquences de cette pathologie valvulaire au niveau du myocarde.

### I.5.6 Évolution vers l'insuffisance cardiaque

La principale raison pour laquelle l'HC pathologique est inquiétante est qu'elle mène fréquemment à l'insuffisance cardiaque (IC). L'IC est un syndrome clinique qui résulte de toute maladie cardiaque affectant la capacité du cœur à pomper ou à se remplir. En d'autres mots, l'IC se caractérise par la perte de fonction systolique et/ou diastolique et peut toucher le cœur droit et le cœur gauche, séparément ou simultanément. Le développement de l'IC est une étape terminale de la maladie cardiaque puisque la survie est d'environ 50% à 5 ans [118] et qu'aucun traitement médical curatif n'est actuellement disponible. L'activation

chronique du système adrénergique et du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) est nocive pour le cœur et stimule un remodelage fibrotique et non compensateur [119]. La hausse chronique de noradrénaline désensibiliserait le cœur à sa stimulation en diminuant le nombre de récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques des cardiomyocytes, ce qui réduirait la contractilité cardiaque [54]. L'apoptose, mort cellulaire programmée activée par le stress cellulaire, contribuerait à la perte de contractilité en diminuant graduellement le nombre de cardiomyocytes [54]. Des altérations dans les réserves énergétiques nuisent aussi à la fonction cardiaque. Il y a une corrélation entre la classe de la *New York Heart Association* (NYHA) (Tableau I.1) et une diminution du ratio phosphocréatine/ATP, ce ratio étant représentatif des réserves énergétiques des cardiomyocytes [20]. À ces mécanismes s'ajoutent une aggravation des modifications métaboliques, de l'homéostasie du calcium et des fibres contractiles retrouvées en HC comme présentées plus haut.

L'IC diastolique survient lorsqu'un ventricule perd de sa compliance, c'est-à-dire qu'il devient plus rigide, perd sa capacité à bien se relaxer entre chaque contraction et a de la difficulté à bien se remplir en diastole pour accommoder un volume sanguin normal [120]. L'IC systolique peut s'ajouter à l'IC diastolique et elle se caractérise par une perte de contractilité cardiaque, ce qui se répercute par une diminution de la fraction d'éjection du ventricule en deçà de 40 à 55% [118]. Cette diminution de la fraction d'éjection occasionne une diminution de la perfusion systémique. Bref, en IC diastolique, le cœur a de la difficulté à se remplir, alors qu'en IC systolique, le cœur peine à éjecter le sang. En ce qui concerne le côté du cœur touché, l'IC droite est habituellement causée par une hausse des pressions pulmonaires : le VD doit vaincre une post-charge plus importante, s'hypertrophie et perd éventuellement sa fonction. La principale cause d'IC droite est la hausse des pressions pulmonaires induite par l'IC gauche [54]. L'IC gauche touche le VG et survient lorsque l'hypertrophie de cette cavité ne parvient plus à accommoder la pré- ou la post-charge augmentée de manière chronique. Lorsque le VG devient insuffisant, il y a une augmentation des pressions à rebours jusqu'aux poumons et éventuellement dans le VD. Ainsi, l'IC gauche peut induire une IC globale, qui touche tout le cœur [120]. L'augmentation des pressions pulmonaires induit l'œdème pulmonaire par augmentation des pressions hydrostatiques capillaires et accumulation liquidienne dans le milieu extracellulaire, ce qui cause une symptomatologie de dyspnée en position déclive, à l'effort ou de manière aiguë [120]. La perte de fonction systolique cardiaque mène à une baisse de perfusion systémique et active les systèmes adrénergiques et SRAA. Les mécanismes derrière la transition entre

l'HC et l'IC ne sont pas tous encore établis. Bien que cette activation neuro-hormonale améliore la contractilité et le débit cardiaques temporairement, elle cause aussi une vasoconstriction qui augmente la post-charge du VG et nuit à son efficacité. La rétention liquidienne encouragée par le SRAA optimise la pré-charge du VG, ce qui améliore initialement sa contractilité selon le mécanisme de Frank-Starling [120]. Par contre, l'augmentation du volume circulant accroît les symptômes liés à la surcharge volémique, comme l'œdème des membres inférieurs, le gain de poids, l'ascite et la congestion hépatique (tous des conséquences d'une IC globale où les pressions hydrostatiques sont élevées dans le réseau veineux) [52]. L'IC induit aussi une fatigabilité et une perte de capacité fonctionnelle, soit la capacité du patient à marcher et à faire ses activités habituelles sans avoir de symptômes d'IC. Cette capacité fonctionnelle peut être gradée selon l'échelle de la NYHA et permet d'ajuster la prise en charge et le pronostique [52]. Un facteur contributif à la détérioration de la fonctionnalité du patient est l'atrophie musculaire associée à l'IC. Des altérations du métabolisme énergétique et de la production et dégradation des fibres musculaires affectent les muscles squelettiques lors d'IC. Une hypothèse est que l'angiotensine II serait en partie responsable de ces changements musculaires menant à la sarcopénie, une perte de masse et de force musculaire [121].

Certains médicaments existent pour diminuer la post-charge ou améliorer la contractilité cardiaque lors d'IC systolique, mais ceux-ci ne peuvent pas guérir la maladie. Le remplacement valvulaire, le cœur mécanique ou la transplantation cardiaque sont les seules options chirurgicales. Le remplacement valvulaire peut améliorer l'HC et la fonction cardiaque si le remodelage ventriculaire n'est pas trop sévère. Toutefois, les maladies valvulaires représentent 10% des causes d'IC [122], les maladies coronariennes étant au premier rang [5]. Globalement, 35% des décès d'origine cardiovasculaire sont en raison d'IC. La prévalence de l'IC serait aux environs de 3% chez les hommes et de 2% chez les femmes, mais le nombre de décès est plus important chez les femmes. On estime qu'en 2030, aux États-Unis, plus de 9 millions d'adultes souffriront d'IC [1].

Classe	Symptômes
I	Aucune limitation lors de l'activité physique; absence de fatigue, de palpitation ou de dyspnée lors de l'activité physique normale
II	Limitation légère à l'activité physique normale où il y a présence de fatigue, palpitation ou dyspnée; aucun symptôme au repos
III	Limitation importante à l'activité physique; fatigue, palpitation ou dyspnée lors d'un léger exercice physique; aucun symptôme au repos
IV	Un moindre exercice physique entraîne des symptômes; présence de symptômes au repos

**Tableau I.1. Classes fonctionnelles de la New York Heart Association.** Traduit et adapté de: « Bonow, R.O. and E.H.d. Braunwald, *Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 9th ed. / edited by Robert O. Bonow ... [et al.]. ed. 2012, Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders. »

## I.6 Dimorphisme sexuel cardiaque

### I.6.1 Dimorphisme sexuel cardiaque physiologique

Le sexe d'un individu est d'abord déterminé par la présence des chromosomes sexuels, XX chez les femelles et XY chez les mâles. À partir de ce génotype se développe un phénotype plutôt masculin ou féminin et cela serait principalement médié par les hormones sexuelles. Les androgènes, comme la testostérone ou la dihydrotestostérone (DHT), sont les stéroïdes sexuels mâles, alors que les œstrogènes, comme le 17- $\beta$ -œstradiol, sont ceux femelles. Des récepteurs nucléaires et même membranaires ou cytosoliques permettent de lier ces stéroïdes pour induire leurs effets. Selon une étude sur des cœurs de souris, la quantité et la nature des récepteurs aux androgènes et aux œstrogènes seraient les mêmes chez les mâles et chez les femelles [123]. Une étude sur des cœurs sains humains en est arrivée à la même conclusion [124].

Au niveau du cœur, des différences sexuelles existent de manière physiologique. Dès l'adolescence, avec la puberté et les changements hormonaux, la masse cardiaque des individus masculins devient plus importante que chez les individus féminins, par hypertrophie physiologique des cardiomyocytes [125]. Des différences au niveau ionique

existent aussi : les niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosoliques seraient plus bas chez les femelles que chez les mâles et cela serait médié par les œstrogènes [126]. À partir de l'adolescence, les femmes ont une repolarisation ventriculaire plus longue, ce qui se répercute sur l'électrocardiogramme par un intervalle QT plus long [127]. Elles auraient aussi une meilleure fonction diastolique [125]. Les cardiomyocytes femelles utiliseraient davantage les acides gras comme substrat énergétique, en comparaison avec les mâles. Ces derniers auraient plutôt recours à une plus grande proportion de dérivés du glucose que les femelles [128, 129]. Vijay *et al.* ont montré que l'expression de gènes de la pyruvate déshydrogénase, l'enzyme permettant la transformation du pyruvate issu de la glycolyse en acétyl-CoA, serait plus importante chez les rats mâles adultes sains que chez les femelles [130]. Un knock-out des gènes pour la PDH au niveau musculaire (cardiaque et squelettique) est rapidement létal chez des souris mâles, mais pas chez les femelles [28]. Ainsi, le myocarde des femelles consommerait plus d'oxygène que celui des mâles en raison d'une utilisation accrue d'acides gras [128, 129]. Selon l'étude animale de Vijay *et al.*, l'expression de gènes de la phosphorylation oxydative serait similaire entre les sexes jusqu'à un âge avancé (78 semaines) où cette expression diminue principalement chez les mâles [130]. Finalement, chez les hommes, il y aurait une diminution du nombre de cardiomyocytes avec l'âge par nécrose et apoptose, ce qui serait accompagné par une perte de fonction « physiologique », alors que ce phénomène ne serait pas, du moins très peu, présent chez les femmes [125, 131, 132].

### I.6.2 Dimorphisme sexuel dans l'hypertrophie cardiaque

Une première distinction entre les sexes au niveau cardiovasculaire est que les femmes pré-ménopausées sont moins atteintes de maladies cardiovasculaires que les hommes de même âge [1]. Après la ménopause, les femmes sont tout autant touchées, mais un dimorphisme sexuel persiste quant à la nature et à la forme de la maladie. Lors d'une surcharge hémodynamique similaire, hommes et femmes ne développent pas une même forme d'HC, les femmes développant une HC semblant d'abord permettre une meilleure compensation [6]. Un avantage du sexe féminin est qu'il est plus sujet à développer une HC physiologique, lors de la grossesse ou de l'entraînement physique. Cette HC physiologique ne s'accompagne pas de fibrose ou d'activation de gènes foœtaux, est réversible et permet une optimisation de la fonction cardiaque [33]. La dilatation des

cavités se fait parallèlement à celle de l'épaisseur des parois. La grossesse est une situation induisant une surcharge de volume globale au cœur. Le cœur féminin s'y adapte en s'hypertrophiant. De plus, malgré un entraînement physique similaire, la masse des cœurs femelles augmente davantage que celle des mâles [133, 134], ce qui laisse penser que les femelles sont prédisposées à une HC physiologique, peut-être en raison de leur possibilité de grossesse [135]. Au niveau énergétique, Foryst-Ludwig *et al.* ont étudié des souris entraînées. Ils ont remarqué que les acides gras libres en circulation augmentent chez les femelles lors d'exercice physique, alors qu'une diminution serait plutôt présente chez les mâles. Cela s'accompagne d'une utilisation accrue des acides gras au cœur par les femelles, alors que l'utilisation de ce substrat reste stable chez les mâles [133].

Pour l'HC pathologique, une première différence sexuelle est le mécanisme causal. Alors que la principale cause d'HC chez les hommes est l'ischémie myocardique, menant à la perte de cardiomyocytes et à une HC plutôt excentrée, l'hypertension artérielle (HTA) est la première cause chez les femmes, ce qui entraîne une augmentation de la post-charge et une HC concentrique [126]. Selon ces étiologies, chez les hommes, la maladie évolue souvent vers une IC systolique, alors que chez les femmes, l'HC mène plutôt à une IC diastolique [136]. Le degré d'HC et l'âge sont d'importants facteurs prédictifs de mortalité chez la femme, alors que chez l'homme, ce sont plutôt la fonction systolique et la classe NYHA [135]. Lors du développement de l'IC, les femmes ont un meilleur pronostic que les hommes [137]. Dans des modèles animaux de surcharge de pression par constriction transaortique (TAC), les femelles développent comme attendu une hypertrophie concentrique, alors que l'hypertrophie des mâles évolue rapidement vers une forme dilatée et une perte de fonction [138]. Les différences hypertrophiques entre les sexes sont aussi présentes en surcharge de volume. Dans un modèle de fistule aorto-cave induisant une surcharge de volume globale à tout le cœur, l'épaississement de la paroi postérieure du cœur est plus important chez les femelles, alors que les diamètres systoliques et diastoliques des mâles sont plus élevés [139]. En d'autres mots, les femelles auraient tendance à hypertrophier de manière concentrique, alors que les mâles développeraient une forme plutôt dilatée [140]. Selon cette étude de Gardner *et al.*, ce remodelage chez les mâles est associé à une mortalité dix fois plus élevée que chez les femelles [140]. De plus, les mâles auraient une augmentation des protéines pro-apoptotiques 16 semaines après la création de la fistule, ce qui n'est pas présent chez les femelles et pourrait être un signe de répercussions du stress hémodynamique plus sévère chez les mâles [141].

Finalement, des différences sexuelles au niveau métabolique existent dans l'HC pathologique. Des modèles animaux d'IC ont permis d'observer que la diminution de l'oxydation des acides gras, fréquemment observée lors d'HC, survenait presque uniquement chez les mâles [142]. Dans un modèle de surcharge de pression par TAC, la diminution de l'expression de gènes du métabolisme énergétique était plus importante chez les mâles, surtout ceux régulés par le co-activateur *Pgc1 $\alpha$*  tels que *Pdk* et *Cpt*, deux gènes favorisant l'utilisation des acides gras. Cette diminution était accompagnée d'une augmentation de l'expression de gènes du remodelage de la matrice extracellulaire comme *Col3*, *Timp2*, *Mmp2* et *Tgf $\beta$ 2* principalement chez les individus de ce sexe [66]. Ces changements d'expression génétique pourraient résulter en une production énergétique moins efficace et une fibrose plus marquée chez les mâles, ce qui influencerait le remodelage cardiaque. Ces différences entre les individus mâles et femelles au niveau des profils transcriptionnels et du type de remodelage cardiaque pourraient s'expliquer en partie par les hormones sexuelles.

### 1.6.3 Rôle des hormones sexuelles au niveau du cœur

#### 1.6.3.1 Les œstrogènes

Les œstrogènes sont les principaux stéroïdes sexuels chez les femelles. Ces dernières les synthétisent principalement au niveau des ovaires. Dans une moindre mesure, les mâles sont aussi exposés aux œstrogènes grâce à l'aromatase, une enzyme présente dans divers tissus, dont le cœur, qui converti certains androgènes en œstrogènes [126]. Les œstrogènes exercent majoritairement leurs actions grâce à leurs récepteurs nucléaires qui, lorsqu'activés, servent de facteurs de transcription. Ils peuvent aussi activer un récepteur membranaire couplé à une protéine G, le GPER (G-coupled protein estrogen receptor) [143]. *ER $\alpha$*  et *ER $\beta$*  sont les deux isoformes de récepteurs majoritairement nucléaires pour les œstrogènes. Ils induisent des effets à moyen et long terme par synthèse protéique, alors que le GPER amène des effets immédiats en activant directement des signaux intracellulaires. *ER $\alpha$*  et *ER $\beta$*  pourraient aussi être présents à la membrane cellulaire pour activer rapidement certaines voies de signalisation. Ces trois récepteurs sont notamment présents dans les cardiomyocytes et fibroblastes cardiaques de mâles et de femelles, tant chez le rat que chez l'humain [134]. Ils ont donc le potentiel d'influencer la réponse cardiaque lors d'un stress de surcharge hémodynamique.

Il a longtemps été considéré que les œstrogènes étaient protecteurs pour le système cardiovasculaire en raison de la faible prévalence des maladies cardiovasculaires chez les femmes pré-ménopausées, exposées aux œstrogènes. Débuter la ménopause avant l'âge de 45 ans augmenterait de 50% le risque de maladies cardiovasculaires en comparaison avec une ménopause plus tardive et cela serait aussi associé à une hausse de mortalité [144]. Auparavant, une thérapie de remplacement hormonal était fréquemment prescrite aux femmes ménopausées en prévention de maladies cardiovasculaires. Or, l'étude WHI (*Women's Health Initiative*) en est arrivée à la conclusion que ce traitement d'œstrogène et de progestérone combinés chez les femmes ménopausées en santé augmentait le risque d'évènements cardiovasculaires à court terme, notamment d'infarctus du myocarde [145]. L'étude HERS (Heart and Estrogen/progestin Replacement Study) en est arrivée à des résultats similaires chez des femmes ménopausées connues pour maladies cardiaques : la thérapie de remplacement hormonal avait tendance à augmenter le risque de maladies coronariennes [146]. De ces études a découlé l'hypothèse que le temps d'initiation du traitement hormonal influence ses effets sur le système cardiovasculaire. En d'autres mots, l'initiation d'un traitement hormonal dans les six ans suivant le début de la ménopause diminuerait l'athérosclérose au niveau carotidien et coronarien. L'étude ELITE (Early Versus Late Intervention Trial with Estradiol) a partiellement confirmé cette hypothèse: l'athérosclérose carotidienne est diminuée seulement chez les femmes ayant débuté un traitement hormonal dans les six ans suivant le début de la ménopause, et non chez celles l'ayant débuté dix ans après. Il n'y avait par contre pas de différence au niveau de l'athérosclérose coronaire entre les groupes ni au niveau de la mortalité [147, 148].

L'influence des œstrogènes dans le développement de l'HC a été étudiée grâce à différents modèles animaux. Certains avaient recours à des animaux ovariectomisés (sans ovaires pour produire les œstrogènes) et d'autres étudiaient des souris génétiquement modifiées n'exprimant plus une isoforme des récepteurs aux œstrogènes. Lors d'une surcharge de volume par fistule aorto-cave, la perte des œstrogènes par ovariectomie mènerait à une dilatation des cavités cardiaques plus marquée chez les femelles intactes (qui avaient toujours leurs ovaires) [149]. Une étude de Donaldson *et al.* a montré qu'en supprimant les œstrogènes par ovariectomie lors d'une surcharge de pression, des souris développent un allongement et un épaississement de leurs cardiomyocytes, ce qui pourrait mener à une hypertrophie plutôt excentrée et une perte de fonction systolique. En donnant un supplément d'œstrogènes aux femelles ovariectomisées soumises à une surcharge de

pression, l'épaississement des cardiomyocytes était encore présent, sans pour autant qu'un allongement important ou une perte de fonction systolique se développe. L'absence d'œstrogènes chez ces souris TAC augmenterait les niveaux protéiques de la calcineurine A (CnA) en comparaison avec les animaux TAC supplémentés en œstrogène. Les œstrogènes diminueraient les niveaux de CnA en augmentant de sa dégradation, ce qui résulterait en une moins grande activation de NFAT et par conséquent, une réponse hypertrophique atténuée [150].

En étudiant les modèles de souris génétiquement modifiées, il apparaît que les effets bénéfiques anti-hypertrophiques des œstrogènes seraient médiés par ER $\beta$ . Dans un modèle de surcharge de pression, les souris  $\beta$ ERKO (sans expression de ER $\beta$ ) développent une importante HC, alors que les  $\alpha$ ERKO (sans expression de ER $\alpha$ ) hypertrophient similairement aux contrôles [151]. Les souris  $\beta$ ERKO malades exprimeraient davantage des gènes pro-apoptotiques [152]. Un des mécanismes anti-hypertrophiques des œstrogènes serait via l'influence des histones déacétylases (HDAC). La stimulation de cardiomyocytes par l'angiotensine II ou l'endothéline 1 réduit l'expression et les niveaux protéiques des HDAC4 et 5, des HDAC de classe II ayant des effets antihypertrophiques. Une étude de Pendram *et al.* sur des cardiomyocytes *in vitro* a montré que la diminution des HDAC4 et 5 par l'angiotensine II ou l'endothéline 1 était réduite en présence d'œstrogènes ou d'un ligand de ER $\beta$  au niveau membranaire [65]. De plus, la stimulation de ER $\beta$  membranaire préviendrait la phosphorylation des HDAC4 et 5. L'angiotensine II et l'endothéline 1 augmentent la phosphorylation des HDAC 4 et 5, ce qui les fait sortir du noyau et inhibe leurs effets anti-hypertrophiques. Par contre, ER $\beta$  stimulé pourrait activer une protéine G inhibitrice, G $\alpha_i$ , ce qui inhiberait le stimulus calcique induit par l'angiotensine II ou l'endothéline 1 et bloquerait ainsi l'activation de la CaMKII qui ne pourrait plus phosphoryler HDAC4 [65]. ER $\beta$  influencerait aussi la phosphorylation de HDAC5, de manière indépendante du calcium, en inhibant l'activation de la PKC qui ne pourrait plus activer la PKD pour phosphoryler HDAC5 [65]. Un exemple des effets anti-hypertrophiques des œstrogènes est qu'ils causeraient une acétylation de la séquence promotrice du gène Myh7, codant pour la fibre contractile  $\beta$ -MHC, ce qui inhiberait son expression et bloquerait la transition de fibres contractiles en HC [153]. En outre, les œstrogènes pourraient influencer négativement HDAC2, une HDAC de classe I. Contrairement aux HDAC de classe II, HDAC2 a des effets pro-hypertrophiques lorsqu'elle est phosphorylée et se trouve au noyau. Lorsqu'activée par certaines kinases, HDAC2 inhiberait indirectement l'activité anti-

hypertrophique de GSK3 $\beta$ , ce qui augmenterait l'activité de facteurs de transcription pro-hypertrophiques comme GATA4 [154]. La stimulation de ER $\beta$  pourrait inhiber certaines kinases activant HDAC2 pour qu'elle reste non-phosphorylée et inactive [65].

En plus des effets sur les HDAC, la stimulation des ER $\beta$  membranaires inhiberait l'HC en favorisant la localisation nucléaire du facteur de transcription anti-hypertrophique KLF15 (Kruppel-like factor 15). Lors d'une stimulation à l'angiotensine II (de cardiomyocytes *in vitro* ou en perfusion sur des souris), KLF15 diminue. Cette diminution serait induite par le TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) sur les cardiomyocytes : ce facteur de croissance activerait la kinase TAK1 (TGF $\beta$  activating kinase 1), celle-ci activant p38 $\alpha$  et ce dernier inhibant l'expression de *Klf15* [155]. Les ER $\beta$  membranaires activés pourraient toutefois bloquer l'activation de TAK1 via l'activation de la protéine kinase A, ce qui maintiendrait les niveaux de KLF15 et permettrait une atténuation de la réponse hypertrophique [156].

La voie d'Akt favorise la survie et la croissance cellulaires et serait particulièrement sensible aux œstrogènes. Ce serait d'ailleurs une importante voie activée lors d'HC physiologique par exercice physique ou par la grossesse [68]. Les niveaux de GSK3 $\beta$  phosphorylé, une cible d'Akt, sont plus élevés chez des souris femelles entraînées par rapport aux mâles. L'activité d'Akt serait donc plus importante physiologiquement chez les individus féminins. Cette observation est aussi présente chez les femmes pré-ménopausées où les niveaux d'Akt phosphorylé au niveau nucléaire sont plus importants que chez les hommes ou les femmes ménopausées. Cela s'expliquerait par l'œstradiol, via ER $\beta$ , qui activerait la PI3K [134] et favoriserait la translocation d'Akt phosphorylée à la sérine 473 vers le noyau. La localisation nucléaire de phospho-Akt lui permet de phosphoryler le facteur de transcription pro-apoptotique Forkhead pour forcer sa sortie du noyau et ainsi inhiber ses effets de mort cellulaire, ce qui explique les effets de survie cellulaire par Akt [157].

La stimulation de ER $\beta$  par l'œstradiol pourrait inhiber l'activation de ERK habituellement présente lors de stimulation à l'angiotensine sur des souris. Cette stimulation de ER $\beta$  diminuerait aussi la fibrose cardiaque induite par l'angiotensine [153]. Chez les femelles, les œstrogènes diminueraient la fibrose lors de surcharge de pression via ER $\beta$ . Paradoxalement, chez les mâles, les œstrogènes activant ER $\beta$  pourraient induire de la fibrose, en augmentant l'expression de *Col1* et *Col3* [158].

Finalement, le métabolisme énergétique serait aussi influencé par les œstrogènes lors d'HC. Non seulement les mitochondries comportent des récepteurs aux œstrogènes qui pourraient servir de facteurs de transcription pour l'ADN mitochondrial, mais l'activation des récepteurs aux œstrogènes pourrait augmenter l'activité transcriptrice de PGC1 $\alpha$  au noyau en augmentant ses co-activateurs [142]. Les œstrogènes augmenteraient les niveaux de PGC-1 $\alpha$  et de PDK4, ce qui résulterait en une inhibition de l'oxydation du glucose et pourrait aussi favoriser l'utilisation des acides gras. Les œstrogènes viendraient donc contrer la transition métabolique fréquemment retrouvée en HC pathologique [66].

En plus des œstrogènes, les individus de sexe féminin synthétisent un autre stéroïde sexuel, la progestérone, qui a ses propres récepteurs nucléaires. La progestérone atteint un pic après l'ovulation afin de maintenir l'endomètre en place pour favoriser la gestation lorsque l'ovule est fécondé. Ses niveaux sont élevés lors de la grossesse [159]. On la retrouve aussi dans les thérapies de remplacement hormonal pour limiter la prolifération de l'endomètre causée par les œstrogènes non opposés [160]. La progestérone pourrait expliquer le gain de masse cardiaque associé à un maintien de la fonction cardiaque observé en grossesse [161] et jouerait potentiellement un rôle dans l'adaptation compensatrice du cœur à la surcharge de volume occasionnée par la grossesse. Cette HC physiologique serait médiée par une augmentation des niveaux de la calcineurine qui activeraient davantage le facteur de transcription pro-hypertrophique NFAT [161], mais aussi par une augmentation de l'activation d'Akt et de Erk1/2 et une diminution de p38 [162]. Cette HC de grossesse serait accompagnée d'une augmentation de l'utilisation des acides gras et d'une diminution de l'utilisation du glucose ou des lactates, ce qui est l'inverse de ce qui est souvent observé en HC pathologique. Ce profil métabolique du cœur lors de la grossesse serait médié en partie par la progestérone qui pourrait favoriser l'activité de PDK4 et ainsi, inhiber la transformation du pyruvate arrivant de la glycolyse par la PDH [163]. D'un autre côté, Feridooni *et al.* ont montré que l'exposition de courte durée de cardiomyocytes de souris femelles à la progestérone diminuait leur contractilité en réduisant la sensibilité des myofibrilles au calcium, ce qui ne serait pas le cas chez les cardiomyocytes de souris mâles étudiés [164]. Cet effet négatif de la progestérone pourrait être une piste d'explication pour les cardiomyopathies péripartum, lorsque la femme développe une insuffisance cardiaque en fin de grossesse ou peu de temps après avoir accouché. Cependant, d'autres changements hormonaux, comme l'augmentation de la prolactine, et au niveau du stress

oxydatif et du profil génétique semblent davantage contribuer au développement de cette maladie [165].

### 1.6.3.2 Les androgènes

Les androgènes sont les hormones sexuelles mâles et comprennent entre autres la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT). Ils sont majoritairement synthétisés par les testicules chez les mâles. Dans une moindre mesure, chez les femelles, les ovaires peuvent sécréter de faibles quantités d'androgènes. Chez l'humain, les androgènes peuvent aussi être synthétisés de façon périphérique par des précurseurs stéroïdiens produits par les glandes surrénales, mais ce mécanisme de production est surtout présent chez les primates et non chez la majorité des autres mammifères [166]. Un des effets connus des androgènes est son aspect anabolisant, c'est-à-dire qu'il favorise la synthèse de composés cellulaires, comme la production énergétique et la synthèse de fibres musculaires dans les myocytes. Ces effets de croissance musculaire sont d'ailleurs ceux recherchés par les consommateurs de stéroïdes anabolisants dans diverses disciplines sportives. Il a été observé que la prise de ces stéroïdes anabolisants ou d'androgènes à des doses supra-physiologiques mène à d'importantes complications cardiovasculaires : infarctus du myocarde, thromboses et embolies vasculaires, hypertrophie cardiaque, arythmies, insuffisance cardiaque ou même mort subite [167]. Au niveau cellulaire, la testostérone et la DHT peuvent induire l'hypertrophie de cardiomyocytes *in vitro*, l'hypertrophie par DHT favorisant même la synthèse d'ANP, un marqueur de stress cellulaire, par les cardiomyocytes [168]. L'administration de doses supra-physiologiques de testostérone chez le rat (dès un minimum de 5 mg/kg) induirait une hypertrophie physiologique et compensée après 4 semaines de traitement, alors qu'à 12 semaines, l'hypertrophie devient excentrée et pathologique avec une hausse du collagène myocardique [169]. Malgré ce profil à première vue néfaste pour le système cardiovasculaire, certaines études ont montré des effets bénéfiques d'une thérapie de remplacement d'androgènes chez des patients souffrant d'IC. L'IC induit un état de catabolisme systémique; elle favorise la dégradation des composés cellulaires, un effet opposé à l'anabolisme induit par les androgènes, d'où l'hypothèse que l'hypoandrogénisme contribue au catabolisme en IC [170]. Un hypoandrogénisme serait observé chez près de 25% des hommes avec IC. Bien que cette association puisse être biaisée par un âge plutôt avancé des patients atteints d'IC (diminution des niveaux d'androgènes à l'andropause et augmentation de l'incidence de l'IC en âge avancé), il y

aurait bel et bien une association entre une baisse des niveaux de testostérone libre sérique et la mortalité liée à l'IC. Or, il n'est pas encore clair si la baisse des androgènes prédispose à un mauvais pronostic cardiovasculaire ou si, à l'inverse, l'IC amène une hypo-production androgénique [171]. Étant donné que les androgènes induisent des effets anaboliques, une thérapie de remplacement hormonal pourrait contrer les conséquences cataboliques de l'IC, notamment sur les muscles périphériques. De plus, les hommes atteints d'un cancer de la prostate recevant un inhibiteur des récepteurs aux androgènes ou ayant été orchidectomisés auraient plus de risque de développer des maladies cardiovasculaires, dont l'insuffisance cardiaque [127]. Certaines études ont montré une amélioration de la capacité fonctionnelle lors d'IC grâce à un traitement de testostérone. L'accroissement de la masse musculaire et la diminution de la post-charge par vasodilatation périphérique pourraient expliquer les effets bénéfiques sur la capacité physique du patient. Malgré cette amélioration systémique, le traitement d'androgènes n'influencerait pas la fonction du cœur, les fractions d'éjection [172].

Tout comme les œstrogènes, les androgènes exercent leurs actions via des récepteurs nucléaires qui, lorsqu'activés, deviennent des facteurs de transcription [168]. Ces récepteurs seraient aussi présents au niveau membranaire pour activer rapidement certaines voies de signalisation. Les androgènes jouent potentiellement un rôle dans le développement de l'HC. Au niveau des cardiomyocytes, ces hormones activeraient la voie de PI3K/Akt, ce qui mènerait à l'inhibition de GSK3 $\beta$  et donc à la levée de l'inhibition sur NFAT, un facteur de transcription qui, rappelons-le, est pro-hypertrophique [85]. Un autre mécanisme d'induction d'HC par les androgènes serait via le calcium. Selon une étude *in vitro* sur cardiomyocytes, la testostérone lierait un GPCR qui active la phospholipase C et l'IP3 pour provoquer un relargage de calcium [173]. Ce calcium pourrait activer diverses voies de signalisation, notamment la CaMKII, ce qui pousserait une sortie des HDAC de classe II du noyau, la levée de l'inhibition de MEF2c et la transcription de gènes pro-hypertrophiques [174]. Le relargage de calcium pourrait aussi résulter en une activation de ERK1/2 qui activerait mTOR pour accroître la synthèse protéique. L'hypothèse est que l'augmentation calcique activerait la PKC qui phosphorylerait RAF1, une kinase en amont de ERK1/2 [175]. Selon une étude de Al Madhoun *et al.*, les récepteurs aux androgènes nucléaires pourraient influencer la transcription de *Mef2c*. Cette hypothèse découle de l'observation que les récepteurs aux androgènes activés jouent un rôle dans la différenciation des cardiomyocytes lors de l'embryogenèse en se liant à une région

promotrice de *Mef2c* et en activant sa transcription. Les récepteurs aux androgènes joueraient un rôle similaire dans l'expression de canaux calciques, comme le LTCC, ce qui favoriserait aussi la différenciation cellulaire [176]. Comme plusieurs gènes foetaux sont réexprimés lors d'HC, il serait possible que les récepteurs aux androgènes jouent un rôle de facteur de transcription dans le développement de l'HC. L'étude d'animaux TAC orchidectomisés, privés d'androgènes par ablation des testicules, a montré que malgré un niveau d'HC similaire entre les animaux intacts et orchidectomisés, ces derniers conservaient une meilleure fonction cardiaque, en plus de moins développer de dilatation cardiaque et de moins exprimer de gènes liés à la fibrose cardiaque [177].

L'influence des androgènes sur le métabolisme énergétique du cœur en HC a peu été étudiée. Par contre, l'idée que les androgènes optimisent l'entrée de substrats énergétiques et la production d'ATP pour favoriser un état anabolique plait à l'esprit. Une étude de Wilson *et al.* sur des cardiomyocytes in vitro, sans stimulus pro-hypertrophique tel que l'angiotensine ou l'isoprotérénol, a montré que la présence de testostérone dans le milieu de culture favorisait la localisation membranaire du transporteur de glucose GLUT4. Cet effet serait induit par l'activation de la CaMKII qui activerait l'AMPK pour induire la translocation membranaire de GLUT4 [178]. Par contre, cela n'a pas été étudié dans un contexte de stress myocardique.

En outre, les androgènes n'auraient pas tous le même effet sur le cœur : la DHT serait possiblement nuisible lors de l'HC [179], alors que la testostérone pourrait être bénéfique. La DHT peut être formée à partir de la testostérone grâce à la 5 $\alpha$ -réductase. Une étude sur des souris TAC traitées avec finastéride, un inhibiteur de la 5 $\alpha$ -réductase, a montré une diminution de l'HC, de la fibrose et de la dilatation, en plus d'une moins grande perte de fonction cardiaque et d'une meilleure survie et ce, chez des animaux mâles et femelles [179]. De plus, lors d'HC, chez l'humain et chez le rat, le métabolisme de la testostérone au cœur est accéléré, ce qui inclut une augmentation de la production de DHT potentiellement via une augmentation de l'expression de la 5- $\alpha$ -réductase [180]. Selon l'étude de Al Madhoun *et al.* citée plus haut, ce serait la DHT, plutôt que la testostérone, qui favoriserait la transcription de *Mef2c* lors de la différenciation des cardiomyocytes étant donné qu'un traitement par finastéride inhibait de manière dose-dépendante les effets de la testostérone sur la transcription de *Mef2c* [176]. En présence de testostérone, les fibroblastes cardiaques synthétiseraient moins de collagène lors d'une stimulation à

l'angiotensine II. Cet effet dans les fibroblastes cardiaques pourrait être médié par une inhibition de l'activation de la voie d'Akt et des Smad, des protéines impliquées dans la signalisation de TGF $\beta$  [181]. À l'inverse, l'incubation de cardiomyocytes et de fibroblastes cardiaques avec de la DHT résulterait en une augmentation de l'expression de TGF $\beta$ , ce qui pourrait induire de la fibrose [177]. Bref, les androgènes auraient une importante influence sur le cœur, mais il n'est pas encore clair s'ils sont néfastes ou bénéfiques lors d'HC. Leurs effets varieraient selon la concentration hormonale, la nature de l'hormone et le type cellulaire.

## **I.7 Problématique à l'étude**

Peu d'études se sont faites dans un contexte de surcharge de volume, les modèles de surcharge de pression pure (exemple du modèle par constriction trans-aortique, TAC) ayant été beaucoup plus étudiés. Bien qu'en clinique la régurgitation aortique (AR) soit moins fréquente que la sténose de cette valve en Occident, il n'en demeure pas moins pertinent d'étudier ce mécanisme de surcharge de volume. Le remplacement percutané de la valve aortique (TAVI) peut se compliquer d'une régurgitation aortique. L'augmentation de l'utilisation de cette technique s'accompagne d'une hausse de l'incidence de l'AR, une pathologie qui assombrit le pronostic des patients atteints [50]. De plus, dans les populations des pays en voie de développement et dans les populations autochtones en Australie ou ici, au Canada, les maladies valvulaires d'origine rhumatismale sont malheureusement encore bien présentes et atteignent souvent des patients jeunes [182, 183]. Elle occasionne d'importantes morbidité et mortalité dans ces populations qui n'ont généralement pas facilement accès au remplacement valvulaire [47, 182, 184].

Les études montrent que le sexe et les hormones sexuelles ont bel et bien un impact sur le développement de l'HC. Néanmoins, les résultats sont parfois contradictoires et les effets et mécanismes d'action respectifs de ces stéroïdes au cœur restent encore à être mieux définis. Lors d'une surcharge de pression, le sexe féminin développe davantage une HC concentrique et maintient sa fonction cardiaque, ce qui est contraire au sexe masculin dont les cavités cardiaques évoluent rapidement vers une forme dilatée moins fonctionnelle [138, 140]. Il serait donc pertinent d'évaluer si, en imposant une surcharge de volume similaire entre des animaux mâles et femelles, ceux-ci conservent leurs tendances dans la

morphologie hypertrophique ou s'ils développent une HC excentrée comme attendu dans ce type de stress hémodynamique. De plus, les hormones sexuelles influenceraient la réponse hypertrophique, mais la nature de leurs effets selon différents mécanismes hypertrophiques reste à être mieux comprise. Il a longtemps été pensé que les œstrogènes sont bénéfiques pour le cœur, jusqu'à ce que les études WHI et HERS montrent une hausse des maladies cardiovasculaires avec l'hormonothérapie de remplacement [145, 146]. À l'inverse, les androgènes ont longtemps été considérés comme néfastes pour le système cardiovasculaire jusqu'à ce que l'association entre la sévérité de l'insuffisance cardiaque, la hausse de la mortalité cardiovasculaire et l'hypoandrogénisme soit mise en évidence [171]. Les effets des œstrogènes ont été davantage étudiés que ceux des androgènes. Un modèle de surcharge de volume par fistule aorto-cave a montré que l'ovariectomie favorise le gain de masse du cœur et sa dilatation [149]. Dans ce même modèle, le traitement d'animaux mâles avec des œstrogènes permettrait de diminuer la dilatation cardiaque et de conserver la fonction cardiaque [185]. Or, l'influence des androgènes dans un modèle de surcharge de volume n'a, à ma connaissance, jamais été étudiée.

## **I.8 Hypothèses et objectifs de la recherche**

Dans un premier temps, mon objectif était de comparer l'HC secondaire à une surcharge de volume chronique entre des rats mâles et des rats femelles. Cette comparaison s'effectuait d'abord au niveau du gain de masse du cœur, notre variable primaire. Les variables secondaires de morphologie du remodelage cardiaque, de profil transcriptionnel du myocarde et de l'activité d'enzymes du métabolisme énergétique faisaient aussi partie de la comparaison entre les sexes. Mon hypothèse était que l'HC des animaux mâles différerait de celle des femelles et que ces dernières développeraient une HC plutôt compensée, c'est-à-dire peu dilatée et sans perte de fonction cardiaque. Les mâles développeraient une HC plutôt dilatée associée à une perte de fonction cardiaque. Au niveau du profil transcriptionnel et du métabolisme énergétique, ceux-ci seraient davantage modifiés par la maladie chez les mâles puisque ce sont ces derniers qui présenteraient une réponse hypertrophique moins bien adaptée. Cette hypothèse est basée sur des études antérieures de surcharge de volume globale à tout le cœur de Dent *et al.* et de Gardner *et al.* où des rats mâles évoluent rapidement vers des cavités cardiaques dilatées et une insuffisance cardiaque [139, 140].

Ayant observé des différences significatives entre les sexes dans la première partie de l'étude, nous avons voulu étudier si ce dimorphisme était en partie attribuable aux hormones sexuelles, soit aux androgènes chez les mâles et aux œstrogènes chez les femelles. Mon objectif pour cette seconde partie du projet était de comparer l'HC secondaire à une surcharge de volume chronique entre des rats privés d'hormones sexuelles par gonadectomie et des rats intacts (non gonadectomisés) pour chaque sexe. Notons que chez le rat Wistar il n'y a pas de production d'androgènes aux surrénales, ce qui permet une suppression complète de ces hormones sexuelles grâce à l'orchidectomie [166]. J'ai encore une fois étudié le gain de masse cardiaque comme variable primaire et comme variables secondaires, le profil transcriptionnel, l'activité d'enzymes du métabolisme énergétique et en nouveauté, le contenu et la forme de protéines impliquées dans la signalisation de voies hypertrophiques. Chez les mâles, mon hypothèse était que l'absence d'androgènes diminuerait la réponse hypertrophique et pourrait amener une meilleure compensation cardiaque, tout en atténuant les changements au niveau du métabolisme énergétique. Comme mentionné plus tôt, les androgènes ont des effets pro-hypertrophiques sur les cardiomyocytes [168]. De manière plus spécifique, la DHT pourrait induire une HC peu compensatrice. Une étude de Zwadlo *et al.* sur un modèle de surcharge de pression a montré que l'inhibition de la transformation de la testostérone en DHT diminuait la fibrose et la dilatation cardiaques et améliorait la fonction du cœur et la survie des animaux [186]. Ces effets des androgènes, et plus particulièrement de la DHT, pourraient être responsables de l'hypertrophie peu adaptée observée chez ce sexe. Chez les femelles, mon hypothèse était que la perte des œstrogènes augmenterait la réponse hypertrophique, étant donné que ces hormones auraient des effets anti-hypertrophiques sur le cœur [151, 156]. Globalement, mon hypothèse était que les mâles intacts auraient une importante HC qui évoluerait vers une dilatation et une perte de fonction cardiaque, que les animaux gonadectomisés mâles et femelles auraient un profil hypertrophique similaire et que les femelles intactes auraient un degré d'HC moindre, mais qui compenserait bien la surcharge.

# **Chapitre 1 - Female rats with severe left ventricle volume overload exhibit more cardiac hypertrophy but fewer myocardial transcriptional changes than males**

## **1.1 Résumé**

Lorsque le cœur d'animaux mâles est soumis à une surcharge hémodynamique, celui-ci progresse plus rapidement vers l'insuffisance cardiaque que les femelles. Nous avons étudié le dimorphisme sexuel dans la réponse hypertrophique d'animaux mâles et femelles soumis à une surcharge de volume induite par une régurgitation aortique (AR). Pour chaque sexe, les animaux ont subi l'induction de l'AR ou une chirurgie fantôme (Sham) et ont été suivis durant 26 semaines. Le gain de masse cardiaque et l'épaississement des parois était significativement plus important chez les femelles AR (ARf) que chez les mâles AR (ARm). Toutefois, les ARm ont eu une diminution de l'expression de gènes liés à la  $\beta$ -oxydation et à la fonction et biogenèse mitochondriales, de même que de l'activité d'une enzyme étant liée à la  $\beta$ -oxydation. Le profil transcriptionnel est resté relativement stable chez les ARf, ce qui pourrait les aider à développer une hypertrophie cardiaque plus compensatrice.

## 1.2 Abstract

**Background:** Aortic valve regurgitation (AR) imposes a volume overload (VO) to the left ventricle (LV). Male rats with a pathological heart overload usually progress more quickly towards heart failure than females. We examined whether a sexual dimorphism exists in the myocardial transcriptional adaptations to AR.

**Methods:** Adult Wistar male and female rats either underwent a sham operation or were induced with AR and then followed for 26 weeks.

**Results:** Female AR rats gained relatively more LV mass than males (75 vs. 42%). They had a similar increase in LV chamber dimensions compared to males but more wall thickening. On the other hand, fatty acid oxidation (FAO)-related LV enzyme activity was only decreased in AR males. The expression of genes encoding FAO-related enzymes was only reduced in AR males and not in females. A similar situation was observed for the expression of genes involved in mitochondrial biogenesis or function as well as for genes encoding for transcription factors implicated in the control of bioenergetics and mitochondrial function ( $Err\alpha$ ,  $Err\gamma$  or  $Pgc1\alpha$ ).

**Conclusion:** Although females develop more LV hypertrophy from severe VO, their myocardial gene expression remains closer to normal. This could provide survival benefits for females with severe VO.

Key words: sex dimorphism, volume overload, hypertrophy, cardiomyopathy, aortic valve, insufficiency, rat, gene expression

### 1.3 Page titre

Female rats with severe left ventricle volume overload exhibit more cardiac hypertrophy but fewer myocardial transcriptional changes than males.

Catherine Beaumont<sup>1</sup>, Élisabeth Walsh-Wilkinson<sup>1</sup>, Marie-Claude Drolet, Élise Roussel, Dominic Lachance, Marie Arsenault and Jacques Couet.

Groupe de recherche sur les valvulopathies, Centre de Recherche, Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Université Laval, Quebec City, Canada.

Running title: Sexual dimorphism in rats with aortic valve regurgitation.

<sup>1</sup>: These authors have contributed equally to this work.

Corresponding authors: Jacques Couet PhD and Marie Arsenault MD  
Groupe de Recherche en Valvulopathies, Centre de Recherche,  
Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec  
2725, Chemin Sainte-Foy, Québec, (Québec), Canada, G1V 4G5  
Phone: 1-418-656-4760; Fax: 1-418-656-4509  
Email: jacques.couet@med.ulaval.ca or marie.arsenault@criucpq.ulaval.ca

## 1.4 Introduction

Cardiac hypertrophy (H) is used as a prognostic indicator of progression towards heart failure (HF). HF occurs in women as frequently as in men but later in life and less often from ischaemic causes [1]. Women are more likely than men to develop HF with preserved ejection fraction (HFpEF) associated with diastolic dysfunction and concentric left ventricle (LV) remodelling. Unfortunately, no treatment has been proven effective for HFpEF. LVH becomes more prevalent in women after menopause and constitutes the strongest mortality predictor from HF [2]. Pressure overload causes concentric LV hypertrophy. In pressure overload (PO) diseases such as aortic valve stenosis or arterial hypertension, female patients usually develop more LVH, although they have better EF and less myocardial fibrosis than male patients [3, 4]. Hypertensive women also develop more LVH compared to men even for similar blood pressure levels [4]. Volume overload (VO) typically induces eccentric LV hypertrophy. Sex differences in patients with volume overload (VO) diseases (heart valve regurgitations) remain mostly unstudied.

In pre-clinical heart disease models in rodents (either rat or mouse), oestrogens have been shown to slow the development of LVH, delay HF and improve survival [5, 6]. For instance, male mice with transverse aortic constriction (TAC; a PO model) develop concentric LVH sooner than females [7]. LV remodelling in these male TAC mice later evolves towards eccentric LVH and HF symptoms [8]. Genes associated with extracellular matrix (ECM) production or with mitochondrial function are also more strongly modulated in males. Similar observations have been made in several other animal models of LVH and/or HF [5, 6]. Two VO models have been studied in rats. Females with arteriovenous fistula (AVF) develop a similar amount or more LVH than males [9-12]. Progression towards HF is slower for females, and their survival rate is higher [13]. In the aortic valve regurgitation (AR) rat model, we observed that females developed more LVH than males and that removing oestrogens with by performing an ovariectomy did not influence LVH development [14].

In both pre-clinical PO and VO rodent models, the development of HF seems to be slower in females, but this may not be directly linked to levels of cardiac hypertrophy. Therefore, we wanted to investigate sex differences in myocardial transcriptional adaptations to severe VO from severe AR. We demonstrate that LV gene expression in rats

with severe AR is significantly less altered in females, although they developed significantly more cardiac hypertrophy than males.

## 1.5 Results

All sham-operated animals were alive at the end of the protocol. Three male AR rats and one female AR rat died suddenly overnight before the end of the six-month follow-up period. No animals developed signs of heart failure, defined as dyspnoea, peripheral oedema or excessive weight gain. [Table 1.1](#) summarizes the animal characteristics after 6 months. AR animals tended to have lower body weight ( $p=0.13$ ) and to be leaner ( $p=0.11$ ).

### 1.5.1 Cardiac hypertrophy

AR caused a significant gain of cardiac mass for both male and female rats ([Table 1.1](#)). This gain of mass was proportionally more important in females than in males (75% vs. 42%, respectively), although the severity of AR was similar ([Table 1.2](#)). The relative left and right ventricle (RV) weights indexed for body weight were also increased more in female AR rats than in males (LV: 82% vs. 64% and RV: 70% vs. 38%, respectively).

### 1.5.2 Echocardiographic data

As expected, AR caused marked LV dilatation, as illustrated by an increase in the end-diastolic dimensions ([Table 1.2](#)) that was similar for both sexes (~30%). End-systolic diameters were also significantly increased in male (+59%) and female (+43%) AR rats, resulting in a larger decrease in LV fractional shortening (FS) in males (-20%) than in females (-11%;  $p=0.0015$ ). Another index of systolic function, the LV mid-wall velocity (WVI), was lower in the male AR group than in the female group ( $p=0.041$ ). Septal wall thickness increased in AR females ( $p=0.024$ ) but not in males. A similar trend was also observed for the LV posterior wall ( $p=0.12$ ). Both AR males and females displayed eccentric LV remodelling, as evidenced by a decrease in relative wall thickness (RWT;  $(SW+PW)/EDD$ ) compared to sham animals. The LV remodelling tended to be less eccentric in females than in males, however ( $p=0.055$ ). The calculated mean LV wall stress [15] resulting from AR

was moderately higher in males than in females compared to sham controls (+47% vs. +37%, respectively). The myocardial performance index or MPI (a composite index reflecting global systolic-diastolic performance) was similar between male and female AR animals.

### 1.5.3 Hemodynamic measurements

Heart rates were lower in AR groups ([Table 1.3](#)). Stroke volume doubled in male AR rats (+102%), whereas it only increased by 63% in females. The calculated cardiac output was significantly increased in both AR groups versus the sham groups and again, more in males than in females (85% vs. 53%, respectively). Invasive intra-cardiac measurements yielded similar  $dP/dt+$  values in all 4 groups, although they tended to be lower in AR groups. The same was true for the  $dP/dt-$  values that were significantly lower in both AR groups, this being more evident in females. LV end-diastolic pressures (EDP) tended to be higher in male rats, but they were similarly increased in AR male and female rats. Systolic arterial pressures were similar between the four groups. As expected, diastolic arterial pressure was decreased in AR animals (a feature of the disease) but to the same extent in both sexes, leading to increased pulse pressure.

### 1.5.4 Evolution of LV remodelling and function during the course of the study

We measured the variation of different echocardiographic parameters during the 26 weeks of the study by comparing values at the end of the protocol to those at baseline in order to emphasize both the contributions of the volume overload and normal growth on cardiac remodelling. As illustrated in [Figure 1.1A](#) and [B](#), LV chamber dimensions (systolic and diastolic) increased by the same extent in male and female AR rats. On the other hand, this was accompanied by more thickening of the septum in the ArF group and of the posterior wall in both ShF and ArF groups ([Figure 1.1C](#) and [D](#)). This resulted in less eccentric LV remodelling over time as well as in a smaller increase in stroke volume in AR females compared to males. The increase in LV wall stress was slightly more important in male AR rats than in females ([Figure 1.1F](#)).

### 1.5.5 Tissue analysis

We did not observe any significant differences between groups after 6 months in terms of interstitial LV fibrosis as estimated by Masson's trichrome staining (not shown). Cardiomyocyte cross-sectional area (CSA) was increased in AR animals compared to sham animals, as illustrated in [Figure 1.2A](#) and [C](#). LV capillary density was significantly reduced in the ArM group but remained normal in ArF animals ([Figure 1.2B](#) and [D](#)).

### 1.5.6 Markers of hypertrophy and extracellular matrix remodelling

As expected, Anp and Bnp gene expression was elevated in AR animals ([Figure 1.3A](#); see [Table 1.S1](#) for complete gene names). The increase in Anp expression was stronger in males. Trp6 (transient receptor potential channel 6) gene expression was elevated in male AR animals but not in females. The same was observed for pro-collagen 1 (Col1a). Serca2 and Myh6 mRNA levels were down-regulated only in the ArM group ([Figure 1.3B](#)). Baseline levels of expression for the genes illustrated in [Figure 1.3](#) were similar between male and female sham-operated rats, with the exception of higher expression of Myh6 in females and Col3 and Lox in males ([Figure 1.S1](#)).

### 1.5.7 LV energy metabolism and markers

Fatty acid oxidation (FAO) capacity was impaired in the LV of AR rats, as illustrated by the decreased hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase (HADH) enzymatic activity ([Figure 1.4A](#)). This was statistically significant only for males, whereas it remained stable in females. Hexokinase activity was increased in both AR groups, while citrate synthase activity remained stable ([Figure 1.4B](#) and [C](#)). The activity of succinate dehydrogenase, the only enzyme that participates in both the citric acid cycle and in the respiratory chain, was significantly reduced in males AR rats but not in females.

In a previous gene expression profiling study, we observed that a number of genes related to FAO were down-regulated in AR male rats after 9 months of severe volume overload [16]. The expression levels of most of these genes were significantly decreased in male AR rats, whereas this decrease was only minimal in females ([Figure 1.5A](#) and [C](#)). A

similar pattern was observed for genes involved in myocardial glucose utilization ([Figure 1.5B](#)). The expression of several transcription factor genes implicated in myocardial bioenergetics followed this trend, being more altered in males than in females ([Figure 1.5D](#)). The baseline levels of expression of several FAO (Cpt1b, Hadh, HadhA and HadhB) and glycolysis (Glut4 and Pdh1 $\alpha$ ) genes were lower in females, as illustrated in [Figure 1.S2](#). On the other hand, the mRNA levels of Err $\gamma$ , Sirt and Pgc1 $\alpha$  were higher in ShF than in ShM animals.

### 1.5.8 Markers of mitochondrial function

We previously identified a group of 54 genes that were associated with mitochondrial function and down-regulated in male AR rats [16]. Here, we studied a subset (12) of these genes, as illustrated in [Figure 1.6](#). The mRNA levels of genes related to the citric acid cycle, the respiratory chain or mitochondrial biogenesis were more altered in male AR rats compared to females. Baseline levels in sham-operated animals were similar between male and female animals, the only exception being Atp5a1 ([Figure 1.S3](#)).

## 1.6 Discussion

The main observation of this study is that the female sex is associated with a myocardial transcriptional profile that is closer to normal despite developing more hypertrophy in response to volume overload. There was more LV wall thickening in female AR animals, whereas chamber dilation was relatively similar, resulting in less eccentric LV remodelling compared to males. This remodelling was accompanied by lower levels of wall stress in females despite higher levels of hypertrophy and a similar degree of aortic valve regurgitation.

Most bioenergetics and mitochondrial function markers we measured remained in the normal or near-normal range in female AR animals, whereas they were clearly lowered in males. This suggests that the cardiac hypertrophy level cannot be considered to have a similar predictive value for the progression towards HF for both sexes. Relatively normal myocardial bioenergetics in females in spite of the presence of more cardiac hypertrophy may explain why their progression towards HF is slower than in males with VO [11, 13, 17,

18]. The different LV remodelling pattern (less eccentric in females) also seems to result in lower wall stress, which may play a role in maintaining normal myocardial bioenergetics. On the other hand, the increase in LV wall stress caused by VO in female rats remained important. However, the moderate transcriptional and metabolic responses of the myocardium to this significant stress are surprising.

Chronic and pathologic cardiac overload leads to neurohormonal activation. We previously demonstrated that blocking these systems (adrenergic and/or renin-angiotensin-aldosterone) led to decreased LV hypertrophy in the AR rat model and better survival [19-21]. Dent and collaborators demonstrated the presence of sex differences in neurohormonal activation in the arteriovenous fistula (ARF) VO model. After 16 weeks of VO from ARF, they observed that the protein levels of both the  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2-adrenergic receptors were decreased in male rats but increased in females. Catecholamine plasma levels were also significantly lower in females. This was accompanied with increased adenylate cyclase activity, suggesting that  $\beta$ -AR levels and function remained mostly normal in female ARF animals[9]. This could likely contribute to the maintenance of relatively normal energy metabolism and mitochondrial function as we observed in our study, considering the importance of this system in regulating metabolism [22, 23]. We did not observe marked sex differences in the expression of the adrenergic receptors at the gene level ([Figure 1.S4](#)) between our groups, but this does not exclude differences at another level. We previously reported increased catecholamine levels in male AR rats [24] but only minimal changes in the mRNA levels of  $\beta$ -Ars [20, 24].

Sex differences in the development of cardiac hypertrophy have been studied in several animal models. In Wistar rats with ascending aortic banding, LV hypertrophy was shown to be similar between the sexes, but progression towards HF was faster in males [25, 26]. In that PO model, the mRNA levels of Anp, Myh7 and Serca2a were all more altered in males than in females. In mice with TAC, males also developed similar levels of hypertrophy compared to females but displayed more myocardial fibrosis and progressed faster to HF [7, 27]. Interestingly, many genes associated with mitochondrial function were more down-regulated in males than in females [27]. In our study, we observed after 6 months a general reduction in the expression of many mitochondrial function markers in males, while these markers remained mostly unchanged in females. We showed in a previous study that the amount of LV mitochondrial DNA in our model after 9 months was similar to controls [16].

However, this result did not prove that mitochondrial morphology was normal in our rats. Although we did not thoroughly evaluate mitochondrial function in this study, our transcriptional profile indicates that mitochondrial function is worse in male AR rats. Moreover, we observed that the activity of succinate dehydrogenase, an enzyme implicated in both the citric acid cycle and the respiratory chain, was reduced again only in male AR rats [28]. Pgc1 $\alpha$ , an important factor in the control of mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation (FAO), followed the same expression pattern [27]. Pgc1 $\alpha$  was previously demonstrated to be positively modulated by oestrogens, which could explain our observation. In a mouse model of doxorubicin-mediated cardiotoxicity, similar sex differences were observed. The male myocardial transcription profile of genes associated with mitochondrial function was more altered than the female profile. This correlated with poorer LV systolic function and survival [29].

We observed that FAO was impaired in male AR animals. This is in accordance with previous observations made in this model [16, 19, 30]. We also know from previous  $\mu$ PET studies performed in male rats with chronic AR that glucose utilization is also increased at this stage of the disease [19]. Our current results suggest that this energy substrate shift to glucose may have not taken place in female AR rats. Eccentric cardiac hypertrophy does not seem to trigger changes in myocardial substrate preference in female rats. It is interesting to note that myocardial capillary density seemed less affected in female AR rats, suggesting a better myocardial angiogenic response to severe VO [31]. This may result in not only better nutrient availability to the cardiac cells but also better oxygen availability, facilitating FAO, a highly oxygen-consuming process compared to glycolysis [32]. These observations support the need to investigate further and to study myocardial energy substrate avidity by  $\mu$ PET in animals of both sexes [16, 19, 33].

In addition to Pgc1 $\alpha$ , the expression of both oestrogen receptor-related (Err) transcription factors ( $\alpha$  and  $\gamma$ ) was reduced in AR males but remained unchanged in females. Err transcription factors regulate genes involved in FAO, mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation [34, 35]. Their impact is probably even more important than that of Pgc1 $\alpha$ , which is not down-regulated in patients with HF [36]. Err $\alpha$  is also a known downstream target of the oestrogen receptor  $\alpha$ , which could explain the maintained mRNA levels of various genes in females [37].

The role of oestrogens in the rat AR model of LV remodelling is still unclear. Ovariectomy does not influence the level of LV hypertrophy in the rat AR model [14]. This previous study was too small to address whether oestrogen removal influences survival. The current results suggest that the female sex provides benefits, but we are not able to determine whether oestrogens are responsible for these benefits during the evolution of eccentric LVH. Dent and collaborators reported in the ARF model that ovariectomy was associated with less hypertrophy but more LV dilation and that exogenous oestradiol administration reversed this effect [11]. Interestingly, the presence or absence of oestrogens had important effects on the myocardial  $\beta$ -AR content, plasma catecholamine levels and adenylate cyclase activity in ARF rats. Oestrogens can also stimulate calcineurin degradation downstream of these signalling pathways, attenuating the evolution of cardiac hypertrophy towards HF [38]. In this study, oestradiol replacement therapy in ovariectomized TAC mice was also shown to limit cardiomyocyte elongation without affecting width, suggesting a capacity of oestrogens to delay eccentric hypertrophy, decompensation and possibly HF.

### 1.6.1 Study limitations

Our results support that the female sex provides benefits in keeping closer to normal myocardial function and bioenergetics in presence of severe VO and this despite important LV remodelling. This is in line with other observations relating to cardiac hypertrophy made in women [1, 8]. Heart adaptations to VO in women (with the exception of pregnancy) have received very little attention so far. Observations made in animals cannot necessarily be transposed to humans, and caution must be used. This study did not take into account ageing and menopause, factors that are highly relevant to heart disease in women. The effect of gonadectomy and hormone replacement therapy was not assessed in this study. We did not perform a thorough evaluation of mitochondrial function or neurohormonal status, but limited ourselves to primarily studying gene expression. It is likely that an analysis performed at the level of proteins, enzymatic activity or function would have provided more definitive conclusions.

## 1.7 Conclusion

In this study, we showed that the abnormal transcriptional pattern usually associated with pathological cardiac hypertrophy does not occur in female rats with severe aortic valve regurgitation, despite an important gain in heart mass. We observed that cardiac remodelling in AR female rats leads to moderately less LV eccentricity and wall stress, better capillary density and more stable expression of many myocardial bioenergetics and mitochondrial function markers. The precise role of oestrogens during LV eccentric hypertrophy development will need to be addressed in upcoming studies.

## 1.8 Methods

### 1.8.1 Animals

Wistar male (350–375 g) and female (225–250 g) rats purchased from Charles River (Saint-Constant QC, Canada) were studied for 180 days (26 weeks). The animals were divided into four groups: male sham-operated animals (ShM; n=11), female sham (ShF; n=8), males with aortic regurgitation (ArM; n=10) and female AR (ArF; n=7). The protocol was approved by the Université Laval's Animal Protection Committee and followed the recommendations of the Canadian Council on Laboratory Animal Care. Severe AR was induced by retrograde puncture of the aortic valve leaflets under echocardiographic guidance as previously described [39, 40]. Only animals with >60% regurgitation were included in the study. The regurgitant fraction was estimated by the ratio of the forward systolic flow time–velocity integral (VTI) to the reversed diastolic flow VTI measured by pulsed Doppler in the thoracic descending aorta.

Left ventricular and arterial pressures and dP/dT (positive and negative) were measured invasively using a dedicated catheter under isoflurane anaesthesia (5 animals/gr.) [41]. A complete echo exam was performed before AR induction and at the end of the protocol as previously described [19, 39, 42, 43]. LV mass was calculated by the following formula:  $1.04((\text{EDD} + \text{PW} + \text{SW})^3 - \text{EDD}^3)$ . EDD, PW, and SW are end-diastolic diameter, posterior wall thickness, and septal wall thickness, respectively. Left ventricular mean wall

stress was estimated using the formula developed by Quinones *et al.*:  $SAP \times ((EDD+ESD)/2 \times (PWd + PWs))$ . SAP, ESD, PWd, and PWs are systolic arterial pressure, end-systolic diameter, diastolic posterior wall thickness, and systolic posterior wall thickness, respectively [15]. The hearts were harvested as previously described [14, 24].

### 1.8.2 Cardiomyocyte cross-sectional area

Sections from paraffin-embedded mid-LV portions were stained using Masson's trichrome staining. Three sections per slide were studied for the evaluation of cross-sectional area (CSA) of the cardiomyocytes as described previously [44].

### 1.8.3 Staining for capillary density measurement

Sections of 8- $\mu$ m thickness were cut from the frozen LV and were stained with isolectin B4 from *Bandeiraea simplicifolia* coupled with horseradish peroxidase (Sigma, Mississauga, ON, Canada). Capillary density was analysed in the subendocardial region of the LV myocardium (inner third) as described elsewhere [31].

### 1.8.4 Analysis of mRNA accumulation by quantitative RT-PCR

The analysis of LV mRNA levels by quantitative RT-PCR has been described in detail elsewhere [45]. QuantiTect (Qiagen) and IDT (Coralville, Iowa) Primer Assays (preoptimized specific primer pairs; [Table 1.S1](#)) and QuantiFast SYBR Green PCR kits (Qiagen) were used. We also used two pairs of non-pre-optimized primers for Echs1 (5'-GCTTTCAGGGTGTCTTGATTTG-3' and 5'-GAGCTATGCACTGCAGATAGT-3'; 95 bp transcript) and Sirt1 (5'-GAACCTCTGCCTCTACATT-3' and 5'-CATACTCGCCACCTAACCTATG-3'; 94 bp transcript). Cyclophilin A (Ppia) was used as the control "housekeeping" gene.

### 1.8.5 Enzymatic activity determination

Left ventricle samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed for maximal ( $V_{\text{max}}$ ) enzyme activities. Small pieces of LV (20-30 mg) were homogenized in a glass-glass homogenizer with either 9 or 39 volumes of ice-cold extracting medium pH 7.4 (250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA) depending on the enzyme activity assayed. Enzymatic activities for hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase (HADH), hexokinase (HK), citrate synthase (CS) and succinate dehydrogenase (SDH) were determined as previously described [28, 46].

### 1.8.6 Statistical analysis

Results are presented as the mean  $\pm$  SEM. Intergroup comparisons were performed using a 2-way ANOVA followed by a Holm-Sidak post-test. Student's t test was used when two groups were compared directly. Statistical significance was set at a p value  $<0.05$ . The statistical analyses were performed using Graph Pad Prism version 7.02 for Windows, Graph Pad Software (San Diego CA). All methods were carried out in accordance with the relevant guidelines and regulations.

## 1.9 Author contribution statement and Acknowledgements

CB and EWW performed the gene expression and enzyme activity studies and designed most of the figures. MCD and DL managed the animal study and performed echocardiography. ER performed the LV morphology analyses and assisted during the animal surgeries. MA and JC conceived the study and wrote the manuscript.

The authors want to thank Éric Plante, Adnane Zendaoui and Andrée-Anne Bouchard-Thomassin for their contribution to the realization of this study. This work was supported by operating grants to Dr Couet and Arsenault from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-61818 and MOP-106479), the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC) and the Quebec Heart and Lung University Institute Foundation (FIUCPQ). There are no financial disclosures for any of the authors involved in this manuscript.

## 1.10 References

1. Taylor, A.L., *Heart failure in women*. *Curr Heart Fail Rep*, 2015. **12**(2): p. 187-95.
2. Merz, A.A. and S. Cheng, *Sex differences in cardiovascular ageing*. *Heart*, 2016. **102**(11): p. 825-31.
3. Regitz-Zagrosek, V. and U. Seeland, *Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure*. *Wien Med Wochenschr*, 2011. **161**(5-6): p. 109-16.
4. Doumas, M., et al., *Gender differences in hypertension: myths and reality*. *Curr Hypertens Rep*, 2013. **15**(4): p. 321-30.
5. Mahmoodzadeh, S., D. Fliegner, and E. Dworatzek, *Sex differences in animal models for cardiovascular diseases and the role of estrogen*. *Handb Exp Pharmacol*, 2012(214): p. 23-48.
6. Blenck, C.L., et al., *The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease*. *Circ Res*, 2016. **118**(8): p. 1294-312.
7. Fliegner, D., et al., *Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010. **298**(6): p. R1597-606.
8. Regitz-Zagrosek, V., et al., *Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure*. *Circ J*, 2010. **74**(7): p. 1265-73.
9. Dent, M.R., P.S. Tappia, and N.S. Dhalla, *Gender related alterations of beta-adrenoceptor mechanisms in heart failure due to arteriovenous fistula*. *J Cell Physiol*, 2012. **227**(8): p. 3080-7.
10. Dent, M.R., P.S. Tappia, and N.S. Dhalla, *Gender differences in beta-adrenoceptor system in cardiac hypertrophy due to arteriovenous fistula*. *J Cell Physiol*, 2011. **226**(1): p. 181-6.
11. Dent, M.R., P.S. Tappia, and N.S. Dhalla, *Gender differences in cardiac dysfunction and remodeling due to volume overload*. *J Card Fail*, 2010. **16**(5): p. 439-49.
12. Dent, M.R., P.S. Tappia, and N.S. Dhalla, *Gender differences in apoptotic signaling in heart failure due to volume overload*. *Apoptosis*, 2010. **15**(4): p. 499-510.
13. Gardner, J.D., et al., *Estrogen attenuates chronic volume overload induced structural and functional remodeling in male rat hearts*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **298**(2): p. H497-504.
14. Drolet, M.C., et al., *Gender-related differences in left ventricular remodeling in chronic severe aortic valve regurgitation in rats*. *J Heart Valve Dis*, 2006. **15**(3): p. 345-51.
15. Quinones, M.A., et al., *Noninvasive quantification of left ventricular wall stress. Validation of method and application to assessment of chronic pressure overload*. *Am J Cardiol*, 1980. **45**(4): p. 782-90.
16. Roussel, E., et al., *Transcriptional Changes Associated with Long-Term Left Ventricle Volume Overload in Rats: Impact on Enzymes Related to Myocardial Energy Metabolism*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 949624.
17. Brower, G.L., J.D. Gardner, and J.S. Janicki, *Gender mediated cardiac protection from adverse ventricular remodeling is abolished by ovariectomy*. *Mol Cell Biochem*, 2003. **251**(1-2): p. 89-95.
18. Gardner, J.D., G.L. Brower, and J.S. Janicki, *Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload*. *J Card Fail*, 2002. **8**(2): p. 101-7.
19. Arsenault, M., et al., *Angiotensin II-converting enzyme inhibition improves survival, ventricular remodeling, and myocardial energetics in experimental aortic regurgitation*. *Circ Heart Fail*, 2013. **6**(5): p. 1021-8.
20. Plante, E., et al., *Benefits of long-term beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **294**(4): p. H1888-95.
21. Zendaoui, A., et al., *Effects of spironolactone treatment on an experimental model of chronic aortic valve regurgitation*. *J Heart Valve Dis*, 2012. **21**(4): p. 478-86.
22. Santulli, G. and G. Iaccarino, *Adrenergic signaling in heart failure and cardiovascular aging*. *Maturitas*, 2016. **93**: p. 65-72.
23. Ciccarelli, M., et al., *Adrenergic receptors and metabolism: role in development of cardiovascular disease*. *Front Physiol*, 2013. **4**: p. 265.
24. Plante, E., et al., *Effectiveness of beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation*. *Circulation*, 2004. **110**(11): p. 1477-83.
25. Weinberg, E.O., et al., *Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy*. *J Am Coll Cardiol*, 1999. **34**(1): p. 264-73.

26. Douglas, P.S., et al., *Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(4): p. 1118-25.
27. Witt, H., et al., *Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice*. J Mol Med (Berl), 2008. **86**(9): p. 1013-24.
28. Bouchard-Thomassin, A.A., et al., *A high-fructose diet worsens eccentric left ventricular hypertrophy in experimental volume overload*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(1): p. H125-34.
29. Moulin, M., et al., *Sexual dimorphism of doxorubicin-mediated cardiotoxicity: potential role of energy metabolism remodeling*. Circ Heart Fail, 2015. **8**(1): p. 98-108.
30. Lachance, D., et al., *Endurance training or beta-blockade can partially block the energy metabolism remodeling taking place in experimental chronic left ventricle volume overload*. BMC Cardiovasc Disord, 2014. **14**: p. 190.
31. Zendaoui, A., et al., *Usefulness of carvedilol in the treatment of chronic aortic valve regurgitation*. Circ Heart Fail, 2011. **4**(2): p. 207-13.
32. Lopaschuk, G.D., et al., *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease*. Physiol Rev, 2010. **90**(1): p. 207-58.
33. Dhahri, W., et al., *Metformin Reduces Left Ventricular Eccentric Re-modeling In Experimental volume Overload in the Rat*. J Clin Exp Cardiol, 2012. **13**(11): p. 8.
34. Huss, J.M., et al., *The nuclear receptor ERRalpha is required for the bioenergetic and functional adaptation to cardiac pressure overload*. Cell Metab, 2007. **6**(1): p. 25-37.
35. Alaynick, W.A., et al., *ERRgamma directs and maintains the transition to oxidative metabolism in the postnatal heart*. Cell Metab, 2007. **6**(1): p. 13-24.
36. Hu, X., et al., *AMP activated protein kinase-alpha2 regulates expression of estrogen-related receptor-alpha, a metabolic transcription factor related to heart failure development*. Hypertension, 2011. **58**(4): p. 696-703.
37. Liu, D., et al., *Estrogen stimulates estrogen-related receptor alpha gene expression through conserved hormone response elements*. Endocrinology, 2003. **144**(11): p. 4894-904.
38. Donaldson, C., et al., *Estrogen attenuates left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy by an estrogen receptor-dependent pathway that increases calcineurin degradation*. Circ Res, 2009. **104**(2): p. 265-75, 11p following 275.
39. Plante, E., et al., *Left ventricular response to sustained volume overload from chronic aortic valve regurgitation in rats*. J Card Fail, 2003. **9**(2): p. 128-40.
40. Arsenault, M., et al., *Experimental aortic regurgitation in rats under echocardiographic guidance*. J Heart Valve Dis, 2002. **11**(1): p. 128-34.
41. Lachance, D., et al., *Effects of exercise in volume overload: insights from a model of aortic regurgitation*. Med Sci Sports Exerc, 2009. **41**(6): p. 1230-8.
42. Lachance, D., et al., *Moderate exercise training improves survival and ventricular remodeling in an animal model of left ventricular volume overload*. Circ Heart Fail, 2009. **2**(5): p. 437-45.
43. Plante, E., et al., *Impact of anesthesia on echocardiographic evaluation of systolic and diastolic function in rats*. J Am Soc Echocardiogr, 2006. **19**(12): p. 1520-5.
44. Couet, J., et al., *Treatment of combined aortic regurgitation and systemic hypertension: Insights from an animal model study*. Am J Hypertens, 2006. **19**(8): p. 843-50.
45. Champetier, S., et al., *Gene profiling of left ventricle eccentric hypertrophy in aortic regurgitation in rats: rationale for targeting the beta-adrenergic and renin-angiotensin systems*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(3): p. H669-77.
46. Dhahri, W., et al., *Chronic high-fat diet-induced obesity decreased survival and increased hypertrophy of rats with experimental eccentric hypertrophy from chronic aortic regurgitation*. BMC Cardiovasc Disord, 2014. **14**: p. 123.

## 1.11 Tables

**Table 1.1. Animal characteristics at the end of the study.**

Parameters	ShM (n=11/11)	ShF (n=7/10)	ArM (n=7/7)	ArF (n=7/8)
Body weight, g	703 ± 27.9	349 ± 13.5b	668 ± 45.3	353 ± 15.3b
Heart, mg	1604 ± 70.8	882 ± 30.5b	2282 ± 96.6a	1563 ± 101.1a, b
Ind. Heart, mg/g	2.3 ± 0.11	2.5 ± 0.09	3.4 ± 0.14a	4.4 ± 0.12a, b
LV, mg	985 ± 26.6	591 ± 20.9b	1550 ± 70.1a	1094 ± 66.0a, b
Ind. LV, mg/g	1.4 ± 0.06	1.7 ± 0.06	2.3 ± 0.07a	3.1 ± 0.23a, b
Right ventricle, mg	333 ± 14.0	185 ± 6.7b	424 ± 22.2a	320 ± 40.4a, b
Ind. RV, mg/g	0.48 ± 0.025	0.53 ± 0.022	0.66 ± 0.063a	0.90 ± 0.133a, b
Retroperitoneal fat, g	8.9 ± 1.0	2.8 ± 0.4b	6.7 ± 0.8	2.3 ± 0.5b

Sham: sham-operated controls; Ar: aortic regurgitation; M: male rats and F: female rats. LV: left ventricle, RV: right ventricle and Ind. indexed. Values are expressed as the mean ± SEM. The number of animals per group is indicated in parentheses. a: p<0.05 vs. the corresponding sham group and b: p<0.05 vs. the corresponding male group.

**Table 1.2. Echocardiography data.**

Parameters	ShM (n=11)	ShF (n=7)	ArM (n=7)	ArF (n=7)
EDD, mm	9.3 ± 0.15	7.9 ± 0.08b	12.1 ± 0.52a	10.4 ± 0.2a, b
ESD, mm	4.4 ± 0.09	3.7 ± 0.08b	7.0 ± 0.45a	5.5 ± 0.19a, b
SW, mm	1.5 ± 0.03	1.3 ± 0.02b	1.5 ± 0.03	1.4 ± 0.03a, b
PW, mm	1.5 ± 0.03	1.4 ± 0.03b	1.6 ± 0.02	1.5 ± 0.02a
LV mass (echo), mg	1109 ± 51.2	724 ± 13.0b	1793 ± 148.9a	1246 ± 85.4a, b
Ind. LV mass (echo), mg/g	1.6 ± 0.08	2.1 ± 0.07b	2.7 ± 0.08a	3.7 ± 0.28a, b
RWT, unitless	0.33 ± 0.004	0.34 ± 0.006	0.26 ± 0.012a	0.28 ± 0.004a
mWS, mmHg.cm <sup>2</sup>	189 ± 1.8	169 ± 1.8	278 ± 15.0a	231 ± 5.6a, b
FS, %	53 ± 0.5	54 ± 0.6	42 ± 1.4a	47 ± 1.0a, b
% regurgitation	na	na	79 ± 4.5	79 ± 7.1
LAD, mm	6.4 ± 0.14	4.3 ± 0.12b	7.9 ± 0.37a	5.7 ± 0.17a, b
MWV, mm/s	20.9 ± 0.58	22.3 ± 0.74	18.0 ± 0.91	21.2 ± 0.80
MPI (Tei index)	0.39 ± 0.019	0.43 ± 0.018	0.52 ± 0.030a	0.52 ± 0.050a

EDD: end-diastolic diameter, ESD: end-systolic diameter, SW: septal wall thickness, PW: posterior wall, Ind: indexed, RWT: relative wall thickness, mWS: mean LV wall stress, FS: fractional shortening, LAD, left atrial diameter, MWV: LV mid-wall velocity and MPI: myocardial performance index. Na: not applicable. Values are expressed as the mean ± SEM. The number of animals per group is indicated in parentheses. a: p<0.05 vs. the corresponding sham group and b: p<0.05 vs. the corresponding male group. Echocardiography measurements were obtained under inhaled isoflurane anaesthesia.

**Table 1.3. Haemodynamic values.**

Parameters	ShM (n=11)	ShF (n=7)	ArM (n=7)	ArF (n=7)
HR, bpm	365 ± 11.0	396 ± 9.0	337 ± 12.9a	380 ± 9.3b
SV, µl	202 ± 3.0	160 ± 0.6b	409 ± 31.0a	260 ± 4.1a,b
CO, ml/min	74 ± 2.7	64 ± 3.2b	137 ± 10.3a	98 ± 2.7a,b
dP/dT+	5470 ± 475	6519 ± 465	4881 ± 354	5679 ± 707
dP/dT-	5389 ± 375	6598 ± 603	4526 ± 271	3467 ± 295a
EDP, mmHg	13.6 ± 0.68	11.3 ± 1.48	17.1 ± 1.06a	13.7 ± 1.60b
SAP, mmHg	125 ± 7.0	123 ± 5.0	131 ± 6.6	128 ± 9.6
DAP, mmHg	78 ± 3.0	75 ± 4.2	58 ± 2.9a	56 ± 5.2a
PP, mmHg	47 ± 5.3	48 ± 3.2	72 ± 4.8a	72 ± 5.0a

HR: heart rate, bpm: beats per minute, SV: stroke volume, CO: cardiac output, dP/dt+ and dP/dt-, maximal and minimal derivative of pressure/time, EDP: LV end-diastolic pressure, SAP: systolic arterial pressure, DAP: diastolic arterial pressure and PP: pulse pressure. Values are expressed as the mean ± SEM. The number of animals per group is indicated in parentheses. a: p<0.05 vs. the corresponding sham group and b: p<0.05 vs. the corresponding male group. Echo and LV pressure measurements were obtained under inhaled isoflurane anaesthesia.

## 1.12 Figure legends

**Figure 1.1:** Progression of different LV parameters as evaluated by echocardiography during the duration of the study (26 weeks).  $\Delta$ : % difference between week 0 and week 26, EDD: end-diastolic diameter (A), ESD: end-systolic diameter (B), SW: septal wall thickness (C), PW: posterior wall thickness (D), RWT: relative wall thickness (E), mWS: mean wall stress (F), FS: fractional shortening (G), SV: stroke volume (H) and CO: cardiac output (I). The results are reported in % as the mean  $\pm$  SEM (n=7-11/gr). Probability values from a 2-way ANOVA and Holm-Sidak post-testing to evaluate the p value of sex, (S), disease (D) or disease-sex interactions (S  $\times$  D) are shown next to each panel.

**Figure 1.2:** Impact of LV dilatation and hypertrophy caused by severe aortic regurgitation on cardiomyocyte cross-sectional area (Top panels; A and B) and on myocardial capillary density (bottom panels (C and D). Left panels (A and C): The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n=6-7/gr.). Probability values are from a 2-way ANOVA and Holm-Sidak post-testing. \*: p<0.05 or \*\*: p<0.01 between indicated groups. Upper right panels: Representative Masson's trichrome staining of mid-chamber short-axis LV sections (magnification x200); bottom right panels: LV sections stained with isolectin B4 coupled with horseradish peroxidase (magnification x400).

**Figure 1.3:** Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of various hypertrophy (top two graphs; A and B) and extracellular matrix remodelling (bottom; C) markers. The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean  $\pm$  SEM (n=5-6/gr.). The mRNA levels of the sham (sham-operated animals) groups (ShM and ShF) were normalized to 1 and are represented by the dotted line. White columns represent the ArM group, and black columns represent the ArF group. \*: p<0.05 vs. the corresponding sham group and ¶: p<0.05 between the ArM and ArF groups.

**Figure 1.4:** LV myocardial activity levels of enzymes implicated in fatty acid  $\beta$ -oxidation, glucose metabolism and mitochondrial energy production in male and female AR rats after 6 months. Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase (HADH) (A), hexokinase (HK) (B), citrate synthase (C), and succinate dehydrogenase (D) enzymatic activities were measured in LV homogenates from 5-6 animals in each group as described in the Methods. The results

are reported as the mean  $\pm$  SEM. Probability values are from a 2-way ANOVA and Holm-Sidak post-testing. \*:  $p < 0.05$  and \*\*:  $p < 0.01$  between indicated groups.

**Figure 1.5:** Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for enzymes implicated in fatty acid oxidation (left panels; A and C) and glycolysis (top right panel; B) and for transcription factors related to bioenergetics control (right bottom panel; D). The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean  $\pm$  SEM ( $n=5-6/gr.$ ). The mRNA levels of the sham (sham-operated animals) groups (ShM and ShF) were normalized to 1 and are represented by the dotted line. White columns represent the ArM group, and black columns represent the ArF group. \*:  $p < 0.05$  vs. the corresponding sham group and ¶:  $p < 0.05$  between the ArM and ArF groups.

**Figure 1.6:** Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for markers of mitochondrial biogenesis and function (A and B). The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean  $\pm$  SEM ( $n=5-6/gr.$ ). The mRNA levels of the sham (sham-operated animals) groups (ShM and ShF) were normalized to 1 and are represented by the dotted line. White columns represent the ArM group, and black columns represent the ArF group. \*:  $p < 0.05$  vs. the corresponding sham group and ¶:  $p < 0.05$  between the ArM and ArF groups.

### 1.13 Figures

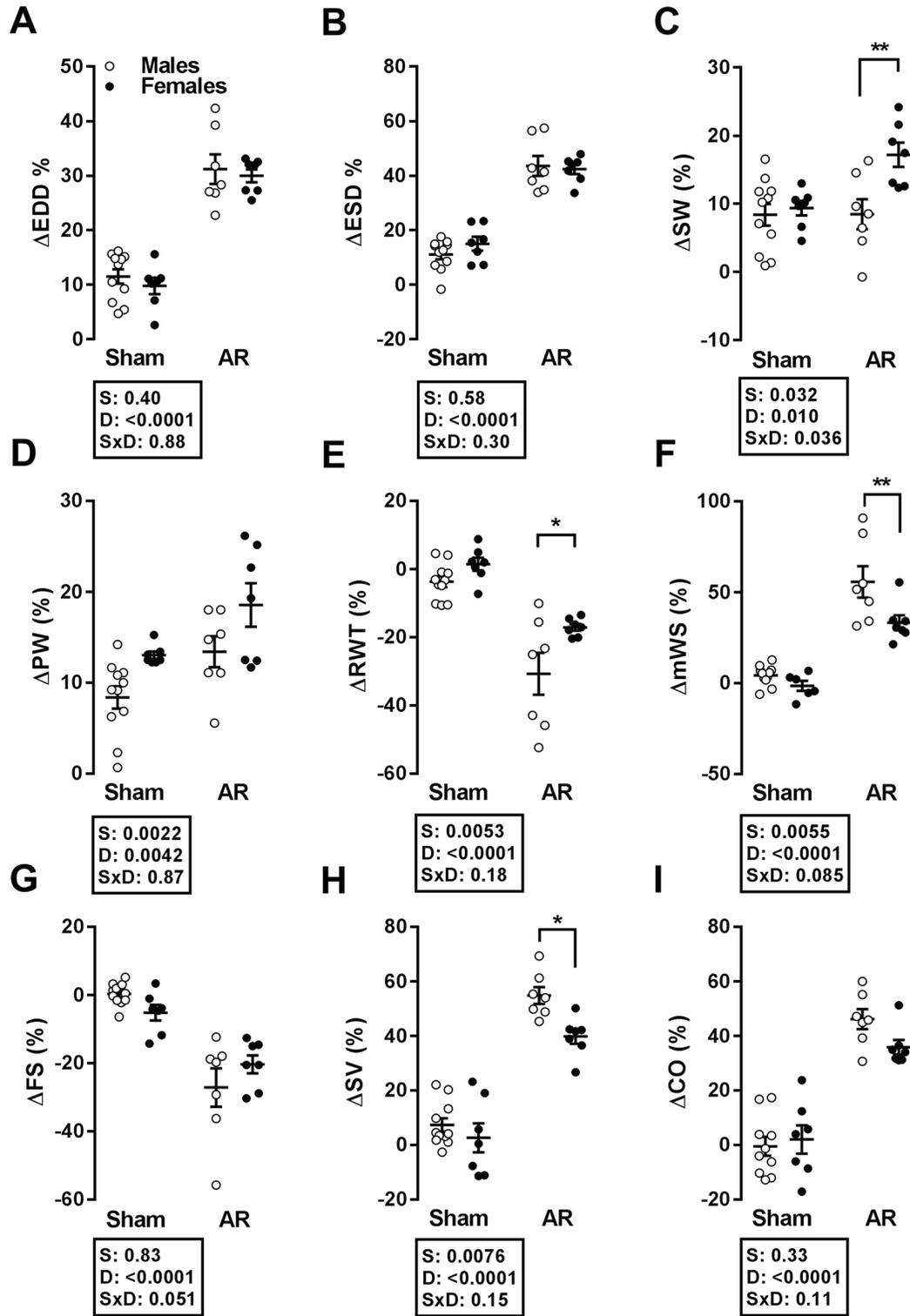
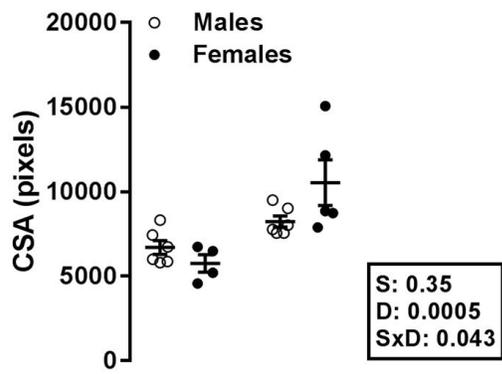
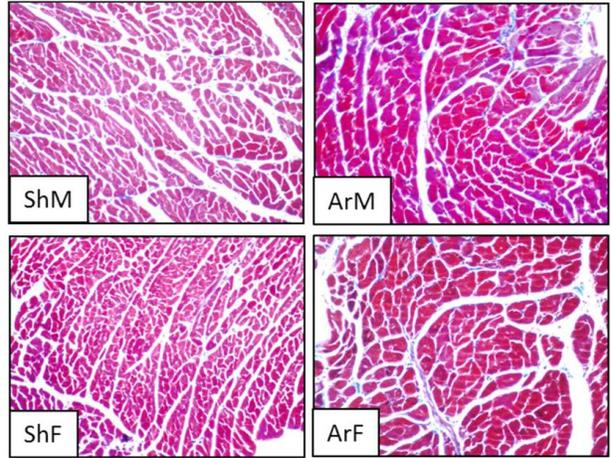
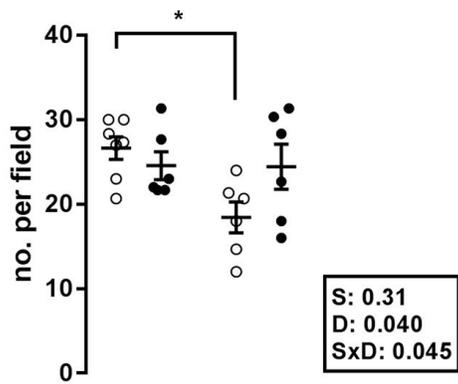
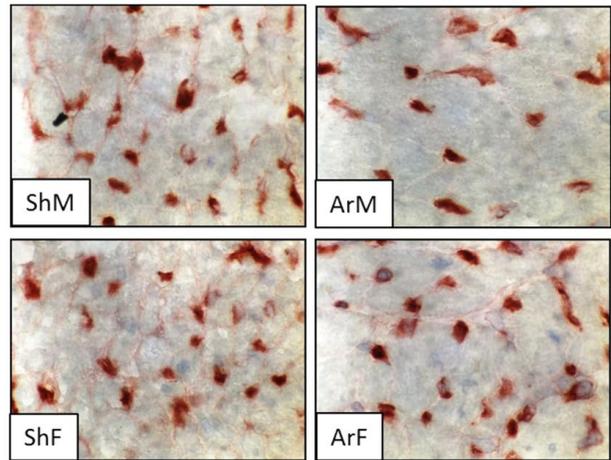


Figure 1.1. Progression of different LV parameters as evaluated by echocardiography

**A****B****C****D**

**Figure 1.2. Impact of LV dilation and hypertrophy caused by severe aortic regurgitation on cardiomyocyte cross-sectional area and on myocardial capillary density**

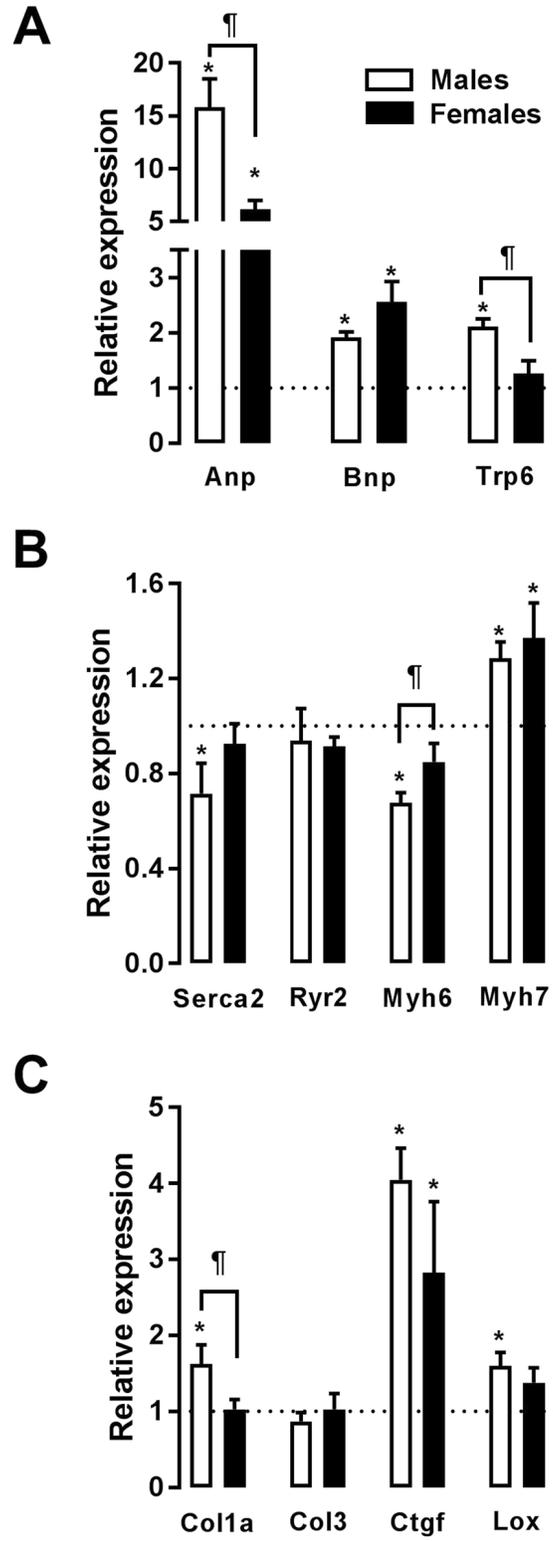
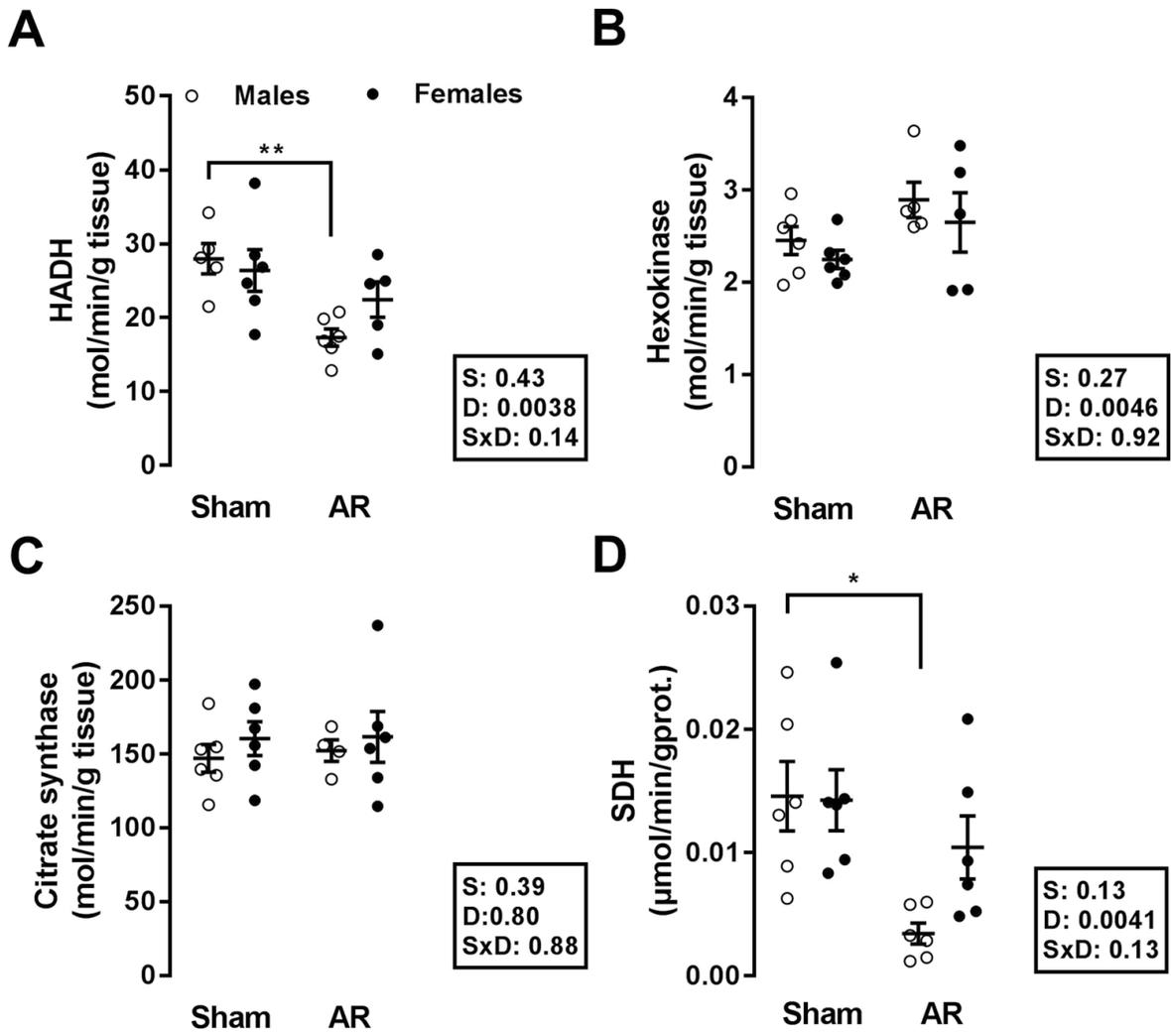
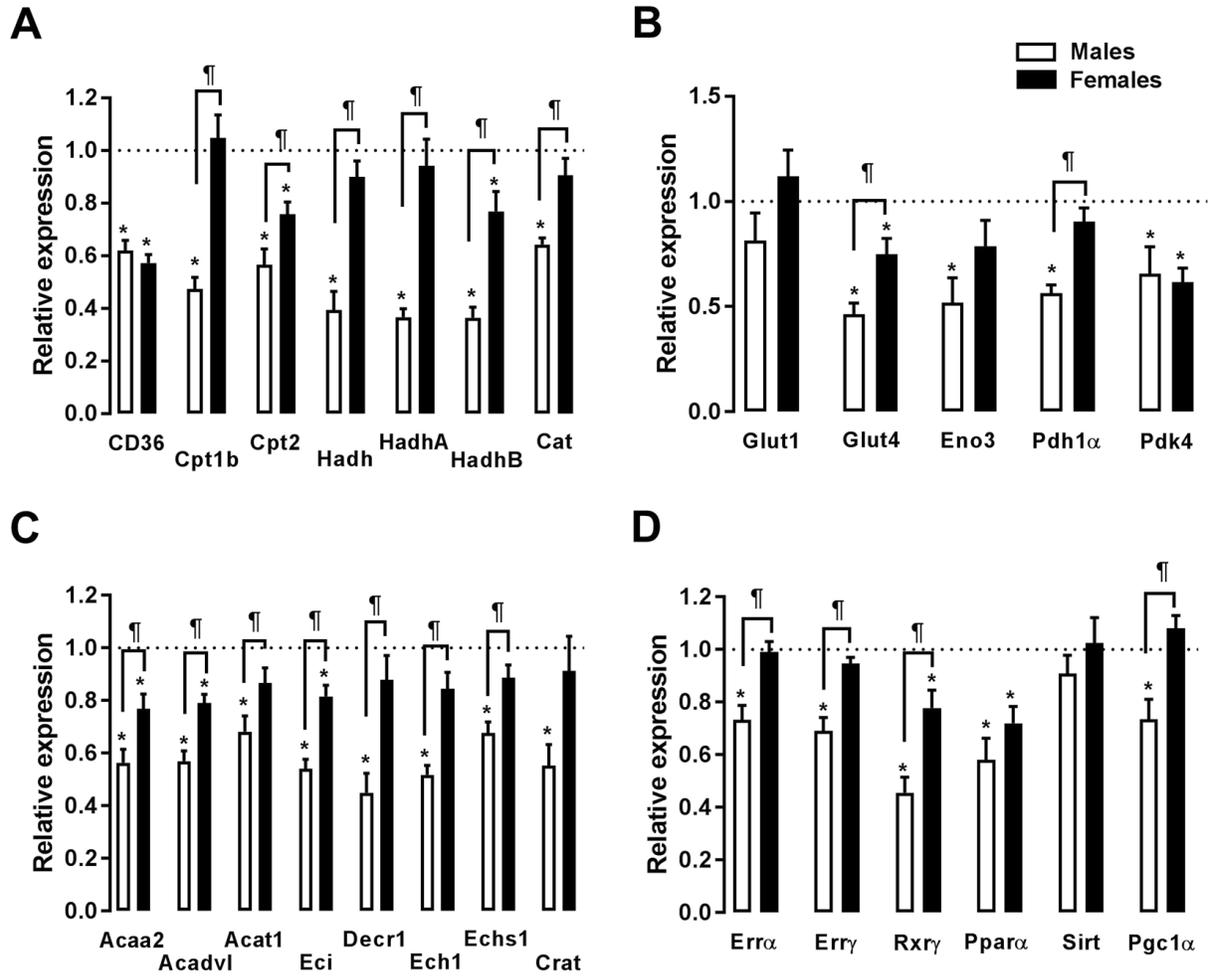


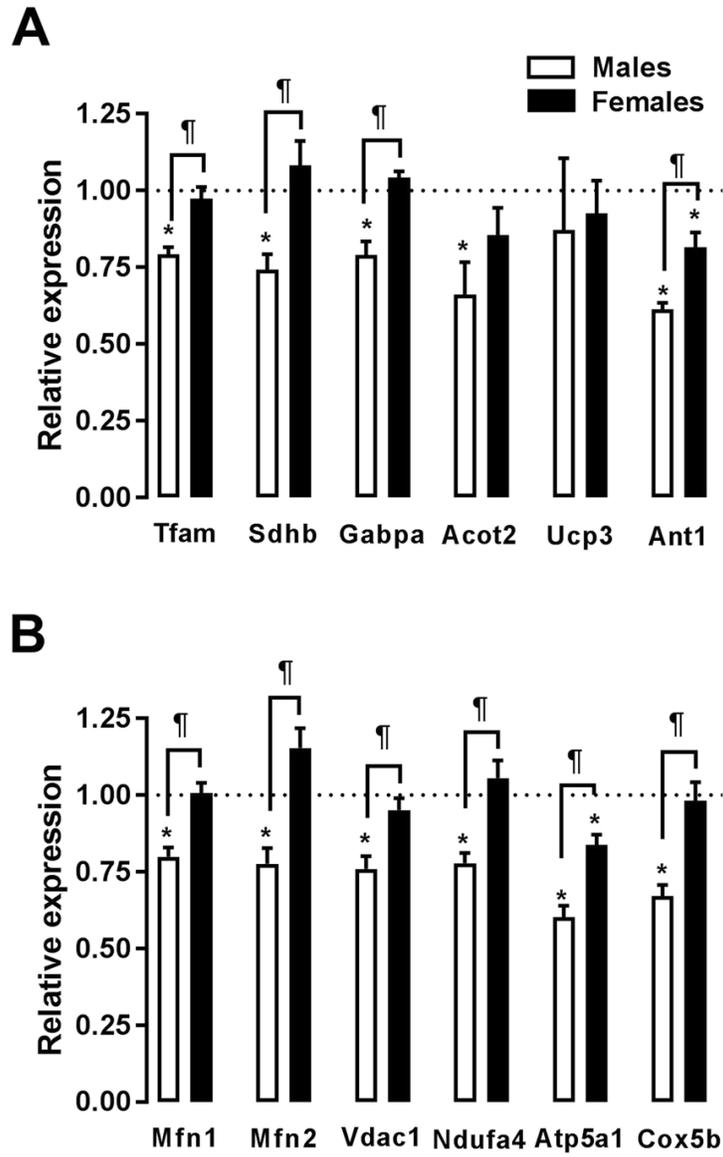
Figure 1.3. mRNA levels of various hypertrophy and extracellular matrix remodelling markers



**Figure 1.4.** LV myocardial activity levels of enzymes implicated in fatty acid  $\beta$ -oxydation, glucose metabolism and mitochondrial energy production in male and female



**Figure 1.5.** mRNA levels of gene encoding for enzymes implicated in fatty acid oxidation, glycolysis and for transcription factors related to bioenergetics control



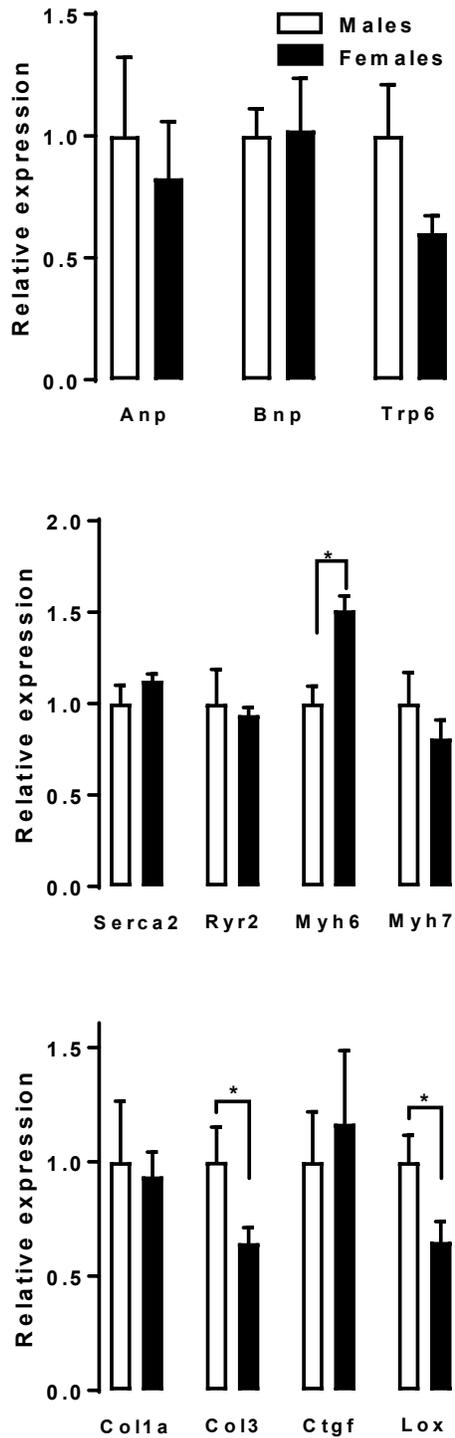
*Figure 1.6. mRNA levels of genes encoding for markers of mitochondrial biogenesis and function*

## 1.14 Supplemental tables and figures

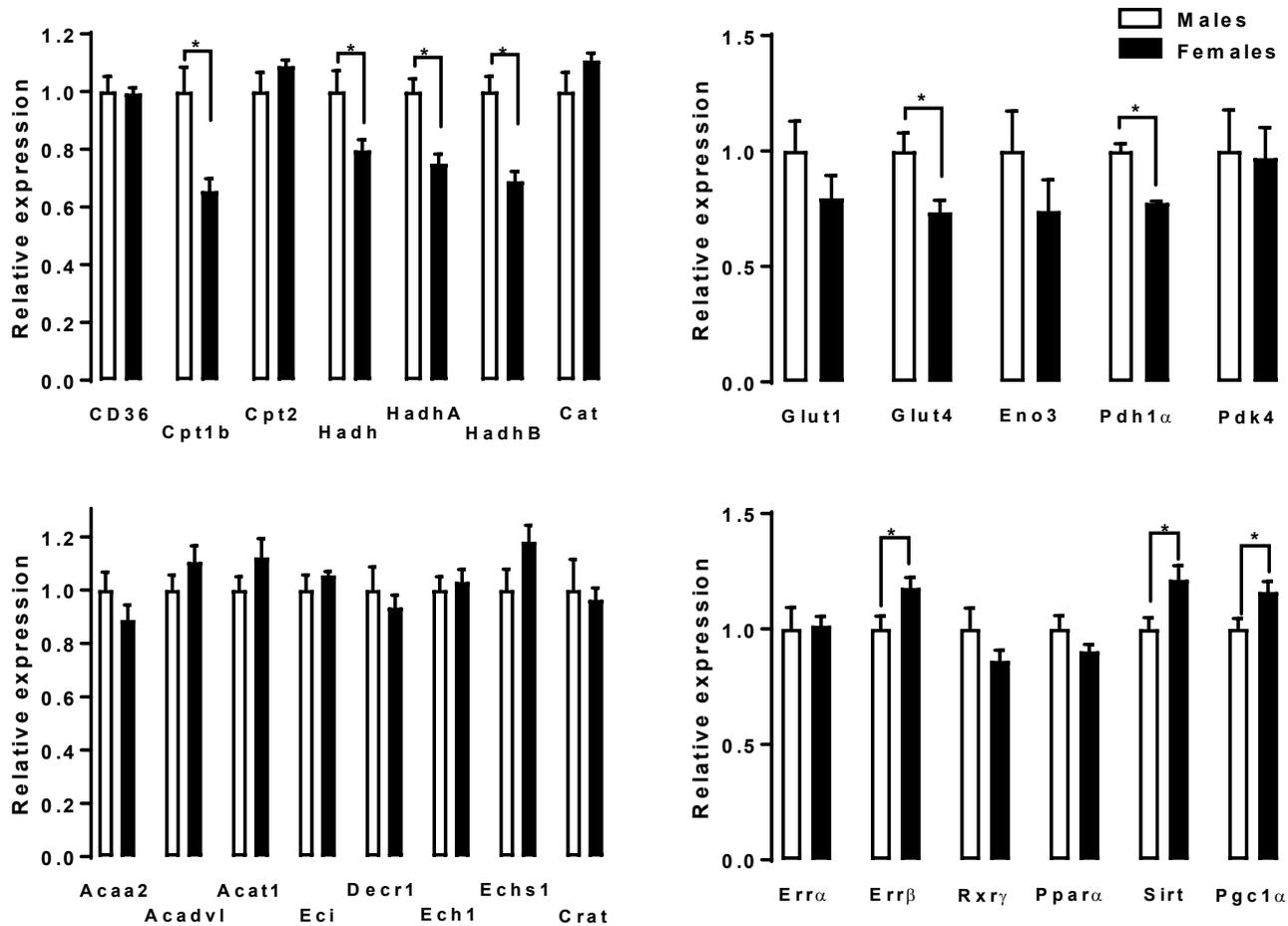
**Table 1.S1. Primer Assays used in qPCR analysis of gene expression.**

mRNA	Symbol	Cat. No.	Amplicon (bp)
acetyl CoA acyltransferase 2	Acaa2	Rn.PT.58.5300756	111
acyl CoA déshydrogenase, very long chain	Acadvl	Rn.PT.58.13279450	147
acetyl CoA acetyltransferase 1	Acat1	Rn.PT.58.18447027	102
acyl-CoA thioesterase 2 (Acotinase-2)	Acot2	QT00407204	77
solute carrier family 25, member 4	Ant1, Slc25a4	QT01081633	143
ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, cardiac	Atp2a2, Serca2a	QT01081500	96
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	Atp5a1	Rn.PT.58.6992257	100
solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	Cat, Slc25a20	Rn.PT.58.6247859	116
procollagen-1 alpha-1	Col1a	Rn.PT.58.7562513	134
procollagen-3 alpha-1	Col3	QT01083537	111
cytochrome c oxidase subunit 5B	Cox5b	Rn.PT.58.8467954	138
cartinine palmitoyltransferase 1b, muscle	CPT1b	QT01084069	98
carnitine palmitoyltransferase 2	CPT2	QT00186473	150
carnitine O-acetyltransferase	Crat	Rn.PT.58.36282119	97
connective tissue growth factor	Ctgf	QT00182021	102
2,4-dienoyl CoA reductase 1	Decr1	Rn.PT.58.44352482	120
enoyl CoA hydratase 1	Ech1	Rn.PT.58.33832465	99
enoyl CoA delta isomerase 1	Eci1	Rn.PT.58.37662439	119
enoyl CoA hydratase, short chain, 1, mitochondrial	EchS1	Non-optimized primers	95
enolase 3, beta	Eno3	QT00180138	106
estrogen related receptor, alpha	Erra	Rn.PT.58.5170310	111
estrogen related receptor, gamma	Errg	Rn.PT.58.8028733	109
fatty acid translocase/CD36, similar to	FAT/CD36	QT01702680	81
GA binding protein transcription factor, alpha	Gabpa	Rn.PT.58.12555216	137
solute carrier family 2 member 1	Glut1, Slc2a1	QT00178024	85
solute carrier family 2 member 4	Glut4, Slc2a4	QT00175931	146
hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	Hadh	Rn.PT.58.17867024	135
hydroxyacyl-CoA dehydrogenase alpha	Hadha	Rn.PT.58.46222281	138
hydroxyacyl-CoA dehydrogenase beta	Hadhb	Rn.PT.58.7613498	130

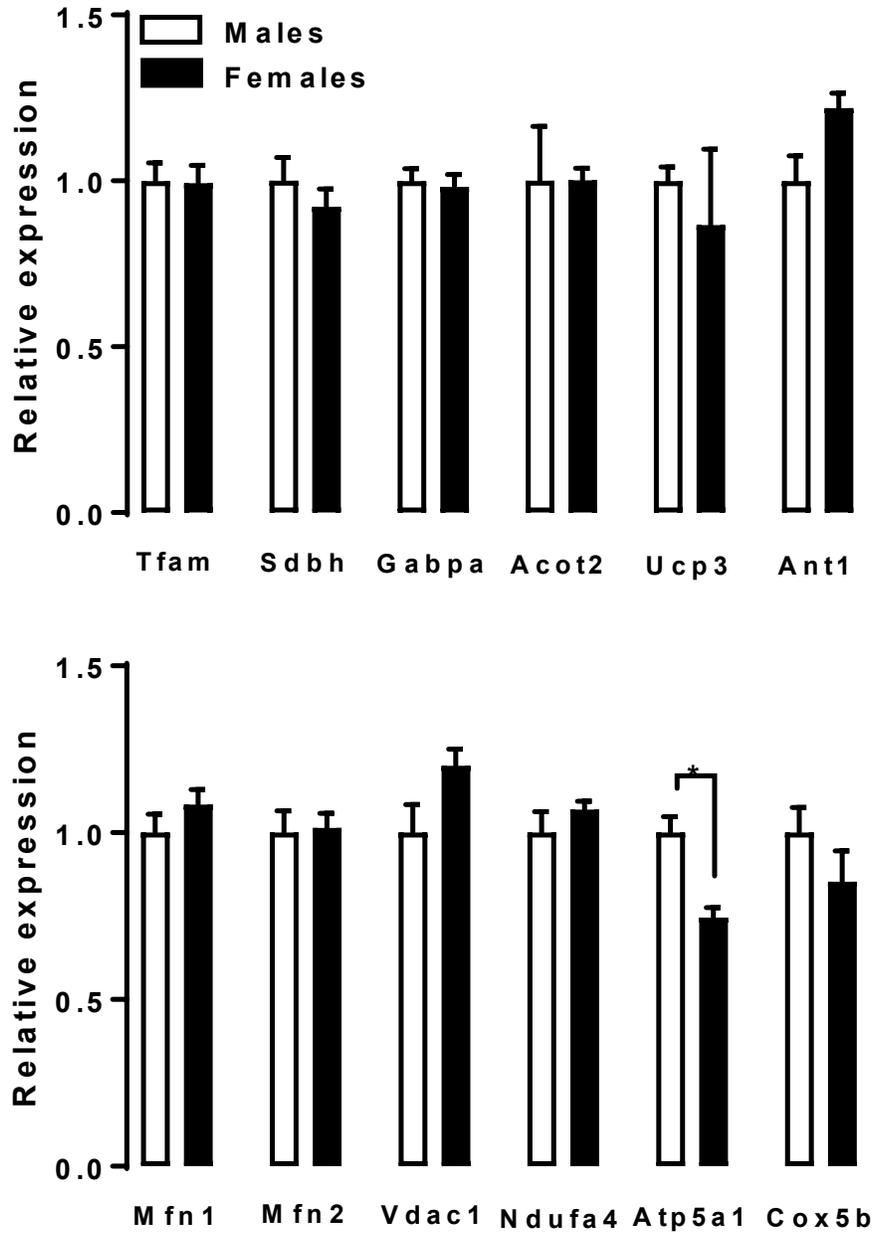
Lysyl oxidase	Lox	QT00185591	148
mitofusin 1	Mfn1	Rn.PT.58.44207597	106
mitofusin 2	Mfn2	Rn.PT.58.13375660	124
myosin, heavy polypeptide 6, cardiac	Myh6	QT00190267	127
myosin, heavy polypeptide 7, cardiac	Myh7	QT00189504	144
NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A4	Ndufa4	Rn.PT.58.11318539	134
natriuretic peptide precursor type A	Nppa, Anp	QT00366170	94
Natriuretic peptide precursor type B	Nppb	Rn.PT.58.5595685.g	108
pyruvate dehydrogenase alpha 1	pdha1	QT01830220	93
pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	Pdk4	QT00189287	145
peroxisome proliferator activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	Pgc1 $\alpha$	QT00189196	108
peroxisome proliferator activated receptor alpha	Ppar $\alpha$	QT00176575	66
cyclophilin a	Ppia	QT00177394	106
retinoid X receptor gamma	Rxry	Rn.PT.58.6519292	103
ryanodine Receptor 2, cardiac	Ryr2	QT01811936	60
succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B	Sdhb	Rn.PT.58.9629097	110
sirtuin 1	Sirt1	Non-optimized primers	94
transcription factor A, mitochondrial	Tfam	Rn.PT.58.13772978	124
transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6	Trpc6	QT00195804	101
uncoupling protein 3	Ucp3	QT00176589	103
voltage-dependent anion channel 1	Vdac1	Rn.PT.58.37188705	116



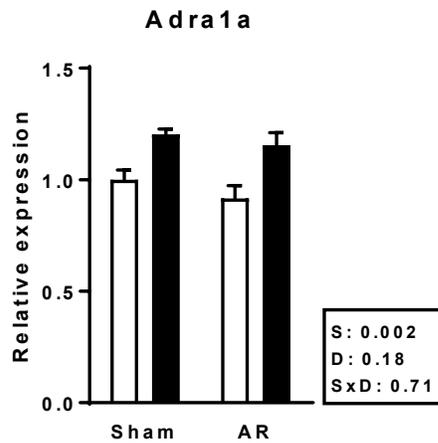
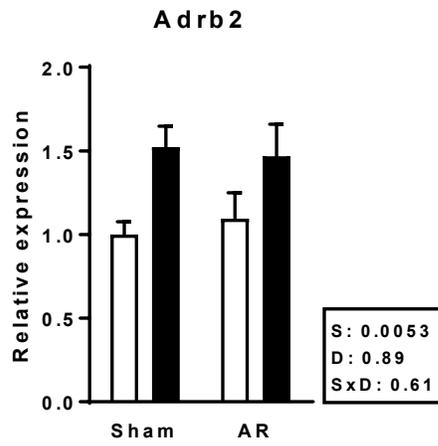
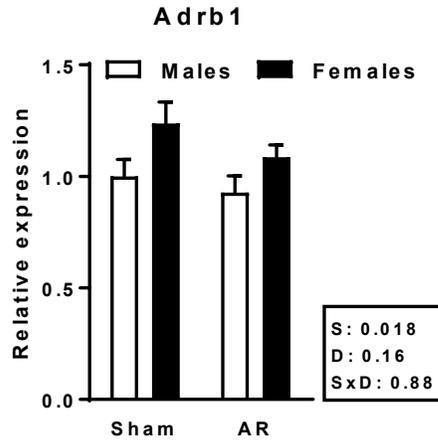
**Figure 1.S1. Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of various hypertrophy (top two graphs) and extracellular matrix remodeling (bottom) markers in male (white) and female (black) sham-operated animals. Results are reported in arbitrary units (AU) as mean  $\pm$  SEM (n=5-6/gr.). ShM mRNA levels were normalized to 1. \*: p<0.05 between groups.**



**Figure 1.S2. Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for enzymes implicated in fatty acid oxidation (left panels), glycolysis (top right panel) and or for transcription factors related to bioenergetics control (right bottom panel) in male (white) and female (black) sham-operated animals. Results are reported in arbitrary units (AU) as mean  $\pm$  SEM (n=5-6/gr.). ShM mRNA levels were normalized to 1. \*: p<0.05 between groups.**



**Figure 1.S3: Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for markers of mitochondrial biogenesis and function in male (white) and female (black) sham-operated animals. Results are reported in arbitrary units (AU) as mean  $\pm$  SEM (n=5-6/gr.). ShM mRNA levels were normalized to 1. \*: p<0.05 between groups.**



**Figure 1.S4: Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for adrenergic receptors (beta1, beta2 and alpha1 in male (white) and female (black) sham-operated animals. Results are reported in arbitrary units (AU) as mean ± SEM (n=6/gr.). ShM mRNA levels were normalized to 1.**

# **Chapitre 2 - Testosterone deficiency reduces cardiac hypertrophy in a rat model of severe volume overload**

## **2.1 Résumé**

Nous avons montré que l'hypertrophie cardiaque (HC) lors d'une surcharge de volume induite par une régurgitation aortique (AR) s'accompagne d'importants changements transcriptionnels chez les rats mâles, et ce, malgré un gain de masse cardiaque moins important que chez les femelles. Les androgènes chez les mâles pourraient expliquer ces différences. Nous avons étudié durant 26 semaines deux groupes d'animaux AR, avec ou sans leurs gonades (respectivement AR et AROcx) et deux groupes d'animaux Sham, avec ou sans leurs gonades (respectivement S et SOcx). Les AR ont développé une HC, une perte de fonction systolique et une dilatation du ventricule gauche plus importantes que les AROcx. Les AROcx ont maintenu un profil transcriptionnel et un métabolisme énergétique similaire aux contrôles, contrairement aux AR. Bref, les androgènes joueraient un rôle néfaste dans le dimorphisme sexuel lors d'HC, surtout en ce qui concerne la transition métabolique puisque leur perte chez les AROcx semble bénéfique.

## 2.2 Abstract

**Background:** Cardiac hypertrophy (CH) develops differently in males and females. We have previously shown that male rats develop more myocardial transcriptional changes in response to volume overload induced by aortic regurgitation (AR), although they had a lesser increase in cardiac mass than females. Sex hormones can influence heart physiology and response to hemodynamic stress, especially in pressure overload situations. However, less is known about the effects of androgens on CH during volume overload such as in severe AR; these steroids could explain the transcriptional changes that we have previously observed.

**Objective:** Our objective was to compare the development of CH in response to volume overload induced by AR in male rats, with and without their gonads to produce androgens.

**Methods:** We studied forty-four male Wistar rats. Half of them were orchietomized. AR was induced in 12 orchietomized rats (AROCx) and 13 intact rats (AR). The rest of the animals were sham-operated (S and SOcx groups). All groups were followed for 26 weeks.

**Results:** Androgen loss induced by orchietomy decreased general growth of animals. Heart gain of mass after AR induction was more important in intact than in Ocx animals (60% vs. 40% respectively,  $p=0.019$ ). There was also a tendency toward decreased survival in intact AR rats ( $p=0.052$ ). Left ventricle dilation was more important in the AR group, where end-diastolic diameter increase by 37% over S group and of 17% in AROcx ( $p<0.0001$ ). Systolic function was better maintained in AROcx; fractional shortening only decreased by 15%, while it decreased by 26% in AR intact animals ( $p=0.029$ ). Moreover, AR rats developed more important changes in LV gene expression than AROcx ones, especially for genes linked to energy metabolism. Enzyme activity ratio of hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase over hexokinase, an index of energy substrates shift towards glucose, was only significantly decreased in the AR group. Finally, protein analysis showed that phosphorylated Jnk content was more important in AR than in AROcx, implying increased activation of this stress pathway.

**Conclusion:** Loss of androgens has an impact on heart hypertrophy caused by severe volume overload. It is associated with decreased heart hypertrophy and a normalization of the LV transcriptional profile. This profile is similar to what we previously observed in females with AR, suggesting that androgens may play an important role in the myocardial energy metabolism control in cardiac hypertrophy.

## 2.3 Page titre

Testosterone deficiency reduces cardiac hypertrophy in a rat model of severe volume overload

Short title: Androgens in cardiac hypertrophy.

Catherine Beaumont, Élisabeth Walsh-Wilkinson, Marie-Claude Drolet, Élise Roussel, Nicolas Melançon, Jonathan Beaudoin, Marie Arsenault and Jacques Couet.

Groupe de recherche sur les valvulopathies, Centre de Recherche, Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Université Laval, Quebec City, Canada.

Corresponding author: Jacques Couet PhD

Groupe de Recherche en Valvulopathies, Centre de Recherche,  
Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec  
2725, Chemin Sainte-Foy, Québec, (Québec), Canada, G1V 4G5

Phone: 1-418-656-4760; Fax: 1-418-656-4509

Email: [jacques.couet@med.ulaval.ca](mailto:jacques.couet@med.ulaval.ca)

## 2.4 Introduction

Cardiovascular diseases are among the leading causes of mortality in both men and women [1]. However, they often develop differently depending on the sex. Men are usually affected earlier in life and often face faster progression than women [2]. On the other hand, women suffer from heart disease later in life, usually after menopause [3]. Cardiac hypertrophy (CH), an independent cause of morbidity and mortality from heart disease also displays a sex dimorphism in patients and in pre-clinical models.

CH develops in response to a recurrent or chronic significant hemodynamic stress. A pathological stimulus will lead to maladaptive CH and eventually if left untreated, to heart failure (HF). Significant pressure overload (e.g. hypertension, aortic valve stenosis) or volume overload (e.g. aortic or mitral valve regurgitation) will induce left ventricle (LV) remodeling characterized by changes in wall thickness, diameter cavity, extracellular matrix organization, gene transcription, cell signaling and energy metabolism [4-7].

We recently showed in a rat model of chronic volume overload (VO) caused by severe aortic valve regurgitation (AR) that females developed as much if not more CH than males. However, male left ventricle (LV) shows more dilatation and loses more contractile function than those of females [8]. In another rat VO model (aorto-caval fistula), a faster progression toward HF was observed in males and resulted in poorer survival [9, 10]. At the cellular and molecular levels, we observed that male AR rats show an important down regulation in LV gene expression of many fatty acid oxidation genes and an up-regulation of glucose metabolism genes, whereas this characteristic energy metabolism substrate preference switch does not happen in AR females [8]. Since sex hormones have a potent effect on differentiation, they could explain a large part of the sex dimorphism observed in CH.

Estrogens have been widely studied in the cardiovascular research field, especially because of the lower incidence of cardiovascular diseases in premenopausal women [11]. However, effects of androgens on heart physiology are less well understood. It is not clear if androgens are protective or deleterious for the cardiovascular system. Studies have shown that low testosterone levels predispose men to a higher cardiovascular disease risk. Testosterone can also increase functional capacity and cardiac output in men with

chronic HF [12, 13]. Nevertheless, some studies associated testosterone replacement therapy with a higher risk of cardiac events [14]. Cardiac myocytes treated in vitro with androgens (testosterone and/or dihydrotestosterone) show a pro-hypertrophic effect of these hormones [15] in agreement with the well-known anabolic effect of androgens on muscle hypertrophy [16]. In fact, androgens influence the development of pathological CH, but whether if their action is beneficial is still unclear.

Androgens are synthesized only by testes in rats [17]. We studied intact and orchiectomized animals (Ocx) with or without VO induced by AR. Our results suggest that androgens do influence cardiac remodeling in VO and have an impact on the heart response to this hemodynamic stress. Androgens tend to lead to a maladaptive hypertrophic response, which impairs cardiac function and the myocardial energy metabolism profile.

## **2.5 Methods**

### **2.5.1 Animals**

Forty-four male Wistar rats (275 to 300g) (Charles River, Saint-Constant, QC, Canada) were studied. Twenty-two of which were purchased orchiectomized. Experimental groups were as followed: Sham-operated (S; n=9), orchiectomized sham-operated (SOcx; n=10), AR; (n=13) and orchiectomized AR (AROCx; n=12). AR was induced as previously described by perforation of one or two aortic valve leaflets using a catheter via the right carotid and under echocardiographic guidance [18, 19]. Sham-operated animals only had ligation of their right carotid. The protocol was approved by the Université Laval's Animal Protection Committee and followed the recommendations of the Canadian Council on Laboratory Animal Care.

### **2.5.2 Echocardiography and Sacrifice**

An echocardiographic exam was performed two weeks after surgery and at the end of the protocol 24 weeks later as previously described [20-22]. At the end of the protocol, the heart and the lungs were harvested and weighed. Heart chambers were

dissected, weighted and the LV was then quickly frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until further use. A mid-LV section was kept in formalin and fixed in paraffin for histologic analysis.

### 2.5.3 Gene Expression Analysis by RT-PCR

LV gene expression was quantified for 6 animals per group by quantitative RT-PCR as described elsewhere [23]. Pre-optimized primers were from QuantiTect (Qiagen) and IDT (Coralville, Iowa) ([Table 2.S1](#)) and SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio Rad, Hercules, CA) was used. The non-pre-optimized primers were for the 2,4-dienoyl-CoA reductase 1 gene (Decr1; 5'-CAT TCC GTA TCT ACC CCA TTC AG-3' and 5'-GCT ATC ACT ACG ATC TAT GCT GAG-3'; 120 pb transcript), enoyl-CoA hydratase, short chain 1 (EchS1; 5'-GCT TTC AGG GTG TCT TGA TTT G-3' and 5'-GAG CTA TGC ACT GCA GAT AGT-3'; 95 pb transcript), natriuretic peptide precursor type A (Nppa; 5'-GCA GAT TTG GCT GTT ATC TTC G-3' and 5'-GGT AGG ATT GAC AGG ATT GGA-3'; 79 pb transcript) and natriuretic peptide precursor type B (Nppb; 5'-GTC TCC CTA AAA CAA CCT CAG C-3' and 5'-CGA AAT TCC AAG ATG GCA CAT AG-3'; 108 pb transcript). Cyclophilin A (Ppia; 5'-GCA GAC AAA GTT CCA AAG ACA G-3' and 5'-CCA TTA TGG CGT GTG AAG TC-3'; 140 pb transcript) was used as the control "housekeeping" gene.

### 2.5.4 Enzymatic Activity

Enzymatic activities related to energy metabolism and to oxidative stress were measured. LV samples were kept at -80°C until assayed for maximal ( $V_{max}$ ) enzyme activities. Enzymatic activities for Hexokinase (HK), Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase (HADH), Succinate dehydrogenase (SDH), Citrate synthase (CS) and Creatine kinase (CK) were determined as previously described [24, 25].

For the beta-hydroxybutyrate dehydrogenase (BDH) enzyme assay, LV tissue was homogenized in 40 volumes of extracting solution. The extracting solution was composed of triethanolamine (50mM; pH 7.5), EDTA (1mM), MgCl<sub>2</sub> (2mM) and β-mercaptoethanol (30mM). The homogenates were then sonicated. BDH transforms β-hydroxybutyrate in acetoacetate and this reaction uses the NAD<sup>+</sup> cofactor. The assay measures the

absorbance at 340 nm as an indication of NADH formation and BDH activity. The samples were tested in duplicates.

Enzymatic activity for catalase, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) was measured using adapted protocols from kit supplier (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (CAT100, 19160 and CGP1, respectively).

### 2.5.5 Immunoblotting

Protein content was estimated by Western blotting as described previously [26, 27]. Antibodies were diluted 1:1000 in a TSB-T solution with 5% BSA. Phospho-ERK1/2, phospho-JNK1/2, phospho-p38, phospho-GSK3 and phospho-PTEN antibodies were all obtained from Cell Signaling Technologies (Danvers MA). ERK1/2 (Millipore, Etobikoke, ON, Canada) and p38 (Santa Cruz, Santa Cruz CA) were also diluted 1:1000 in TSB-T solution with 5% BSA. GSK3 (Santa Cruz, Santa Cruz CA) and phospho-FAK (Cell Signaling Technologies) were diluted 1:500 in TSB-T solution with 5% BSA. Antibody concentrations diluted in a TBS-T solution with 5% milk were phospho-Akt Thr308 (1:500, Cell Signaling Technologies), Akt (1:1000, Cell Signaling Technologies), Jnk2 (1:1000, Santa Cruz), PTEN (1:1000, Cell Signaling Technologies), FAK (1:1000, Santa Cruz) and non-phospho-PTEN (1:1000, Cell Signaling Technologies). Antibodies diluted in TBS-T only were phospho-Akt Ser473 (1:2000, Cell Signaling Technologies), phospho-S6 (1:2000, Cell Signaling Technologies), S6 (1:2000, Cell Signaling Technologies), phospho-PKD (1:1000, Cell Signaling Technologies) and PKD (1:500, Abcam, Toronto, ON, Canada). All antibodies were from rabbits, except for JNK2 and Akt, which were from mice. The appropriate second antibody was diluted 1:2000 in TBS-T with 5% milk before membrane incubation at room temperature for one hour. Western Lightning Plus ECL (Perkin-Elmer, Woodbridge, ON, Canada) and Clarity Max ECL (Bio-Rad) were used for membrane revelation with the Gel Doc system and Image Lab software (Bio-Rad). For normalization, the "Total lane method" was used and adjustments were made according to pre-blocking membrane exposure and to a standard pool.

### 2.5.6 Histology

Picrosirius red staining was done in order to compare mid-LV sections size and fibrosis content (n = 6/group). LV pieces fixed in paraffin were cut and deparaffinized. Tissue sections were sequentially rehydrated for 5 minutes with 100% ethanol, 95% ethanol and 70% ethanol (diluted in water). Sections were then coloured for 1 hour in 0.1% Sirius red diluted in saturated picric acid. Sections were washed in 1% acetic acid, dehydrated three times in 100% ethanol for 5 minutes and finally, washed in xylene. A picture of each LV was acquired with a Zeiss optical microscope and Zen software (Germany) with a size of 280 tiles in order that every LV sample fits in and can be compared.

### 2.5.7 Statistical Analysis

Results are presented as the mean  $\pm$  the standard error of the mean (SEM). Two-way ANOVA analysis was performed and Holm-Sidak post-test was used for comparison between the groups (Graph Pad Prism 7.04, San Diego, CA). A Student's t-test was used when only two groups were compared. A p-value  $< 0.05$  was considered significant.

## 2.6 Results

Five out of 13 AR rats were alive at the end of protocol. All animals in the other groups survived the total duration of the protocol. Difference in survival was not significant for AR animals (p = 0.052) ([Figure 2.1A](#)). Orchiectomized (Ocx) animals had a significantly lower body weight than intact animals (p<0.0001). There was no significant change in lungs weight (a marker of HF) between the S and the AR groups and between the SOcx and the AROcx groups ([Table 2.1](#)).

### 2.6.1 Cardiac Hypertrophy

LV volume overload from AR caused a significant gain of cardiac mass for both control and Ocx animals (p<0.0001) ([Figure 2.1C](#)). This gain was larger in intact compared

to orchietomized rats (60% vs. 40%, respectively;  $p = 0.019$ ). AR severity was similar between the groups (Table 2.2). Cardiac hypertrophy from AR was more marked in the LV compared to RV and the LV gain of mass was more important in intact AR animals than in Ocx ones (LV: 66%, RV: 45% for AR compared to LV: 45%, RV: 32% for AROcx) (Table 2.1 and Figure 2.1D). The important LV hypertrophic response in AR animals was also apparent on a LV mid-ventricular section; the AROcx LV tended to be similar to S animals (Figure 2.1B).

### 2.6.2 Echocardiographic Data

LV dilation was significantly greater in AR than in AROcx rats as illustrated by increased end-diastolic (EDD) and end-systolic dimensions (ESD) (Figure 2.2A and Table 2.2). Septal wall thickness (SW) increased in AR animals compared to sham, but this increase was significantly greater in intact rats ( $p < 0.0001$ ) (Table 2.2). A larger decrease in LV fractional shortening (FS) was observed in intact AR animals compared to AROcx (-26% vs. -15%, respectively) (Figure 2.2B). As expected, LV stroke volume (SV) was significantly increased in AR and AROcx males. Again, there was a tendency toward a more important SV increase in intact AR than in AROcx male rats ( $p = 0,056$ ) (Figure 2.2C). Heart rates were similar between the groups (Table 2.2).

We measured diastolic flow parameters through the mitral valve. E wave, representing LV rapid filling, was significantly higher in AR animals (Figure 2.2D). Likewise, the slope of the E wave was significantly steeper in AR rats. This was more important in intact compared to Ocx rats (Figure 2.2E). The A wave was reduced in Ocx rats (Figure 2.2F) and there was no significant difference in the E/A ratio between the groups (not shown).

### 2.6.3 Markers of Hypertrophy and Extracellular Matrix Remodeling

We measured LV gene expression for several hypertrophy markers. *Anp* gene expression increased with the disease but more strongly in the AR group (Figure 2.3A-B). *Bnp* expression was also increased in both AR groups, especially in the AROcx group, when compared to their respective sham group. *Trpc6* expression was only increased in

the intact AR group. As expected *Myh6* gene expression was reduced with AR whereas *Myh7* expression tended to increase. *Klf15*, a transcription factor reducing expression of pro-hypertrophic genes [28], was only down regulated in intact AR animals. Orchiectomy itself had little influence on basal LV mRNA levels of these genes ([Figure 2.S1](#))

We then analyzed gene expression of several extracellular matrix (ECM) remodeling markers. In intact AR animals, *Col1 $\alpha$ 1*, *Mmp2*, *Timp1*, *Ctgf* and *Lox1* mRNA levels were significantly increased compared to sham-operated rats ([Figure 2.3C](#)). Gene expression for most those genes in AROcx animals was similar to S controls. Of note, orchiectomy tended to decrease the expression of most of these genes in sham groups, this being significant for *Col1 $\alpha$ 1* and *Col3 $\alpha$ 1* ([Figure 2.S1](#)).

#### 2.6.4 LV energy metabolism and markers

Myocardial metabolic transition from fatty acid to glucose use usually occurs during pathological heart hypertrophy [29]. Globally, mRNA levels of genes encoding fatty acid translocase (FAT) and enzymes implicated in fatty acid oxidation (FAO) were significantly lowered in AR animals, whereas only a few of these FAO genes were significantly down regulated in AROcx ([Figure 2.4A](#)). There was no significant difference between sham groups ([Figure 2.S2](#)).

Glucose metabolism, and especially glycolysis, was also influenced by AR and the presence or absence of androgens ([Figure 2.4B](#)). *Glut1* was significantly more expressed in the AR group. *Glut1* is a glucose transporter responsible for the non-regulated entry of glucose into the cell. On the contrary, the expression of the glucose transporter regulated by insulin, *Glut4*, was significantly less expressed in the AR animals, whereas it stayed at basal levels in AROcx [30]. *Hk1* encodes for the first enzyme of glycolysis, hexokinase, and was significantly increased in AR animals. However, *Pfk* and *Eno3* mRNA levels, two other enzymes of glycolysis, were significantly reduced in the AR group. *Pfk* was also reduced in the AROcx. There was no significant difference in *Pdha1* or *Pdk4* gene expression.

We then measured gene expression for *Err $\alpha$* , *Err $\gamma$* , *Rxr $\gamma$*  and *Ppara $\alpha$* , transcription factors and cofactors involved in the regulation in myocardial energy metabolism. *Err $\alpha$*

and *Rxr $\gamma$*  gene expression was decreased in both AR groups whereas, *Err $\gamma$*  and *Ppara* levels were only down regulated in intact AR rats ([Figure 2.4C](#)). *Rxr $\gamma$*  had a lower basal level in Ocx animals ([Figure 2.S2](#)), but the decrease in the AR group was still more important than in AROcx.

Metabolic changes are accompanied by modifications in the expression of genes implicate in mitochondrial biogenesis and function ([Figure 2.4D](#)). There was a down regulation of those genes in the AR group, except for both mitofusin 1 and 2 genes (*Mfn1* and *Mfn2*) that only tended to be reduced compared to sham rats. This down regulation was also present in the AROcx animals when compared to their respective controls. However, no significant difference was seen in the AROcx group for *Gabpa* and *Nduf4* genes. *Nduf4* encodes for a subunit of the first complex of the respiratory chain. Of note, *Cox5b1*, encoding for a subunit of cytochrome c (the fourth complex of the respiratory chain), was significantly more expressed in SOcx rats compared to S ones ([Figure 2.S3](#)).

The enzymatic activity of the hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase (HADH), an enzyme implicated in the oxidation of medium chain fatty acid, was not significantly different between the groups although it tended to be lowered in the AR group ([Figure 2.5A](#)).

The hexokinase (HK) enzymatic activity determination was performed in order to measure myocardial glucose use. HK activity was significantly increased with AR ([Figure 2.5B](#)). Moreover, HADH/HK activities ratio was significantly reduced in AR animals ([Figure 2.5C](#)).

Nevertheless, the activity of other enzymes relevant for energy metabolism was not changed by Ocx or AR. Creatine kinase (CK) activity was not different between the groups, except that AR tended to decrease it ([Figure 2.5D](#)). Citrate synthase (CS) activity, the first enzyme of the citric acid cycle was not influenced by AR or the absence of androgens ([Figure 2.5E](#)). Likewise, there was no significant change in succinate dehydrogenase (SDH) activity, an enzyme of both the citric acid cycle and the second complex of the respiratory chain ([Figure 2.5F](#)). We studied  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase (BDH) activity in order to measure ketone bodies use in the hypertrophied myocardium. Aortic regurgitation reduced BDH activity in intact animals only. Orchiectomy also decreased BDH activity in both sham and AR rats ([Figure 2.5G](#)).

### 2.6.5 Oxidative Stress Markers

Superoxide dismutase (SOD) activity levels were similar in all groups, although there were differences in *Sod* genes expression (Figure 2.6A, D). *Sod1* was significantly reduced in AR animals, but it remained stable in the AROcx group. *Sod2* expression was also significantly decreased in the AR group, whereas *Sod2* diminution was not significant in AROcx animals. Finally, *Sod3* was significantly higher in AR animals compared to their controls. Catalase activity was lower in Ocx animals but not influenced by AR (Figure 2.6B). Glutathione peroxidase activity did not change with Ocx, but significantly increased with AR (Figure 2.6C). *Nox2* (NADPH oxidase, isoform 2) gene expression, which encodes for an enzyme producing reactive oxygen species, was higher in groups with AR compared to their respective controls (Figure 2.6D). *Nox4* expression remained stable between groups. No difference was observed between the two sham groups (Figure 2.S3).

### 2.6.6 Cell signaling

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathways are important pathways implicated in cell growth and cardiomyocyte hypertrophy [31]. Phospho-Erk1/2 significantly decreased with AR, whereas total Erk1/2 significantly increased with the disease (Figure 2.7A-D). Aortic regurgitation tended to increase the phosphorylated p38 content. There was accompanied by an increase in total p38 content with Ocx, (Figure 2.7A and E-G). Similarly, phospho-Jnk2, increased with AR. This increase was more important in the intact AR group. There was no significant difference between the Ocx groups. Total Jnk2 was reduced in Ocx groups (Figure 2.7A and H-J).

Protein kinase B (Akt) is implicated in both hypertrophy and survival pathways in the myocardium [31]. The phosphatase and tensin homolog (Pten) can inhibit Akt and glycogen synthase kinase 3 (Gsk3) can be inhibited by Akt phosphorylation. Significant Pten changes were only observed in the total form, where AR increased its content and Ocx decreased it. However, when compared to each other, AR animals were the only one to have a significant increase. Pten ratio was also influenced by Ocx, which slightly increased it and maintained it in response to AR (Figure 2.8A-E). Phospho-Akt (S473) levels were significantly increased with AR most markedly in Ocx rats. (Figure 2.8A and

F-H). Aortic regurgitation also increased the phosphorylated form of Gsk3. (Figure 2.8A and I-K).

S6, a ribosomal protein downstream of Akt and mTORC1 (mTOR complex 1) implicated in the regulation of translation and cell growth, was then analyzed. Phospho-S6 was decreased by Ocx, but the total form was constant between the groups (Figure 2.9A-D). Loss of androgens significantly decreased phosphorylated and total Focal adhesion kinase (Fak) content, AR had no effect (Figure 2.9A and E-G). Finally, protein kinase D (Pkd) phosphorylated form was also decreased by Ocx, but did not change with AR. Total Pkd increased with the loss of androgens (Figure 2.9A and H-J).

## **2.7 Discussion and conclusion**

In this study, our results suggest that androgens are important drivers of pathological cardiac hypertrophy development caused by severe left ventricle overload from chronic aortic regurgitation. Loss of androgens in AR rats resulted in reduced gain of cardiac mass, less LV dilation, better function and a strong tendency for better survival of the animals.

LV transcriptional changes in response to volume overload were less marked in orchietomized animals compared to intact ones. In fact, the portrait of LV gene expression we observed in orchietomized AR rats had similarities with the one we reported recently in a study comparing intact AR females to AR males [32]. Surprisingly, AR females had a stronger hypertrophic response to AR than males in this previous study, the opposite we observed here with orchietomized males here. This suggests that LV hypertrophy and the LV transcriptional response may not be completely linked and that other factors are implicated. Biological sex and sex hormones are probably among these factors.

Orchietomy reduced growth of animals which can be explained by the loss of androgens and their anabolic effects [33]. In parallel, normal cardiac growth was reduced in orchietomized animals emphasizing the importance of androgens in this process. Here, we show that adaptive cardiac remodeling caused by severe and chronic LV volume overload is also modulated by androgens. Hypertrophy and dilation also is usually

accompanied in AR males by an increased expression of genes related to the extracellular matrix remodeling in AR myocardium [23, 34]. This was less evident in AROcx rats. Androgens are known to regulate pro-fibrotic mechanisms. Testosterone pro-fibrotic effects were previously shown to be mediated via the Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II, which activates pro-fibrotic transcription factors, such as MEF2 [35].

Even if volume overload was similar between both AR groups (around 80%), stress and hypertrophic markers measured in this study pointed out that intact animals myocardium was more responsive than those deprived of androgens. For instance, pJnk content was increased in both AR groups but this increase was more important in intact animals. Jnk can be phosphorylated and activated by stress stimuli and its differential activation could explain in part, differences in the cardiac response to overload between AR and AROcx rats [36].

Hypertrophic marker gene expression results showed that AR animals myocardium sensed increased LV wall stress. Again, those genes were more expressed in the LV of intact AR rats, especially *Anp* and *Trpc6*, which might suggest a greater perceived stress from volume overload. This also suggest that androgens modulate heart wall stress sensing. Interestingly, focal adhesion kinase, a mediator of integrin activation, is strongly downregulated in the orchietomized rat heart regardless of the presence of a hemodynamic stress. With the exception of Jnk signaling, the effects of the loss of androgens did not seem to be mediated via Akt, Gsk3 or p38 signaling. All AR animals had higher levels of pAkt and seemed to have enhanced Akt activity, as pGsk3 content similarly increased with the disease.

Increased hypertrophy in intact AR rats is probably related to anabolic effects of androgens. Testosterone can induce hypertrophy in cultured cardiac myocytes [15]. The pro-hypertrophic effects of androgens may be amplified by heart stress, which is probably the case here with the LV volume overload. One proposed mechanism to explain hypertrophy induced by testosterone is higher calcium concentrations in cardiac myocytes, which can activate multiple pro-hypertrophic pathways [37-39]. This could explain the higher basal levels of pS6 and pPkd we observed in intact groups because those proteins can be phosphorylated by calcium signalling intermediates [31, 40]. In addition, calcium stimulus activates calcineurin, which can subsequently dephosphorylate the NFAT transcription factor, the latter activating pro-hypertrophic gene expression. The

increased pJnk content we observed in the intact AR group could antagonize calcineurin effects through phosphorylation of NFAT. However, Jnk is not able to totally block calcineurin hypertrophic effects, which maintains the balance toward hypertrophic stimulation [41]. In addition, testosterone stimulation of cardiomyocytes can result in S6 phosphorylation, which mediate cardiac growth and/or hypertrophy [42].

As we had previously reported in this rat model of LV volume overload, many genes related to myocardial energy metabolism were modulated in the intact AR LV [20, 32, 43]. As previously observed for females, orchietomized AR rats displayed less modulation of those genes [32]. This was also true for several genes encoding for mitochondrial function. The expected shift toward glucose use by the myocardium was observed in intact AR rats where hexokinase activity was enhanced and a decrease of HADH/HK ratio was recorded. There was no change in activities of other energy metabolism enzymes studied (i.e. citrate synthase, succinate dehydrogenase and creatine kinase) suggesting that only some of these enzymes are influenced by either the disease or hormonal status. Moreover, ketone body metabolism also seems impaired by the hormonal status and the disease, as it was observed with BDH assay. Conversely, ketone body use usually increases in heart hypertrophy and HF [44]. However, studies on ketone body metabolism during heart hypertrophy were usually done on pressure overload models, which could differ from predominantly volume overload situations. More studies on ketone body metabolism in volume overload hypertrophy will be needed to draw any clear conclusion.

Pathological remodeling of the heart frequently involves down regulation of fatty acids use in order to decrease myocardial oxygen consumption [29, 43]. Here, we show that hormonal status of males with volume overload influences their myocardial metabolic profile. In addition, estrogens are not the only mediator of sexual dimorphism in the metabolic profile induced by heart hypertrophy, as it has been suggested [45]. Androgen deprivation by orchietomy can reduce metabolic changes without abolishing it. This suggests that AROcx animals could have a relatively preserved myocardial energy metabolism, which could help in response to the higher energy demands from cardiac hypertrophy. This also suggests that androgens contribute to the myocardial energy switch during pathological hypertrophy.

In addition to the enhanced hypertrophy and metabolic changes in the intact AR animals, this group probably experienced increased myocardial oxidative stress. Glutathione peroxidase activity was enhanced. Presence of androgens were also linked to increased catalase activity. Genes related to ROS metabolism saw their expression to be more altered in presence of androgens in AR rats. Expression of *Nox2*, which is associated to ROS production was increased in intact AR animals whereas, a small decrease in expression of superoxide dismutase genes (e.g. *Sod1*, *Sod2*) related to protection mechanisms was recorded. Some of these changes were also present in the AROcx group, but again, with less amplitude. This implies that androgens may influence ROS metabolism, by either increasing their production and/or decreasing protective mechanisms.

There is no clear evidence of androgens effects on the hypertrophic heart and on heart failure in literature. HF male patients often display hypoandrogenism. Androgens therapy in HF patients sometimes help maintaining functional capacity, but these benefits may be explained by peripheral effects of androgens on skeletal muscle, without directly improving heart function [46]. In addition, different types of androgens may not have the same impact on the heart: testosterone can stimulate coronary vasodilatation [47], whereas dihydrotestosterone (DHT, the product of testosterone transformation by the 5 $\alpha$ -reductase) could impair heart function and adaptation to stress by enhancing fibrosis [48]. For instance, even if both testosterone and DHT, induce hypertrophy in cardiomyocytes, only DHT increases ANP levels [15]. In fact, 5 $\alpha$ -reductase activity and DHT levels may be increased in the hypertrophic heart, which could enhance androgens negative effects [49, 50].

One limitation of our study is that we did not study the effect of androgen replacement therapy on orchietomized animals. It is not clear if we could have reproduced physiological androgen levels in our animals over a long period of 6 months. We would have to give a therapy with the different types of androgens because they do not have the same putative effects and giving only one type of androgens would not reproduce the physiological context. Also, the levels would have to be monitored to avoid supra-physiological levels of androgens, which are known to be deleterious [51].

Another limitation is that rats have been orchietomized at a relatively young age, before their natural growth has ended. This may have influenced the heart response to the hemodynamic stress. Experiments in older rats could have been informative and should be realized in the future. Unlike the situation encountered in most human patients, regurgitation was induced acutely in the animals enacting a probably more intense response of the heart than the one experienced by AR patients.

In conclusion, we showed that androgens reduce the hypertrophic response of the heart caused by severe and chronic volume overload from aortic valve regurgitation. Androgens lead to more hypertrophy possibly by enhancing the capacity of the heart to sense and to respond to increased wall stress. Loss of androgens in AROcx animals also lead to a hypertrophic transcriptional pattern with almost no alteration in gene expression related to MEC or to energy metabolism, which is very similar to AR females [8]. Unlike AR females, AROcx males have reduced hypertrophy suggesting that factors related to biological sex and/or estrogens have to be taken into account. Estrogens have been extensively studied in pre-clinical models of cardiac hypertrophy. Here we show that they do not constitute the sole steroid hormone mediators of sexual dimorphism. Androgens are also of major significance and they could be responsible for more maladaptive cardiac remodeling and a worse prognosis.

## 2.8 References

1. Roth, G.A., et al., *Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015*. J Am Coll Cardiol, 2017. **70**(1): p. 1-25.
2. Leinwand, L.A., *Sex is a potent modifier of the cardiovascular system*. J Clin Invest, 2003. **112**(3): p. 302-7.
3. Roger, V.L., et al., *Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2012. **125**(1): p. e2-e220.
4. Lopaschuk, G.D., et al., *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease*. Physiol Rev, 2010. **90**(1): p. 207-58.
5. Champetier, S., et al., *Gene profiling of left ventricle eccentric hypertrophy in aortic regurgitation in rats: rationale for targeting the beta-adrenergic and renin-angiotensin systems*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(3): p. H669-77.
6. Grossman, W., D. Jones, and L.P. McLaurin, *Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle*. J Clin Invest, 1975. **56**(1): p. 56-64.
7. Witt, H., et al., *Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice*. J Mol Med (Berl), 2008. **86**(9): p. 1013-24.
8. Beaumont, C., et al., *Female rats with severe left ventricle volume overload exhibit more cardiac hypertrophy but fewer myocardial transcriptional changes than males*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 729.
9. Dent, M.R., P.S. Tappia, and N.S. Dhalla, *Gender differences in cardiac dysfunction and remodeling due to volume overload*. J Card Fail, 2010. **16**(5): p. 439-49.
10. Gardner, J.D., G.L. Brower, and J.S. Janicki, *Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload*. J Card Fail, 2002. **8**(2): p. 101-7.
11. Blenck, C.L., et al., *The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease*. Circ Res, 2016. **118**(8): p. 1294-312.
12. Pugh, P.J., T.H. Jones, and K.S. Channer, *Acute haemodynamic effects of testosterone in men with chronic heart failure*. Eur Heart J, 2003. **24**(10): p. 909-15.
13. Malkin, C.J., et al., *Testosterone therapy in men with moderate severity heart failure: a double-blind randomized placebo controlled trial*. Eur Heart J, 2006. **27**(1): p. 57-64.
14. Xu, L., et al., *Testosterone therapy and cardiovascular events among men: a systematic review and meta-analysis of placebo-controlled randomized trials*. BMC Med, 2013. **11**: p. 108.
15. Marsh, J.D., et al., *Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes*. Circulation, 1998. **98**(3): p. 256-61.
16. Basualto-Alarcón, C., et al., *Testosterone signals through mTOR and androgen receptor to induce muscle hypertrophy*. Med Sci Sports Exerc, 2013. **45**(9): p. 1712-20.
17. van Weerden, W.M., et al., *Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens*. Life Sci, 1992. **50**(12): p. 857-61.
18. Plante, E., et al., *Left ventricular response to sustained volume overload from chronic aortic valve regurgitation in rats*. J Card Fail, 2003. **9**(2): p. 128-40.
19. Arsenault, M., et al., *Experimental aortic regurgitation in rats under echocardiographic guidance*. J Heart Valve Dis, 2002. **11**(1): p. 128-34.
20. Arsenault, M., et al., *Angiotensin II-converting enzyme inhibition improves survival, ventricular remodeling, and myocardial energetics in experimental aortic regurgitation*. Circ Heart Fail, 2013. **6**(5): p. 1021-8.
21. Lachance, D., et al., *Moderate exercise training improves survival and ventricular remodeling in an animal model of left ventricular volume overload*. Circ Heart Fail, 2009. **2**(5): p. 437-45.
22. Plante, E., et al., *Impact of anesthesia on echocardiographic evaluation of systolic and diastolic function in rats*. J Am Soc Echocardiogr, 2006. **19**(12): p. 1520-5.
23. Plante, E., et al., *Benefits of long-term beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(4): p. H1888-95.

24. Bouchard-Thomassin, A.A., et al., *A high-fructose diet worsens eccentric left ventricular hypertrophy in experimental volume overload*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(1): p. H125-34.
25. Dhahri, W., et al., *Chronic high-fat diet-induced obesity decreased survival and increased hypertrophy of rats with experimental eccentric hypertrophy from chronic aortic regurgitation*. BMC Cardiovasc Disord, 2014. **14**: p. 123.
26. Plante, E., et al., *Effectiveness of beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation*. Circulation, 2004. **110**(11): p. 1477-83.
27. Belanger, M.M., E. Roussel, and J. Couet, *Up-regulation of caveolin expression by cytotoxic agents in drug-sensitive cancer cells*. Anticancer Drugs, 2003. **14**(4): p. 281-7.
28. Leenders, J.J., et al., *Repression of cardiac hypertrophy by KLF15: underlying mechanisms and therapeutic implications*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36754.
29. Sambandam, N., et al., *Energy metabolism in the hypertrophied heart*. Heart Fail Rev, 2002. **7**(2): p. 161-73.
30. Mueckler, M. and B. Thorens, *The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 121-38.
31. Heineke, J. and J.D. Molkentin, *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 589-600.
32. Beaumont, C., et al., *Female rats with severe left ventricle volume overload exhibit more cardiac hypertrophy but fewer myocardial transcriptional changes than males*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 729.
33. Kloner, R.A., et al., *Testosterone and Cardiovascular Disease*. J Am Coll Cardiol, 2016. **67**(5): p. 545-57.
34. Plante, E., et al., *Comparative study of vasodilators in an animal model of chronic volume overload caused by severe aortic regurgitation*. Circ Heart Fail, 2009. **2**(1): p. 25-32.
35. Duran, J., et al., *Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Androgen Signaling Pathways Modulate MEF2 Activity in Testosterone-Induced Cardiac Myocyte Hypertrophy*. Front Pharmacol, 2017. **8**: p. 604.
36. Sabapathy, K., et al., *Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation*. Mol Cell, 2004. **15**(5): p. 713-25.
37. Lucas-Herald, A.K., et al., *Genomic and non-genomic effects of androgens in the cardiovascular system: clinical implications*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(13): p. 1405-1418.
38. Sebag, I.A., et al., *Sex hormone control of left ventricular structure/function: mechanistic insights using echocardiography, expression, and DNA methylation analyses in adult mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(4): p. H1706-15.
39. Vicencio, J.M., et al., *Testosterone induces an intracellular calcium increase by a nongenomic mechanism in cultured rat cardiac myocytes*. Endocrinology, 2006. **147**(3): p. 1386-95.
40. Vicencio, J.M., et al., *Anabolic androgenic steroids and intracellular calcium signaling: a mini review on mechanisms and physiological implications*. Mini Rev Med Chem, 2011. **11**(5): p. 390-8.
41. Liang, Q., et al., *c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling*. EMBO J, 2003. **22**(19): p. 5079-89.
42. Altamirano, F., et al., *Testosterone induces cardiomyocyte hypertrophy through mammalian target of rapamycin complex 1 pathway*. J Endocrinol, 2009. **202**(2): p. 299-307.
43. Roussel, E., et al., *Transcriptional Changes Associated with Long-Term Left Ventricle Volume Overload in Rats: Impact on Enzymes Related to Myocardial Energy Metabolism*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 949624.
44. Aubert, G., et al., *The Failing Heart Relies on Ketone Bodies as a Fuel*. Circulation, 2016. **133**(8): p. 698-705.
45. Peterson, L.R., et al., *Sex differences in myocardial oxygen and glucose metabolism*. J Nucl Cardiol, 2007. **14**(4): p. 573-81.
46. Toma, M., et al., *Testosterone supplementation in heart failure: a meta-analysis*. Circ Heart Fail, 2012. **5**(3): p. 315-21.

47. Webb, C.M., et al., *Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease*. *Circulation*, 1999. **100**(16): p. 1690-6.
48. Montalvo, C., et al., *Androgens contribute to sex differences in myocardial remodeling under pressure overload by a mechanism involving TGF- $\beta$* . *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e35635.
49. Thum, T. and J. Borlak, *Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy*. *FASEB J*, 2002. **16**(12): p. 1537-49.
50. Zwadlo, C. and J. Borlak, *Dihydrotestosterone--a culprit in left ventricular hypertrophy*. *Int J Cardiol*, 2012. **155**(3): p. 452-6.
51. Pirompol, P., et al., *Supra-physiological dose of testosterone induces pathological cardiac hypertrophy*. *J Endocrinol*, 2016. **229**(1): p. 13-23.

## 2.9 Tables

Parameters	S (n=9)	AR (n=8)	SOcx (n=10)	AROCx (n=9)
Body weight, g	820 ± 25	751 ± 20 <sup>¶</sup>	562 ± 17 <sup>T</sup>	573 ± 14 <sup>T</sup>
Tibia, mm	60.5 ± 0.2	60.7 ± 0.4	56.0 ± 0.2 <sup>T</sup>	56.1 ± 0.3 <sup>T</sup>
Heart, mg	1549 ± 27	2487 ± 85 <sup>¶</sup>	1122 ± 24 <sup>T</sup>	1594 ± 43 <sup>¶T</sup>
Indexed Heart, mg/g	1.90 ± 0.05	3.32 ± 0.10 <sup>¶</sup>	2.01 ± 0.05	2.82 ± 0.10 <sup>¶T</sup>
LV, mg	1182 ± 17	1956 ± 64 <sup>¶</sup>	861 ± 20 <sup>T</sup>	1249 ± 36 <sup>¶T</sup>
Indexed LV, mg/g	1.45 ± 0.04	2.62 ± 0.08 <sup>¶</sup>	1.54 ± 0.04	2.21 ± 0.09 <sup>¶T</sup>
RV, mg	277 ± 14	366 ± 24 <sup>¶</sup>	187 ± 8 <sup>T</sup>	252 ± 17 <sup>¶T</sup>
Indexed RV, mg/g	0.34 ± 0.02	0.49 ± 0.03 <sup>¶</sup>	0.33 ± 0.01	0.44 ± 0.03 <sup>¶</sup>
Lungs, g	3.2 ± 0.2	3.4 ± 0.2	2.2 ± 0.2 <sup>T</sup>	2.3 ± 0.2 <sup>T</sup>

**Table 2.1. Animal characteristics at the end of the protocol.** S: sham control group, SOcx: sham orchietomized group, AR: aortic regurgitation control group, AROcx: AR orchietomized group, LV: left ventricle and RV: right ventricle. Values are expressed as the mean ± SEM. Group comparisons were made with Two-way ANOVA and Holm-Sidak post-test. <sup>¶</sup> p < 0.05 vs. the respective sham group and <sup>T</sup> p < 0.05 vs. the respective intact (non-Ocx) group.

Parameters	S (n=9)	AR (n=12)	SOcx (n=10)	AROcx (n=9)
EDD, mm	9.41 ± 0.08	12.9 ± 0.2 <sup>¶</sup>	8.8 ± 0.1 <sup>T</sup>	10.2 ± 0.2 <sup>¶T</sup>
ESD, mm	4.7 ± 0.1	8.1 ± 0.3 <sup>¶</sup>	4.6 ± 0.1	6.1 ± 0.3 <sup>¶T</sup>
SW, mm	1.24 ± 0.04	1.83 ± 0.04 <sup>¶</sup>	1.13 ± 0.02	1.27 ± 0.05 <sup>¶T</sup>
RWT, unitless	0.263 ± 0.008	0.285 ± 0.005	0.257 ± 0.005	0.250 ± 0.008 <sup>T</sup>
FS, %	50.1 ± 1.2	37.1 ± 1.6 <sup>¶</sup>	47.4 ± 1.1	40.3 ± 1.6 <sup>¶</sup>
HR, bpm	362 ± 8	345 ± 12	362 ± 8	384 ± 6
SV, ul	399 ± 7	634 ± 33 <sup>¶</sup>	364 ± 5	498 ± 22 <sup>¶T</sup>
CO, mL/min	144 ± 4	217 ± 12 <sup>¶</sup>	132 ± 4	187 ± 11 <sup>¶</sup>
Aortic reg., %	N/A	85 ± 2	N/A	79 ± 3

**Table 2.2. Echocardiographic and hemodynamic parameters at the end of the protocol.**

EDD: end-diastolic diameter, ESD: end-systolic diameter, SW: septum wall thickness, RWT: relative wall thickness, FS: fractional shortening, HR: heart rate, SV: stroke volume, CO: cardiac output, bpm: beats per minute, Aortic reg.: aortic regurgitation, N/A: not applicable. Values are expressed as the mean ± SEM. Group comparisons were made with Two-way ANOVA and Holm-Sidak post-testing. <sup>¶</sup> p < 0.05 vs. the respective sham group and <sup>T</sup> p < 0.05 vs. the respective intact group.

## 2.10 Figure Legends

**Figure 2.1.** Survival of animals with aortic regurgitation during the protocol (A), mid left ventricle histological short-axis sections (B). Variation of heart weight (C) and LV weight (D) after tissue harvesting (n = 8-10/gr). For C and D, the measured parameters of animals with aortic regurgitation were reported on those of their respective sham group to obtain the % variation. For A, p-value from Logrank test. For C and D, Student t test.

**Figure 2.2.** Echocardiographic parameters on LV diastolic diameter, systolic function and compliance evaluated at the end of the protocol (n = 9-12/gr). Variations of end diastolic diameter (A), of fractional shortening (FS) (B) and of stroke volume (C). Evaluation of the E wave (D), E-wave slope (E) and A wave (F). For A-C, p-value above the graph is from Student t-test. D-F. Statistics in the boxes next to each graph are from Two-way ANOVA and Holm-Sidak post-testing. P-value of orchietomy (O), disease (D) and interaction (OxD), \*p < 0.05 vs. their respective sham group and + p-value < 0.05 between the indicated groups.

**Figure 2.3.** Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy (A, B) and extracellular matrix remodeling (C) markers. The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean  $\pm$  SEM (n = 5-6/gr.). Messenger RNA levels of the S group were normalized to 1 and is represented by the dotted line. The blue column represents the AR animals while orange columns represent AROcx animals. \*: p < 0.05 or \*\*: p < 0,01 vs. their respective sham group and +: p < 0.05 or ++: p < 0,01 between the indicated groups.

**Figure 2.4.** Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for proteins related to fatty acid uptake and oxidation (A), for proteins relevant to glucose metabolism (B) for transcription factors related to fatty acid metabolism (C) and mitochondrial function and biogenesis (D). The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean  $\pm$  SEM (n = 5-6/gr.). The mRNA level of the S group was normalized to 1 and is represented by the dotted line. The blue column represents the AR animals while orange columns represent AROcx animals. \*: p < 0.05 or \*\*: p < 0,01 vs. their respective sham group and +: p < 0.05 or ++: p < 0,01 between the indicated groups.

**Figure 2.5.** LV myocardial activity levels of enzymes implicated in myocardial energy metabolism. Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase (HADH) (A), hexokinase (B), the HADH/hexokinase ratio (C) Creatine kinase (CK) (D), citrate synthase (CS) (E), succinate dehydrogenase (SDH) (F) and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase (BDH) (G). The results are reported as the mean  $\pm$  SEM (n = 8/gr.). Probability values in the boxes are from a 2-way ANOVA and symbols, from Holm-Sidak multiple comparisons post-testing. \*p < 0.05 vs. their respective sham group and +p-value < 0,05 between the indicated groups.

**Figure 2.6.** LV myocardial oxidative stress. Superoxide dismutase (SOD) (A), Catalase (B) and Glutathione peroxidase (C) enzymatic activities. (n = 8/gr.). Real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for oxidative stress markers (D). The results are reported as the mean  $\pm$  SEM (n = 5-6/gr.). Messenger RNA levels of the S group were normalized to 1 and are represented by the dotted line. Statistics in the boxes next to graphs are from Two-way ANOVA and Holm-Sidak post-testing results are represented with the bars and symbols over columns. \*: p < 0.05 or \*\*: p < 0.01 vs. their respective sham group and +: p < 0.05 or ++: p < 0.01 between the indicated groups.

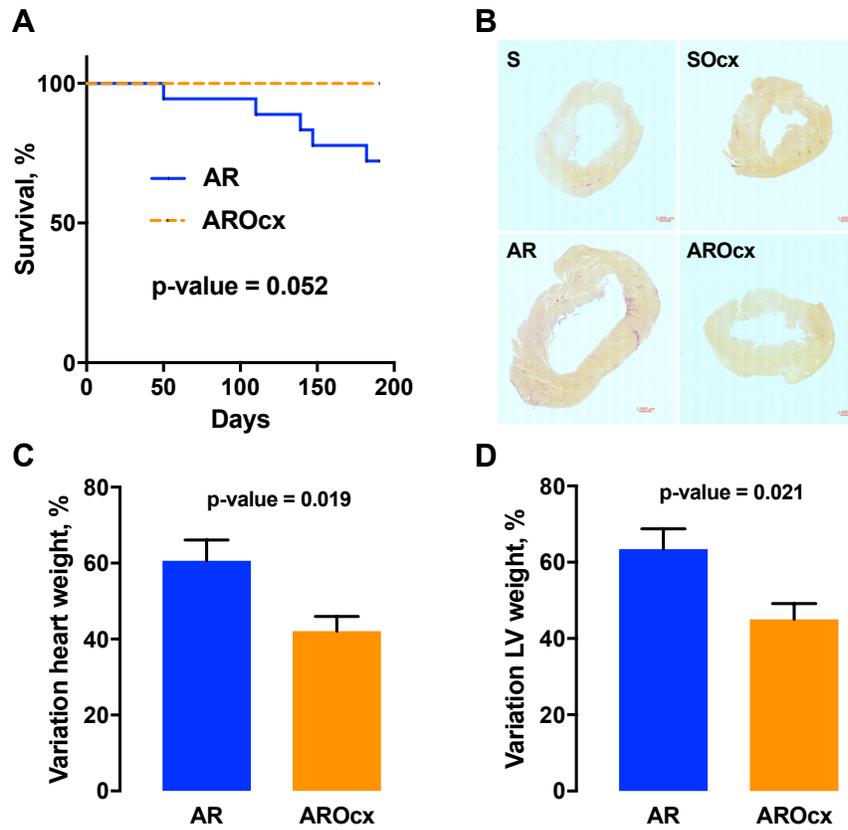
**Figure 2.7.** Evaluation by Western Blot of LV protein contents of Erk1/2, p38 and Jnk. Representative blots for each signaling molecules (A). Graphs B to J represent densitometric measurements after normalization. Phosphorylated Erk1/2 (B), total Erk1/2 (C) and ratio for pErk1/2 over total Erk1/2 (D), phosphorylated p38 (E), total p38 (F) and ratio for pp38 over total p38 (G), phosphorylated Jnk2 (H), total Jnk (I) and ratio for pJnk over total Jnk (J). The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean  $\pm$  SEM (n = 6/gr.). Probability values in the boxes are from a 2-way ANOVA and symbols, from Holm-Sidak multiple comparisons post-testing. \*p: < 0.05 vs. their respective sham group and +: p-value < 0.05 between the indicated groups.

**Figure 2.8.** Evaluation by Western Blot of the LV protein levels of Pten, Akt and Gsk3. Representative blots for each signaling molecules (A). Graphs B to K represent densitometric measurement after normalization. Phosphorylated Pten (B), non-phosphorylated Pten (C), total Pten (D) and ratio for pPten over total Pten (E), phosphorylated Akt on serine 473 (F), total Akt (G) and ratio for pAkt over total Akt (H), phosphorylated Gsk3 (I), total Gsk3 (J) and ratio for pGsk3 over total Gsk3 (K). The results

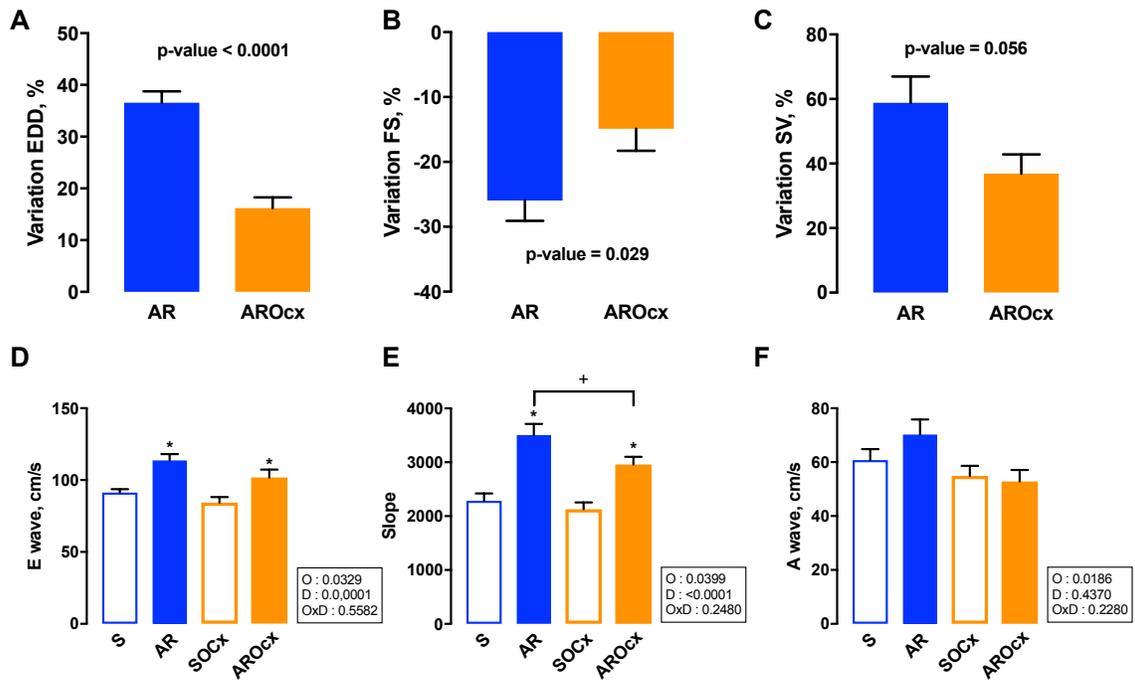
are reported in arbitrary units (AU) as the mean  $\pm$  SEM (n = 6/gr.). Probability values in the boxes are from a 2-way ANOVA and symbols, from Holm-Sidak multiple comparisons post-testing. \*: p < 0.05 vs. their respective sham group and +: p-value < 0.05 between the indicated groups.

**Figure 2.9.** Evaluation by Western Blot of the LV protein levels of S6, Fak and Pkd. Representative blots for each signaling molecules (A). Graphs B to J represent densitometric measurement after normalization. Phosphorylated S6 on serines 240 and 244 (B), total S6 (C) and ratio for pS6 over total S6 (D), phosphorylated Fak (E), total Fak (F) and ratio for pFak over total Fak (G), phosphorylated Pkd (H), total Pkd (I) and ratio for pPkd over total Pkd (J). The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean  $\pm$  SEM (n = 6/gr.). Probability values in the boxes are from a 2-way ANOVA and symbols, from Holm-Sidak multiple comparisons post-testing. \*: p < 0.05 vs. their respective sham group and +: p-value < 0.05 between the indicated groups.

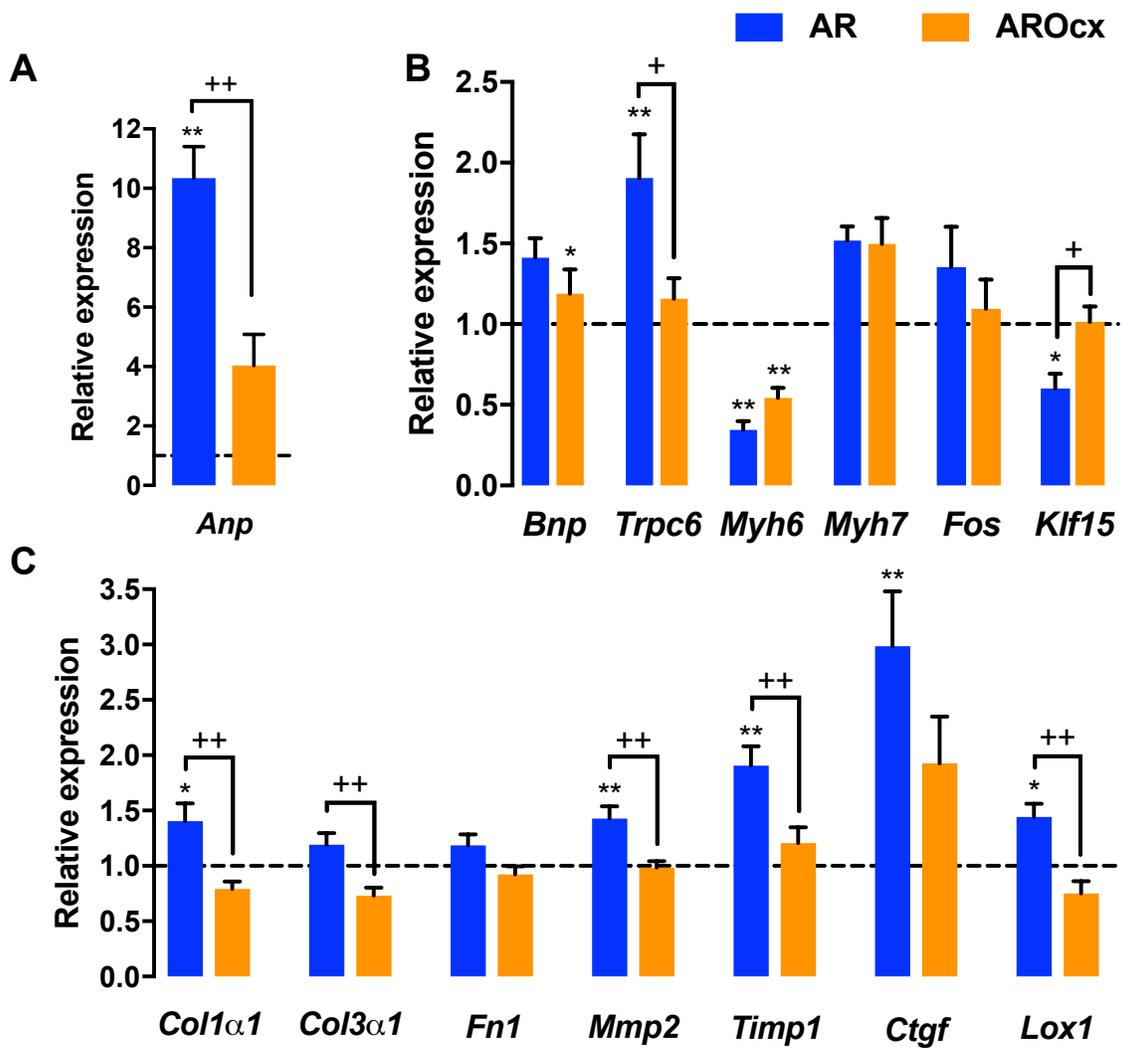
## 2.11 Figures



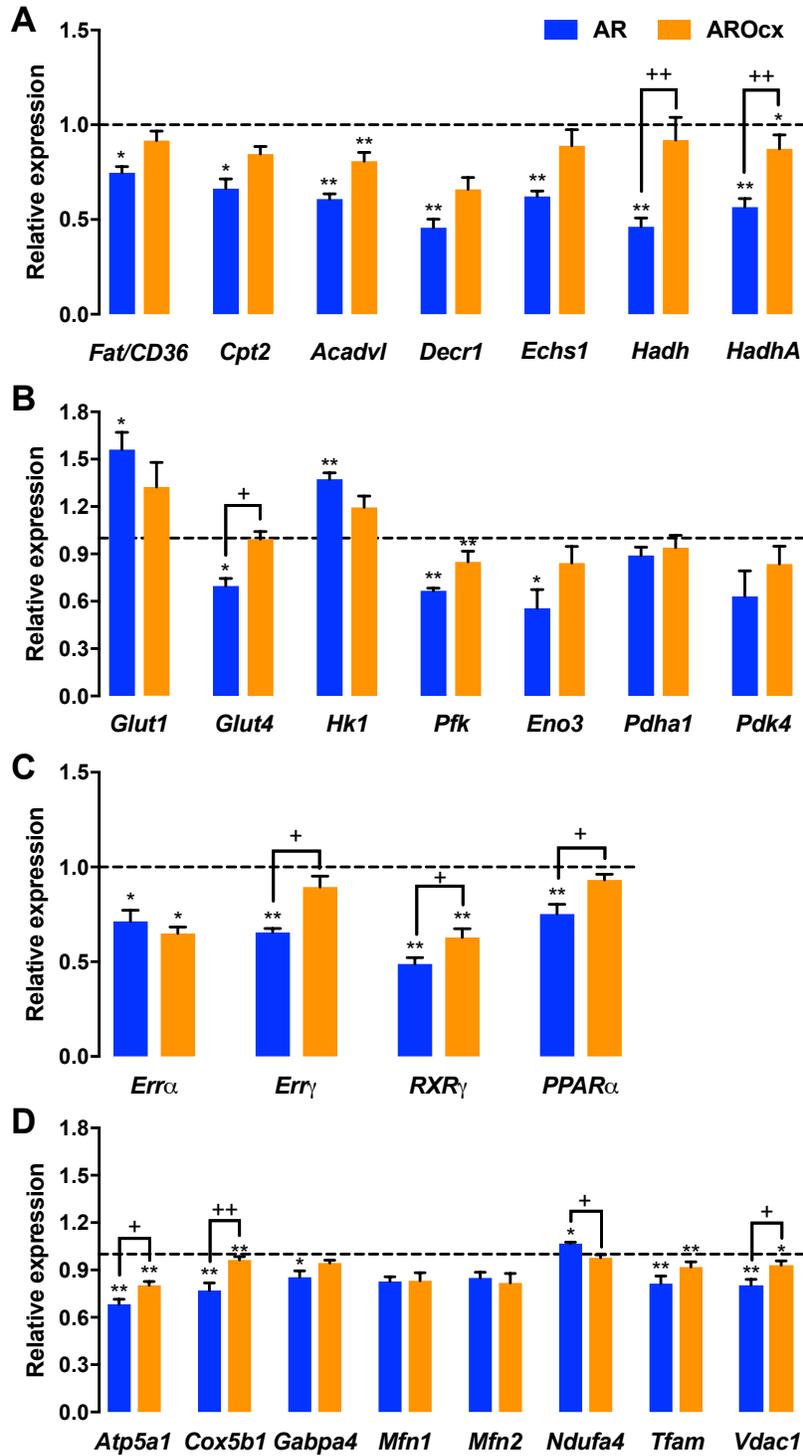
**Figure 2.1.** Survival of animals with aortic regurgitation during the protocol, mid left ventricle histological short-axis sections and variations of heart weight and LV weight



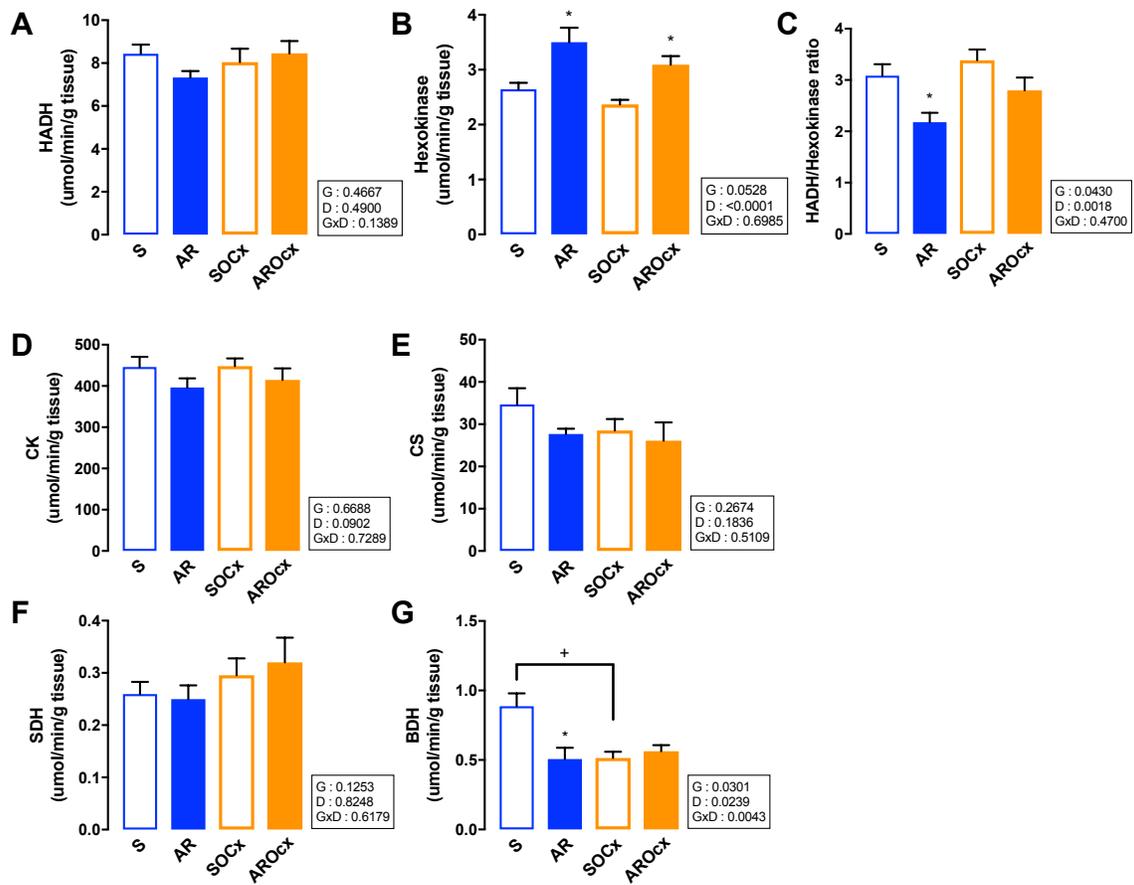
**Figure 2.2. Echocardiographic parameters on LV diastolic diameter, systolic function and compliance**



**Figure 2.3.** Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy and extracellular matrix remodeling markers



**Figure 2.4.** mRNA levels of genes encoding for proteins related to fatty acid uptake and oxidation, for proteins relevant to glucose metabolism, for transcription factors related to fatty acid metabolism and mitochondrial function and biogenesis



**Figure 2.5. LV myocardial activity levels of enzymes implicated in myocardial energy metabolism**

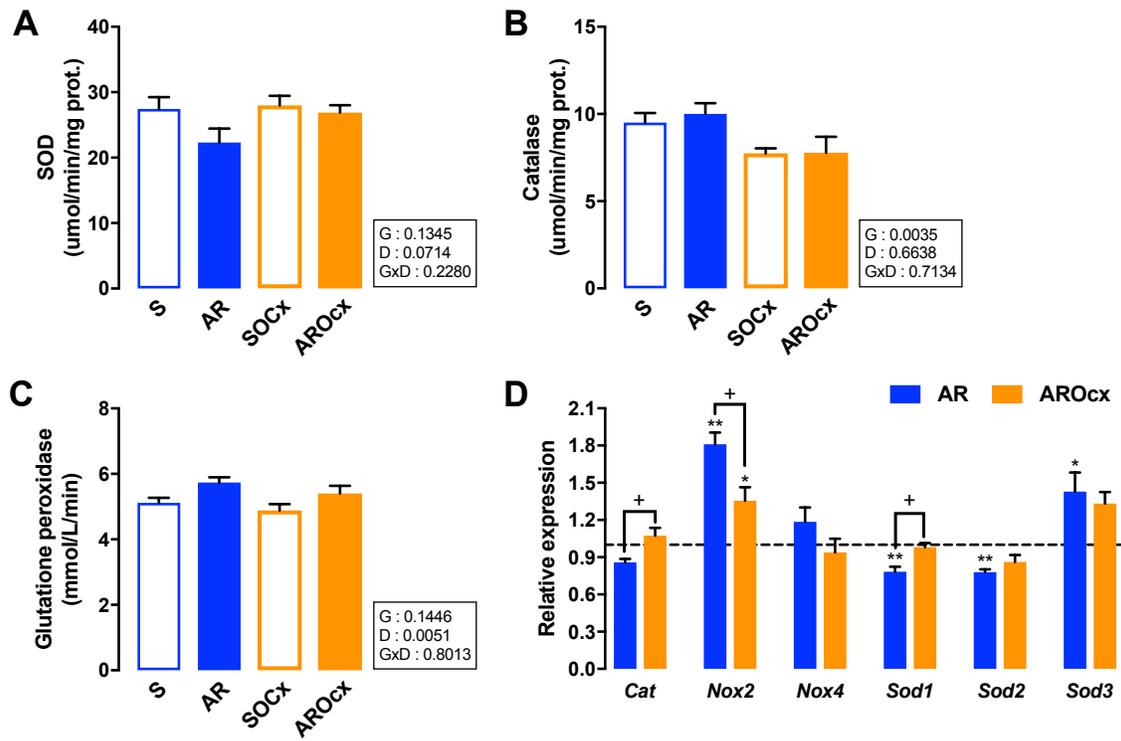
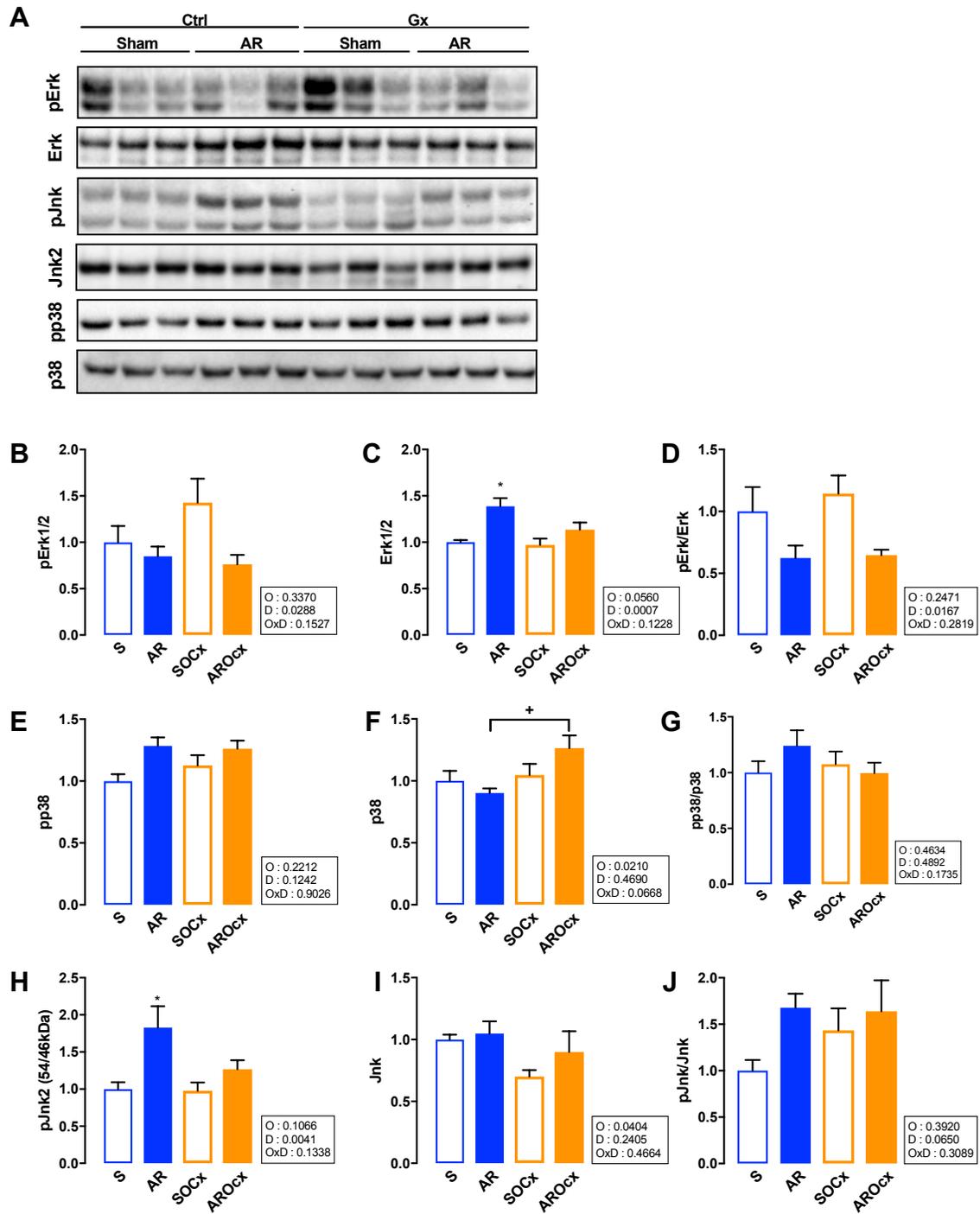
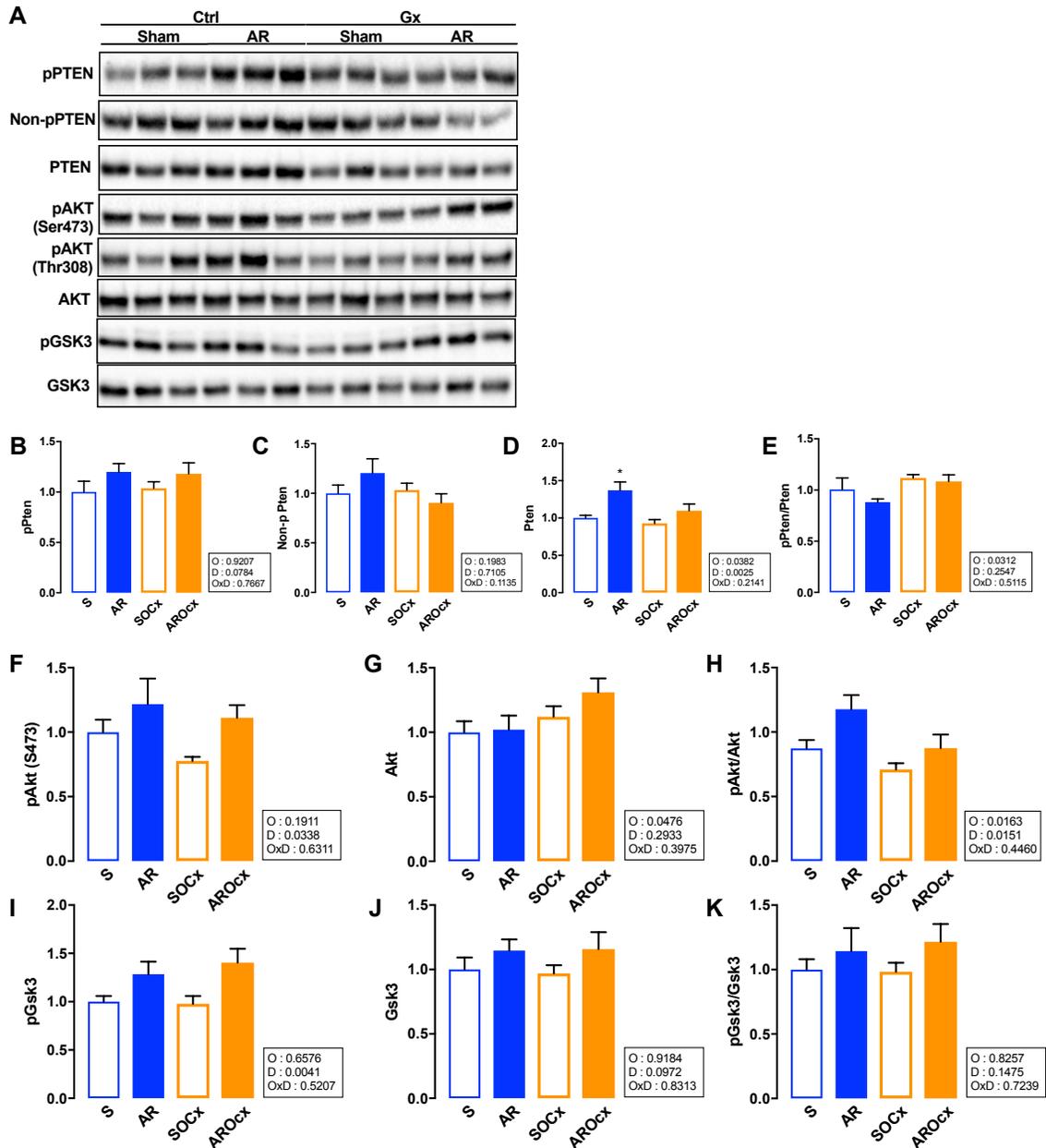


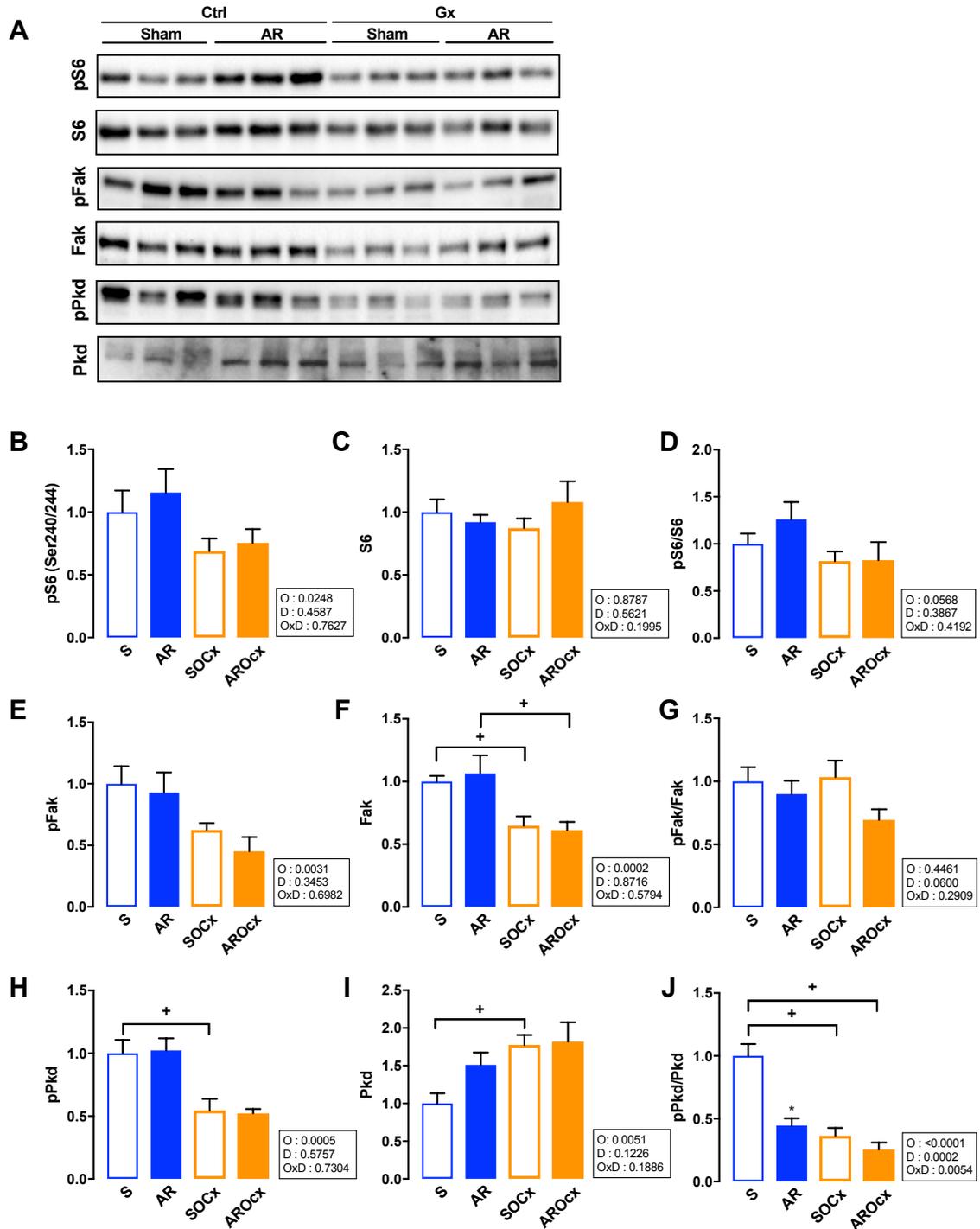
Figure 2.6. LV myocardial oxidative stress



**Figure 2.7. Evaluation by Western Blot of LV protein contents of Erk1/2, p38 and Jnk**



**Figure 2.8. Evaluation by Western Blot of the LV protein levels of Pten, Akt and Gsk3**



**Figure 2.9. Evaluation by Western Blot of the LV protein levels of S6, Fak and Pkd**

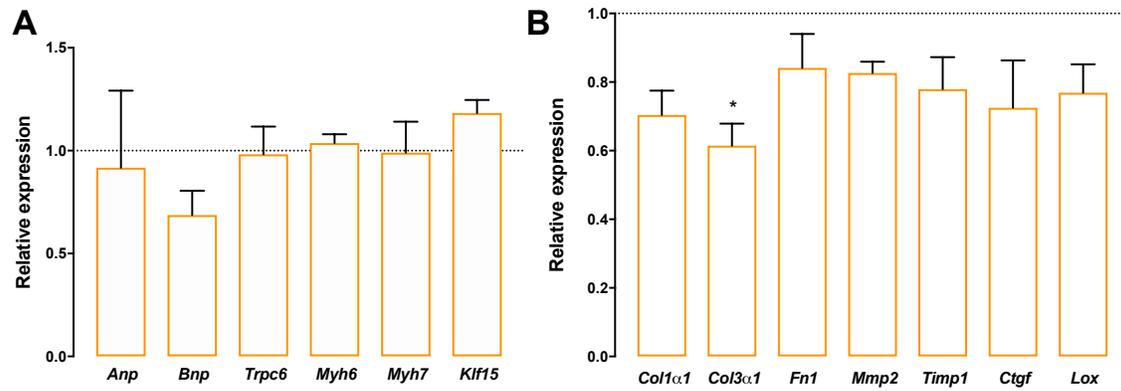
## 2.12 Supplemental tables and figures

**Table 2.S1. Name and abbreviation of all primers used for gene expression analysis by quantitative RT-PCR.** The table also includes catalogue numbers (from IDT or Qiagen) and the amplicon of the primers

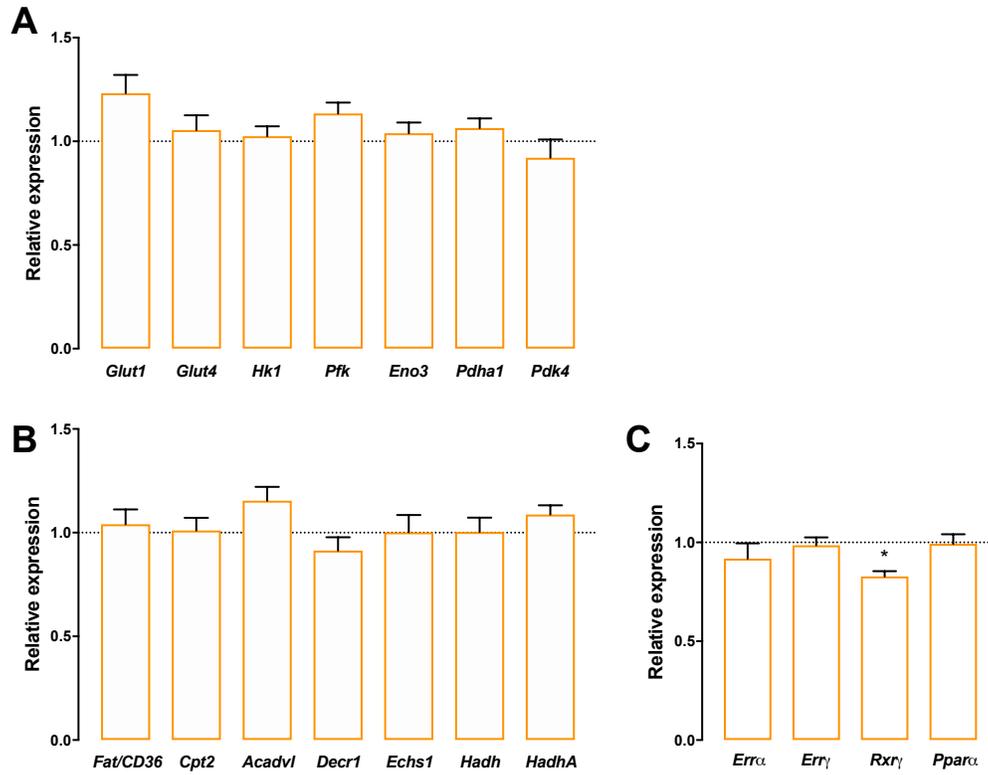
mARN	Symbol	Cat. No.	Amplicon (pb)
acetyl-CoA acyltransferase 2	<i>Acaa2</i>	Rn.PT.58.5300756	111
acyl-CoA dehydrogenase, very long chain	<i>Acadvl</i>	Rn.PT.58.13279450	147
acetyl CoA acetyltransferase 1	<i>Acat</i>	Rn.PT.58.18447027	102
ANT-1 solute carrier family 25, member 4	<i>Ant1, Slc25a4</i>	Rn.PT.58.36556272	103
ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	<i>Atp5a1</i>	Rn.PT.58.6992257	100
Catalase	<i>Cat</i>	Rn.PT.58.44210986	147
CD36/ fatty acid translocase	<i>Fat/CD36</i>	Rn.PT.58.13645667	122
procollagen-1 alpha-1	<i>Col1a1</i>	Rn.PT.58.7562513	134
procollagen-3 alpha-1	<i>Col3a1</i>	Rn.PT.58.11138874	100
cytochrome c oxidase subunit 5B	<i>Cox5b1</i>	Rn.PT.58.8467954	138
cartinine palmitoyltransferase 1b, muscle	<i>Cpt1b</i>	Rn.PT.58.9348596	105
carnitine palmitoyltransferase 2	<i>Cpt2</i>	Rn.PT.58.5579430	107
carnitine O-acetyltransferase	<i>Crat</i>	Rn.PT.58.36282119	97
connective tissue growth factor	<i>Ctgf</i>	QT00182021	102
2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	<i>Decr1</i>	Rn.PT.58.44352482	120
enoyl CoA hydratase 1, peroxisomal	<i>Ech1</i>	Rn.PT.58.33832465	99
enoyl CoA hydratase, short chain 1, mitochondrial	<i>Echs1</i>	Rn.PT.58.44352482	95
enoyl CoA delta isomerase 1	<i>Eci</i>	Rn.PT.58.37662439	119
enolase 3, beta	<i>Eno3</i>	Rn.PT.58.37792224	103
estrogen related receptor, alpha	<i>Erra</i>	Rn.PT.58.5170310	111
estrogen related receptor, gamma	<i>Erry</i>	Rn.PT.58.8028733	141
osteosarcoma viral oncogene homolog	<i>Fos</i>	QT01576330	73

Fibronectin 1	<i>Fn1</i>	Rn.PT.58.18226984	114
GA binding protein transcription factor, alpha	<i>Gapba</i>	Rn.PT.58.12555216	137
solute carrier family 2 member 1	<i>Glut1, Slc2a1</i>	QT00178024	85
solute carrier family 2 member 4	<i>Glut4, Slc2a4</i>	Rn.PT.58.34939400	115
hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	<i>Hadh</i>	Rn.PT.58.17867024	135
hydroxyacyl-CoA dehydrogenase alpha	<i>HadhA</i>	Rn.PT.58.46222281	138
hydroxyacyl-CoA dehydrogenase beta	<i>HadhB</i>	Rn.PT.58.7613498	130
Hexokinase 1	<i>Hk1</i>	Rn.PT.58.8913174	108
Hexokinase 2	<i>Hk2</i>	Rn.PT.58.46137159	110
Krüppel-like factor 15	<i>Klf15</i>	Rn.PT.58.12431283	129
Lysyl oxidase	<i>Lox1</i>	Rn.PT.58.10677971	150
mitofusin 1	<i>Mfn1</i>	Rn.PT.58.44207597	106
mitofusin 2	<i>Mfn2</i>	Rn.PT.58.13375660	124
matrix metalloproteinase-2	<i>Mmp2</i>	Rn.PT.58.44737355	87
myosin, heavy polypeptide 6, cardiac	<i>Myh6</i>	Rn.PT.58.8646063	150
myosin, heavy polypeptide 7, cardiac	<i>Myh7</i>	Rn.PT.58.34623828	125
NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A4	<i>Ndufa4</i>	Rn.PT.58.11318539	139
cytochrome b-245 heavy chain	<i>Cybb, Nox2</i>	Rn.PT.58.9525537	139
NADPH oxidase 4	<i>Nox4</i>	Rn.PT.58.11992143	107
natriuretic peptide precursor type A	<i>Nppa, Anp</i>	Rn.PT.58.5865224	79
natriuretic peptide precursor type B	<i>Nppb, Bnp</i>	Rn.PT.58.5595685	108
pyruvate dehydrogenase alpha 1	<i>Pdha1</i>	Rn.PT.58.14147312	145
pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	<i>Pdk4</i>	Rn.PT.58.6203434	135
Phosphofructokinase	<i>Pfk</i>	Rn.PT.58.17873275	122
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	<i>Ppara</i>	Rn.PT.58.35488724	134
cyclophilin A	<i>Ppia</i>	Rn.PT.39a,22214830	140
retinoid X receptor gamma	<i>Rxry</i>	Rn.PT.58.6519292	103
superoxide dismutase 1, soluble	<i>Sod1</i>	Rn.PT.58.5432362	138
superoxide dismutase 2, mitochondrial	<i>Sod2</i>	Rn.PT.58.7509049	107

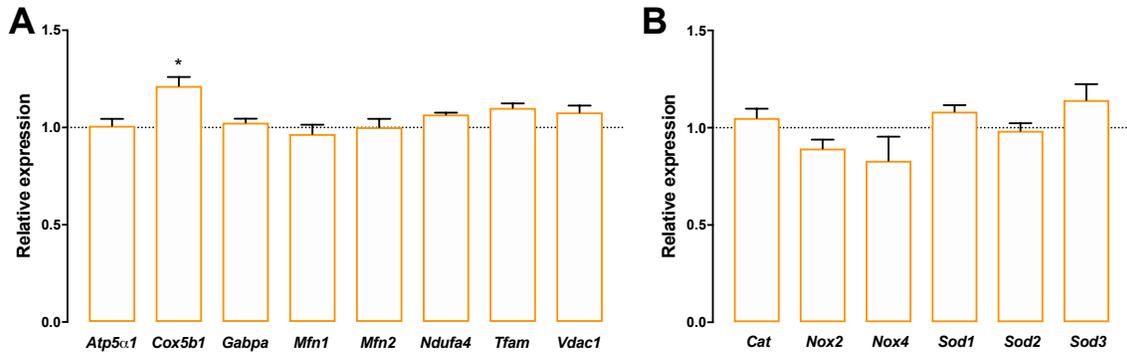
superoxide dismutase 3, extracellular	<i>Sod3</i>	QT00379358	92
transcription factor A, mitochondrial	<i>Tfam</i>	Rn.PT.58.13772978	124
Tissue inhibitor of metalloproteinases 1	<i>Timp1</i>	Rn.PT.58.34442920	127
transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6	<i>Trpc6</i>	Rn.PT.58.18089975	94
voltage-dependent anion channel 1	<i>Vdac1</i>	Rn.PT.58.37188705	116



**Figure 2.S1. Comparison of SOcx with S with real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy (A) extracellular matrix remodeling (B) markers.** The mRNA levels of the S group were normalized to 1 and are represented by the dotted line. The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean  $\pm$  SEM (n = 6/gr.). \*p < 0.05 vs. the S group.



**Figure 2.S2. Comparison of SOcx with S with real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for glucose uptake and glycolysis (A), fatty acid oxidation (B) and transcription factor (C) markers.** The mRNA levels of the S group were normalized to 1 and are represented by the dotted line. The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean  $\pm$  SEM (n = 6/gr.). \*p < 0.05 vs. the S group.



**Figure 2.S3. Comparison of SOcx with S with real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for mitochondrial function and biogenesis (A) and oxidative stress (B) markers.** The mRNA levels of the S group were normalized to 1 and are represented by the dotted line. The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean  $\pm$  SEM (n = 6/gr.). \*p < 0.05 vs. the S group.

# Chapitre 3 - Effets de la présence d'œstrogènes sur l'hypertrophie cardiaque chez les femelles soumises à une surcharge de volume chronique

## 3.1 Présentation de l'étude

En parallèle à l'étude sur les mâles intacts ou gonadectomisés présentée au chapitre 2, nous avons réalisé une étude comparable chez des femelles intacts ou ovariectomisées. Nous voulions investiguer quels seraient les effets de la présence ou de l'absence des œstrogènes dans le développement de l'HC en surcharge de volume. En d'autres mots, nous voulions savoir si la présence d'œstrogènes pourrait expliquer une partie du dimorphisme sexuel observé en HC. Le protocole chez les femelles était en tous points identique à celui présenté chez les mâles au chapitre 2, à l'exception que, pour l'étude des femelles, les myocardes n'ont pas fait l'objet d'une étude histologique, ni d'immunobuvardage au moment de la rédaction de ce mémoire.

Des femelles intacts, qui avaient toujours leurs ovaires, ont été comparées à des femelles ovariectomisées (Ovx), lesquelles n'avaient donc plus leurs gonades pour synthétiser des œstrogènes. Chacune de ces catégories se divisait en deux groupes, soit les animaux contrôles *Sham* et les animaux avec une régurgitation aortique *AR*. Au total, nous avons comparé quatre groupes : les femelles intacts *Sham* (S, n = 11), les femelles intacts *AR* (AR, n = 14), les femelles *Ovx Sham* (SOvx, n = 10) et les femelles *Ovx AR* (AROvx, n = 10). Chacun de ces groupes a été suivi six mois à la fin desquels une échocardiographie a été réalisée. Les cœurs ont été prélevés lors de l'euthanasie pour les peser et analyser leur expression génétique par RT-PCR quantitative et leur activité enzymatique ultérieurement.

Globalement, la perte des œstrogènes a eu peu d'effet sur le cœur des animaux, à l'exception de ce qui concerne le gain de masse cardiaque. Pour cette raison et par souci de concision, seulement les résultats les plus pertinents seront présentés dans ce chapitre.

## 3.2 Résultats

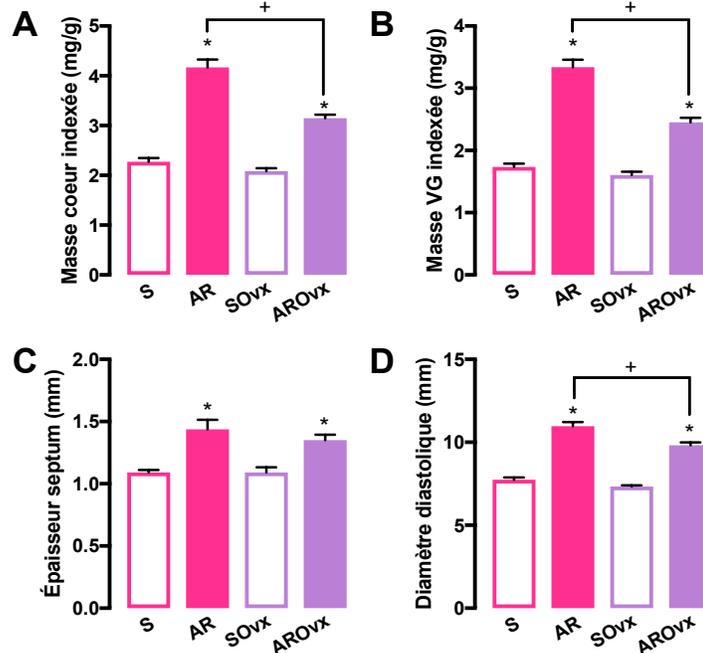
### 3.2.1 Hypertrophie cardiaque

La perte des œstrogènes chez les animaux ovariectomisés contrôles a eu un impact sur leur croissance et leur gain de masse corporelle. Les animaux ovariectomisés étaient plus petits comme en témoignent leur masse corporelle et leur longueur de tibia significativement plus petites (Tableau 3.1). Pour le cœur, la comparaison des masses cardiaques indexées chez les animaux sham n'est pas différente. Par contre, le gain de masse cardiaque indexée en réponse à la régurgitation aortique est plus important chez les animaux ayant toujours leurs ovaires (gain de 81% chez les AR contre un gain de 51% chez les AROcx en les comparant à leur groupe contrôle respectif,  $p = 0,0028$ ) (Figure 3.1A). Une remarque similaire s'applique quant au gain de masse du VG (Figure 3.1B); le gain de masse est moindre chez les animaux privés d'œstrogènes.

En ce qui concerne la forme du remodelage cardiaque, les deux groupes d'animaux malades ont présenté une HC plutôt excentrée (dilatation) caractérisée par un épaississement du septum interventriculaire et un fort élargissement du diamètre diastolique du VG. L'épaississement du septum interventriculaire était similaire entre les deux groupes d'animaux avec une régurgitation aortique (Figure 3.1C). Une différence significative est par contre présente dans la dilatation du VG : l'augmentation du diamètre diastolique chez les animaux ovariectomisés malades est moins important que chez les animaux intacts (Figure 3.1D).

Paramètres	S (n=11)	AR (n=14)	SOvx (n=10)	AROvx (n=10)
Masse corporelle, g	428 ± 15	428 ± 16	368 ± 11 §	417 ± 14
Tibia, mm	51.2 ± 0.3	52.8 ± 0.3 ¶	49.8 ± 0.3 §	50.3 ± 0.2 †
Coeur, mg	963 ± 20	1740 ± 70 ¶	765 ± 20 §	1304 ± 25 ¶†
VG, mg	735 ± 17	1405 ± 47 ¶	588 ± 13 §	1015 ± 25 ¶†
VD, mg	170 ± 5	250 ± 15 ¶	129 ± 8 §	200 ± 13 ¶†
VD indexé, mg/g	0.40 ± 0.02	0.59 ± 0.04 ¶	0.35 ± 0.01	0.48 ± 0.03 ¶†
Poumons, g	1.7 ± 0.1	3.1 ± 0.3 ¶	2.4 ± 0.2	2.2 ± 0.3 †

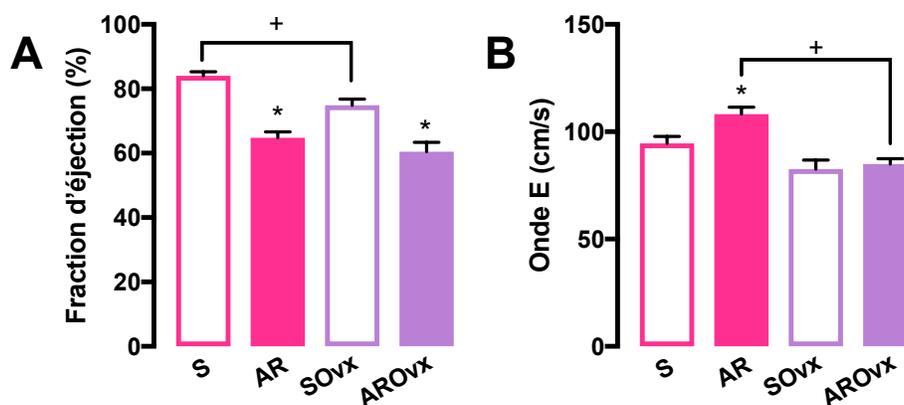
**Tableau 3.1. Mesures et masses des animaux à la fin du protocole.** S: groupe contrôle Sham intact, AR: groupe malade intact, SOvx: groupe contrôle Sham ovariectomisé, AROvx: groupe malade ovariectomisé, VG: ventricule gauche, VD: ventricule droit. Lorsqu'indiquée, l'indexation des mesures s'est faite avec la masse corporelle de l'animal. Les valeurs indiquées représentent la moyenne ± erreur-type. La comparaison des groupes s'est faite avec l'ANOVA bivariée et le Holm-Sidak post-test. ¶p < 0,05 vs. le groupe sham respectif, §p < 0,05 vs. le groupe S et †p < 0,05 vs. le groupe AR.



**Figure 3.1. Masses cardiaques et mesures échocardiographiques du ventricule gauche des animaux à la fin du protocole.** A : masse réelle du cœur, indexée par la masse de l'animal, B : masse réelle du ventricule gauche indexée par la masse de l'animal, C : épaisseur du septum interventriculaire mesuré par échocardiographie et D : diamètre du ventricule gauche en fin de diastole mesuré par échocardiographie. S: groupe contrôle Sham intact, AR: groupe malade intact, SOvx: groupe contrôle Sham ovariectomisé, AROvx: groupe malade ovariectomisé. Les valeurs sont rapportées comme la moyenne ± erreur-type (n=6/groupe). La comparaison des groupes s'est faite avec l'ANOVA bivariée et le Holm-Sidak post-test. \*p < 0,05 vs. le groupe sham respectif et +p < 0,05 entre les groupes indiqués.

### 3.2.2 Fonction cardiaque

La fraction d'éjection est meilleure chez les animaux sham intacts que chez les sham ovariectomisés. Néanmoins, cette différence n'est plus présente lorsque les animaux sont soumis à la régurgitation aortique; leur fonction systolique diminue de manière similaire en réponse à la surcharge (Figure 3.2A et Tableau 3.2). Au niveau de la fonction diastolique, il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes d'animaux sham. Chez les animaux malades, certains paramètres de fonction diastolique sont plus altérés chez les femelles intactes. L'onde E est davantage augmentée chez les animaux AR que chez les AROvx (augmentation significative de 14% chez les AR contre une augmentation non-significative de 3% chez les AROvx, Figure 3.2B). De même, la pente de l'onde E est significativement moins abrupte chez les AROvx que chez les AR, quoique chacun de ces groupes ne se démarque pas de leur groupe sham respectif. On pourrait toutefois évoquer une tendance vers une moins bonne fonction diastolique chez les femelles intactes malades (Tableau 3.2). L'onde A et le ratio E/A n'ont pas été significativement affectés par l'absence d'œstrogènes ou la régurgitation aortique.



**Figure 3.2. Mesures et calculs échocardiographiques de fonctions cardiaques systolique et diastolique** en fin de protocole sous anesthésie à l'isoflurane. A : fraction d'éjection pour l'évaluation de la fonction systolique, B : onde E pour l'évaluation de la fonction diastolique. S: groupe contrôle Sham intact, AR: groupe malade intact, SOvx: groupe contrôle Sham ovariectomisé, AROvx: groupe malade ovariectomisé. Les valeurs sont rapportées comme la moyenne  $\pm$  erreur-type (n=6/groupe). La comparaison des groupes s'est faite l'ANOVA bivariée et le Holm-Sidak post-test. \*p < 0,05 vs. le groupe sham respectif et +p < 0,05 entre les groupes indiqués.

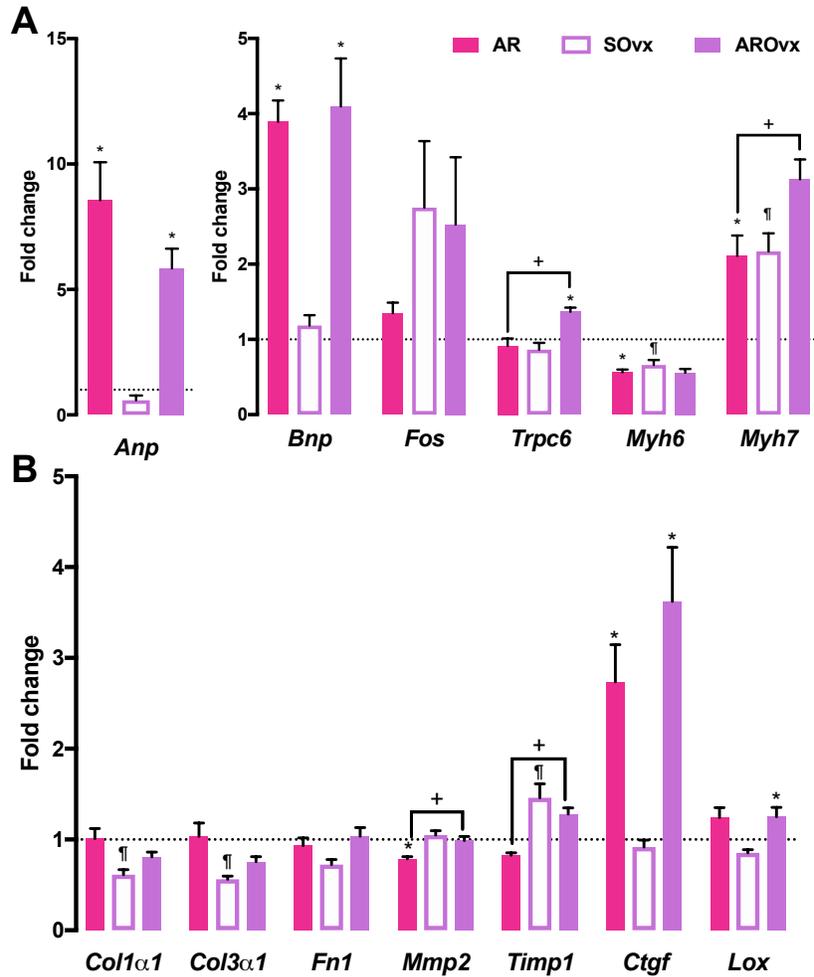
Paramètres	S (n=11)	AR (n=14)	SOvx (n=10)	AROVx (n=10)
ESD, mm	3.1 ± 0.1	6.5 ± 0.3 <sup>¶</sup>	3.7 ± 0.1	6.2 ± 0.3 <sup>¶</sup>
RWT, sans unité	0.28 ± 0.05	0.26 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.28 ± 0.08
FS, %	60.3 ± 1.5	41.0 ± 1.6 <sup>¶</sup>	50.2 ± 1.9 <sup>§</sup>	37.6 ± 2.5 <sup>¶</sup>
FC, bpm	386 ± 12	379 ± 7	366 ± 11	373 ± 11
SV, µl	295 ± 10	527 ± 29 <sup>¶</sup>	221 ± 7 <sup>§</sup>	398 ± 18 <sup>¶†</sup>
CO, mL/min	113 ± 3	191 ± 7 <sup>¶</sup>	81 ± 3 <sup>§</sup>	148 ± 8 <sup>¶†</sup>
Onde A, cm/s	61 ± 3	58 ± 2	53 ± 4	48 ± 3
Ratio E/A	1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.1
Pente de l'onde E, cm/s <sup>2</sup>	3057 ± 206	3556 ± 230	2292 ± 144	2760 ± 115 <sup>†</sup>
AR, %		84 ± 3		79 ± 3

**Tableau 3.2. Mesures et calculs échocardiographiques en fin de protocole** sous anesthésie à l'isoflurane. ESD : diamètre du ventricule gauche en fin de systole, RWT : épaisseur relative des parois du ventricule gauche par rapport au diamètre de cette cavité, FS : fraction de raccourcissement, FC : fréquence cardiaque, SV : volume d'éjection, CO : débit cardiaque, bpm : battements par minute, AR : régurgitation aortique. Les valeurs indiquées représentent la moyenne ± erreur-type. La valeur p pour la comparaison du pourcentage de régurgitation (AR) est de 0,2252 avec un t-test. La comparaison des groupes s'est faite avec l'ANOVA bivariée et le Holm-Sidak post-test. <sup>¶</sup>p < 0,05 vs. le groupe sham respectif, <sup>§</sup>p < 0,05 vs. le groupe S et <sup>†</sup>p < 0,05 vs. le groupe AR.

### 3.2.3 Marqueurs hypertrophiques et fibrotiques

Malgré les différences dans le gain de masse et la fonction cardiaque selon la présence d'œstrogènes, le profil transcriptionnel des animaux malades était similaire entre les animaux AR et AROvx. L'expression de marqueurs hypertrophique était similaire entre les deux groupes d'animaux malades (Figure 3.3A). Seulement l'expression de *Trpc6* et de *Myh7* était significativement plus importante chez les animaux AROvx. Curieusement, l'expression de *Myh6* et de *Myh7* était altérée par l'absence d'œstrogènes chez les sham, la perte des œstrogènes ayant un effet similaire à la maladie chez les AR.

L'expression de gènes en lien avec le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) était aussi peu influencée par le statut hormonal des animaux (Figure 3.3B). L'expression de *Ctgf* était similairement augmentée dans les deux groupes d'animaux AR. La perte des œstrogènes influence l'expression de gènes du remodelage de la MEC chez les animaux sains. L'expression des gènes des collagènes, *Col1α1* et *Col3α1*, est diminuée



**Figure 3.3. Mesure de l'ARN messager en lien avec l'hypertrophie cardiaque et le remodelage de la matrice extracellulaire** par RT-PCR quantitative en temps réel à partir de tissu de VG. A : marqueurs d'hypertrophie cardiaque, B : marqueurs de remodelage de la matrice extracellulaire. Les niveaux d'ARN messager du groupe S ont été normalisés à 1 et sont représentés par la ligne horizontale pointillée. Les unités sont arbitraires et les valeurs sont rapportées comme la moyenne  $\pm$  erreur-type (n=5-6/groupe). Les colonnes roses représentent les AR, les violettes et blanches, les SOvx et les violettes remplies, les AROvx. La comparaison des groupes s'est faite avec l'ANOVA bivariée et le Holm-Sidak post-test. \*p < 0,05 vs. le groupe sham respectif, †p < 0,05 vs. Le groupe S et ††p < 0,05 vs. les groupes indiqués.

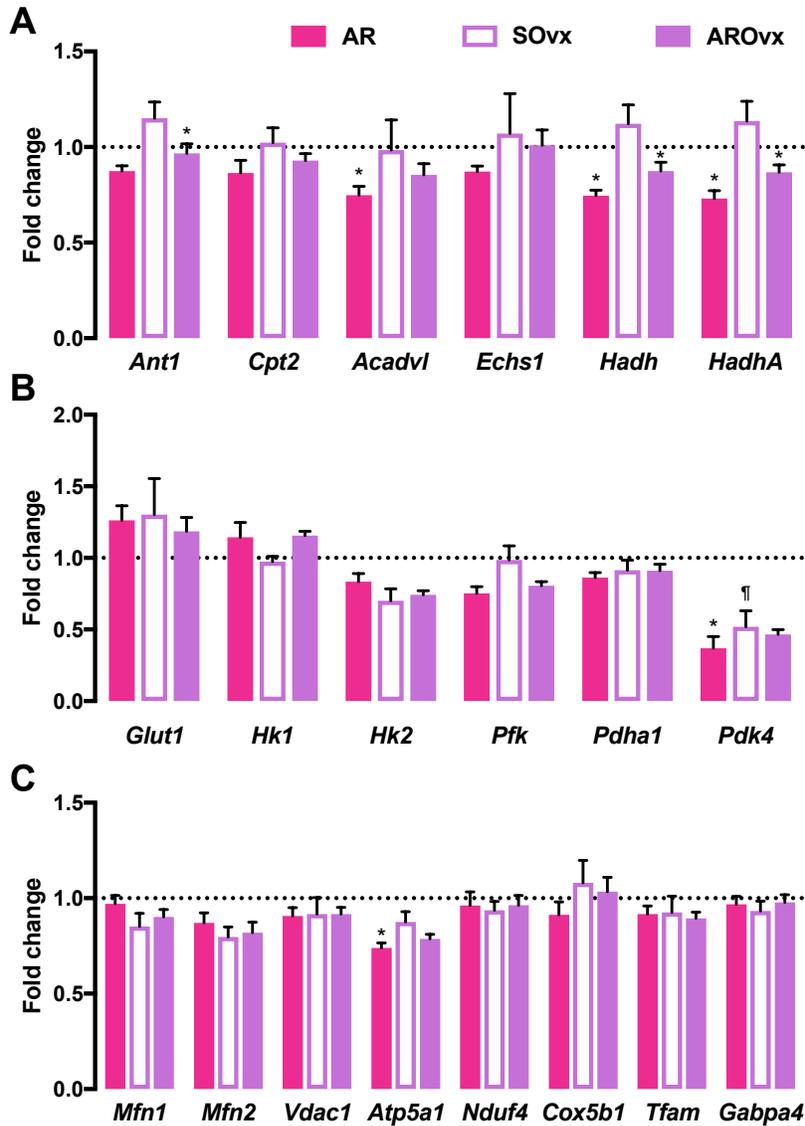
chez les SOvx en comparaison avec les S. À l'inverse, l'expression de *Timp1* est augmentée chez les SOvx lorsque comparés aux S. Ces différences dans les niveaux basaux d'expression expliquent pourquoi il y a des différences significatives entre les AR et les AROvx pour ces gènes. L'expression de *Mmp2* et *Timp1* est diminuée par la maladie, mais elle reste augmentée chez les AROvx par rapport aux AR en raison d'une expression basale

plus importante. L'augmentation d'expression de *Lox* était seulement significative chez les AROvx en raison d'un niveau d'expression basal tendant à être plus bas avec l'ovariectomie.

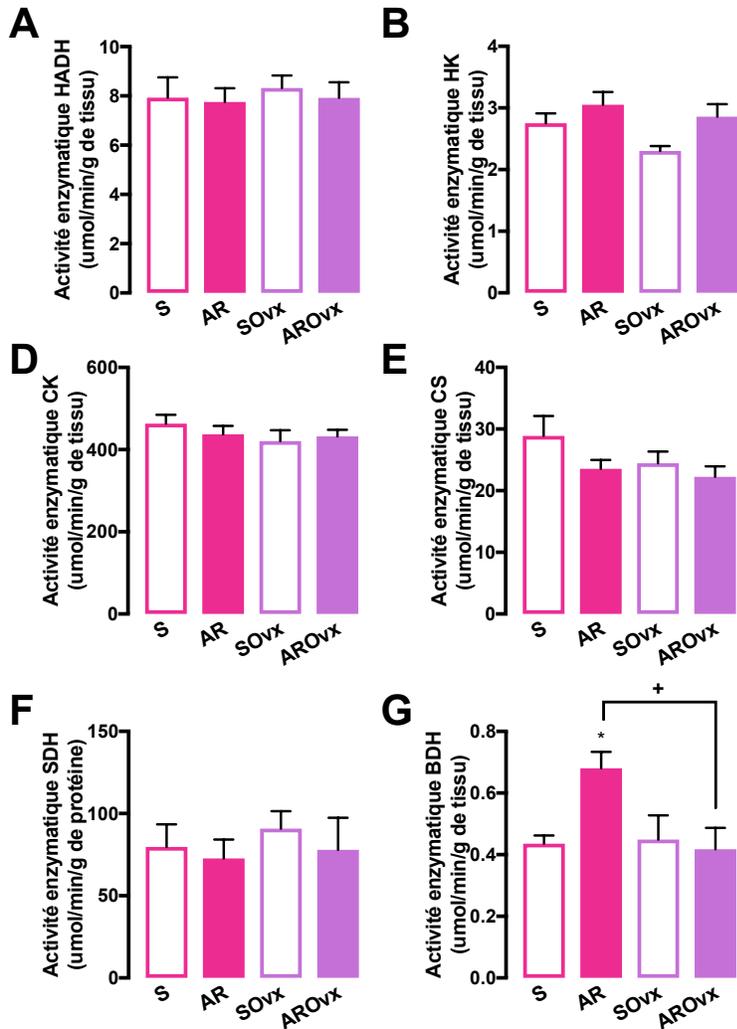
### 3.2.4 Métabolisme énergétique

Similairement à l'expression de marqueurs hypertrophiques chez les animaux malades, le profil transcriptionnel de gènes du métabolisme énergétique était peu altéré par l'absence d'œstrogènes. Seulement l'expression de *Hadh* et *HadhA* était diminuée similairement chez les animaux malades (Figure 3.4A). Sinon, l'expression d'*Ant1* était significativement diminuée chez les AROvx, alors qu'*Acadv1* était significativement moins exprimé chez les AR. Pour les gènes de la glycolyse, seulement l'expression de *Pdk4* était diminuée chez les AR et les SOvx, la perte des œstrogènes chez les animaux sham ayant un effet similaire à la maladie (Figure 3.4B). Finalement, l'expression de gènes mitochondriaux a peu été affectée par la perte des œstrogènes ou par la maladie (Figure 3.4C). Seulement l'expression d'*Atp5 $\alpha$ 1* a significativement diminué chez les AR.

En ce qui concerne l'activité d'enzymes du métabolisme énergétique, telle l'hydoxyacyl-CoA déshydrogénase, l'hexokinase, la citrate synthase, la créatine kinase et la succinate déshydrogénase, aucune différence significative n'a été détectée entre les groupes, à l'exception de l'enzyme  $\beta$ -hydroxybutyrate déshydrogénase (BDH) impliquée dans l'utilisation des corps cétoniques comme source énergétique (Figure 3.5). En effet, l'activité de cette dernière enzyme semble accentuée par la présence d'œstrogènes chez les animaux malades. Par contre, les œstrogènes ne semblent pas influencer l'activité basale de cette enzyme; les œstrogènes n'exerceraient leurs effets qu'en présence du stress de surcharge.



**Figure 3.4. Mesure de l'ARN messager en lien avec le métabolisme énergétique et la fonction mitochondriale** par RT-PCR quantitative en temps réel à partir de tissu de VG. A : gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme des acides gras, B : gènes codant pour des protéines du métabolisme du glucose et C : gènes codant pour les protéines en lien avec la fonction et biogenèse mitochondriale. Les niveaux d'ARN messager du groupe S ont été normalisés à 1 et sont représentés par la ligne horizontale pointillée. Les unités sont arbitraires et les valeurs sont rapportées comme la moyenne  $\pm$  erreur-type (n=5-6/groupe). Les colonnes roses représentent les AR, les violettes et blanches, les SOvx et les violettes pleines, les AROvx. La comparaison des groupes s'est faite avec l'ANOVA bivariée et le Holm-Sidak post-test. \*p < 0,05 vs. le groupe sham respectif, <sup>†</sup>p < 0,05 vs. Le groupe S et +p < 0,05 vs. les groupes indiqués.



**Figure 3.5. Activité d'enzymes du métabolisme énergétique mesurés au VG.** A : activité de l'hydroxyacyl-Coenzyme A déshydrogénase (HADH), B : activité de l'hexokinase (HK), C : ratio des activités de l'HADH/HK, D : activité de la créatine kinase (CK), E : activité de la citrate synthase (CS), F : activité de la succinate déshydrogénase (SDH) et G : activité de la  $\beta$ -hydroxybutyrate déshydrogénase (BDH). Les valeurs sont rapportées comme la moyenne  $\pm$  erreur-type ( $n=6$ /groupe). Les colonnes roses représentent les AR, les violettes et blanches, les SOvx et les violettes pleines, les AROvx. La comparaison des groupes s'est faite avec l'ANOVA bivariée et le Holm-Sidak post-test. \* $p < 0,05$  vs. le groupe sham respectif et + $p < 0,05$  vs. les groupes indiqués.

### 3.3 Discussion et conclusion

La présence des œstrogènes semble influencer la réponse du cœur lors d'une surcharge de volume. En effet, nos animaux intacts et produisant des stéroïdes sexuels ont eu un gain de masse cardiaque significativement plus important que les femelles ovariectomisées, malgré une régurgitation aortique similaire entre les groupes. Ce gain de masse cardiaque est un signe d'une HC plus importante en présence des œstrogènes. Cet effet pourrait être comparé à l'HC de grossesse, un état induisant une surcharge de volume au cœur [33]. Ainsi, nous pourrions émettre l'hypothèse que la réponse hypertrophique en présence d'œstrogènes lors d'une surcharge de volume, comme lors d'une régurgitation

aortique ou de la grossesse, serait médiée en partie par ces hormones. De plus, ces hormones pourraient influencer le type de remodelage cardiaque. Malgré un épaississement des parois comparable entre les deux groupes d'animaux malades, le VG des animaux AR était plus large que celui des animaux AROvx. Les animaux AR avaient tendance à développer une HC plus excentrée que les animaux AROvx en réponse à la surcharge de volume. Par contre, lorsque l'on compare l'épaisseur relative des parois du VG, les deux groupes malades sont comparables aux groupes sham malgré le gain de masse cardiaque. Cette similitude s'explique par l'augmentation proportionnelle des diamètres du VG à l'épaississement des parois du VG, ce qui correspond à la définition d'une HC excentrée. La morphologie hypertrophique serait donc peu influencée par la présence des œstrogènes quoique l'ampleur de la réponse hypertrophique, évaluée par la masse cardiaque indexée, puisse être plus importante en présence d'œstrogènes. Ainsi, même si certaines études antérieures ont montré que les femelles développent davantage une HC concentrique en surcharge de pression, il semblerait qu'une surcharge de volume mène bel et bien à une HC excentrée, même chez les femelles, privées ou non d'œstrogènes [150]. De plus, nous n'avons pas observé de progression vers une HC dilatée chez les animaux privés d'œstrogènes comme Brower *et al.* ont observé dans un modèle de fistule aorto-cave après 21 semaines d'étude [149]. Bien que la fistule aorto-cave entraîne aussi une surcharge de volume au cœur, il n'est pas impossible que cette surcharge globale à tout le cœur n'occasionne pas la même réponse hypertrophique que la régurgitation aortique, cette dernière imposant une surcharge de volume, avec une petite composante de surcharge de pression, initialement isolée au VG.

L'HC chez les animaux malades semblait compenser en partie la surcharge de volume, peu importe le statut hormonal. En effet, la fonction cardiaque systolique des deux groupes d'animaux malades était comparable, bien que diminuée par rapport aux animaux sains. Le statut hormonal pourrait toutefois influencer la fonction diastolique lors de l'HC. L'onde E et sa pente étant plus augmentés chez les AR; ils pourraient signifier une perte de compliance du VG, celui-ci perdant de sa capacité à s'élargir pour accommoder davantage de sang.

Malgré les différences hypertrophiques dépendant du statut hormonal qui viennent d'être mentionnées, le métabolisme énergétique des animaux malades était similaire entre les groupes et même presque entièrement conservé par rapport aux animaux sham.

Seulement des diminutions significatives dans l'expression de *Hadh*, *Hadha* et *Pdk4* ont été observées, ce qui montre une légère tendance vers une diminution de l'utilisation des acides gras et une augmentation de l'utilisation du glucose, quoique le reste des gènes étudiés et les activités enzymatiques mesurées ne vont pas en ce sens. Une autre remarque concerne le métabolisme des corps cétoniques qui semble accentué chez les AR. Le stress de surcharge additionné à la présence des œstrogènes semble favoriser l'utilisation des corps cétoniques comme substrat énergétique du myocarde. Il serait intéressant d'étudier les effets des œstrogènes sur le métabolisme des corps cétoniques au myocarde puisqu'à ma connaissance, aucune étude n'a été faite sur le sujet. Ainsi, les différences hypertrophiques entre les AR et AROvx ne s'expliqueraient pas par des différences du métabolisme énergétique et les œstrogènes ne joueraient pas un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique du cardiomyocyte soumis à une surcharge.

Curieusement, le statut hormonal influencerait l'expression basale de certains gènes dans des myocards sains. En effet, la perte des œstrogènes augmenterait le ratio *Myh7/Myh6*, d'une manière similaire à ce que peut induire l'HC pathologique. Considérant qu'une augmentation de ce ratio est associée à une moins bonne contractilité cardiaque [86], cela pourrait être un effet cardiaque négatif de la perte des œstrogènes. D'ailleurs, cette moins bonne contractilité cardiaque potentielle pourrait expliquer la fraction d'éjection plus faible des SOvx en comparaison avec les S. À cette différence basale s'ajouterait l'expression moins importante du gène de la *Pdk* chez les SOvx. Peut-être qu'une plus grande transformation de pyruvate provenant de la glycolyse par la PDH se produit en absence d'œstrogènes, mais les autres données étudiées ne témoignent pas d'une glycolyse accélérée chez les SOvx. Finalement, les gènes codant pour le collagène sont moins exprimés chez les SOvx, alors que l'expression de *Timp1* est majorée. Cela pourrait témoigner d'une stabilité de la MEC du myocarde en absence d'œstrogènes, soit que la perte des œstrogènes diminuerait la production de composants de la MEC tout en diminuant aussi les enzymes la dégradant.

Bref, la présence d'œstrogènes influence la réponse hypertrophique du cœur lors d'une surcharge de volume chez des rats femelles. Les œstrogènes favoriseraient surtout un gain de masse cardiaque et peut-être une tendance vers une HC excentrée et une moins bonne fonction diastolique. Le statut hormonal n'aurait toutefois peu d'impact sur le métabolisme énergétique du cœur hypertrophié.

# Conclusion

## C.1 Discussion

L'étude comparative de l'HC chez les animaux mâles et femelles en présence d'une régurgitation aortique nous a d'abord montré qu'un dimorphisme sexuel est bien présent dans l'HC induite par une surcharge de volume et que les différences se situent surtout au niveau du gain de masse cardiaque, qui est plus important chez les femelles, et au niveau de l'expression de gènes du métabolisme énergétique, qui est plus altérée chez les mâles. À partir de cette recherche, nous avons étudié l'hypothèse que ce dimorphisme était médié par les hormones sexuelles. Nous avons donc réalisé les deux études présentées dans les deux chapitres précédents. Nous avons comparé l'HC de rats mâles orchidectomisés à l'HC de rats mâles intacts. Nous avons fait de même avec des rats femelles, ovariectomisées ou non. Grâce à ces trois études, nous pouvons conclure que les hormones sexuelles ont bel et bien un effet sur le dimorphisme sexuel en HC, mais qu'elles ne seraient pas le seul facteur à considérer.

Si l'on se fie au gain de masse cardiaque, nos études sont assez comparables entre elles. L'étude des femelles intacts et ovariectomisées montre que le gain de masse cardiaque à la suite d'une AR est plus important chez les femelles intacts, un gain de masse qui est comparable à celui des femelles correspondantes de l'étude du chapitre 1 comparant les mâles aux femelles. Un point intéressant est que l'ovariectomie diminue le gain de masse cardiaque à un niveau similaire à celui observé dans l'étude comparant les mâles aux femelles. De plus, la perte des androgènes chez les mâles diminuerait davantage le gain de masse cardiaque. Ainsi, les stéroïdes sexuels semblent avoir des effets pro-hypertrophiques sur le cœur soumis à une surcharge de volume et ces effets seraient plus importants avec les œstrogènes. Selon nos résultats, mon hypothèse de départ serait partiellement valide : les androgènes ont bel et bien des effets pro-hypertrophiques, mais les œstrogènes encouragent aussi l'HC. Bien que certaines études suggèrent des effets anti-hypertrophiques des œstrogènes [151, 156], il a été montré que ces hormones pouvaient aussi activer la voie pro-hypertrophique d'Akt, notamment dans les situations d'HC physiologique [134]. Selon notre étude, la présence des androgènes chez les rats mâles mènerait bien à une dilatation du VG, à une perte de fonction cardiaque plus importante et potentiellement à une mortalité accrue. Chez les femelles AR, la fonction

cardiaque était peu influencée par le statut hormonal, quoique la fonction diastolique avait tendance à être moins bonne chez les femelles intactes ce qui peut être lié au remodelage du ventricule plus important chez elle.

La perte des androgènes ne ramènerait pas vers un profil hypertrophique plus féminin comme j'avais émis en hypothèse, sauf au niveau du profil transcriptionnel en lien avec le métabolisme énergétique et le remodelage de la matrice extracellulaire. En effet, les animaux mâles orchidectomisés, tout comme les femelles, ovariectomisées ou non, avaient peu de perturbation de l'expression de gènes du métabolisme énergétique ou de la matrice extracellulaire, malgré la présence de la régurgitation aortique. Ainsi, il semblerait que les altérations métaboliques retrouvées en HC pathologique soient davantage attribuables à la présence d'androgènes chez les mâles qu'à des effets protecteurs des œstrogènes chez les femelles.

De ces trois études découle l'observation que le sexe masculin et les androgènes encourageraient un remodelage cardiaque ne permettant pas une compensation optimale de la surcharge. Les androgènes pourraient influencer la perception du stress pro-hypertrophique, comme nous avons pu l'observer avec certaines protéines impliquées dans ce mécanisme. Ces effets des androgènes pourraient activer préférentiellement des voies de signalisation mal-adaptatives. Néanmoins, des études chez l'humain ont montré une amélioration de la capacité fonctionnelle lorsque l'on traite des patients atteints d'IC avec un supplément d'androgènes [129]. La classe fonctionnelle NYHA pourrait même être améliorée par une thérapie d'androgènes [171]. Or, ces effets bénéfiques des androgènes se feraient probablement via des effets systémiques, et non cardiaques. La testostérone aurait des effets pro-hypertrophiques sur le muscle squelettique, en plus d'entraîner une vasodilatation systémique, ce qui réduit la post-charge du cœur et assure une bonne perfusion systémique [229]. Une étude de Volterrani *et al.* a par contre montré que la testostérone n'améliore pas la fonction cardiaque [170]. Ainsi, les androgènes semblent peu bénéfiques pour le cœur en surcharge, quoique leurs effets systémiques puissent aider l'état général du patient dans son ensemble.

Quelques différences transcriptionnelles liées au statut hormonal ont été observées chez les animaux sains. Chez les mâles orchidectomisés, *Col3 $\alpha$ 1* et *Rxry* étaient significativement diminués, alors que *Cox5b1* était augmenté. Chez les femelles

ovariectomisées, *Myh7* et *Timp1* étaient augmentés, alors que *Myh6*, *Col1 $\alpha$ 1*, *Col3 $\alpha$ 1* et *Pdk4* étaient diminués. Ainsi, il n'est pas exclu que les hormones sexuelles influencent l'expression de ces gènes. Par exemple, les œstrogènes pourraient acétyler les séquences promotrices du gène *Myh7* [153], ce qui bloquerait sa transcription. La perte des œstrogènes pourrait donc supprimer cet effet inhibiteur et augmenter l'expression de *Myh7*. Les œstrogènes pourraient aussi augmenter les niveaux de PDK4, d'où une diminution de son expression lorsque l'on supprime les œstrogènes [66].

Finalement, lorsque l'on compare nos animaux mâles et femelles gonadectomisés ayant une régurgitation de la valve aortique, des différences d'HC persistent. Les femelles ayant tendance à hypertrophier davantage, quoique le profil transcriptionnel reste assez similaire aux animaux contrôles. Ainsi, d'autres facteurs propres au sexe, en plus des stéroïdes sexuels, doivent influencer le développement de l'HC. Un de ces facteurs importants est le sexe chromosomique, soit le fait d'être un individu XX ou XY. Ces chromosomes influenceraient potentiellement le développement différentiel de l'HC selon le sexe et ce concept sera abordé un peu plus loin.

## C.2 Limitations

Bien que nos recherches suggèrent que la présence et la nature des hormones sexuelles influencent le développement de l'HC lors d'un stress de surcharge pro-hypertrophique, un lien de causalité clair n'est pas établi. Afin de clarifier ce lien de causalité, il aurait fallu aussi étudier des animaux gonadectomisés recevant un remplacement hormonal pour voir si leur profil d'HC se rapprochait de celui des animaux intacts, pour renverser les effets de la perte des hormones sexuelles. Ce remplacement hormonal n'a pas été fait puisqu'il est difficile de reproduire artificiellement les niveaux physiologiques hormonaux. La sécrétion hormonale varie dans la journée et peut se faire selon certains cycles. Pour les androgènes, chez les hommes, la sécrétion est pulsatile et son maximum se produit à huit heures du matin [230]. Cette variation sécrétoire est d'autant plus vraie chez les femmes avec le cycle ovarien variant sur environ 28 jours [231]. Ces variations sont aussi présentes chez les animaux. Que ce soit en injectant manuellement des hormones chez les animaux, ce qui cause un pic d'absorption, ou en utilisant une pompe sous-cutanée, qui libère en continu une certaine quantité d'hormones, on ne peut reproduire

exactement la sécrétion physiologique. La méthode d'administration influence l'absorption et cela peut mener à des niveaux hormonaux qui sont plus hauts ou plus bas que les niveaux physiologiques, ce qui fausse les résultats. Par exemple, l'hyperandrogénisme serait néfaste pour le cœur et favoriserait une HC non compensatrice au long cours [167, 169]. Si nous avions voulu traiter nos animaux orchidectomisés avec des androgènes, nous aurions risqué de dépasser les limites physiologiques en ne pouvant pas reproduire exactement la sécrétion endogène, ce qui aurait biaisé nos résultats. Néanmoins, des résultats préliminaires de notre laboratoire ont montré qu'un remplacement d'œstrogènes par pompe sous-cutanée a peu d'effets sur le gain de masse du cœur et sur la forme du remodelage cardiaque. Dans cette nouvelle étude, le remplacement hormonal n'a pas permis de rétablir un profil hypertrophique similaire aux femelles intactes. Pourtant, les œstrogènes ont bien eu un effet sur les animaux puisque les femelles traitées n'ont pas subi l'atrophie utérine habituellement observée chez les animaux ovariectomisés.

Une autre limitation de notre étude est le fait que nos animaux sont jeunes. La gonadectomie a d'ailleurs influencé leur croissance, comme on peut le voir chez les mâles contrôles Sham orchidectomisés dont le poids de l'animal et du cœur sont moindre par rapport aux animaux intacts contrôles, d'où l'utilité de la comparaison des masses cardiaques indexées par le poids de l'animal. Néanmoins, pour ce qui est de la fonction cardiaque et de la morphologie du remodelage, celles-ci étaient comparables entre les deux groupes d'animaux contrôles, ce qui laisse penser qu'à part pour la différence dans sa croissance et pour l'expression de certains gènes, le cœur était peu influencé par le statut hormonal chez les animaux sains. Les animaux ont été gonadectomisés à environ trois semaines de vie par le fournisseur. Bien que cette chirurgie ait été exécutée avant l'âge de la puberté, qui arrive vers six semaines chez le rat [232], les animaux ont été exposés à des hormones sexuelles en bas âge et lors de leur développement utérin. Cette exposition précoce pourrait avoir des conséquences plus tardives, même après la fin de l'exposition aux hormones sexuelles, c'est ce que l'on appelle l'« empreinte génétique » un concept d'épigénétique. L'épigénétique consiste en l'étude des facteurs environnementaux ou héréditaires qui influencent de manière quasi permanente la conformation de l'ADN et l'expression génique [233]. Ainsi, les hormones sexuelles pourraient favoriser une méthylation et un repliement de l'ADN de manière à inhiber ou à favoriser l'expression de certains gènes à long terme. Elles pourraient aussi favoriser l'expression d'ARN non-codant, des brins d'ARN non traduits en protéine qui influencent directement le repliement de l'ADN

et la dégradation de l'ARN messager. Par exemple, l'activation du récepteur ER $\beta$  pourrait favoriser l'expression d'ARN non-codant inhibant la réponse fibrotique lors d'une surcharge de pression [234]. En dehors du champ de la cardiologie, il a été montré que l'exposition de rats mâles à des œstrogènes ou à des perturbateurs endocriniens diminuait leur fertilité à long terme et cela pourrait même se répercuter sur les générations suivantes [235]. À l'inverse, il semblerait que les femmes avec le syndrome des ovaires polykystique (SOPK), une maladie caractérisée par un hyperandrogénisme qui perturbe le cycle ovulatoire, surexposent leur progéniture aux androgènes *in utero*, ce qui favoriserait le développement du SOPK chez la progéniture féminine [236]. Ces deux études évoquent des impacts à long terme d'une exposition limitée aux hormones sexuelles chez le sexe opposé. Il est fort probable que les hormones sexuelles puissent aussi induire une réponse à long terme chez leur sexe respectif (œstrogènes chez les femelles, androgènes chez les mâles). Dans notre étude, ces hormones ont peut-être influencé la réponse hypertrophique en raison de l'empreinte qu'elles ont laissée lors du développement de l'animal et de ses premières semaines de vie. Ce biais aurait pu être réduit en gonadectomisant les rats dès leur naissance, quoique cela n'aurait pas empêché l'exposition *in utero*. L'utilisation de modèles animaux n'exprimant plus les récepteurs aux androgènes ou aux œstrogènes aurait pu, dans une certaine mesure, éviter le biais de l'exposition lors du développement embryonnaire.

Le jeune âge des animaux étudiés constitue aussi une limitation de notre étude dans la mesure où notre modèle est peut-être moins représentatif des pathologies cardiaques chez l'humain qui touchent majoritairement une population plus âgée. Les résultats auraient peut-être été différents si nous avions étudié des animaux plus vieux. Mon hypothèse est que l'étude d'animaux plus âgés aurait accentué les différences entre les sexes. Il a été montré, chez les animaux et chez l'humain, que les individus de sexe masculin ont une diminution du nombre de cardiomyocytes avec l'âge, notamment par apoptose, sans qu'il n'y ait de pathologie cardiaque sous-jacente. Ce phénomène ne serait pas présent chez les individus féminins [125, 131, 132]. Ainsi, les individus masculins ayant déjà un nombre de cardiomyocytes réduit avec l'âge seraient davantage hypothéqués par la présence d'une surcharge de volume que les femelles. De plus, chez des rats en santé âgés de 78 semaines, l'expression de gènes liés à la phosphorylation oxydative au cœur est davantage altérée chez les femelles que chez les mâles [130], ce qui suggère une production énergétique plus efficace chez les individus féminins. Lorsqu'on se fie à nos études sur de

jeunes animaux, les effets négatifs du vieillissement sur les cœurs mâles pourraient exacerber la réponse hypertrophique potentiellement moins compensatrice chez les mâles. Les mâles âgés partiraient désavantagés par rapport aux femelles. Un projet intéressant serait de reproduire cette étude avec des animaux plus âgés pour vérifier cette hypothèse, mais l'obtention d'animaux âgés est longue et onéreuse.

Une dernière limitation qui s'applique à toutes les études sur les animaux est la précaution nécessaire quant à la généralisation des résultats chez les humains. Bien que le rat soit un bon modèle pour l'étude du système cardiovasculaire [129], il demeure un animal d'une moins grande complexité que l'humain. La complexité de l'humain vient du fait qu'en addition aux processus biologiques, l'impact des facteurs environnementaux et psychologiques est probablement plus significatif. Les habitudes de vies, comme la pratique d'activité physique et le choix de l'alimentation, sont des exemples influençant la santé cardiovasculaire. Ces différences entre l'humain et les modèles animaux pourraient expliquer pourquoi certaines études animales ne concordent pas avec les études chez les humains. Un autre aspect qui pourrait expliquer les divergences entre les humains et les animaux lors de l'étude du dimorphisme sexuel est la notion de *genre* qui s'ajoute au sexe biologique chez l'humain. Le genre est défini par les Instituts de recherche en santé du Canada comme : « les rôles, comportements, expressions et identités des hommes, des femmes, des filles, des garçons et des personnes de diverses identités de genre [qui influencent] la perception qu'ont les gens d'eux-mêmes et d'autrui, leur façon d'agir et d'interagir ainsi que la répartition du pouvoir et des ressources dans la société » [237]. Le genre teinte les habitudes de vie d'une personne, mais aussi comment les autres perçoivent cette personne. Dans le domaine de la santé, cette perception peut être influencée par des idées préconçues, comme la pensée répandue que les femmes souffrent moins de maladies cardiovasculaires que les hommes. De ce préjugé découle une prise en charge non optimale des maladies cardiovasculaires chez les femmes. Par exemple, les femmes seraient moins sujettes à être dirigées en échocardiographie que les hommes, même si leur situation clinique le requiert [7]. Dans les études sur les humains, le genre vient teinter l'étude du dimorphisme sexuel en se superposant aux effets plutôt biologiques du sexe. Bref, l'étude d'animaux ne nous permet pas d'étudier la dimension de genre des individus, malgré le fait que cette notion soit importante chez l'humain puisqu'elle pourrait influencer l'issue clinique.

### C.3 Perspective – Le Rôle du sexe chromosomique

Nos animaux mâles et femelles malades privés d'hormones sexuelles n'ont pas développé une réponse hypertrophique identique, ce qui signifie que les hormones sexuelles ne sont pas les seules à influencer le dimorphisme sexuel en HC. À la base, ce qui différencie un individu de sexe biologique masculin d'un individu de sexe féminin est la nature des chromosomes sexuels, soit XX chez les individus féminins et XY chez les individus masculins. Ces chromosomes joueraient un rôle dans le dimorphisme sexuel, sans nécessairement utiliser les hormones sexuelles comme intermédiaires. Ce sont les chromosomes sexuels qui permettent le développement des gonades et par conséquent, la production des hormones sexuelles. Le gène Sex-determining Region of Y chromosome (SRY, sur le chromosome Y) permet la différenciation en phénotype masculin, c'est-à-dire qu'il induit la formation embryonnaire des testicules pour la production d'androgènes et d'hormone anti-mullérienne permettant la différenciation des organes génitaux. En absence de SRY, le phénotype féminin se développe, avec l'organogenèse d'ovaires pour la production d'œstrogènes [238]. De cette différenciation embryonnaire découle l'influence des chromosomes sexuels dans la production hormonale. Néanmoins, d'autres gènes sur les chromosomes X et Y pourraient induire des différences entre les individus mâles et femelles. En d'autres mots, le chromosome Y propre aux mâles ou la double représentation du X chez les femelles pourraient être responsable de certaines caractéristiques propres à chaque sexe. La communauté scientifique a longtemps pensé qu'un des X chez les femelles était entièrement inactivé, ce qui s'est révélé être faux. Le deuxième X serait partiellement inactivé; 75% des gènes de ce chromosome échapperaient à l'inhibition [142]. Ainsi, il est possible qu'un même gène soit exprimé sur les deux chromosomes X et que cette co-expression puisse influencer le phénotype féminin via l'effet de la protéine produite. Plusieurs gènes du chromosome X codent pour des histones déméthylases ou certaines protéines influençant la traduction [239]. Ainsi, la co-expression de certains gènes du X pourrait avoir de multiples effets dans la régulation de l'expression génique ou la production protéique. Du côté du chromosome Y, peu de gènes biologiquement importants sont connus à ce jour [239]. Le fait d'avoir un ou deux X ou d'avoir un Y pourrait donc être néfaste ou bénéfique pour le cœur. De plus, les hormones sexuelles et l'activation de leurs récepteurs pourraient avoir des effets synergiques ou antagonistes avec les effets de l'expression de gènes des chromosomes sexuels, complexifiant ainsi les facteurs derrière le dimorphisme sexuel [239]. En ce qui concerne l'HC, les hormones sexuelles influencent la forme d'HC et

la capacité d'adaptation du cœur face à la surcharge. Néanmoins, nous pourrions émettre l'hypothèse que l'expression de gènes sur les chromosomes sexuels pourrait influencer le myocarde et sa réponse face à un stress pro-hypertrophique. Une interaction entre les hormones et les chromosomes sexuels ne peut être exclue pour expliquer le dimorphisme sexuel en HC.

Différents modèles de souris ont été développés pour vérifier l'hypothèse que les chromosomes sexuels influencent le phénotype sexuel en dehors de leurs effets sur les hormones sexuelles. Un premier modèle est le *Four Core Genotype* (FCG). Ce modèle vise à vérifier si le génotype sexuel, XX ou XY, influence le phénotype sexuel indépendamment des gonades. Ce modèle supprime le gène SRY du chromosome Y ( $Y^-$ ). On obtient ainsi, des souris XX et  $XY^-$  ayant un phénotype féminin, c'est-à-dire avec des ovaires pour produire des œstrogènes. Le FCG comprend aussi deux autres génotypes où l'on a déplacé le gène SRY sur un autosome, souvent le chromosome 3 [239]. On obtient alors des souris  $XX^{SRY}$  et  $XY^{-SRY}$  avec un phénotype masculin, c'est-à-dire avec des testicules pour produire des androgènes [240]. Ainsi, en comparant les animaux XX aux animaux  $XX^{SRY}$  ou les  $XY^-$  aux  $XY^{-SRY}$ , on peut étudier les effets des hormones sexuelles sans avoir le biais des chromosomes sexuels. En comparant les animaux XX aux animaux  $XY^-$  ou les  $XX^{SRY}$  aux  $XY^{-SRY}$ , on peut étudier les effets des chromosomes sexuels, indépendamment des hormones sexuelles (en gonadectomisant les animaux). Par contre, la faiblesse de ce modèle est qu'il ne permet pas de distinguer si les effets des chromosomes sexuels sont causés par la présence du chromosome Y ou par la co-représentation du X. Un deuxième modèle de souris a été développé pour pallier ce problème.

Le deuxième complémentaire au FCG est le  $Y^*$ . Ce modèle utilise un chromosome Y modifié où un centromère a été ajouté à une extrémité distale. Ce centromère permet au  $Y^*$  de se recombiner avec un chromosome X. La recombinaison avec le X n'est pas nécessaire (génotype  $XY^*$ ), mais peut se faire de deux manières résultant en différents génotypes ( $XX^*Y$  et  $XY^*X$ ). Au total, le croisement d'une souris XX avec une  $XY^*$  résulte en quatre génotypes de sexe gonadique différents (Tableau C.1) [241, 242]. Il est à noter que le génotype  $XY^*X$  n'a qu'un X de fonctionnel, d'où son abréviation fréquemment utilisée de XO [239]. Ces animaux sont généralement étudiés gonadectomisés afin de ne conserver que l'effet des chromosomes sexuels. Ce modèle permet d'étudier l'effet du chromosome Y

en comparant les animaux XY\* aux animaux XO et les XX aux XXY\*, en plus de permettre l'étude de la co-expression du X en comparant les animaux XX aux XO et les XY\* aux XXY\*.

	XX	XY*X	XY*	XXY*
Gonades	Ovaires	Ovaires	Testicules	Testicules

**Tableau C.1. Type de gonade associé aux quatre génotypes du modèle Y\***. Inspiré de: Arnold, A.P., et al., *Sex Hormones and Sex Chromosomes Cause Sex Differences in the Development of Cardiovascular Diseases*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. **37**(5): p. 746-756.

À ma connaissance, ces deux modèles animaux n'ont pas encore servi à l'étude de l'HC. Néanmoins, certaines études les ont utilisés dans des contextes d'ischémie myocardique ou d'étude du SRAA au niveau rénal. En étudiant le rein avec le modèle FCG, Dadam *et al.* ont découvert que le génotype XX favorise l'expression d'*Agtr2*, situé sur le chromosome X et que cela serait indépendant de la présence d'hormones sexuelles. Ce gène code pour le récepteur à l'angiotensine II de type 2 (AT2R) et sa co-expression chez les individus XX résulterait en une vasodilatation plus marquée, ce qui pourrait constituer un certain avantage cardiovasculaire [243]. Une autre étude de Pessôa *et al.* a néanmoins montré que cet effet du génotype sur les effets vasodilatateurs d'AT2R ne serait présent qu'en présence d'œstrogènes [244]. Cela constitue donc un bon exemple de l'effet synergétique que peuvent avoir les hormones avec les effets des chromosomes sexuels. L'effet bénéfique d'un génotype XX ne serait par contre pas évident au niveau du cœur. Lors d'ischémie cardiaque, la présence de deux X serait associée à une plus grande zone de tissus infarctés, une conclusion rendue possible grâce au modèle Y\*. En effet, une étude de Li *et al.* a montré que les animaux XX\*Y et XX avaient une plus grande étendue de tissus nécrotique en comparaison aux animaux XY\*X ou XY\*. Les auteurs expliquent cet effet par une sensibilité à la surcharge de calcium plus importante chez les XX. Cela mènerait à une ouverture du pore perméable de transition mitochondrial dès de faibles surcharges calciques et entrainerait l'activation de voie d'apoptose et de mort cellulaire [245]. Ces auteurs avancent l'hypothèse que les œstrogènes antagoniseraient ces effets néfastes, d'où la faible prévalence des maladies cardiaques ischémiques chez les femmes préménopausées. Bref, la littérature actuelle suggère que la présence de deux chromosomes X aurait davantage d'effet cardiovasculaire que la présence du chromosome Y. De plus, l'interaction des hormones sexuelles avec les effets des chromosomes jouerait un rôle important dans le dimorphisme sexuel cardiaque. L'étude de modèles hypertrophiques avec

les animaux FCG et Y\* serait une voie à envisager afin de mieux comprendre le dimorphisme sexuel dans la réponse hypertrophique cardiaque, puisqu'actuellement, les hormones sexuelles ne semblent pas expliquer à elles seules les différences mâle-femelle en HC.

#### **C.4 Retombées et conclusion**

Une conclusion globale que l'on peut tirer de mon projet de maîtrise est que les individus masculins et féminins ne sont pas égaux face à l'HC et son évolution vers l'IC, les individus mâles semblant développer une HC moins compensatrice qui pourrait être influencée par la présence d'androgènes et qui assombrit leur pronostic. L'étude du dimorphisme sexuel dans les maladies cardiaques est essentielle afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques propres à chaque sexe. En effet, ceux-ci sont influencés par le sexe de l'individu, que ce soit via les hormones ou les chromosomes sexuels, voire même via les habitudes de vie. Les études en cardiologie s'intéressant au sexe biologique et au genre des individus nous permettent aussi de prendre conscience des préjugés du domaine médical face à la prise en charge des patients de sexe féminin. Une meilleure compréhension des facteurs influençant le développement de l'HC, comme l'effet des stéroïdes sexuels, permettra de mieux traiter cette pathologie. L'accroissement des connaissances sur l'impact du sexe lors d'HC permettra le développement de thérapies ciblées aux mécanismes physiopathologiques propres aux sexes masculin et féminin. Cette future individualisation de la thérapeutique laisse espérer qu'elle deviendra plus efficace et qu'elle permettra de retarder ou même éviter l'évolution de l'HC vers l'IC.

# Bibliographie

1. Roger, V.L., et al., *Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2012. **125**(1): p. e2-e220.
2. Canada, S. *Décès, causes de décès et espérance de vie, 2016*. Le Quotidien, 2018.
3. Lloyd-Jones, D.M., et al., *Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age*. Circulation, 2006. **113**(6): p. 791-8.
4. Leening, M.J., et al., *Sex differences in lifetime risk and first manifestation of cardiovascular disease: prospective population based cohort study*. BMJ, 2014. **349**: p. g5992.
5. Dar, O. and M.R. Cowie, *Chapter 27. The Epidemiology and Diagnosis of Heart Failure*, in *Hurst's The Heart, 13e*, V. Fuster, R.A. Walsh, and R.A. Harrington, Editors. 2011, The McGraw-Hill Companies: New York, NY.
6. Stock, E.O. and R. Redberg, *Cardiovascular disease in women*. Curr Probl Cardiol, 2012. **37**(11): p. 450-526.
7. Regitz-Zagrosek, V., et al., *Gender in cardiovascular diseases: impact on clinical manifestations, management, and outcomes*. Eur Heart J, 2016. **37**(1): p. 24-34.
8. Humphries, K.H., et al., *Sex differences in cardiovascular disease - Impact on care and outcomes*. Front Neuroendocrinol, 2017. **46**: p. 46-70.
9. Moore, K.L., A.F. Dalley, and A.M.R. Agur, *Clinically oriented anatomy*. 7th ed. 2014, Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health. xxviii, 1134 p.
10. Katz, A.M., *Physiology of the heart*. 5th ed. 2011, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. xv, 576 p.
11. Fonarow, G.C. and J.J. Hsu, *Left Ventricular Ejection Fraction: What Is "Normal"?* JACC Heart Fail, 2016. **4**(6): p. 511-3.
12. Bers, D.M. and S.R. Houser, *Calcium Fluxes and Homeostasis*, in *Muscle - Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*, J.H.E. Olson, Editor. 2012, Elsevier. p. 1528.
13. Vicencio, J.M., et al., *Anabolic androgenic steroids and intracellular calcium signaling: a mini review on mechanisms and physiological implications*. Mini Rev Med Chem, 2011. **11**(5): p. 390-8.
14. Fukuda, N., et al., *Titin-based regulations of diastolic and systolic functions of mammalian cardiac muscle*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(5): p. 876-81.
15. Kobirumaki-Shimozawa, F., et al., *Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism*. J Physiol Sci, 2014. **64**(4): p. 221-32.
16. Anderson, M.E., *Calmodulin kinase and L-type calcium channels; a recipe for arrhythmias?* Trends Cardiovasc Med, 2004. **14**(4): p. 152-61.
17. Takimoto, E. and D.A. Kass, *Regulation of Cardiac Systolic Function and Contractility*, in *Muscle: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease* J.A. Hill and E.N. Olson, Editors. 2012, Elsevier. p. 285-297.
18. MacLennan, D.H. and E.G. Kranias, *Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 566-77.
19. Murgia, M., et al., *Controlling metabolism and cell death: at the heart of mitochondrial calcium signalling*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 781-8.
20. Lopaschuk, G.D., *Metabolic Modulators in Heart Disease: Past, Present, and Future*. Can J Cardiol, 2017. **33**(7): p. 838-849.
21. Lopaschuk, G.D., et al., *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease*. Physiol Rev, 2010. **90**(1): p. 207-58.
22. Lopaschuk, G.D., et al., *Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1213**(3): p. 263-76.
23. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 5th ed. ed. 2008, New York: Garland Science ; [London : Taylor & Francis, distributor].

24. Simsek Papur, O., et al., *Acute and Chronic Effects of Protein Kinase-D Signaling on Cardiac Energy Metabolism*. Front Cardiovasc Med, 2018. **5**: p. 65.
25. Shao, D. and R. Tian, *Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy*. Compr Physiol, 2015. **6**(1): p. 331-51.
26. Luiken, J.J., et al., *Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters*. Pflugers Arch, 2004. **448**(1): p. 1-15.
27. Kodde, I.F., et al., *Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2007. **146**(1): p. 26-39.
28. Hue, L. and H. Taegtmeyer, *The Randle cycle revisited: a new head for an old hat*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(3): p. E578-91.
29. Madrazo, J.A. and D.P. Kelly, *The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **44**(6): p. 968-75.
30. Finck, B.N. and D.P. Kelly, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease*. Circulation, 2007. **115**(19): p. 2540-8.
31. Yang, Q. and Y. Li, *Roles of PPARs on regulating myocardial energy and lipid homeostasis*. J Mol Med (Berl), 2007. **85**(7): p. 697-706.
32. Brønnum, H. and R. Kalluri, *Cardiac Fibrosis: Cellular and Molecular Determinants in Muscle: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*, J.A. Hill and E.N. Olson, Editors. 2012, Elsevier. p. 389-404.
33. Bernardo, B.C., et al., *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies*. Pharmacol Ther, 2010. **128**(1): p. 191-227.
34. Lorell, B.H. and B.A. Carabello, *Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis*. Circulation, 2000. **102**(4): p. 470-9.
35. Grossman, W., D. Jones, and L.P. McLaurin, *Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle*. J Clin Invest, 1975. **56**(1): p. 56-64.
36. Pfeffer, M.A., *Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction*. Annu Rev Med, 1995. **46**: p. 455-66.
37. Krumholz, H.M., M. Larson, and D. Levy, *Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension*. Am J Cardiol, 1993. **72**(3): p. 310-3.
38. Cuspidi, C., et al., *Prevalence of left-ventricular hypertrophy in hypertension: an updated review of echocardiographic studies*. J Hum Hypertens, 2012. **26**(6): p. 343-9.
39. Cahill, T.J., H. Ashrafian, and H. Watkins, *Genetic cardiomyopathies causing heart failure*. Circ Res, 2013. **113**(6): p. 660-75.
40. Iung, B., et al., *Valvular heart disease in the community: a European experience*. Curr Probl Cardiol, 2007. **32**(11): p. 609-61.
41. Otto, C.M., R.O. Bonow, and C.M.V.h.d. Otto, *Valvular heart disease : a companion to Braunwald's heart disease*. 3rd ed. ed. 2009, Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.
42. Plante, E., et al., *Left ventricular response to sustained volume overload from chronic aortic valve regurgitation in rats*. J Card Fail, 2003. **9**(2): p. 128-40.
43. Wisenbaugh, T., J.F. Spann, and B.A. Carabello, *Differences in myocardial performance and load between patients with similar amounts of chronic aortic versus chronic mitral regurgitation*. J Am Coll Cardiol, 1984. **3**(4): p. 916-23.
44. Simula, D.V., et al., *Surgical pathology of carcinoid heart disease: a study of 139 valves from 75 patients spanning 20 years*. Mayo Clin Proc, 2002. **77**(2): p. 139-47.
45. Lindman, B.R., et al., *Calcific aortic stenosis*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16006.
46. Thaden, J.J., V.T. Nkomo, and M. Enriquez-Sarano, *The global burden of aortic stenosis*. Prog Cardiovasc Dis, 2014. **56**(6): p. 565-71.
47. Iung, B. and A. Vahanian, *Epidemiology of valvular heart disease in the adult*. Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(3): p. 162-72.

48. Carapetis, J.R., et al., *The global burden of group A streptococcal diseases*. *Lancet Infect Dis*, 2005. **5**(11): p. 685-94.
49. Terré, J.A., I. George, and C.R. Smith, *Pros and cons of transcatheter aortic valve implantation (TAVI)*. *Ann Cardiothorac Surg*, 2017. **6**(5): p. 444-452.
50. Athappan, G., et al., *Incidence, predictors, and outcomes of aortic regurgitation after transcatheter aortic valve replacement: meta-analysis and systematic review of literature*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **61**(15): p. 1585-95.
51. Frey, N., E.N. Olson, and J.A. Hill, *Mechanisms of Stress-Induced Cardiac Hypertrophy*, in *Muscle - Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*, J. Hill and E. Olson, Editors. 2012, Elsevier. p. 1528.
52. Bonow, R.O. and E.H.d. Braunwald, *Braunwald's heart disease : a textbook of cardiovascular medicine*. 9th ed. / edited by Robert O. Bonow ... [et al.]. ed. 2012, Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders.
53. Berridge, M.J., *The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease*. *Physiol Rev*, 2016. **96**(4): p. 1261-96.
54. Muslin, A.J., *The Pathophysiology of Heart Failure*, in *Muscle: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*, J.A.O. Hill, Eric N., Editor. 2012, Elsevier. p. 523-535.
55. Carey, R.M., *Aldosterone and cardiovascular disease*. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2010. **17**(3): p. 194-8.
56. Wu, J., et al., *Insights into the activation and inhibition of angiotensin II type 1 receptor in the mechanically loaded heart*. *Circ J*, 2014. **78**(6): p. 1283-9.
57. Mori, J., et al., *Impact of the renin-angiotensin system on cardiac energy metabolism in heart failure*. *J Mol Cell Cardiol*, 2013. **63**: p. 98-106.
58. Martin, M.L., et al., *G-Protein-Coupled Receptors in the Heart*, in *Muscle: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*, J.A. Hill and E.N. Olson, Editors. 2012, Elsevier. p. 87-112.
59. Pagel-Langenickel, I., *Evolving Role of Natriuretic Peptides from Diagnostic Tool to Therapeutic Modality*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. **1067**: p. 109-131.
60. Dhalla, N.S. and A.L. Müller, *Protein Kinases as Drug Development Targets for Heart Disease Therapy*. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2010. **3**(7): p. 2111-2145.
61. Wehrens, X.H., et al., *Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(3): p. 511-8.
62. Ljubojevic, S., et al., *Early remodeling of perinuclear Ca<sup>2+</sup> stores and nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> signaling during the development of hypertrophy and heart failure*. *Circulation*, 2014. **130**(3): p. 244-55.
63. Nakayama, H., et al., *The IP<sub>3</sub> receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli*. *Circ Res*, 2010. **107**(5): p. 659-66.
64. Heineke, J. and J.D. Molkentin, *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(8): p. 589-600.
65. Pedram, A., et al., *Estrogen regulates histone deacetylases to prevent cardiac hypertrophy*. *Mol Biol Cell*, 2013. **24**(24): p. 3805-18.
66. Witt, H., et al., *Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice*. *J Mol Med (Berl)*, 2008. **86**(9): p. 1013-24.
67. Wilkins, B.J., et al., *Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy*. *Circ Res*, 2004. **94**(1): p. 110-8.
68. Frey, N., E.N. Olson, and J.A. Hill *Mechanisms of Stress-Induced Cardiac Hypertrophy*, in *Muscle: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*, J.A. Hill and E.N. Olson Editors. 2012, Elsevier. p. 481-494.
69. Chen, X., et al., *Ca<sup>2+</sup> influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes*. *Circ Res*, 2005. **97**(10): p. 1009-17.
70. Dorn, G.W. and T. Force, *Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 527-37.
71. Braz, J.C., et al., *PKC alpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2)*. *J Cell Biol*, 2002. **156**(5): p. 905-19.

72. Avkiran, M., et al., *Protein kinase d in the cardiovascular system: emerging roles in health and disease*. *Circ Res*, 2008. **102**(2): p. 157-63.
73. Harrison, B.C., et al., *Regulation of cardiac stress signaling by protein kinase d1*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(10): p. 3875-88.
74. Franchini, K.G., *Focal adhesion kinase -- the basis of local hypertrophic signaling domains*. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **52**(2): p. 485-92.
75. Domingos, P.P., et al., *Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **282**(2): p. H556-64.
76. Russell, B., et al., *Mechanical stress-induced sarcomere assembly for cardiac muscle growth in length and width*. *J Mol Cell Cardiol*, 2010. **48**(5): p. 817-23.
77. Clemente, C.F., et al., *Focal adhesion kinase governs cardiac concentric hypertrophic growth by activating the AKT and mTOR pathways*. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **52**(2): p. 493-501.
78. Peng, X., et al., *Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(1): p. 217-27.
79. Mederos y Schnitzler, M., U. Storch, and T. Gudermann, *AT1 receptors as mechanosensors*. *Curr Opin Pharmacol*, 2011. **11**(2): p. 112-6.
80. Seth, M., et al., *TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart*. *Circ Res*, 2009. **105**(10): p. 1023-30.
81. Sanna, B., et al., *Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(3): p. 865-78.
82. Liang, Q., et al., *c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling*. *EMBO J*, 2003. **22**(19): p. 5079-89.
83. Liao, P., et al., *The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(21): p. 12283-8.
84. Lachance, D., et al., *Early left ventricular remodeling in acute severe aortic regurgitation: insights from an animal model*. *J Heart Valve Dis*, 2008. **17**(3): p. 300-8.
85. Duran, J., et al., *GSK-3 $\beta$ /NFAT Signaling Is Involved in Testosterone-Induced Cardiac Myocyte Hypertrophy*. *PLoS One*, 2016. **11**(12): p. e0168255.
86. Lompre, A.M., et al., *Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload*. *Nature*, 1979. **282**(5734): p. 105-7.
87. Champetier, S., et al., *Gene profiling of left ventricle eccentric hypertrophy in aortic regurgitation in rats: rationale for targeting the beta-adrenergic and renin-angiotensin systems*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **296**(3): p. H669-77.
88. Siddiqi, N., et al., *Cardiac metabolism in hypertrophy and heart failure: implications for therapy*. *Heart Fail Rev*, 2013. **18**(5): p. 595-606.
89. Neubauer, S., *The failing heart--an engine out of fuel*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(11): p. 1140-51.
90. Karwi, Q.G., et al., *Loss of Metabolic Flexibility in the Failing Heart*. *Front Cardiovasc Med*, 2018. **5**: p. 68.
91. Barger, P.M., et al., *Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(12): p. 1723-30.
92. Sambandam, N., et al., *Energy metabolism in the hypertrophied heart*. *Heart Fail Rev*, 2002. **7**(2): p. 161-73.
93. Neglia, D., et al., *Impaired myocardial metabolic reserve and substrate selection flexibility during stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **293**(6): p. H3270-8.
94. Sihag, S., et al., *PGC-1alpha and ERRalpha target gene downregulation is a signature of the failing human heart*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **46**(2): p. 201-12.
95. Harris, R.A. and E.T. Harper, *Glycolytic Pathway*. eLS, 2015.
96. Morio, B. and R.R. Wolfe, *Ketone Bodies*. eLS, 2015.

97. Aubert, G., et al., *The Failing Heart Relies on Ketone Bodies as a Fuel*. *Circulation*, 2016. **133**(8): p. 698-705.
98. Cotter, D.G., R.C. Schugar, and P.A. Crawford, *Ketone body metabolism and cardiovascular disease*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013. **304**(8): p. H1060-76.
99. Bedi, K.C., et al., *Evidence for Intramyocardial Disruption of Lipid Metabolism and Increased Myocardial Ketone Utilization in Advanced Human Heart Failure*. *Circulation*, 2016. **133**(8): p. 706-16.
100. Stanley, W.C., F.A. Recchia, and G.D. Lopaschuk, *Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(3): p. 1093-129.
101. Dirx, E., et al., *Protein kinase D1 is essential for contraction-induced glucose uptake but is not involved in fatty acid uptake into cardiomyocytes*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(8): p. 5871-81.
102. Giordano, F.J., *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 500-8.
103. Maejima, Y., D. Zablocki, and J. Sadoshima, *Oxidative Stress and Cardiac Muscle*, in *Muscle: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*, J.A. Hill and E.N. Olson, Editors. 2012, Elsevier. p. 309-322.
104. Pahlm, O. and G.S. Wagner, *Multimodal cardiovascular image : principles and clinical applications*. 2011, New York: McGraw-Hill Medical.
105. Levy, D., et al., *Echocardiographic criteria for left ventricular hypertrophy: the Framingham Heart Study*. *Am J Cardiol*, 1987. **59**(9): p. 956-60.
106. Hurst, J.W., et al., *Hurst's the heart manual of cardiology*. Thirteenth edition / editors Richard A. Walsh, MD, FACC, FAHA, James C. Fang, MD, Valentin Fuster, MD PhD, MACC, FAHA. ed.
107. Marwick, T.H., et al., *ECHOCARDIOGRAPHY*, in *Hurst's The Heart, 14e*, V. Fuster, et al., Editors. 2017, McGraw-Hill Education: New York, NY.
108. Bookout, A.L., et al., *High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2006. **Chapter 15**: p. Unit 15.8.
109. Ni, D., P. Xu, and S. Gallagher, *Immunoblotting and Immunodetection*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2016. **114**: p. 10.8.1-10.8.37.
110. Arsenault, M., et al., *Experimental aortic regurgitation in rats under echocardiographic guidance*. *J Heart Valve Dis*, 2002. **11**(1): p. 128-34.
111. Plante, E., et al., *Benefits of long-term beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **294**(4): p. H1888-95.
112. Lachance, D., et al., *Moderate exercise training improves survival and ventricular remodeling in an animal model of left ventricular volume overload*. *Circ Heart Fail*, 2009. **2**(5): p. 437-45.
113. Dhahri, W., et al., *Chronic high-fat diet-induced obesity decreased survival and increased hypertrophy of rats with experimental eccentric hypertrophy from chronic aortic regurgitation*. *BMC Cardiovasc Disord*, 2014. **14**: p. 123.
114. Drolet, M.C., et al., *Blockade of the acute activation of mTOR complex 1 decreases hypertrophy development in rats with severe aortic valve regurgitation*. Springerplus, 2015. **4**: p. 435.
115. Lachance, D., et al., *Endurance training or beta-blockade can partially block the energy metabolism remodeling taking place in experimental chronic left ventricle volume overload*. *BMC Cardiovasc Disord*, 2014. **14**: p. 190.
116. Roussel, E., et al., *Transcriptional Changes Associated with Long-Term Left Ventricle Volume Overload in Rats: Impact on Enzymes Related to Myocardial Energy Metabolism*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 949624.
117. Borer, J.S., et al., *Myocardial fibrosis in chronic aortic regurgitation: molecular and cellular responses to volume overload*. *Circulation*, 2002. **105**(15): p. 1837-42.
118. Roger, V.L., *Epidemiology of heart failure*. *Circ Res*, 2013. **113**(6): p. 646-59.
119. Tanai, E. and S. Frantz, *Pathophysiology of Heart Failure*. *Compr Physiol*, 2015. **6**(1): p. 187-214.
120. Francis, G.S., W.H.W. Tang, and R.A. Walsh, *Chapter 26. Pathophysiology of Heart Failure*, in *Hurst's The Heart, 13e*, V. Fuster, R.A. Walsh, and R.A. Harrington, Editors. 2011, The McGraw-Hill Companies: New York, NY.

121. Kinugawa, S., et al., *Skeletal Muscle Abnormalities in Heart Failure*. Int Heart J, 2015. **56**(5): p. 475-84.
122. Hasenfuss, G., *Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy*. Cardiovasc Res, 1998. **39**(1): p. 60-76.
123. Lizotte, E., et al., *Expression, distribution and regulation of sex steroid hormone receptors in mouse heart*. Cell Physiol Biochem, 2009. **23**(1-3): p. 75-86.
124. InanlooRahatloo, K., et al., *Sex-based differences in myocardial gene expression in recently deceased organ donors with no prior cardiovascular disease*. PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0183874.
125. Leinwand, L.A., *Sex is a potent modifier of the cardiovascular system*. J Clin Invest, 2003. **112**(3): p. 302-7.
126. Bell, J.R., et al., *Sex and sex hormones in cardiac stress--mechanistic insights*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2013. **137**: p. 124-35.
127. Huang, C.K., et al., *Androgen receptor (AR) in cardiovascular diseases*. J Endocrinol, 2016. **229**(1): p. R1-R16.
128. Peterson, L.R., et al., *Sex differences in myocardial oxygen and glucose metabolism*. J Nucl Cardiol, 2007. **14**(4): p. 573-81.
129. Blenck, C.L., et al., *The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease*. Circ Res, 2016. **118**(8): p. 1294-312.
130. Vijay, V., et al., *Sexual dimorphism in the expression of mitochondria-related genes in rat heart at different ages*. PLoS One, 2015. **10**(1): p. e0117047.
131. Keller, K.M. and S.E. Howlett, *Sex Differences in the Biology and Pathology of the Aging Heart*. Can J Cardiol, 2016. **32**(9): p. 1065-73.
132. Fazal, L., et al., *Effects of biological sex on the pathophysiology of the heart*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(3): p. 555-66.
133. Foryst-Ludwig, A., et al., *Sex differences in physiological cardiac hypertrophy are associated with exercise-mediated changes in energy substrate availability*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(1): p. H115-22.
134. Mahmoodzadeh, S., D. Fliegner, and E. Dworatzek, *Sex differences in animal models for cardiovascular diseases and the role of estrogen*. Handb Exp Pharmacol, 2012(214): p. 23-48.
135. Regitz-Zagrosek, V., et al., *Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure*. Circ J, 2010. **74**(7): p. 1265-73.
136. Regitz-Zagrosek, V. and U. Seeland, *Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure*. Wien Med Wochenschr, 2011. **161**(5-6): p. 109-16.
137. Ho, K.K., et al., *Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects*. Circulation, 1993. **88**(1): p. 107-15.
138. Douglas, P.S., et al., *Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(4): p. 1118-25.
139. Dent, M.R., P.S. Tappia, and N.S. Dhalla, *Gender differences in cardiac dysfunction and remodeling due to volume overload*. J Card Fail, 2010. **16**(5): p. 439-49.
140. Gardner, J.D., G.L. Brower, and J.S. Janicki, *Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload*. J Card Fail, 2002. **8**(2): p. 101-7.
141. Dent, M.R., P.S. Tappia, and N.S. Dhalla, *Gender differences in apoptotic signaling in heart failure due to volume overload*. Apoptosis, 2010. **15**(4): p. 499-510.
142. Ventura-Clapier, R., et al., *Sex in basic research: concepts in the cardiovascular field*. Cardiovasc Res, 2017. **113**(7): p. 711-724.
143. Menazza, S. and E. Murphy, *The Expanding Complexity of Estrogen Receptor Signaling in the Cardiovascular System*. Circ Res, 2016. **118**(6): p. 994-1007.
144. Muka, T., et al., *Association of Age at Onset of Menopause and Time Since Onset of Menopause With Cardiovascular Outcomes, Intermediate Vascular Traits, and All-Cause Mortality: A Systematic Review and Meta-analysis*. JAMA Cardiol, 2016. **1**(7): p. 767-776.

145. Rossouw, J.E., et al., *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial*. JAMA, 2002. **288**(3): p. 321-33.
146. Hulley, S., et al., *Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group*. JAMA, 1998. **280**(7): p. 605-13.
147. Hodis, H.N., et al., *Methods and baseline cardiovascular data from the Early versus Late Intervention Trial with Estradiol testing the menopausal hormone timing hypothesis*. Menopause, 2015. **22**(4): p. 391-401.
148. Hodis, H.N., et al., *Vascular Effects of Early versus Late Postmenopausal Treatment with Estradiol*. N Engl J Med, 2016. **374**(13): p. 1221-31.
149. Brower, G.L., J.D. Gardner, and J.S. Janicki, *Gender mediated cardiac protection from adverse ventricular remodeling is abolished by ovariectomy*. Mol Cell Biochem, 2003. **251**(1-2): p. 89-95.
150. Donaldson, C., et al., *Estrogen attenuates left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy by an estrogen receptor-dependent pathway that increases calcineurin degradation*. Circ Res, 2009. **104**(2): p. 265-75, 11p following 275.
151. Skavdahl, M., et al., *Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(2): p. H469-76.
152. Fliegner, D., et al., *Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **298**(6): p. R1597-606.
153. Pedram, A., et al., *Estrogen inhibits cardiac hypertrophy: role of estrogen receptor-beta to inhibit calcineurin*. Endocrinology, 2008. **149**(7): p. 3361-9.
154. Trivedi, C.M., et al., *Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3 beta activity*. Nat Med, 2007. **13**(3): p. 324-31.
155. Leenders, J.J., et al., *Regulation of cardiac gene expression by KLF15, a repressor of myocardin activity*. J Biol Chem, 2010. **285**(35): p. 27449-56.
156. Hoa, N., et al., *Estrogen receptor beta maintains expression of KLF15 to prevent cardiac myocyte hypertrophy in female rodents*. Mol Cell Endocrinol, 2018. **470**: p. 240-250.
157. Camper-Kirby, D., et al., *Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males*. Circ Res, 2001. **88**(10): p. 1020-7.
158. Petrov, G., et al., *Regression of myocardial hypertrophy after aortic valve replacement: faster in women?* Circulation, 2010. **122**(11 Suppl): p. S23-8.
159. Molina, P.E., *Endocrine physiology*. 3rd ed. ed. 2010, New York: McGraw-Hill Medical ; London : McGraw-Hill [distributor].
160. Stanczyk, F.Z., *Pharmacokinetics and potency of progestins used for hormone replacement therapy and contraception*. Rev Endocr Metab Disord, 2002. **3**(3): p. 211-24.
161. Chung, E., F. Yeung, and L.A. Leinwand, *Calcineurin activity is required for cardiac remodelling in pregnancy*. Cardiovasc Res, 2013. **100**(3): p. 402-10.
162. Chung, E., F. Yeung, and L.A. Leinwand, *Akt and MAPK signaling mediate pregnancy-induced cardiac adaptation*. J Appl Physiol (1985), 2012. **112**(9): p. 1564-75.
163. Liu, L.X., et al., *PK4 Inhibits Cardiac Pyruvate Oxidation in Late Pregnancy*. Circ Res, 2017. **121**(12): p. 1370-1378.
164. Feridooni, H.A., et al., *Acute exposure to progesterone attenuates cardiac contraction by modifying myofilament calcium sensitivity in the female mouse heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017. **312**(1): p. H46-H59.
165. Arany, Z. and U. Elkayam, *Peripartum Cardiomyopathy*. Circulation, 2016. **133**(14): p. 1397-409.
166. van Weerden, W.M., et al., *Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens*. Life Sci, 1992. **50**(12): p. 857-61.
167. Thieme, D. and P. Hemmersbach, *Doping in sports*. 2010, Berlin ; London: Springer.
168. Marsh, J.D., et al., *Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes*. Circulation, 1998. **98**(3): p. 256-61.

169. Pirompol, P., et al., *Supra-physiological dose of testosterone induces pathological cardiac hypertrophy*. J Endocrinol, 2016. **229**(1): p. 13-23.
170. Volterrani, M., G. Rosano, and F. Iellamo, *Testosterone and heart failure*. Endocrine, 2012. **42**(2): p. 272-7.
171. Oskui, P.M., et al., *Testosterone and the cardiovascular system: a comprehensive review of the clinical literature*. J Am Heart Assoc, 2013. **2**(6): p. e000272.
172. Kloner, R.A., et al., *Testosterone and Cardiovascular Disease*. J Am Coll Cardiol, 2016. **67**(5): p. 545-57.
173. Vicencio, J.M., et al., *Testosterone induces an intracellular calcium increase by a nongenomic mechanism in cultured rat cardiac myocytes*. Endocrinology, 2006. **147**(3): p. 1386-95.
174. Duran, J., et al., *Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Androgen Signaling Pathways Modulate MEF2 Activity in Testosterone-Induced Cardiac Myocyte Hypertrophy*. Front Pharmacol, 2017. **8**: p. 604.
175. Altamirano, F., et al., *Testosterone induces cardiomyocyte hypertrophy through mammalian target of rapamycin complex 1 pathway*. J Endocrinol, 2009. **202**(2): p. 299-307.
176. Al Madhoun, A.S., et al., *Testosterone enhances cardiomyogenesis in stem cells and recruits the androgen receptor to the MEF2C and HCN4 genes*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **60**: p. 164-71.
177. Montalvo, C., et al., *Androgens contribute to sex differences in myocardial remodeling under pressure overload by a mechanism involving TGF- $\beta$* . PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35635.
178. Wilson, C., et al., *Testosterone increases GLUT4-dependent glucose uptake in cardiomyocytes*. J Cell Physiol, 2013. **228**(12): p. 2399-407.
179. Zwadlo, C. and J. Borlak, *Dihydrotestosterone--a culprit in left ventricular hypertrophy*. Int J Cardiol, 2012. **155**(3): p. 452-6.
180. Thum, T. and J. Borlak, *Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy*. FASEB J, 2002. **16**(12): p. 1537-49.
181. Chung, C.C., et al., *Androgen attenuates cardiac fibroblasts activations through modulations of transforming growth factor- $\beta$  and angiotensin II signaling*. Int J Cardiol, 2014. **176**(2): p. 386-93.
182. Madden, S. and L. Kelly, *Update on acute rheumatic fever: it still exists in remote communities*. Can Fam Physician, 2009. **55**(5): p. 475-8.
183. Carapetis, J.R., *Rheumatic heart disease in developing countries*. N Engl J Med, 2007. **357**(5): p. 439-41.
184. Steer, A.C. and J.R. Carapetis, *Prevention and treatment of rheumatic heart disease in the developing world*. Nat Rev Cardiol, 2009. **6**(11): p. 689-98.
185. Gardner, J.D., et al., *Estrogen attenuates chronic volume overload induced structural and functional remodeling in male rat hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(2): p. H497-504.
186. Zwadlo, C., et al., *Antiandrogenic therapy with finasteride attenuates cardiac hypertrophy and left ventricular dysfunction*. Circulation, 2015. **131**(12): p. 1071-81.
187. Taylor, A.L., *Heart failure in women*. Curr Heart Fail Rep, 2015. **12**(2): p. 187-95.
188. Merz, A.A. and S. Cheng, *Sex differences in cardiovascular ageing*. Heart, 2016. **102**(11): p. 825-31.
189. Doumas, M., et al., *Gender differences in hypertension: myths and reality*. Curr Hypertens Rep, 2013. **15**(4): p. 321-30.
190. Dent, M.R., P.S. Tappia, and N.S. Dhalla, *Gender related alterations of beta-adrenoceptor mechanisms in heart failure due to arteriovenous fistula*. J Cell Physiol, 2012. **227**(8): p. 3080-7.
191. Dent, M.R., P.S. Tappia, and N.S. Dhalla, *Gender differences in beta-adrenoceptor system in cardiac hypertrophy due to arteriovenous fistula*. J Cell Physiol, 2011. **226**(1): p. 181-6.
192. Drolet, M.C., et al., *Gender-related differences in left ventricular remodeling in chronic severe aortic valve regurgitation in rats*. J Heart Valve Dis, 2006. **15**(3): p. 345-51.
193. Quinones, M.A., et al., *Noninvasive quantification of left ventricular wall stress. Validation of method and application to assessment of chronic pressure overload*. Am J Cardiol, 1980. **45**(4): p. 782-90.

194. Arsenault, M., et al., *Angiotensin II-converting enzyme inhibition improves survival, ventricular remodeling, and myocardial energetics in experimental aortic regurgitation*. *Circ Heart Fail*, 2013. **6**(5): p. 1021-8.
195. Zendaoui, A., et al., *Effects of spironolactone treatment on an experimental model of chronic aortic valve regurgitation*. *J Heart Valve Dis*, 2012. **21**(4): p. 478-86.
196. Santulli, G. and G. Iaccarino, *Adrenergic signaling in heart failure and cardiovascular aging*. *Maturitas*, 2016. **93**: p. 65-72.
197. Ciccarelli, M., et al., *Adrenergic receptors and metabolism: role in development of cardiovascular disease*. *Front Physiol*, 2013. **4**: p. 265.
198. Plante, E., et al., *Effectiveness of beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation*. *Circulation*, 2004. **110**(11): p. 1477-83.
199. Weinberg, E.O., et al., *Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy*. *J Am Coll Cardiol*, 1999. **34**(1): p. 264-73.
200. Witt, H., et al., *Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice*. *J Mol Med (Berl)*, 2008. **86**(9): p. 1013-24.
201. Bouchard-Thomassin, A.A., et al., *A high-fructose diet worsens eccentric left ventricular hypertrophy in experimental volume overload*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **300**(1): p. H125-34.
202. Moulin, M., et al., *Sexual dimorphism of doxorubicin-mediated cardiotoxicity: potential role of energy metabolism remodeling*. *Circ Heart Fail*, 2015. **8**(1): p. 98-108.
203. Lachance, D., et al., *Endurance training or beta-blockade can partially block the energy metabolism remodeling taking place in experimental chronic left ventricle volume overload*. *BMC Cardiovasc Disord*, 2014. **14**: p. 190.
204. Zendaoui, A., et al., *Usefulness of carvedilol in the treatment of chronic aortic valve regurgitation*. *Circ Heart Fail*, 2011. **4**(2): p. 207-13.
205. Dhahri, W., et al., *Metformin Reduces Left Ventricular Eccentric Re-modeling In Experimental volume Overload in the Rat*. *J Clin Exp Cardiol*, 2012. **13**(11): p. 8.
206. Huss, J.M., et al., *The nuclear receptor ERRalpha is required for the bioenergetic and functional adaptation to cardiac pressure overload*. *Cell Metab*, 2007. **6**(1): p. 25-37.
207. Alaynick, W.A., et al., *ERRgamma directs and maintains the transition to oxidative metabolism in the postnatal heart*. *Cell Metab*, 2007. **6**(1): p. 13-24.
208. Hu, X., et al., *AMP activated protein kinase-alpha2 regulates expression of estrogen-related receptor-alpha, a metabolic transcription factor related to heart failure development*. *Hypertension*, 2011. **58**(4): p. 696-703.
209. Liu, D., et al., *Estrogen stimulates estrogen-related receptor alpha gene expression through conserved hormone response elements*. *Endocrinology*, 2003. **144**(11): p. 4894-904.
210. Lachance, D., et al., *Effects of exercise in volume overload: insights from a model of aortic regurgitation*. *Med Sci Sports Exerc*, 2009. **41**(6): p. 1230-8.
211. Plante, E., et al., *Impact of anesthesia on echocardiographic evaluation of systolic and diastolic function in rats*. *J Am Soc Echocardiogr*, 2006. **19**(12): p. 1520-5.
212. Couet, J., et al., *Treatment of combined aortic regurgitation and systemic hypertension: Insights from an animal model study*. *Am J Hypertens*, 2006. **19**(8): p. 843-50.
213. Roth, G.A., et al., *Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015*. *J Am Coll Cardiol*, 2017. **70**(1): p. 1-25.
214. Beaumont, C., et al., *Female rats with severe left ventricle volume overload exhibit more cardiac hypertrophy but fewer myocardial transcriptional changes than males*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 729.
215. Pugh, P.J., T.H. Jones, and K.S. Channer, *Acute haemodynamic effects of testosterone in men with chronic heart failure*. *Eur Heart J*, 2003. **24**(10): p. 909-15.
216. Malkin, C.J., et al., *Testosterone therapy in men with moderate severity heart failure: a double-blind randomized placebo controlled trial*. *Eur Heart J*, 2006. **27**(1): p. 57-64.
217. Xu, L., et al., *Testosterone therapy and cardiovascular events among men: a systematic review and meta-analysis of placebo-controlled randomized trials*. *BMC Med*, 2013. **11**: p. 108.

218. Basualto-Alarcón, C., et al., *Testosterone signals through mTOR and androgen receptor to induce muscle hypertrophy*. *Med Sci Sports Exerc*, 2013. **45**(9): p. 1712-20.
219. Belanger, M.M., E. Roussel, and J. Couet, *Up-regulation of caveolin expression by cytotoxic agents in drug-sensitive cancer cells*. *Anticancer Drugs*, 2003. **14**(4): p. 281-7.
220. Leenders, J.J., et al., *Repression of cardiac hypertrophy by KLF15: underlying mechanisms and therapeutic implications*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e36754.
221. Mueckler, M. and B. Thorens, *The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters*. *Mol Aspects Med*, 2013. **34**(2-3): p. 121-38.
222. Beaumont, C., et al., *Female rats with severe left ventricle volume overload exhibit more cardiac hypertrophy but fewer myocardial transcriptional changes than males*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 729.
223. Plante, E., et al., *Comparative study of vasodilators in an animal model of chronic volume overload caused by severe aortic regurgitation*. *Circ Heart Fail*, 2009. **2**(1): p. 25-32.
224. Sabapathy, K., et al., *Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation*. *Mol Cell*, 2004. **15**(5): p. 713-25.
225. Lucas-Herald, A.K., et al., *Genomic and non-genomic effects of androgens in the cardiovascular system: clinical implications*. *Clin Sci (Lond)*, 2017. **131**(13): p. 1405-1418.
226. Sebag, I.A., et al., *Sex hormone control of left ventricular structure/function: mechanistic insights using echocardiography, expression, and DNA methylation analyses in adult mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **301**(4): p. H1706-15.
227. Toma, M., et al., *Testosterone supplementation in heart failure: a meta-analysis*. *Circ Heart Fail*, 2012. **5**(3): p. 315-21.
228. Webb, C.M., et al., *Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease*. *Circulation*, 1999. **100**(16): p. 1690-6.
229. Bušić, Ž. and V. Čulić, *Central and peripheral testosterone effects in men with heart failure: An approach for cardiovascular research*. *World J Cardiol*, 2015. **7**(9): p. 504-10.
230. Snyder, P.J., *Androgens and the Male Reproductive Tract*, in *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e, L.L. Brunton, R. Hilal-Dandan, and B.C. Knollmann, Editors. 2017, McGraw-Hill Education: New York, NY.
231. Rosen, M.P. and M.I. Cedars, *Female Reproductive Endocrinology and Infertility*, in *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*, 10e, D.G. Gardner and D. Shoback, Editors. 2017, McGraw-Hill Education: New York, NY.
232. Sengupta, P., *The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's*. *Int J Prev Med*, 2013. **4**(6): p. 624-30.
233. Gayon, J., *From Mendel to epigenetics: History of genetics*. *C R Biol*, 2016. **339**(7-8): p. 225-30.
234. Kerkhof, P.L.M.e. and V.e. Miller, *Sex-specific analysis of cardiovascular function*.
235. Dumasia, K., et al., *Estrogen signaling, through estrogen receptor  $\beta$ , regulates DNA methylation and its machinery in male germ line in adult rats*. *Epigenetics*, 2017. **12**(6): p. 476-483.
236. Homburg, R., et al., *A novel method to demonstrate that pregnant women with polycystic ovary syndrome hyper-expose their fetus to androgens as a possible stepping stone for the developmental theory of PCOS. A pilot study*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2017. **15**(1): p. 61.
237. IRSC. *Qu'est-ce que le genre? Qu'est-ce que le sexe?* 2018 [cited 2018 29 novembre]; Available from: <http://www.cihir-irsc.gc.ca/f/48642.html>.
238. Ganong, W.F., *Review of medical physiology*. 21st ed. ed. 2003, New York ; London: Lange Medical Books/McGraw-Hill.
239. Arnold, A.P., et al., *Sex Hormones and Sex Chromosomes Cause Sex Differences in the Development of Cardiovascular Diseases*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. **37**(5): p. 746-756.
240. Itoh, Y., et al., *Four core genotypes mouse model: localization of the Sry transgene and bioassay for testicular hormone levels*. *BMC Res Notes*, 2015. **8**: p. 69.
241. Burgoyne, P.S., et al., *The Y\* rearrangement in mice: new insights into a perplexing PAR*. *Cytogenet Cell Genet*, 1998. **80**(1-4): p. 37-40.

242. Eicher, E.M., et al., *The mouse Y\* chromosome involves a complex rearrangement, including interstitial positioning of the pseudoautosomal region*. Cytogenet Cell Genet, 1991. **57**(4): p. 221-30.
243. Dadam, F.M., et al., *Sex chromosome complement involvement in angiotensin receptor sexual dimorphism*. Mol Cell Endocrinol, 2017. **447**: p. 98-105.
244. Pessôa, B.S., et al., *Angiotensin II type 2 receptor- and acetylcholine-mediated relaxation: essential contribution of female sex hormones and chromosomes*. Hypertension, 2015. **66**(2): p. 396-402.
245. Li, J., et al., *The number of X chromosomes influences protection from cardiac ischaemia/reperfusion injury in mice: one X is better than two*. Cardiovasc Res, 2014. **102**(3): p. 375-84.