

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ACTIVITÉ PHYSIQUE (3407)

PAR
SIMON BERGERON VAILLANCOURT

EFFETS D'UN AGONISTE PPAR δ APRÈS UN INFARCTUS DU MYOCARDE SUR
LA FONCTION CARDIAQUE ET L'EXPRESSION DE GÈNES MÉTABOLIQUES
CHEZ LE RAT.

SEPTEMBRE 2011

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
SUMMARY	vi
REMERCIEMENTS	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
1. INTRODUCTION	1
2. CADRE THÉORIQUE.....	4
Métabolisme du cœur	4
Les lipides.....	4
Les glucides	6
Réponse métabolique du cœur à un événement ischémique	10
Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)	12
Généralités.....	12
Ligands	15
Effets physiologiques de PPAR δ sur le cœur	16
3. PROBLÉMATIQUE	19
4. QUESTION ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	20
Question de recherche	20
Hypothèses de recherche.....	20

5.	ARTICLE	22
	Abstract	23
	Introduction	25
	Methods	26
	Results	30
	Discussion	38
	Conclusion.....	43
	Bibliography	44
6.	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	47
	Effet de PPAR δ sur la fonction cardiaque et la taille de l'infarctus.....	48
	Effet de PPAR δ sur l'expression de gènes métaboliques.....	50
	Limites et perspectives	51
7.	CONCLUSION GÉNÉRALE	54
8.	BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE	55

RÉSUMÉ

Un infarctus du myocarde peut occasionner de l'incapacité fonctionnelle et grandement réduire la qualité de vie. Suivant un traumatisme de nature ischémique, des altérations métaboliques peuvent survenir et affecter négativement l'utilisation des substrats énergétiques du cœur. Plusieurs évidences scientifiques supportent l'idée que réduire la captation et l'utilisation des lipides tout en augmentant celles du glucose améliore la fonction cardiaque suivant un incident ischémique. Optimiser le métabolisme des substrats énergétiques est présentement perçu comme une intervention thérapeutique nouvelle et prometteuse dans un contexte d'ischémie et de maladie cardiaque. Ce type d'intervention a pour objectif de ralentir la progression de la maladie et de maximiser l'efficacité de la pompe cardiaque. Récemment, l'activation du récepteur nucléaire PPAR δ (peroxisome proliferator-activated receptor δ) a montré des bénéfices contre les traumatismes cardiaques en augmentant l'expression de plusieurs gènes métaboliques et le maintien de la fonction cardiaque, en plus de réduire l'apoptose et la taille de l'infarctus. Puisque PPAR δ est reconnu comme un important régulateur métabolique, nous avons évalué dans cette étude les effets d'un traitement hâtif avec un agoniste PPAR δ (GW0742) sur la fonction cardiaque, la taille de l'infarctus, les signaux apoptotiques et l'expression de gènes métaboliques suite à un infarctus du myocarde chez le rat.

Pour réaliser cette étude, trois groupes de rats (Sprague-Dawley) ont été formés. Le premier groupe (MI-T, $n = 7$) a subi un infarctus du myocarde avec une occlusion de l'artère coronaire gauche et a reçu un agoniste PPAR δ (GW0742) par gavage (10mg/kg/jour) 24h après infarctus : le traitement fut d'une durée de 6 jours. Le second groupe a subi la même procédure chirurgicale mais n'a reçu aucun traitement pharmacologique (MI, $n = 6$). Un dernier groupe (opéré; $n = 3$), destiné à contrôler l'effet chirurgical, a également subi la même procédure chirurgicale sans occlusion de l'artère coronaire n'induisant aucun infarctus. Sept jours après l'infarctus, des mesures hémodynamiques ventriculaires et artérielles furent complétées sous anesthésie avec un cathéter introduit dans le ventricule gauche via l'artère carotidienne. Après le sacrifice, le cœur, les ventricules, les oreillettes et la cicatrice furent individuellement pesés, puis congelés pour des analyses ultérieures. L'expression des protéines régulatrices de l'apoptose (Bax et Bcl-2) ainsi que la protéine PPAR δ furent mesurées par électrophorèse et immunobuvardage tandis que l'expression des gènes métaboliques (PFK-1, PDK-4 et MCAD) et du gène PPAR δ a été mesurée par RT-PCR.

Les résultats de cette étude démontrent que l'administration de l'agoniste PPAR δ GW0742 après infarctus a permis de normaliser la fonction cardiaque et la pression artérielle systolique malgré aucun changement au niveau de la taille de la cicatrice et de l'expression des gènes métaboliques. De plus, malgré que le traitement ait augmenté l'expression du gène PPAR δ , ceci ne s'est pas traduit en expression protéique et n'a pu modifier l'expression de certaines protéines régulatrices de l'apoptose (Bax et Bcl-2).

Bien qu'une préactivation/surexpression de la protéine PPAR δ ait des effets cardioprotecteurs contre un évènement ischémique cardiaque, son potentiel thérapeutique comme intervention secondaire ainsi les mécanismes impliqués restent à démontrer.

SUMMARY

Optimizing energy substrate metabolism represents a novel and promising therapeutic intervention in ischemic and heart diseases. Recently, prior activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR δ) has shown beneficial effects against cardiac injury. Since PPAR δ is an important metabolic regulator, we evaluated the effects of an early treatment after myocardial infarction with a selective PPAR δ agonist (GW0742) on cardiac function, infarct size and metabolic gene expression in the rat heart.

GW0742 was administered via oral gavage (10mg/kg/day) in adult male Sprague-Dawley rats (MI-T; $n = 7$) 24 hours following coronary artery ligation and was continued for a period of 6 days. The control group (MI, $n = 6$) remained untreated, and sham-operated animals (Sham; $n = 3$) underwent a similar surgical procedure but without occlusion of the coronary artery. Hemodynamic measurements were performed 7 days post infarction with a Millar Catheter. Protein (PPAR δ , Bax and Bcl-2) and mRNA (PPAR δ , PFK-1, PDK-4 and MCAD) expression levels were measured by Western blot and by RT-PCR analysis respectively.

Body weight (BW) was not statistically different across groups nor were heart weight (HW) and heart weight to body weight ratio (HW:BW). Infarct size, scar weight (SW), scar surface area (SSA) and scar weight to heart weight ratio (SW:HW) were not significantly different between groups ($p > 0.05$). Left ventricular rate of pressure

development and mean and systolic blood pressure were significantly greater in the MI-T and sham groups as compared to MI ($p < 0.05$). Six days of oral administration of PPAR δ agonist GW0742 post-infarction did not affect left ventricular (LV) mRNA expression of selected metabolic genes. Although PPAR δ mRNA was significantly upregulated ($p < 0.01$), its protein expression was unaltered. Western blot analysis performed on LV did not show any significant difference between Bax and Bcl-2 protein expression, as well as Bcl-2/Bax ratio in the GW0742 treated group as compared to the non-treated animals.

We showed that, when administered early after myocardial infarction, GW0742 did not change metabolic gene expression, infarct size and apoptosis regulatory proteins but did improve PPAR δ mRNA expression level and normalized cardiac function.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire. En premier lieu, je remercie Claude Lajoie, Ph.D., professeur à l'Université du Québec à Trois-Rivières. En tant que directeur de recherche, il m'a guidé dans mon travail et m'a aidé à trouver des solutions pour avancer. De plus, il a aussi contribué à enrichir mon cursus universitaire autant sur le plan académique que personnel.

Je ne remercierai jamais assez Dr Angelo Calderone, chercheur au centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, et son équipe, Hugues Gosselin, technicien de laboratoire et Natacha Duquette, technicienne animalière, pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de mes expérimentations. Sans eux, ce travail n'aurait pu être possible.

Je remercie également les professeurs du département des sciences de l'activité physique de l'UQTR et, plus particulièrement, Louis Laurencelle, Ph.D., pour sa disponibilité et ses conseils.

Finalement, je tiens à remercier Normand Filion, un collègue et ami, pour m'avoir soutenu et encouragé tout au long de ce processus. Il fut un proche important tout au long de mon passage à l'Université du Québec à Trois-Rivières.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 5-1 : Animal morphological characteristics and infarct size.....	31
Tableau 5-2 : Animal hemodynamic parameters.....	32

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1: Conséquences d'une augmentation de la glycolyse anaérobie et d'une réduction des processus oxydatifs dans la mitochondrie.....	9
Figure 2-2: Les différentes structures permettant aux PPAR d'interagir avec les gènes.....	14
Figure 5-1: Effect of GW0742 on left ventricular PPAR δ protein and mRNA expressions post-MI in rats.....	33
Figure 5-2: Representative mRNA expression of metabolic genes in the left ventricle one week post-MI.....	35
Figure 5-3: Effect of GW0742 on Bax and Bcl-2 protein expression and Bcl-2/Bax ratio post-MI.....	37

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADP : adénosine diphosphate

AGL : acide gras libre

AMP : adénosine monophosphate

ATP : adénosine triphosphate

CTE : chaîne de transport des électrons

CPT-1 : carnitine palmitoyl transférase 1

FA : acide gras (fatty acid)

FACS : acyl-CoA synthétase des acides gras (fatty acyl-CoA synthase)

FADH₂ : flavine adénine dinucléotide sous forme réduite

G6P : glucose-6-phosphate

GLUT4 : transporteur de glucose 4

I/R : ischémie/reperfusion (ischemia/reperfusion)

LAD : ligation de l'artère coronaire gauche

LCAD : acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne longue (long chain acyl-CoA dehydrogenase)

LDH : lactate déshydrogénase

LDL : lipoprotéine à faible densité (low-density lipoprotein)

LV : ventricule gauche (left ventricle)

MCAD : acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (medium chain acyl-CoA dehydrogenase)

PDH : pyruvate déshydrogénase

PDK : pyruvate déshydrogénase kinase

PFK-1 : phosphofructokinase-1

Pi : phosphate inorganique

PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor

PPRE : élément de réponse de PPAR sur une région cible d'un gène

NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide sous forme oxydée

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite

NR1C1 : sous-famille des récepteurs nucléaires 1, groupe C, membre 1

SERCA2a : ATPase calcique du réticulum sarco/endoplasmique de type 2a

1. INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires constituent un problème de santé majeur dans les sociétés occidentales. En fait, elles représentent l'une des premières causes de mortalité au Canada en plus d'occasionner une charge économique de plus de 22 milliards de dollars annuellement. Selon les plus récentes données provenant de Statistique Canada (2009), 61 000 crises cardiaques ont nécessité des hospitalisations au pays en 2005. Une grande proportion (environ 70%) des individus qui ont subi un infarctus du myocarde demeurent à risque de subir un second événement ischémique. En fait, uniquement durant les 12 mois suivant un infarctus, l'Agence de la santé publique du Canada (2009) estime qu'environ 12% de ces mêmes patients devront revisiter les centres hospitaliers pour les mêmes raisons. L'augmentation de l'incidence est principalement due aux taux de survie et de récurrence engendrés par les avancées sur le plan des techniques d'intervention en cardiologie, des technologies, des thérapies pharmacologiques et du vieillissement de la population.

Un infarctus du myocarde a des conséquences majeures sur le muscle cardiaque. En plus du remodelage morphologique et phénotypique, le cœur subit également des changements au niveau de la disponibilité et de l'utilisation des substrats énergétiques : un phénomène appelé remodelage métabolique. Ces changements ne sont pas clairement caractérisés puisqu'ils dépendent du type de pathologie ainsi que de sa sévérité. Ils sont par contre perçus comme pouvant contribuer à la progression des maladies cardiaques

(Jaswal, *et al.*, 2011). La mort de cardiomyocytes par apoptose et nécrose réduit la capacité du cœur à éjecter le sang et subvenir aux besoins vitaux de l'organisme suivant un infarctus. Afin de répondre adéquatement au surplus de charges de travail nouvellement imposées sur les cardiomyocytes survivants, une utilisation optimisée des substrats énergétiques pourrait être bénéfique pour la fonction et la survie du cœur. Selon plusieurs auteurs, le fait de réduire la captation et l'utilisation des lipides et d'augmenter celles du glucose améliore la fonction cardiaque suivant un incident ischémique (Lopaschuk, 1998; Lopaschuk, *et al.*, 2010; Stanley, *et al.*, 2005). Ceci est perçu comme étant une avenue thérapeutique nouvelle et prometteuse dans un contexte d'ischémie et de maladie cardiaque.

Les membres de la famille des « peroxysome proliferator activated receptors » (PPAR) sont d'importants régulateurs engagés dans le métabolisme des lipides. Il y a trois isoformes distinctes de PPAR (PPAR α , PPAR δ et PPAR γ), chacune ayant des effets cardiovasculaires différents. Malgré son expression relativement importante dans le cœur, le rôle et les effets de PPAR δ sur le cœur demeurent les moins connus des trois isoformes. Dans un contexte d'ischémie du myocarde, certaines études ont démontré des effets positifs d'une préactivation/surexpression du récepteur PPAR δ (Burkart, *et al.*, 2007; Kapoor, *et al.*, 2010; Yue, *et al.*, 2008). Toutes ont montré des bénéfices contre les blessures cardiaques en augmentant l'expression de gènes métaboliques et la fonction cardiaque ainsi qu'en réduisant l'apoptose et la taille de l'infarctus. Par contre, les effets de l'administration d'un agoniste PPAR δ après l'infarctus du myocarde sont peu connus.

Considérant les effets positifs de l'activation de PPAR δ préalablement à l'ischémie cardiaque, il serait intéressant d'étudier l'effet d'un agoniste PPAR δ suivant un infarctus du myocarde sur la fonction cardiaque, la taille de la cicatrice et l'expression de gènes métaboliques.

2. CADRE THÉORIQUE

MÉTABOLISME DU CŒUR

Les lipides

Le cœur consomme plus d'énergie que l'importe quel autre organe chez l'homme. Il génère et utilise environ 6 kg d'ATP tous les jours, soit de 20 à 30 fois son propre poids. Chaque jour, il bat approximativement 100 000 fois et pompe 10 tonnes de sang à travers le corps (Neubauer, 2007). Le cœur a donc besoin d'une grande quantité d'énergie pour remplir ses fonctions. Pour subvenir à celles-ci, il convertit l'énergie chimique emmagasinée dans les acides gras et le glucose en énergie mécanique produite par l'interaction de l'actine et de la myosine. L'incapacité de métaboliser les substrats énergétiques de façon adéquate accentue la défaillance mécanique du cœur (Neubauer, 2007). Pour cette raison, ce n'est pas une surprise que le statut énergétique du cœur joue un rôle clé dans la pathogenèse et la progression de certaines maladies cardiaques.

La première source de substrats énergétiques pour le cœur est les acides gras (Wisneski, *et al.*, 1987), qui fournissent approximativement 60% à 90% de l'énergie pour la synthèse de l'ATP (Bing, 1955). La concentration artérielle d'acides gras libres (AGL) est le principal régulateur de l'oxydation des lipides : la captation et l'oxydation des acides gras augmentent en proportion avec la concentration plasmatique artérielle (Bing, 1955; Wisneski, *et al.*, 1987). Le niveau d'AGL augmente durant le jeûne (Lopaschuk, *et al.*, 1994a), lors d'une stimulation adrénergique, mais également après un

infarctus du myocarde (Lopaschuk, *et al.*, 1994b). À l'opposé, une glycémie élevée stimule la libération de l'insuline et réduit ainsi la concentration plasmatique d'AGL, une situation observée lors d'un état postprandial.

Les acides gras entrent dans les cardiomyocytes par diffusion passive ou par des protéines transmembranaires de transport. Une protéine spécifique appelée CD36 est abondamment exprimée dans le muscle cardiaque et semble être la principale protéine à remplir cette fonction dans le cœur (Schaffer, 2002). Une fois dans le cytosol, les AGL sont rapidement activés par estérification via l'acyl-CoA synthétase pour former de l'acyl-CoA. Le produit de cette réaction peut être utilisé pour former des triglycérides, convertis en acyl-carnitine par la carnitine palmitoyl transférase-1 (CPT-1), ou diffusés directement dans la mitochondrie pour approvisionner la β -oxydation en carbone (Schaffer, 2002). Environ 30% des acides gras qui s'introduisent dans le cœur sont emmagasinés sous forme de triglycérides, les 70% restant étant immédiatement oxydés en CO_2 (Lopaschuk, *et al.*, 1994a; Wisneski, *et al.*, 1987). Le myocyte cardiaque peut donc oxyder des acides gras de sources endogène et exogène selon la disponibilité des substrats ainsi que la demande en énergie. Une fois activés, les acides gras sous forme d'acyl-CoA doivent pénétrer la mitochondrie pour contribuer à la production d'énergie. La membrane mitochondriale est elle aussi munie de protéines spécifiques permettant le passage de l'acyl-CoA à travers celle-ci. Pour ce faire, la CPT-1 catalyse la réaction liant l'acyl-CoA à la carnitine pour former l'acyl-carnitine. Sous cette forme, la CPT-1 peut faire pénétrer les acides gras à l'intérieur de la matrice mitochondriale par translocation

(déplacement intracellulaire). Une fois dans la mitochondrie, elle est reconvertie en acyl-CoA par la CPT-2 pour ensuite s'engager dans la β -oxydation.

La β -oxydation est la principale voie de dégradation des acides gras. Ce procédé consiste à scinder de manière répétitive 2 carbones de l'acyl-CoA générant du NADH et du FADH_2 pour fournir des protons d'hydrogène à la chaîne de transport des électrons (CTE) afin de générer de l'ATP. La β -oxydation comprend quatre réactions biologiques initiées par l'activité d'enzymes spécifiques selon la longueur de la chaîne d'acyl-CoA. Parmi celles-ci, l'acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCAD) est l'enzyme de la bêta oxydation la plus connue (Thorpe & Kim, 1995). La mesure de l'expression génétique de MCAD dans le cœur est une méthode fréquemment utilisée pour apprécier l'augmentation de l'oxydation des lipides (van Bilsen, *et al.*, 2009).

Les glucides

Pour sa part, l'oxydation du pyruvate, provenant du glucose ou du lactate, compte pour environ 10% à 40% de l'énergie nécessaire pour la formation de l'ATP dans le cœur sain (Stanley, *et al.*, 1997). En condition normale, le pyruvate est généré par l'entremise de la glycolyse et de l'oxydation du lactate. Le myocarde sain consomme efficacement le lactate et ce, même en condition de travail près du maximum (Gertz, *et al.*, 1988). Le myocarde produit du lactate lorsque la glycolyse s'active de façon accrue et

disproportionnée comparativement à l'oxydation du pyruvate, une condition observable en situation d'ischémie du myocarde (Stanley, *et al.*, 1997).

Les substrats énergétiques pour la glycolyse proviennent du glucose exogène et des réserves de glycogène. Le cœur possède une très grande capacité à capter et transporter le glucose (Young, *et al.*, 1999), un apport assuré majoritairement par les GLUT4. La translocation de ces protéines de transport vers la membrane cellulaire s'accroît en réponse à une stimulation de l'insuline, une augmentation du travail cardiaque ou une ischémie, ce qui augmente la capacité des cardiomyocytes à capter le glucose. Une fois dans le cytosol, le glucose est rapidement phosphorylé pour former du glucose-6-phosphate (G6P). Sous cette forme, il est utilisé pour la synthèse du glycogène ou par la glycolyse. La phosphofructokinase-1 (PFK-1) est l'enzyme clé régulatrice de l'étape irréversible de la glycolyse et sert de catalyseur à ce procédé. Cette enzyme est généralement activée par l'ADP, l'AMP et le P_i . Conséquemment, le flux de la glycolyse est accéléré lorsque le potentiel énergétique de la cellule diminue. Inversement, la PFK-1 est inhibée par une concentration élevée d'ATP, par le produit de sa propre réaction, le fructose 1,6-biphosphate et également par une diminution du pH intracellulaire. Une fois le procédé complété, la glycolyse produit du pyruvate dans le cytosol pouvant être oxydé dans la mitochondrie. Comme mentionné plus haut, le cœur est également un consommateur de lactate. Pour ce faire, une enzyme, la lactate déshydrogénase (LDH), convertit le lactate en pyruvate pour qu'il puisse être utilisé par la mitochondrie.

L'oxydation du pyruvate, produit de la glycolyse et de l'oxydation du lactate, est régulée dans la matrice mitochondriale par la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'activité de la PDH est déterminée par son niveau de phosphorylation (Stanley, *et al.*, 2005). Or, elle est inactivée via phosphorylation par la PDH kinase (PDK) et activée via déphosphorylation par la PDH phosphatase. La PDK est à son tour inhibée par le pyruvate et la réduction des ratios NADH/NAD⁺ et l'acétyl-CoA/CoA, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'activité de la PDH et l'oxydation du pyruvate. Il existe quatre isoformes de la PDK, la PDK4 étant l'isoforme prédominante dans le cœur (Harris, *et al.*, 2001). Les lipides sont d'importants régulateurs de l'oxydation du glucose et du lactate dans le cœur (Hue & Taegtmeyer, 2009). Un haut niveau de lipides circulants et d'acides gras intracellulaires augmente l'inhibition de la PDH par phosphorylation via l'action de l'enzyme PDK. En résulte une diminution de l'oxydation du pyruvate produit par la glycolyse ou par l'oxydation du lactate. Plus spécifiquement, une oxydation accrue des acides gras augmente la concentration d'équivalents réduits (NADH, FADH₂) et d'acétyl-CoA dans la mitochondrie, ce qui active la PDK et inhibe la PDH. Ainsi, les lipides exercent leur inhibition sur l'oxydation du glucose en augmentant le potentiel énergétique intramitochondrial. En somme, le niveau d'oxydation du pyruvate dans le cœur dépend du degré de phosphorylation de PDH, de la concentration de substrat (pyruvate), et du potentiel énergétique dans la mitochondrie. La figure 2-1 montre les conséquences d'une augmentation de la glycolyse anaérobie et d'une réduction des processus oxydatifs dans la mitochondrie.

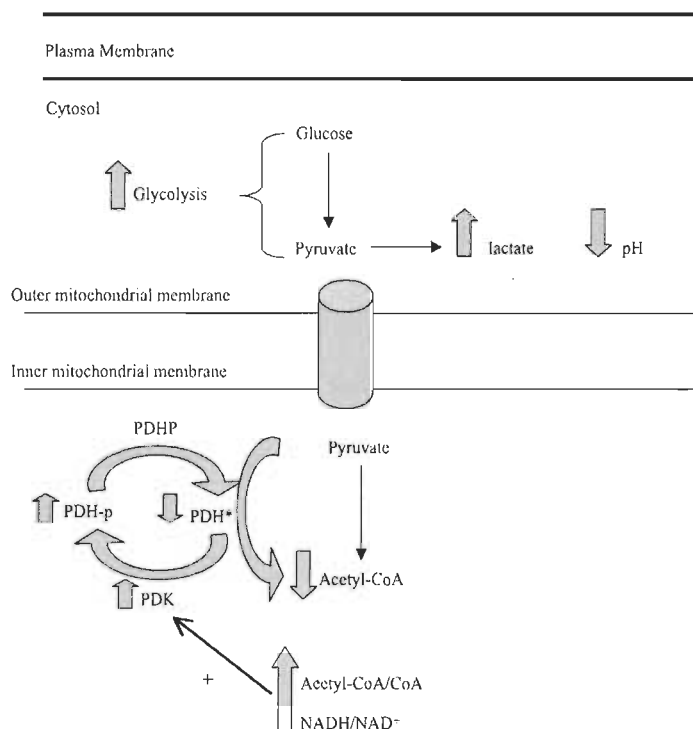


Figure 2-1. Conséquences métaboliques d'une production d'énergie dépendante de la glycolyse anaérobie. Avec la réduction de la disponibilité de l'oxygène, l'oxydation des acides gras et du glucose diminue et la cellule devient plus dépendante de la glycolyse anaérobie pour générer de l'ATP. Lors d'ischémie non complète, l'oxydation des lipides et l'activité de la CTE et du cycle de Krebs diminuent, ce qui a pour conséquence d'augmenter la concentration de NADH et d'acétyl-CoA dans la mitochondrie. Cette augmentation active la PDK, résultant en une diminution de l'activité de PDH et l'accumulation de pyruvate dans le cytosol qui sera converti en lactate. Ceci est accompagné d'une diminution du pH intracellulaire. CTE : chaîne de transport des électrons ; PDHP : pyruvate déshydrogénase phosphatase; PDH-p : pyruvate déshydrogénase phosphorylée (inactive) ; PDH* : pyruvate déshydrogénase non phosphorylée (active) ; PDH; pyruvate déshydrogénase kinase. (Tirée de Taha & Lopaschuk, 2007, p. 559)

Conformément à ce qui précède, une suppression de la β -oxydation réduit le ratio mitochondrial de NADH/NAD⁺ et acétyl-CoA/CoA et conséquemment augmente le flux d'oxydation du glucose et du lactate via la PDH (Chandler, *et al.*, 2003; Clarke, *et al.*,

1996). En ce sens, il a été démontré que l'utilisation d'un inhibiteur de l'oxydation des acides gras (Etomoxir) dans le cœur résulte en une augmentation rapide de l'oxydation du glucose et du lactate (Stanley, *et al.*, 1997). Les enzymes clés de la glycolyse aérobie (PFK-1 et PDH) ainsi que les transporteurs de glucose représentent des cibles thérapeutiques possibles pour réguler l'utilisation des substrats chez des patients atteints de maladies cardiaques (Beadle & Frenneaux, 2010; Jaswal, *et al.*, 2011). Ce concept a déjà fait l'objet de recherches dans lesquelles l'augmentation de la fonction contractile, suite à un accroissement du flux métabolique glycolytique, entraîne une amélioration de l'hémodynamie chez des patients souffrant de d'insuffisance cardiaque (Cottin, *et al.*, 2002; Hermann, *et al.*, 1999).

RÉPONSE MÉTABOLIQUE DU CŒUR À UN ÉVÈNEMENT ISCHÉMIQUE

L'ischémie du myocarde altère la synthèse de l'ATP parce que l'apport en oxygène est réduit ou interrompu. En effet, la production d'ATP provenant de la β -oxydation des lipides et de l'oxydation du glucose est considérablement réduite puisque l'oxygène est nécessaire dans ces processus. Lors d'une ischémie modérée à sévère, il y a une augmentation de l'utilisation du glucose comme substrat énergétique par le myocarde (Tamm, *et al.*, 1994). La réduction de la formation d'ATP de manière oxydative diminue la quantité d'ATP disponible pour la contraction des myofilaments et la fonction des pompes à calcium du réticulum sarcoplasmique (SERCA2a). La chute du niveau d'ATP et l'accumulation du calcium dans le cytosol stimulent la glycolyse, l'absorption du glucose et la déplétion du glycogène (Stanley, 2004). La glycolyse devient alors une

importante source d'énergie durant l'ischémie de par son aptitude à générer de l'ATP en anaérobiose. Cependant, le pyruvate produit n'est pas immédiatement oxydé par la mitochondrie. Un découplage s'installe entre l'oxydation et la production de pyruvate, augmentant ainsi la formation de lactate et de proton (H^+), ce qui diminue le pH intracellulaire et acidifie le cardiomyocyte. Par ailleurs, avec la diminution du pH, le manque de flux sanguin durant un infarctus du myocarde ne permet pas de métaboliser les produits de la glycolyse, augmentant davantage l'inhibition de PFK-1 (Depre, *et al.*, 1993; Kolobova, *et al.*, 2001).

De plus, l'acidose intracellulaire réduit la capacité du muscle cardiaque à maintenir l'homéostasie calcique et à utiliser l'ATP pour maintenir adéquatement la fonction cardiaque. L'ATP requise pour pomper le calcium dans le réticulum sarcoplasmique est augmentée avec la réduction du pH (Fabiato & Fabiato, 1978) et la concentration de calcium requise pour générer une même force de contraction augmente également (Hool, 2007; Murphy, *et al.*, 1991). Alors, avec la diminution du pH, une plus grande quantité d'ATP est utilisée pour le maintien de l'homéostasie calcique, diminuant sa disponibilité pour la contraction cardiaque. Avec la réduction de la quantité totale d'ATP produite et disponible, ceci contribue également à la perte de fonction cardiaque durant l'ischémie.

Parallèlement, le stress ischémique contribue à la libération des catécholamines, favorisant la lipolyse et l'élévation des AGL plasmatiques. Ceci augmente la disponibilité des acides gras au détriment du glucose, pénalisant davantage son

utilisation. En résulte une réduction de son oxydation durant l'ischémie, nuisant à l'homéostasie et à l'efficacité de contraction du cœur. De plus, un apport réduit en oxygène diminue l'activité de la CTE. Les capacités oxydatives de la mitochondrie étant réduites, elle ne parvient plus à oxyder entièrement les acides gras. Cette situation favorise l'accumulation d'équivalents réduits (NADH et FADH₂) dans la matrice mitochondriale. Ne pouvant plus intégrer la CTE, ces équivalents réduits contribuent à inhiber davantage les processus oxydatifs (Neely & Morgan, 1974).

En résumé, dans la zone du tissu cardiaque affectée par l'ischémie, il y a une diminution d'ATP, une activation de la glycolyse anaérobie, une réduction de l'oxydation du pyruvate menant à une production du lactate et de protons, une chute du pH intracellulaire et une perte de contractilité. L'optimisation de l'utilisation des substrats énergétiques pourrait s'avérer profitable pour le myocarde ischémique. Les « peroxisome proliferator-activated receptors » (PPAR) sont d'importants régulateurs métaboliques et leur activation pourrait être bénéfique dans ce contexte pour le cœur.

PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR (PPAR)

Généralités

Les PPAR sont des récepteurs appartenant à la famille des facteurs de transcription nucléaire. Ce sont des protéines intracellulaires, qui stimulent la transcription génétique en se liant à une séquence spécifique de l'ADN suivant son activation par un ligand.

Trois isoformes PPAR furent identifiées : PPAR α (NR1C1), PPAR δ (NR1C2) et PPAR γ (NR1C3). Ensemble, elles forment le groupe C dans la sous-famille 1 des récepteurs nucléaires. Les récepteurs PPAR ont un haut niveau de similarité fonctionnelle et structurale, mais ils sont encodés par des gènes distincts. PPAR α est davantage exprimé dans les tissus ayant une forte capacité oxydative, tels le cœur, le foie et les fibres musculaires à contraction lente (Braissant, *et al.*, 1996). Dans le cœur, son activation mène à une augmentation de l'oxydation des lipides et une diminution de l'utilisation du glucose. Pour sa part, PPAR δ est exprimé dans presque l'ensemble du corps avec un niveau d'expression relativement élevé dans le cœur, le muscle squelettique et le cerveau (Braissant, *et al.*, 1996). Son implication a été démontrée dans plusieurs activités métaboliques, comme le métabolisme des lipides et des lipoprotéines (Leibowitz, *et al.*, 2000; Oliver, *et al.*, 2001; Sprecher, 2007), l'oxydation des lipides et des glucides (Burkart, *et al.*, 2007; Wang, *et al.*, 2004), le processus inflammatoire (Tan, *et al.*, 2001), la respiration mitochondriale (Luquet, *et al.*, 2003; Wang, *et al.*, 2004) et la détermination du type de fibres musculaires (Wang, *et al.*, 2004). Finalement, PPAR γ est particulièrement présent dans le tissu adipeux (Braissant, *et al.*, 1996) et joue un rôle vital dans la différenciation des adipocytes et le stockage des gras (Rosen, *et al.*, 1999).

Les PPAR se situent généralement dans le noyau de la cellule et régulent la transcription génétique des suites d'une hétérodimérisation avec le récepteur rétinoïde X (RXR). Ce complexe, une fois formé, est alors en mesure de se lier à une région spécifique de l'ADN du gène cible. Cette région est appelée l'élément de réponse PPAR

ou « PPRE ». Cette section consiste en deux séquences de nucléotides identiques (AGGTCA) entrecoupées par un seul nucléotide (5'-AGGTCA n AGGTCA-3'). Les PPRE fonctionnels ont été retrouvés dans les régions régulatrices de gènes liés à l'homéostasie des lipides et des glucides, l'inflammation, la différenciation et la prolifération cellulaire. La figure 2-2 montre les différentes structures permettant aux PPAR d'interagir avec les gènes.

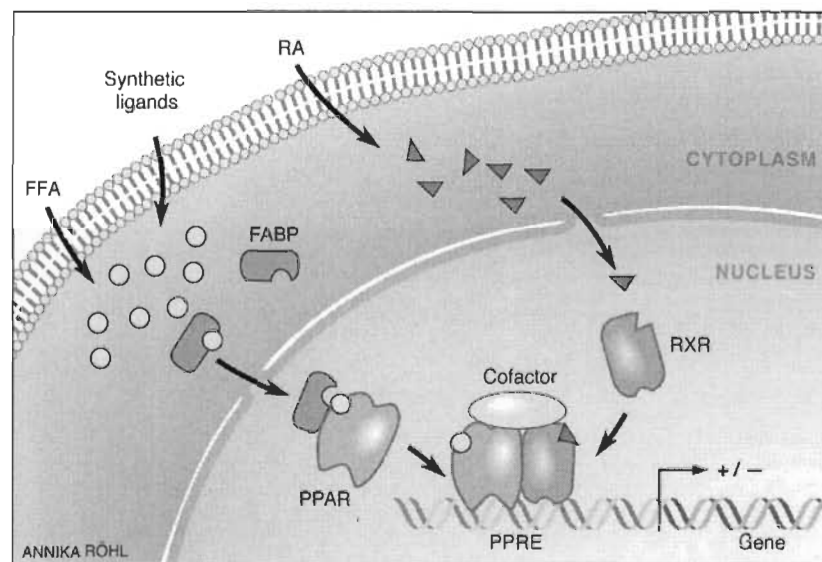


Figure 2-2. Les PPAR forment un hétérodimère avec le récepteur rétinoïde X (RXR) et régulent la transcription des gènes possédant un élément de réponse PPAR (PPRE). Les effets peuvent être modifiés par les interactions avec différents cofacteurs. Les protéines de fixation des acides gras (FABP) peuvent se lier et fournir aux PPAR des ligands. Un certain nombre de ligands possibles sont représentés, incluant les acides gras libres (FFA), les ligands synthétiques et le ligand du RXR, l'acide rétinoïque (RA). (Tirée de Ehrenborg & Krook, 2009, p. 375).

Ligands

Pour être activés, les PPAR doivent se lier à d'autres composantes afin d'entamer un changement de conformation essentiel à leur interaction avec les gènes. Les ligands activant les récepteurs PPAR sont tous les acides gras à chaîne longue, ou leurs dérivés, ainsi que des composés synthétiques spécifiques. Plus spécifiquement, les prostaglandines, les leukotriennes, les eicosanoïdes ainsi que l'acide rétinoïque, un métabolite de la vitamine A, sont des substances endogènes agissant comme ligands auprès des PPAR δ . Les substances exogènes sont des agents synthétiques ayant été développés avec un haut niveau de spécificité pour chaque isoforme PPAR. Certains agonistes de PPAR α sont présentement utilisés pour abaisser le niveau de triglycérides sanguins dans le traitement de la dyslipidémie et des maladies cardiovasculaires (Fruchart, *et al.*, 1999). Les agonistes spécifiques de PPAR γ , dont le thiazolidinedilone, sont présentement à l'étude pour traiter le diabète de type 2 (Gerstein, 2006; Mayerson, *et al.*, 2002). Pour ce qui est de PPAR δ , quelques agonistes synthétiques spécifiques sont actuellement disponibles. Aucun n'est cliniquement utilisé en ce moment, mais deux études chez l'humain ont récemment été publiées utilisant un agoniste de PPAR δ comme traitement et ont montré une amélioration du profil lipidique et glycolytique des participants (Risérus, *et al.*, 2008; Sprecher, *et al.*, 2007).

EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE PPAR δ SUR LE CŒUR

Malgré l'expression relativement importante de PPAR δ dans le myocarde, ses effets sur le cœur n'ont que récemment été investigués. Les premières études visant à connaître les effets de PPAR δ sur le cœur ont été conduites avec des cellules de cardiomyocytes *in vitro*. Elles ont démontré que l'activation ou la surexpression de PPAR δ augmentaient l'expression des gènes généralement ciblés par l'activation de PPAR α (Cheng, *et al.*, 2004b; Gilde, *et al.*, 2003). En fait, ces deux isoformes ciblent principalement des gènes prenant part à l'oxydation des lipides. La similarité des gènes activés suggère que les rôles de PPAR α et δ pourraient s'entrecouper. Par contre, il a été montré que l'expression génétique de l'une de ces isoformes PPAR est indépendante de l'activation de l'autre (Cheng, *et al.*, 2004b). Par exemple, l'expression de PPAR α n'est pas modifiée suite à un traitement avec un agoniste PPAR δ . Ceci permet également de confirmer la spécificité des agents synthétiques utilisés.

Afin de mieux comprendre les effets possibles de PPAR δ sur le cœur dans son entier, Cheng *et al.* (2004a) ont développé un modèle de souris transgénique qui n'exprime pas le PPAR δ . Ce type de souris développait des cardiomyopathies sévères et mourait prématurément pour cause de défaillance cardiaque. Les cardiomyopathies de ces souris étaient caractérisées par une accumulation progressive de lipides dans le myocarde, une hypertrophie cardiaque pathologique, une lipoapoptose et une dysfonction cardiaque. Un déclin de l'expression des gènes engagés dans l'oxydation

des lipides ainsi que du taux d'oxydation de ceux-ci favorisait la lipotoxicité des cardiomyocytes. Ainsi, ces résultats supportent le rôle crucial de PPAR δ dans le maintien d'une oxydation des lipides et d'une fonction cardiaque normale dans le cœur.

Puisqu'une absence du récepteur PPAR δ dans le cœur peut s'avérer fatale, les effets de sa surexpression deviennent fort intéressants. D'un point de vue métabolique, PPAR δ régule l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme cardiaque des lipides, incluant ceux de l'acyl-CoA synthase des acides gras (FACS), de l'isoforme musculaire de la carnitine palmitoyltransférase-1 (CPT-1) et de la l'acyl-CoA déshydrogénase à chaîne moyenne et longue (MCAD et LCAD) (Cheng, *et al.*, 2004b; Gilde, *et al.*, 2003; Hondares, *et al.*, 2007). L'augmentation de l'expression de ces gènes suivant une activation de PPAR δ est aussi accompagnée d'une augmentation du taux d'utilisation de ceux-ci par le cœur, particulièrement d'une hausse de la β -oxydation des lipides (Gilde, *et al.*, 2003). Dans les myocytes cardiaques ayant subi un stimulus hypertrophique (hypertension, infarctus, etc.), l'activation de PPAR δ par ses ligands prévient la sous-expression des gènes participant au métabolisme des lipides et la β -oxydation généralement associée à cette condition (Pellieux, *et al.*, 2009; Planavila, *et al.*, 2005). Étonnamment, le fait d'utiliser un modèle transgénique qui sur-exprime le gène de PPAR δ spécifique au cœur augmente également le taux d'oxydation des glucides dans le myocarde (Burkart, *et al.*, 2007). Ce résultat est associé à une hausse de l'expression des gènes clés du métabolisme des glucides (GLUT4 et PFK). De par son

implication dans le métabolisme des lipides, mais également des glucides, l'activation de PPAR δ pourrait être bénéfique afin de limiter l'atténuation du métabolisme oxydatif dans un contexte d'ischémique cardiaque.

3. PROBLÉMATIQUE

Suivant un infarctus du myocarde, le muscle cardiaque subit des transformations progressives sur les plans physiologique, phénotypique, anatomique et également métabolique. Afin de promouvoir la contractilité cardiaque, optimiser l'utilisation des substrats énergétiques présente une nouvelle avenue thérapeutique. Plusieurs évidences montrent que l'utilisation de régulateurs métaboliques peut favoriser l'efficacité et la contraction cardiaque via leur capacité à influencer l'utilisation des substrats énergétiques. De ce fait, dans un contexte post infarctus où la fonction cardiaque est réduite, favoriser l'oxydation du glucose et son couplage avec la glycolyse pourrait s'avérer bénéfique pour le cœur. Le facteur de transcription PPAR δ est un important régulateur métabolique. Son activation/surexpression préalable à l'ischémie cardiaque a montré des effets bénéfiques en augmentant l'expression de certains gènes métaboliques et la fonction cardiaque, ainsi qu'en réduisant l'apoptose et la taille de l'infarctus. Ces effets souvent salutaires sont attribués à l'aptitude de PPAR δ à favoriser l'utilisation du glucose en plus de contribuer à réduire l'inflammation. Par contre, d'un point de vue thérapeutique, les effets de l'administration d'un agoniste PPAR δ après un infarctus du myocarde sont peu connus. Étant caractérisé comme un important régulateur métabolique, l'activation de PPAR δ via un agoniste synthétique pourrait favoriser l'oxydation des glucides et l'équilibre entre les substrats énergétiques et ainsi promouvoir le maintien de la fonction cardiaque suivant un infarctus.

4. QUESTION ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

Question de recherche

Suivant un infarctus du myocarde, le fait de maximiser l'utilisation des substrats dans la région non infarctée du ventricule peut s'avérer profitable afin d'optimiser la fonction cardiaque. Par contre, le rôle du facteur de transcription PPAR δ comme important régulateur des gènes métaboliques dans la région non infarctée est peu connu. Ainsi, l'activation de PPAR δ via un agoniste synthétique (GW0742; GlaxoSmithKline, USA) pourrait-elle accroître la transcription des gènes métaboliques et améliorer le travail du ventricule gauche non infarcté?

Hypothèses de recherche

- 1- L'activation de PPAR δ via GW0742 après infarctus préviendra le déclin de la fonction cardiaque *in vivo* chez le rat.
- 2- L'activation de PPAR δ via GW0742 accroîtra l'expression du gène et de la protéine PPAR δ dans la région du ventricule gauche non infarcté chez le rat.
- 3- L'activation de PPAR δ via GW0742 augmentera l'expression génétique de la PFK-1 et de MCAD, des enzymes engagées respectivement dans la glycolyse anaérobie et la β -oxydation et elle diminuera celle de PDK4, une enzyme

impliquée dans l'oxydation du pyruvate. Toutes ces mesures seront effectuées dans la région non infarctique du ventricule gauche chez le rat.

Des mesures de fonction cardiaque et d'expression génétique (PPAR δ , PDK4, PFK-1 et MCAD) et protéique (PPAR δ , Bax et Bcl-2) serviront de repères pour évaluer les effets PPAR δ dans la région non infarctique du ventricule gauche chez le rat.

5. ARTICLE

Effects of a PPAR δ agonist on cardiac function and metabolic gene expression post myocardial infarction in the rat heart

Simon Bergeron Vaillancourt¹, Angelo Calderone², Hugues gosselin², Natacha Duquette², Louis Laurencelle¹ and Claude Lajoie^{1*}

Adresses : ¹ Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec. ² Montreal Heart Institute, Montréal, Québec

*corresponding author

ABSTRACT

Optimizing energy substrate metabolism represents a novel and promising therapeutic intervention in ischemic and heart diseases. Recently, prior activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR δ) has shown beneficial effects against cardiac injury. Since PPAR δ is an important metabolic regulator, we evaluated the effects of an early treatment after myocardial infarction with a selective PPAR δ agonist (GW0742) on cardiac function, infarct size and metabolic gene expression in the rat heart.

METHODS: GW0742 was administered via oral gavage (10mg/kg/day) in adult male Sprague-Dawley rats (MI-T; $n = 7$) 24 hours following coronary artery ligation and was continued for a period of 6 days. The control group (MI, $n = 6$) remained untreated, and sham-operated animals (Sham; $n = 3$) underwent a similar surgical procedure but without occlusion of the coronary artery. Hemodynamic measurements were performed 7 days post infarction with a Millar Catheter. Protein (PPAR δ , Bax and Bcl-2) and mRNA (PPAR δ , PFK-1, PDK-4 and MCAD) expression levels were measured by Western blot and by RT-PCR analysis respectively.

RESULTS: Body weight (BW) was not statistically different across groups nor were heart weight (HW) and heart weight to body weight ratio (HW:BW). Infarct size, scar weight (SW), scar surface area (SSA) and scar weight to heart weight ratio (SW:HW)

were not significantly different between groups ($p > 0.05$). Left ventricular rate of pressure development and mean and systolic blood pressure were significantly greater in the MI-T and sham groups as compared to MI ($p < 0.05$). Six days of oral administration of PPAR δ agonist GW0742 post-infarction did not affect left ventricular (LV) mRNA expression of selected metabolic genes. Although PPAR δ mRNA was significantly upregulated ($p < 0.01$), its protein expression was unaltered. Western blot analysis performed on LV did not show any significant difference between Bax and Bcl-2 protein expression, as well as Bcl-2/Bax ratio in the GW0742 treated group as compared to the non-treated animals.

CONCLUSION: We showed that, when administered early after myocardial infarction, GW0742 did not change metabolic gene expression, infarct size and apoptosis regulatory proteins but did improve PPAR δ mRNA expression level and normalized cardiac function.

INTRODUCTION

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) are nuclear receptors with three subtypes (PPAR α , PPAR γ and PPAR δ) that mediate ligand-dependent transcriptional regulation (Burkart, *et al.*, 2007; Cheng, *et al.*, 2004a; Djouadi, *et al.*, 1998; Gilde, *et al.*, 2003). From these subtypes, PPAR δ is predominant in the heart (Gilde & Van Bilsen, 2003) where it plays an important role in regulating metabolic genes involved in fatty acids and glucose utilization (Burkart, *et al.*, 2007; Cheng, *et al.*, 2004a). Cardiac restricted deletion of PPAR δ results in increased myocardial lipid accumulation, dilated cardiomyopathy and cardiac dysfunction (Cheng, *et al.*, 2004a), while PPAR δ overexpression increased glucose utilization and protects the heart against ischemia (Burkart, *et al.*, 2007).

Several lines of evidence support the notion that reducing myocardial fatty acid uptake and oxidation, while increasing glucose utilization, will improve cardiac function following ischemic insult (Jaswal, *et al.*, 2011). Optimizing energy substrate metabolism represents a novel and promising therapeutic intervention in ischemic and heart diseases. Recently, PPAR δ proved its benefits against cardiac injury, promoting cardiac metabolic gene expression and function, as well as reducing apoptosis and infarct size (Burkart, *et al.*, 2007; Yue, *et al.*, 2008). However, in these experiments, PPAR δ was activated or overexpressed prior to myocardial ischemia. To our knowledge, only one study investigated the effect of a treatment with a specific PPAR δ agonist following infarction

(Jucker, *et al.*, 2007). A long-term treatment normalized cardiac substrate utilization independent of left ventricular function, and infarct size benefits were observed.

Notwithstanding the aforementioned study, little is known about the effects of PPAR δ after myocardial infarction. Since PPAR δ is an important metabolic regulator and because increasing glucose utilization could improve cardiac function, we evaluated the effect of an early and short-term treatment with a selective PPAR δ agonist (GW0742; GlaxoSmithKline, USA) on cardiac function, infarct size and metabolic gene expression following myocardial infarction in the rat heart.

METHODS

Animals

This study was carried out on male Sprague Dawley rats (Charles River Laboratories, St-Constant, QC) weighing 250-300 g at their arrival, receiving standard diet and water *ad libitum*. Animals were housed under a 12h dark and 12h light cycle. All protocols were approved by the Animal Care Committee of the Montreal Heart Institute and were in accordance with the Canadian guidelines for the use and care of laboratory animals. Myocardial infarction (MI) was induced in anesthetized (3% isoflurane) rats via ligation of the left anterior descending coronary artery. Briefly, a left thoractomy was performed, the pericardium was opened, and the left coronary artery was ligated with a 4-0 silk ligature approximately 2mm below the left atrium. After tying the ligature, occlusion

was determined visually as a rapid blanching of the left ventricular musculature due to a lack of arterial blood flow. After ligation, a suture (2-0 silk) was tied in the cage ribs for rapid closure of the thoracotomy. The inclusion criterion for the study was based on survival 24h hours post-MI. PPAR- δ agonist GW0742 was administered to the GW0742-treated group (MI-T, $n = 7$) by oral gavage (10mg/kg/day) for the first time 24h after MI. Rats were then administered daily doses of GW0742 for a total period of 6 days. Control group (MI, $n = 6$) did not receive any pharmacological treatment. The sham procedure was identical to the MI procedure except that the occluding ligature was not tied (Sham, $n = 3$).

***In vivo* hemodynamic measurement and infarct size determination**

Hemodynamic measurements were performed at the end of the experiment (7 days post-MI procedures). Animals were anesthetized as mentioned above. Left ventricular hemodynamic parameters (+dP/dt, -dP/dt, systolic and diastolic pressures development) were measured by a microtip pressure transducer catheter (model SPR-407, 2F, Millar instruments, Houston, TX), as previously described (Nguyen, *et al.*, 2001). Systolic and diastolic arterial pressures were measured in the carotid artery prior to entry into the left ventricle. Following hemodynamic measurements, the heart was removed and dissected into left atrium, right atrium, left ventricular free wall, right ventricular free wall, interventricular septum, and scar. Scars were measured for surface area and weight to assess infarct size (Lapointe, *et al.*, 2003), and all portions of the heart were weighed

individually, then frozen in liquid nitrogen stored at -80°C for future biochemical analysis.

Tissue homogenization and sample preparation

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

Western blot analysis

Left ventricular lysate (100–200 ug) was subjected to SDS-polyacrylamide gel (10%) electrophoresis and subsequently transferred to Hybond-C membrane (Amersham, Piscataway, NJ). Equal loading of the samples was confirmed by Ponceau S staining. Membranes were blocked with 5% skim milk in Tris-buffered saline + Tween 20 (TBST; 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0.1% Tween 20) (vol/vol) for 90 min at room temperature before the addition of the primary antibody. The antibodies directed against PPAR δ , Bax (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and Bcl-2 (BD

Biosciences, Mississauga, ON), were prepared at a concentration of 1:5000 (PPAR δ) or 1:500 (Bax, Bcl-2) in either TBST + 5% skim milk, and incubated for 18 h at 4°C.

After incubation, the membranes were washed with TBST and subjected to the appropriate secondary antibody (conjugated to horse-radish peroxidase) for 1-2 h at room temperature, and the bands were subsequently detected by autoradiography utilizing the enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham). Films were quantified by using a flatbed scanner and ImageJ software (Scion, Frederick, MD).

Real time PCR (RT-PCR)

RT-PCR was performed by standard methodology on total RNA isolated from the left ventricle, as previously described (Nguyen, *et al.*, 2003). Real time PCR was performed according to the manufacturer's instructions employing SYBR Green (Applied BioSystems, Foster City, CA). Primers for each gene were obtained from distinct exons that span an intron employing the program Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>). The sequence specificity of each primer was verified with the program Blast derived from the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The primers used were the following: rat PPAR δ , forward 5'-GGAAGAGGAGAAAGAGGAAGTGG-3' and reverse 5'-ATCACAGCCCATCTGCAGC-3'; rat PFK-1, forward 5'-ATCACCTCAGAAGACATCAAG-3' and reverse 5'-CACAGCCGTATTACCAGAG-3'; rat PDK-4, forward 5'-GCGATGTGGTAGCAGTAGTC-3' and reverse 5'-

ATGTGGTGAAGGTGTGAAGG-3' ; rat MCAD, forward 5'-CTGGTGCTGTCGGGCTAG-3' and reverse 5'-AGGCTGCTCGCTGGTAAC-3'. Appropriate negative controls were used for each experiment.

Statistical analysis

All data are reported as the mean \pm SEM. Morphological and hemodynamic parameters were analysed via a one-way ANOVA followed by a Fisher LSD post hoc test. We also performed an ANCOVA to correct for a slightly but not significantly heavier group (MI-T). Results remained concordant with those of regular ANOVA analysis. Thus, the following results will refer to original data. Student's *t* test was used to compare western blotting and RT-PCR results between MI and MI-T groups. A probability of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

General characteristics of rats, hemodynamics and infarct size

Although the body weight in the MI-T group tended to be slightly higher, no significant difference was observed between groups. At sacrifice, one week after first surgical procedures, body weight (BW), heart weight (HW), heart weight to body weight ratio (HW:BW) and heart rate (HR) were not different between groups ($p > 0.05$). Table 5-1 presents animals' morphological characteristics and infarct size. Positive and negative left ventricular rate of pressure development (+dp/dt and -dp/dt), systolic blood pressure (SBP), mean blood pressure (MBP) and left ventricular pressure (LVP) were

significantly lower in MI as compared to sham animals ($p < 0.05$). Diastolic blood pressure (DBP) was marginally significant ($p = 0.06$) between these two groups. MI-T rats also present greater hemodynamic parameters as compared to MI, except for LVP. Left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) was not different between all groups. Despite some lower values, MI-T hemodynamic parameters did not differ from sham animals. Table 5-2 presents the hemodynamic parameters. Infarct size measurements in both MI-induced groups did not reveal any significant difference in terms of scar weight (SW), scar surface area (SSA) or scar weight to heart weight ratio (SW:HW) (Table 5-1).

Table 5-1 Animal Morphological Characteristics and Infarct Size

	MI	MI-T	Sham
Morphological characteristics			
Weight (g)	316 ± 5	331 ± 6	314 ± 8
HW (g)	1.02 ± 0.02	1.11 ± 0.03	1.18 ± 0.14
HW:BW	3.22 ± 0.07	3.36 ± 0.11	3.75 ± 0.42
Infarct size			
SW (mg)	36.4 ± 6.9	41.2 ± 5.8	-
SSA (cm ²)	0.36 ± 0.17	0.42 ± 0.15	-
SW:HW	0.036 ± 0.007	0.037 ± 0.005	-

HW, heart weight; HW:BW, heart weight/body weight ratio; NILV, non infarct left ventricular; SW, scar weight; SSA, scar surface area. Data are presented as means ± SEM. MI, n = 6; MI-T, n = 7; Sham, n = 3.

Table 5-2 Animal Hemodynamic Parameters

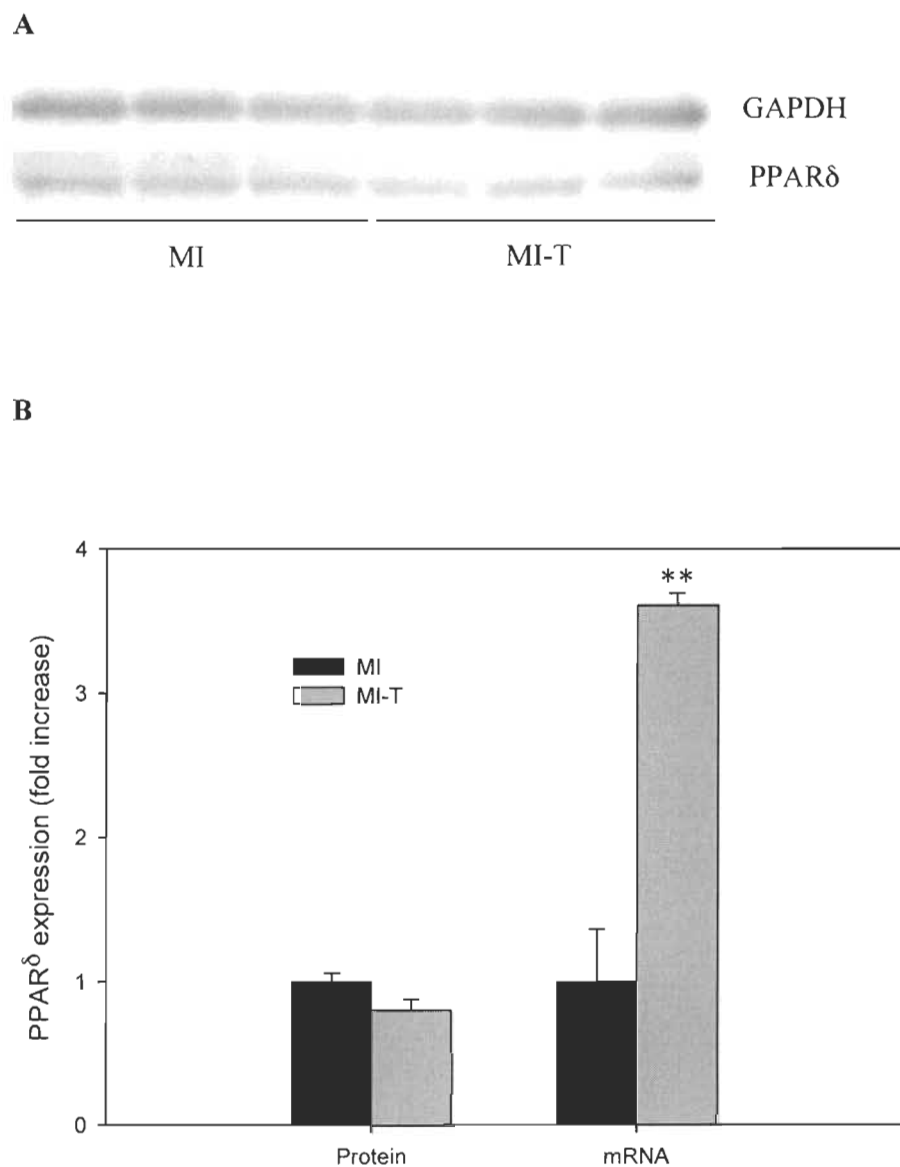
Hemodynamic	MI	MI-T	Sham
LVP (mmHg)	95.8 ± 2.3	99.6 ± 1.8	106.7 ± 2.3*
LVEDP (mmHg)	19.8 ± 2.4	22.4 ± 0.8	19.7 ± 3.8
+dp/dt (mmHg/s)	4150 ± 272	4911 ± 188*	5345 ± 175*
-dp/dt (mmHg/s)	-3388 ± 210	-4045 ± 154*	-4313 ± 132*
SBP (mmHg)	92.8 ± 2.3	99.6 ± 1.6*	104.7 ± 1.9*
DBP (mmHg)	66.3 ± 3.4	76.9 ± 1.4*	75.0 ± 2.9
MBP (mmHg)	75.2 ± 2.9	84.4 ± 1.4*	84.9 ± 2.5*

LVP, left ventricular pressure; LVEDP, ventricular end diastolic pressure; +dp/dt, maximum first derivative of LV pressure; -dp/dt, minimum first derivative of LV pressure; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; MBP, mean blood pressure; Data are presented as means ± SEM. MI, n = 6; MI-T, n = 7; Sham, n = 3; *P < 0.05 vs. MI.

The effect of GW0742 ingestion on left ventricular PPAR δ mRNA and protein expression

One week after coronary ligation, LV mRNA content of PPAR δ was increased by 3.6 fold ($p < 0.001$) in the group treated with the PPAR δ agonist GW0742 as compared with the non-treated MI group. However, despite a distinct increase of PPAR δ mRNA content in the treated group, no significant difference ($p > 0.05$) was observed at the protein expression level between both groups. Furthermore, no significant correlation has been established between PPAR δ mRNA and protein expression ($r = -0.55$, $p > 0.05$). Figure 5.1 presents relative PPAR δ mRNA and protein expression.

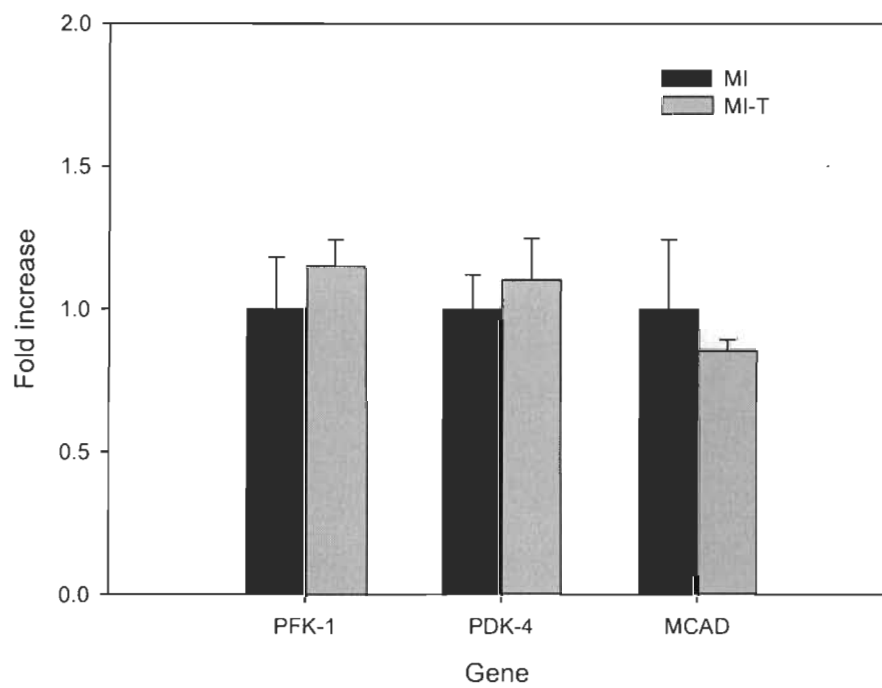
Figure 5-1. Effect of GW0742 on left ventricular PPAR δ protein and mRNA expressions post-MI in rats. **A)** Representative Western blot of PPAR δ protein expression. **B)** PPAR δ protein and mRNA expression. Results are presented as fold increase vs. MI (mean \pm SEM). MI, n = 6; MI-T, n = 7. **P < 0.001 vs. MI.



The effect of GW0742 ingestion on left ventricular mRNA genes involved in heart metabolism

The LV gene expressions involved in anaerobic glycolysis (phosphofructokinase-1; PFK-1), in aerobic glycolysis inhibition (pyruvate dehydrogenase kinase-4; PDK-4) and β -oxidation (medium chain acyl-CoA dehydrogenase; MCAD) were assessed by RT-PCR analysis. Six days of oral administration of PPAR δ agonist GW0742 post-MI did not affect LV mRNA expression of these selected metabolic genes ($p > 0.05$). Treated animals showed the same level mRNA expression as compared to non-treated rats. Figure 5-2 depicts LV mRNA expression of the above-mentioned genes one week after MI.

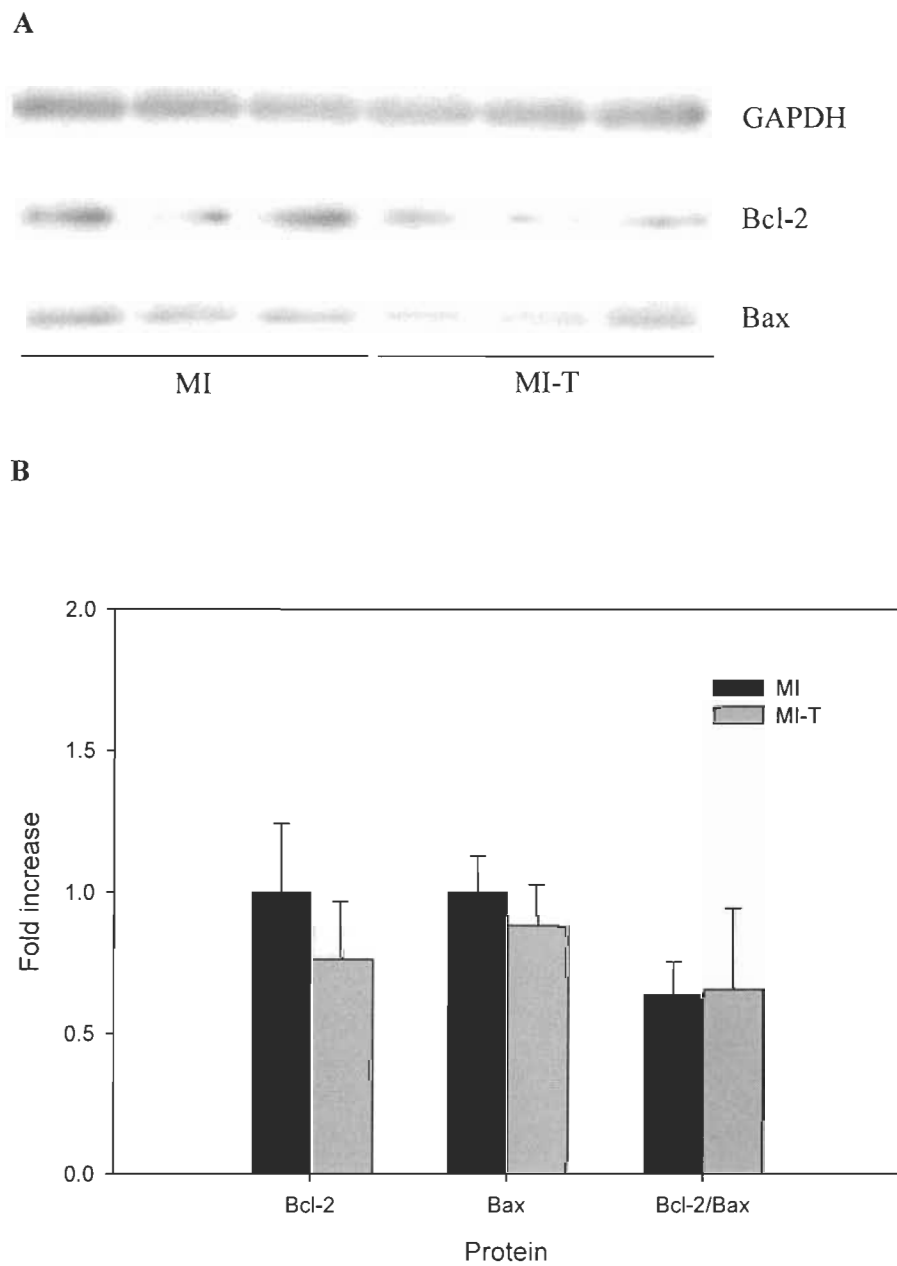
Figure 5-2. Representative mRNA expression of metabolic genes in the left ventricle one week post-MI. Results are expressed as fold increase vs. MI (mean \pm SEM). PFK-1, phosphofructokinase-1; PDK-4, pyruvate dehydrogenase kinase-4; MCAD, medium chain acyl-CoA dehydrogenase; MI, n = 6; MI-T, n = 7.



**The effect of GW0742 ingestion on Bcl-2/Bax protein content in the left ventricle
one week post-MI**

Western blot analysis performed on LV showed no significant difference in Bax and Bcl-2 protein expression in the GW0742 treated group as compared to the non-treated animals ($p > 0.05$). Moreover, Bcl-2/Bax ratio was not significantly different between groups ($p > 0.05$) : see Figure 5-3.

Figure 5-3. Effect of GW0742 on Bax and Bcl-2 protein expression and Bcl-2/Bax ratio post-MI. A) Representative Western blot of Bax and Bcl-2 protein expression. B) Level of protein expression. Results are expressed as fold increase vs. MI (mean \pm SEM). MI, n = 6; MI-T, n = 7.



DISCUSSION

This study presents beneficial effects of a short-term early treatment with a highly specific PPAR δ agonist (GW0742) in a context of myocardial infarction. The major effect of GW0742 was to normalize heart function parameters (arterial pressure and dp/dt) without changes in infarct size.

In a context of ischemic injury, few studies have addressed the effects of PPAR δ activation on heart function parameters or infarct size (Burkart, *et al.*, 2007; Jucker, *et al.*, 2007; Kapoor, *et al.*, 2010; Yue, *et al.*, 2008). Furthermore, the latter studies present four different PPAR δ activation approaches: i) a 7 days pre-treatment activation in Zucker fatty rats (Yue, *et al.*, 2008), ii) an intravenous bolus activation 30 minutes before ischemia in rats (Kapoor, *et al.*, 2010), iii) use of transgenic mice model overexpressing PPAR δ specifically in the heart (Burkart, *et al.*, 2007) and iv) an early activation after myocardial infarction in rats (Jucker, *et al.*, 2007). However, these four experimental designs presented inconsistent results. When PPAR δ is activated before the ischemic event, using a specific agonist (Kapoor, *et al.*, 2010; Yue, *et al.*, 2008) or transgenic animal model (Burkart, *et al.*, 2007), infarct size was reduced. A result which could partly explain the less affected cardiac function following myocardial infarction in Zucker fatty rats after ischemia (Yue, *et al.*, 2008). Along with infarct size, lipotoxicity, inflammation and apoptosis were also reduced in this latter study, factors that certainly contribute to a better cardiac function. However, those observations were not entirely corroborated in other studies since Kapoor *et al.* (2010) did not observe any benefits on

arterial pressure when a PPAR δ agonist was administered minutes before ischemia, although a 47% infarct size reduction was noticed. When PPAR δ is activated before the ischemic event, a trend is noticeable: latter studies have all shown a reduction in infarct size in this condition. However, its effects on heart function remain to be established and this, regardless of the activation period.

Contrary previous research designs, a treatment up to 9 weeks after myocardial infarction with a PPAR δ agonist had no effect on LV function and infarct size in a congestive heart failure animal model (Jucker, *et al.*, 2007). Our study presents an analogous experimental design; we activated PPAR δ 24 hours after myocardial infarction to mimic a curative intervention in LAD animal model. Similarly to the study conducted by Jucker *et al.* (2007), but unlike all the pre-activation design studies, our data did not present any infarct size reduction in the treated group. Despite this result, we observed that LV function and arterial pressure were less affected by the infarction in animals treated with GW0742. In fact, the treatment normalizes cardiac function as compared to sham-operated animals. Recently, GW0742 has been shown to induce a surprisingly rapid (after 24h) remodeling of mice hearts by inducing angiogenesis and cardiomyocyte growth (Wagner, *et al.*, 2009). We did not measure cardiomyocyte dimensions in the present study, albeit heart morphological characteristics were not significantly different in MI-T, which cannot explain their greater LV pressure development. A recent study provides evidence of a cardioprotective effect of GW0742. Indeed, GW0742 is able to reverse the negative effect of ischemia/reperfusion (I/R) on

Bcl family gene expression, a result supported by the down regulation of proapoptotic (Bax and Bid) and upregulation of antiapoptotic (Bcl-xL) genes and proteins (Yue, *et al.*, 2008). Nonetheless, we did not observe any difference in LV level of proapoptotic (Bax) and antiapoptotic (Bcl-2) proteins as well as the Bax/Bcl-2 ratio. PPAR δ agonist did not alter apoptosis signaling when given secondary to the myocardial infarction.

Since PPAR δ is also an important metabolic regulator and neither infarct size nor markers of apoptosis could explain the normalized LV function in the treated group, we examined whether the expression of key metabolic genes might explain our results. Several lines of evidence support the notion that reducing myocardial fatty acid uptake and oxidation while increasing glucose utilization will improve cardiac function following ischemic insult (Jaswal, *et al.*, 2011). PPAR δ is involved in regulating the expression of genes required in cardiac fatty acid metabolism including fatty acyl-CoA synthase (FACS), the muscle isoforms of carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1), long and medium-chains acyl-CoA dehydrogenase (LVAD, MCAD; (Cheng, *et al.*, 2004a; Gilde, *et al.*, 2003). Increased expression of the latter genes is generally accompanied by the expected increases in the rate of myocardial fatty acid utilization (Pellieux, *et al.*, 2009; Planavila, *et al.*, 2005). On the other hand, mice with cardiac-restricted PPAR δ deletion exhibit cardiac dysfunction characterised by progressive myocardial lipid accumulation, cardiac hypertrophy and congestive heart failure (Cheng, *et al.*, 2004a). These data suggest that PPAR δ is required to maintain the heart's high capacity for burning fat. Interestingly, mice over-expressing PPAR δ had increased myocardial

glucose uptake and utilization rather than fatty acids (Burkart, *et al.*, 2007). In conformity with the metabolic phenotype, the key genes involved in the glucose metabolism, such as glucose transporter type 4 (GLUT4) and phosphofructokinase-1 (PFK-1), were increased in the hearts of these transgenic mice. This novel pattern of cardiac substrate utilization seems to have a relative cardioprotective effect, as these mice had smaller cardiac injury after I/R, a well-known adaptive response attributed to their increased capacity to utilize glucose under ischemia, (Mitra & Panja, 2005; Opie & Sack, 2002). Optimizing energy substrate metabolism by enhancing glucose utilization after ischemia may provide a more efficient ATP production and utilization, thus improving cardiac function (Jaswal, *et al.*, 2011; Lopaschuk, 1998; Lopaschuk, *et al.*, 1993). In this regard, we assessed the expression of genes involved in the anaerobic (PFK-1) and aerobic (PDK-4) glycolysis, and in the first step of mitochondrial β -oxidation of fatty acids (MCAD). As PPAR δ activation is known to increase rates of fatty acid β -oxidation and recently glucose utilization, these effects may be beneficial to limit the attenuation of the rates of oxidative metabolism in a context of myocardial infarction. Furthermore, a specific PPAR δ overexpression in the heart induced transcriptional upregulation of mitochondrial biogenesis and defense, as well as oxidative metabolism which promoted cardiac performance in a transgenic mice model (Liu, *et al.*, 2011). Previous investigations that addressed the effects of PPAR δ activation/overexpression on cardiac metabolism and related gene analysis usually observed gene expression alteration concomitantly with substrate utilization (Burkart, *et al.*, 2007; Liu, *et al.*, 2011; Yue, *et al.*, 2008). Based on these studies, we were expecting

alteration in metabolic gene expression to further explain our results. However, contrary to those investigations, we did not observe alterations in the expression level of the abovementioned metabolic genes. Therefore, even though we did not directly measure cardiac metabolism, the absence of expression alterations suggests that an increment of FA or glucose utilization which could have promoted cardiac function in the treated group was not favored.

As the treatment was given orally, we can question whether or not the agonist had truly incorporated the heart. Recently, it has been reported that myocardial I/R results in a significant increase in PPAR δ protein expression and that increment was not affected by a pre-I/R intravenous bolus of GW0742 (Kapoor, *et al.*, 2010). In contrast, a long-term high dose treatment (100mg/kg/day) with a PPAR δ agonist revealed a down regulation of PPAR δ mRNA, whereas a smaller dose (30mg/kg/day) did not have this effect on PPAR δ mRNA (Jucker, *et al.*, 2007). Even though we observed an upregulation in LV PPAR δ mRNA, no increase in protein expression was observed in treated animals. Albeit, studies by Burkart *et al.* (2007) and Yue *et al.* (2008) reported that the same dosage (10mg/kg/day) had positive results on substrate utilization, metabolic gene expression, ventricular function and infarct size in the I/R model. However, in addition to a different technique used to induce infarction (I/R vs. LAD), the agonist was given prior to ischemia in those studies that might explain the resulting differences. As shown by Burkart *et al.* (2007), the less attenuated ventricular function could be partly explained by the more glycolytic metabolic profile of the heart in the

transgenic mice used in this study. Thus, this phenomenon could have led to the reduction in infarct size. Even if the hemodynamic parameters were greater in the treated group, based on gene expression data, the transition toward this salutary metabolic profile might not have occurred in the present study.

Finally, other effects of PPAR δ activation might have occurred. PPAR δ agonists are potent anti-inflammatory agents (Bishop-Bailey & Bystrom, 2009), have the ability to improve insulin sensitivity (Lee, *et al.*, 2006), and can decrease circulating triglycerides and low density lipoproteins (LDL) (Sprecher, 2007). These effects were not in the scope of this study, but could have contributed to a better cardiac function recovery after myocardial infarction.

CONCLUSION

As modulation and regulation of energy metabolism represent a novel and promising area for therapeutic intervention in ischemic heart disease (Ingwall, 2009; Jaswal, *et al.*, 2011; Lopaschuk, *et al.*, 2010), we assessed the effects of a short-term PPAR δ agonist administration early after myocardial infarction on functional parameters and metabolic gene expression. We showed that, when activated after myocardial infarction, PPAR δ did not reduce infarct size but still normalized cardiac function, a benefit which does not seem to pertain either to metabolic gene expression or levels of apoptosis regulatory proteins, as none of these had fluctuated in the non-infarct LV. Because the treatment

was given orally, these results also suggest that benefits on cardiac function could be partly related to other physiological mechanisms, *e.g.*, insulin sensitivity or inflammation process, rather than a cardiac specific effect. Given the fact that PPAR δ preactivation/overexpression has cardioprotective effects against myocardial injuries, its therapeutic potential and related mechanisms as a secondary treatment intervention deserve further investigations.

BIBLIOGRAPHY

- Bishop-Bailey D, & Bystrom J. (2009). Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor-[beta]/[delta] in inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, 124(2), 141-150.
- Burkart EM, Sambandam N, Han X, Gross RW, Courtois M, Gierasch CM, Shoghi K, Welch MJ, & Kelly DP. (2007). Nuclear receptors PPAR delta and PPAR alpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3930-3939.
- Cheng L, Ding G, Qin Q, Huang Y, Lewis W, He N, Evans RM, Schneider MD, Brako FA, Xiao Y, Chen YE, & Yang Q. (2004a). Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nature Medicine*, 10(11), 1245-1250.
- Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, Pitchford C, Bastin J, Gonzalez FJ, & Kelly DP. (1998). A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator- activated receptor alpha- deficient mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(6), 1083-1091.
- Gilde AJ, & Van Bilsen M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 178(4), 425-434.
- Gilde AJ, Van Der Lee KaJM, Willemsen PHM, Chinetti G, Van Der Leij FR, Van Der Vusse GJ, Staels B, & Van Bilsen M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circulation Research*, 92(5), 518-524.
- Ingwall JS. (2009). Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovascular Research*, 81(3), 412-419.

- Jaswal JS, Keung W, Wang W, Ussher JR, & Lopaschuk GD. (2011). Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation -- a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(7), 1333-1350.
- Jucker BM, Doe CP, Schnackenberg CG, Olzinski AR, Maniscalco K, Williams C, Hu TCC, Lenhard SC, Costell M, Bernard R, Sarov-Blat L, Steplewski K, & Willette RN. (2007). PPARdelta activation normalizes cardiac substrate metabolism and reduces right ventricular hypertrophy in congestive heart failure. *Journal Of Cardiovascular Pharmacology*, 50(1), 25-34.
- Kapoor A, Collino M, Castiglia S, Fantozzi R, & Thiemermann C. (2010). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-[beta]/[delta] attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in the rat. *Shock*, 34(2), 117-124.
- Lapointe N, Tsoporis JN, Parker TG, Blais C, Adam A, Rouleau D, Slaughter G, Clément R, Deschepper CF, & Rouleau JL. (2003). Comparative effects of a vasoepitidase inhibitor vs. An angiotensin convertin enzyme inhibitor on cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 254(1), 235-245.
- Lee C-H, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong L-W, Olefsky JM, Gonzalez FJ, Ham J, Kang H, Peters JM, & Evans RM. (2006). PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9), 3444-3449.
- Liu J, Wang P, Luo J, Huang Y, He L, Yang H, Li Q, Wu S, Zhelyabovska O, & Yang Q. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation in adult hearts facilitates mitochondrial function and cardiac performance under pressure-overload condition. *Hypertension*, 57(2), 223-230.
- Lopaschuk GD. (1998). Treating ischemic heart disease by pharmacologically improving cardiac energy metabolism. *The American Journal of Cardiology*, 82(5, Supplement 1), 14-17.
- Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, Jaswal JS, & Stanley WC. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological Reviews*, 90(1), 207-258.
- Lopaschuk GD, Wambolt RB, & Barr RL. (1993). An imbalance between glycolysis and glucose oxidation is a possible explanation for the detrimental effects of high levels of fatty acids during aerobic reperfusion of ischemic hearts. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 264(1), 135-144.
- Mitra B, & Panja M. (2005). Myocardial metabolism: Pharmacological manipulation in myocardial ischaemia. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 53, 552-560.
- Nguyen QT, Cernacek P, Sirois MG, Calderone A, Lapointe N, Stewart DJ, & Rouleau JL. (2001). Long-term effects of nonselective endothelin a and b receptor antagonism in postinfarction rat: Importance of timing. *Circulation*, 104(17), 2075-2081.
- Nguyen QT, Colombo F, Clement R, Gosselin H, Rouleau J-L, & Calderone A. (2003). At1 receptor antagonist therapy preferentially ameliorated right ventricular

- function and phenotype during the early phase of remodeling post-mi. *British Journal of Pharmacology*, 138(8), 1485-1494.
- Opie LH, & Sack MN. (2002). Metabolic plasticity and the promotion of cardiac protection in ischemia and ischemic preconditioning. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(9), 1077-1089.
- Pellieux C, Montessuit C, Papageorgiou IN, & Lerch R. (2009). Angiotensin ii downregulates the fatty acid oxidation pathway in adult rat cardiomyocytes via release of tumour necrosis factor-alpha. *Cardiovascular Research*, 82(2), 341-350.
- Planavila A, Laguna JC, & Vazquez-Carrera M. (2005). Nuclear factor-kappaB activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17464-17471.
- Sprecher DL. (2007). Lipids, lipoproteins, and peroxisome proliferator activated receptor-delta. *The American Journal of Cardiology*, 100(11, Supplement 1), S20-S24.
- Wagner N, Jehl-Pietri C, Lopez P, Murdaca J, Giordano C, Schwartz C, Gounon P, Hatem SN, Grimaldi P, & Wagner K-D. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor beta stimulation induces rapid cardiac growth and angiogenesis via direct activation of calcineurin. *Cardiovascular Research*, 83(1), 61-71.
- Yue T-L, Nerurkar SS, Bao W, Jucker BM, Sarov-Blat L, Steplewski K, Ohlstein EH, & Willette RN. (2008). In vivo activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta protects the heart from ischemia/reperfusion injury in Zucker fatty rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 325(2), 466-474.

6. DISCUSSION GÉNÉRALE

À la suite d'un infarctus du myocarde, les thérapies conventionnelles agissent principalement sur l'hémodynamie systémique et cardiaque afin de réduire la charge de travail du cœur. Ceci permet au cœur d'accomplir sa tâche à un coût énergétique (ATP) moins élevé. Puisque les maladies cardiaques ischémiques et les insuffisances cardiaques sont régulièrement caractérisées par des altérations au niveau du métabolisme oxydatif des lipides et des glucides, les thérapies métaboliques ont fait l'objet de plusieurs études depuis quelques années. Une plus grande oxydation du glucose, via la stimulation du complexe PDH ou l'inhibition de l'activité de la PDK, a montré des résultats positifs sur la fonction cardiaque. Par ailleurs, une étude clinique a montré en utilisant un stimulateur du complexe PDH (dichloroacétate), une augmentation du volume d'éjection systolique en absence de changement au niveau de la fréquence cardiaque et de la consommation d'oxygène du cœur auprès de patient aux prises avec des maladies coronariennes (Wargovich, *et al.*, 1988). Ainsi, favoriser l'utilisation des glucides à l'instar des lipides peut s'avérer avantageux dans de tels contextes.

L'étude réalisée dans le cadre de ce mémoire a permis de montrer que l'administration d'une dose journalière d'un agoniste PPAR δ pendant 6 jours après infarctus réduit le déclin de la fonction cardiaque chez le rat. Puisque le traitement n'a pas modifié la taille de la cicatrice, cette amélioration de la fonction cardiaque n'est pas le résultat d'infarctus plus petits chez les rats traités. De plus, PPAR δ étant un important

régulateur métabolique, nous espérions observer des changements sur le plan de l'expression génétique de certains gènes impliqués dans le métabolisme énergétique. Cependant, aucun de nos trois gènes sélectionnés (PFK-1, PDK-4, MCAD) n'a suffisamment fluctué pour indiquer un changement significatif. En fait, seulement l'expression du gène PPAR δ s'est vue significativement augmentée suivant le traitement. Par ailleurs, la transposition de l'ARNm en formation protéique ne s'est pas concrétisée puisqu'aucun changement ne fut observé au niveau de la protéine comme telle (Figure 5-1). Il est donc possible que des changements post transcriptionnels ou d'activation de la protéine soient en cause. De plus, la littérature présente une grande variabilité de l'administration de l'agoniste, variant de 10 à 100 mg/kg/jour. La dose choisie dans cette étude (10mg/kg/jour) réduit le risque d'une activation non spécifique de l'isoforme PPAR δ en plus d'avoir montré des effets sur le métabolisme, la fonction cardiaque et la taille de l'infarctus (Burkart, *et al.*, 2007; Yue, *et al.*, 2008). Il est aussi probable que le maintien de la fonction cardiaque soit attribuable à d'autres effets physiologiques qu'à l'activation de PPAR δ . Par exemple, les agonistes de PPAR δ améliorent la sensibilité à l'insuline (Lee, *et al.*, 2006) et ont la capacité de diminuer les triglycérides sanguins ainsi que les lipoprotéines à faible densité (LDL) (Sprecher, 2007). De plus, un rôle dans les processus inflammatoires émerge actuellement et a déjà l'objet de quelques recherches (Bishop-Bailey & Bystrom, 2009). Ces effets n'étaient pas évalués dans le cadre de cette étude, mais pourraient avoir joué un rôle dans le maintien/recouvrement de la fonction cardiaque après l'infarctus.

Effet de PPAR δ sur la fonction cardiaque et la taille de l'infarctus

Dans un contexte d'ischémie cardiaque, peu d'études ont relaté les effets et les mécanismes potentiellement concernés suivant l'activation du récepteur PPAR δ sur le cœur. Ces études présentent toutes des protocoles différents et, par le fait même, les résultats diffèrent également. Le moment et la durée d'activation du récepteur ainsi que la technique utilisée pour induire l'infarctus semblent jouer un rôle dans le devenir des structures et de la fonction cardiaque. Un prétraitement avec un agoniste PPAR δ d'une durée de 7 jours favorise le maintien de la fonction cardiaque chez des rats préobèses diabétiques ayant subi un infarctus par I/R (Yue, *et al.*, 2008). Ce résultat est soutenu par une réduction de la taille de l'infarctus ainsi qu'une diminution de la réponse inflammatoire et apoptotique chez les animaux traités. Fait à noter, l'amélioration du profil lipidique sanguin suivant le traitement pourrait également avoir été bénéfique pour ce type de rat dyslipidémique dans un contexte d'ischémie du myocarde. Des résultats semblables sur la taille de l'infarctus ont été rapportés lors de deux autres études, l'une ayant administré un bolus d'agoniste PPAR δ 30-45 minutes avant l'I/R (Kapoor, *et al.*, 2010), l'autre ayant utilisé un modèle de rat transgénique qui sur-exprime PPAR δ uniquement dans le cœur (Burkart, *et al.*, 2007). La pression artérielle n'a pas changé dans l'étude de Kapoor *et al.* (2010) et le taux de développement de pression des ventricules n'a malheureusement pas été mesurée suivant l'ischémie dans aucune de ces deux études. À l'opposé, lorsqu'un même type de traitement est initié après l'infarctus du myocarde, des résultats différents ont été rapportés. En fait, l'étude menée par Jucker *et al.* (2007) ne rapporte aucune amélioration ni sur le plan de la fonction cardiaque, ni

sur la taille de l'infarctus suite à un traitement post infarctus avec un agoniste PPAR δ . Notre méthodologie se rapproche beaucoup de cette dernière étude et nos résultats corroborant en partie les observations qui y sont rapportées. En fait, tout comme dans cette étude, nous n'avons pas observé de changement au niveau de la taille de l'infarctus (Tableau 5-1). Cependant, nous avons noté une amélioration sur le plan de la fonction cardiaque suivant le traitement avec l'agoniste GW0742 (Tableau 5-2). Ce dernier résultat est en lien avec les travaux réalisés par Yue *et al.* (2008) qui relatent également un maintien de la fonction cardiaque post infarctus. Par contre, le traitement pharmacologique précédait l'infarctus lors de cette étude. De plus, contrairement à ces travaux, nous n'avons observé aucune différence sur la taille de la cicatrice et les signaux apoptotiques suivant le traitement (Tableau 5-1 et Figure 5-3). Une constante semble ressortir à la lumière de l'ensemble de ces études : lorsque PPAR δ est surexprimé ou préalablement activé à l'aide d'un agoniste avant un événement ischémique, son activation tend à réduire la taille de l'infarctus. Par contre, les impacts de PPAR δ sur la fonction cardiaque après infarctus ne font pas l'unanimité et ce, peu importe le moment de l'activation.

Effet de PPAR δ sur l'expression de gènes métaboliques

Le récepteur PPAR δ étant un important régulateur du métabolisme, son influence sur l'utilisation des substrats énergétiques pourrait en partie expliquer ses effets sur le cœur. Cheng *et al.* (2004a) ont montré l'importance cruciale qu'a PPAR δ dans le myocarde.

En fait, l'inactivation du gène codant pour le récepteur engendre une mort prématurée chez un modèle transgénique de souris. Une insuffisance cardiaque caractérisée par une diminution de la β -oxydation des lipides, une accumulation progressive de lipide dans le cœur, une lipoapoptose et une hypertrophie cardiaque expliquent le devenir de ce modèle expérimental. PPAR δ est généralement associé à la régulation des gènes principalement impliqués dans le métabolisme des lipides incluant FACS, CPT-1, LCAD et MCAD (Cheng, *et al.*, 2004b; Gilde, *et al.*, 2003). De plus, cette augmentation d'expression génétique est généralement accompagnée d'une augmentation de l'utilisation des lipides par le cœur, particulièrement une augmentation de la β -oxydation (Gilde, *et al.*, 2003). Cependant, il a été démontré qu'une surexpression de PPAR δ spécifique au muscle cardiaque n'entraîne pas une augmentation de l'oxydation des lipides. Étonnamment, ceci augmente l'oxydation du glucose, un effet associé à l'augmentation de l'expression des GLUT-4 cardiaques et de la PFK-1 (Burkart, *et al.*, 2007). Cet effet pourrait être relié à l'aptitude de PPAR δ à augmenter la sensibilité à l'insuline (Lee, *et al.*, 2006). Lorsque regroupés, ces effets pourraient être bénéfiques en freinant l'atténuation du métabolisme oxydatif dans un contexte d'ischémie cardiaque. Bien que l'expression des gènes sélectionnés dans le cadre de notre étude (PFK-1, PDK-4 et MCAD) n'a pas été affectée par le traitement pharmacologique (Figure 5-2), il est tout de même probable que le maintien du métabolisme oxydatif post infarctus puisse avoir contribué à préserver la fonction cardiaque. Une conclusion supportée par les travaux de Jucker *et al.* (2007) rapportant une normalisation de l'utilisation des substrats

énergiques après l'infarctus ainsi que par ceux de Liu *et al.* (2011) mentionnant que l'activation de PPAR δ facilite le métabolisme oxydatif et la performance cardiaque.

Limites et perspectives

Dans le but de poursuivre l'étude présentée ici, certaines mesures peuvent être entreprises. Premièrement, puisque nous avons administré l'agoniste par voie orale, nous aurions pu prélever d'autres tissus ainsi que des échantillons sanguins. En plus de nous permettre de mesurer le niveau plasmatique de l'agoniste PPAR δ , cela nous aurait permis de comparer les effets de l'agoniste sur le cœur par rapport à ses effets sur d'autres organes, le muscle squelettique par exemple. En second lieu, la mesure directe du métabolisme n'étant pas possible, nous sommes au fait que le nombre de gènes analysés était restreint. Un plus grand nombre de gènes aurait peut-être permis de mieux circonscrire les effets de l'activation de PPAR δ sur l'expression des gènes métaboliques. De plus, notre étude ne présente pas de résultats biochimiques pour le groupe opéré (Sham), les tissus n'étant plus disponibles pour réaliser ce type d'analyse. Finalement, avec un faible échantillonnage par groupe, la variabilité des mesures a un grand impact et peut affecter négativement la significativité de nos résultats. Un plus grand nombre d'animaux aurait favorisé une meilleure puissance statistique et un aperçu plus équilibré des divers effets rencontrés.

Dans un contexte d'ischémie, d'insuffisance cardiaque ou d'une autre maladie cardiovasculaire, les projets futurs en lien avec l'activation de PPAR δ devraient s'orienter à mieux caractériser les effets de traitements pharmacologiques, selon qu'ils soient de type prévention primaire ou secondaire. Un traitement de type prévention primaire pourrait bénéficier aux individus aux prises avec une dyslipidémie, une résistance à l'insuline, de l'angine ou ayant de nombreux facteurs de risques de maladie cardiaque. Tandis qu'un traitement de type prévention secondaire pourrait se révéler efficace pour ralentir la progression de la maladie ou prévenir un second infarctus. La divergence des résultats en fonction du protocole expérimental utilisé rend difficile l'évaluation du potentiel thérapeutique de PPAR δ sur le cœur dans l'une ou l'autre de ces circonstances. Pour clarifier la question, le développement de différents modèles animaux transgéniques et surtout le développement d'agonistes plus spécifiques sont nécessaires. Enfin, une perspective qui n'a pas été abordée dans cette étude, l'activation de PPAR δ a récemment été catégorisée comme pouvant servir de substitut à l'exercice physique en plus d'en potentialiser les effets (Narkar, *et al.*, 2008). Les bénéfices de l'exercice sur le cœur étant bien reconnus, il serait également intéressant d'évaluer les effets de l'activation de PPAR δ sous cet angle dans un contexte de maladies cardiovasculaires en plus d'en vérifier les impacts lorsque combiné avec l'entraînement aérobie.

7. CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de cette étude était de vérifier les effets d'un agoniste PPAR δ (GW0742) sur la fonction cardiaque, la taille de l'infarctus et l'expression de gènes métaboliques lorsqu'administré après l'infarctus du myocarde. Cette étude nous a permis de constater que l'activation de PPAR δ après infarctus normalise la fonction cardiaque malgré une absence d'effet sur le plan de l'expression des gènes intervenant dans le métabolisme et sur la taille de la cicatrice. Ainsi, nous nous inscrivons dans la controverse des résultats présentés dans la littérature. Puisque le traitement était administré par voie orale, la nature précise de l'effet, selon qu'il serait spécifique au cœur ou attribuable à d'autres mécanismes physiologiques, reste à élucider. Par exemple, l'impact des agonistes PPAR δ sur la sensibilité à l'insuline, les processus inflammatoires et les lipides circulants pourrait avoir joué un rôle dans le recouvrement de la fonction après l'infarctus. Bien que les résultats ne fassent pas l'unanimité dans la littérature, la préactivation/surexpression de PPAR δ démontre certains effets cardioprotecteurs contre les dommages causés par l'ischémie. Cependant, la détermination de son potentiel thérapeutique à titre de prévention secondaire ou même comme traitement curatif, sans oublier les mécanismes impliqués, nécessite d'autres investigations.

8. BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

- Beadle RM, & Frenneaux M. (2010). Modification of myocardial substrate utilisation: A new therapeutic paradigm in cardiovascular disease. *Heart (British Cardiac Society)*, 96(11), 824-830.
- Bing R. (1955). The metabolism of the heart. *Harvey Lectures*, 50, 27-70.
- Bishop-Bailey D, & Bystrom J. (2009). Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor-[beta]/[delta] in inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, 124(2), 141-150.
- Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, & Wahli W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 137(1), 354-366.
- Burkart EM, Sambandam N, Han X, Gross RW, Courtois M, Gierasch CM, Shoghi K, Welch MJ, & Kelly DP. (2007). Nuclear receptors PPAR delta and PPAR alpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3930-3939.
- Chandler MP, Chavez PN, Mcelfresh TA, Huang H, Harmon CS, & Stanley WC. (2003). Partial inhibition of fatty acid oxidation increases regional contractile power and efficiency during demand-induced ischemia. *Cardiovascular Research*, 59(1), 143-151.
- Cheng L, Ding G, Qin Q, Huang Y, Lewis W, He N, Evans RM, Schneider MD, Brako FA, Xiao Y, Chen YE, & Yang Q. (2004a). Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nature Medicine*, 10(11), 1245-1250.
- Cheng L, Ding G, Qin Q, Xiao Y, Woods D, Chen YE, & Yang Q. (2004b). Peroxisome proliferator-activated receptor [delta] activates fatty acid oxidation in cultured neonatal and adult cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(2), 277-286.
- Clarke B, Wyatt KM, & McCormack JG. (1996). Ranolazine increases active pyruvate dehydrogenase in perfused normoxic rat hearts: Evidence for an indirect mechanism. *Journal Of Molecular And Cellular Cardiology*, 28(2), 341-350.
- Cottin Y, Lhuillier I, Gilson L, Zeller M, Bonnet C, Toulouse C, Louis P, Rochette L, Girard C, & Wolf J-E. (2002). Glucose insulin potassium infusion improves systolic function in patients with chronic ischemic cardiomyopathy. *European Journal of Heart Failure*, 4(2), 181-184.
- Depre C, Rider MH, Veitch K, & Hue L. (1993). Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of heart glycolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 268(18), 13274-13279.

- Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, Pitchford C, Bastin J, Gonzalez FJ, & Kelly DP. (1998). A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(6), 1083-1091.
- Ehrenborg E, & Krook A. (2009). Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Pharmacological Reviews*, 61(3), 373-393.
- Fabiato A, & Fabiato F. (1978). Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *The Journal of Physiology*, 276(1), 233-255.
- Fruchart J-C, Duriez P, & Staels B. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, 10(3), 245-258.
- Gerstein HY, S. Bosch, J. Pogue, J. Sheridan, P. Dincic, N. Hanefeld, M. Hoogwerf, B. Laakso, M. Mohan, V. (2006). Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: A randomised controlled trial. *The Lancet*, 368(9541), 1096-1105.
- Gertz EW, Wisneski JA, Stanley WC, & Neese RA. (1988). Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *The Journal of Clinical Investigation*, 82(6), 2017-2025.
- Gilde AJ, & Van Bilsen M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 178(4), 425-434.
- Gilde AJ, Van Der Lee KaJM, Willemsen PHM, Chinetti G, Van Der Leij FR, Van Der Vusse GJ, Staels B, & Van Bilsen M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circulation Research*, 92(5), 518-524.
- Harris RA, Huang B, & Wu P. (2001). Control of pyruvate dehydrogenase kinase gene expression. *Advances in Enzyme Regulation*, 41, 269-288.
- Hermann HP, Pieske B, Schwarzmüller E, Keul J, Just H, & Hasenfuss G. (1999). Haemodynamic effects of intracoronary pyruvate in patients with congestive heart failure: An open study. *The Lancet*, 353(9161), 1321-1323.
- Hondares E, Pineda-Torra I, Iglesias R, Staels B, Villarroya F, & Giralt M. (2007). PPAR[delta], but not PPAR[alpha], activates pgc-1[alpha] gene transcription in muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(4), 1021-1027.
- Hool LC. (2007). What cardiologists should know about calcium ion channels and their regulation by reactive oxygen species. *Heart, Lung and Circulation*, 16(5), 361-372.
- Hue L, & Taegtmeyer H. (2009). The randle cycle revisited: A new head for an old hat. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 297(3), 578-591.

- Ingwall JS. (2009). Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovascular Research*, 81(3), 412-419.
- Jaswal JS, Keung W, Wang W, Ussher JR, & Lopaschuk GD. (2011). Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation -- a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(7), 1333-1350.
- Jucker BM, Doe CP, Schnackenberg CG, Olzinski AR, Maniscalco K, Williams C, Hu TCC, Lenhard SC, Costell M, Bernard R, Sarov-Blat L, Steplewski K, & Willette RN. (2007). PPARdelta activation normalizes cardiac substrate metabolism and reduces right ventricular hypertrophy in congestive heart failure. *Journal Of Cardiovascular Pharmacology*, 50(1), 25-34.
- Kapoor A, Collino M, Castiglia S, Fantozzi R, & Thiemermann C. (2010). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-[beta]/[delta] attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in the rat. *Shock*, 34(2), 117-124.
- Kolobova E, Tuganova A, Boulatnikov I, & Popov KM. (2001). Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *The Biochemical Journal*, 358(1), 69-77.
- Lapointe N, Tsoporis JN, Parker TG, Blais C, Adam A, Rouleau D, Slaughter G, Clément R, Deschepper CF, & Rouleau JL. (2003). Comparative effects of a vasopeptidase inhibitor vs. An angiotensin convertin enzyme inhibitor on cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 254(1), 235-245.
- Lee C-H, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong L-W, Olefsky JM, Gonzalez FJ, Ham J, Kang H, Peters JM, & Evans RM. (2006). PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9), 3444-3449.
- Leibowitz MD, Fièvet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Berger J, Cullinan CA, Sparrow CP, Baffic J, Berger GD, Santini C, Marquis RW, Tolman RL, Smith RG, Moller DE, & Auwerx J. (2000). Activation of PPAR[delta] alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Letters*, 473(3), 333-336.
- Liu J, Wang P, Luo J, Huang Y, He L, Yang H, Li Q, Wu S, Zhelyabovska O, & Yang Q. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation in adult hearts facilitates mitochondrial function and cardiac performance under pressure-overload condition. *Hypertension*, 57(2), 223-230.
- Lopaschuk GD. (1998). Treating ischemic heart disease by pharmacologically improving cardiac energy metabolism. *The American Journal of Cardiology*, 82(5, Supplement 1), 14-17.
- Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, Itoi T, & Schönekeess BO. (1994a). Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*(1213), 263-276.
- Lopaschuk GD, Collins-Nakai R, Olley PM, Montague TJ, Mcneil G, Gayle M, Penkoske P, & Finegan BA. (1994b). Plasma fatty acid levels in infants and adults after myocardial ischemia. *American Heart Journal*, 128(1), 61-67.

- Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, Jaswal JS, & Stanley WC. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological Reviews*, 90(1), 207-258.
- Lopaschuk GD, Wambolt RB, & Barr RL. (1993). An imbalance between glycolysis and glucose oxidation is a possible explanation for the detrimental effects of high levels of fatty acids during aerobic reperfusion of ischemic hearts. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 264(1), 135-144.
- Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Fredenrich A, Melki J, Rassoulzadegan M, & Grimaldi PA. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor delta; controls muscle development and oxydative capability. *The FASEB Journal*, 2299-2301.
- Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, Enocksson S, Inzucchi SE, Shulman GI, & Petersen KF. (2002). The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 51(3), 797-802.
- Ministère De L'industrie Du Canada. (2009). Mortalité : Liste sommaire des causes 2005. *Statistique Canada, Division de la statistique de la santé*.
- Mitra B, & Panja M. (2005). Myocardial metabolism: Pharmacological manipulation in myocardial ischaemia. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 53, 552-560.
- Murphy E, Perlman M, London R, & Steenbergen C. (1991). Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circulation Research*, 68(5), 1250-1258.
- Narkar VA, Downes M, Yu RT, Embler E, Wang Y-X, Banayo E, Mihaylova MM, Nelson MC, Zou Y, Juguilon H, Kang H, Shaw RJ, & Evans RM. (2008). AMPK and PPAR[delta] agonists are exercise mimetics. *Cell*, 134(3), 405-415.
- Neely JR, & Morgan HE. (1974). Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annual Review of Physiology*, 36, 413-459.
- Neubauer S. (2007). The failing heart - an engine out of fuel. *The New England Journal of Medicine*, 356(11), 1140-1151.
- Nguyen QT, Cernacek P, Sirois MG, Calderone A, Lapointe N, Stewart DJ, & Rouleau JL. (2001). Long-term effects of nonselective endothelin a and b receptor antagonism in postinfarction rat: Importance of timing. *Circulation*, 104(17), 2075-2081.
- Nguyen QT, Colombo F, Clement R, Gosselin H, Rouleau J-L, & Calderone A. (2003). At1 receptor antagonist therapy preferentially ameliorated right ventricular function and phenotype during the early phase of remodeling post-mi. *British Journal of Pharmacology*, 138(8), 1485-1494.
- Oliver WR, Jr., Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznaidman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliwer SA, Hansen BC, & Willson TM. (2001). A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), 5306-5311.

- Opie LH, & Sack MN. (2002). Metabolic plasticity and the promotion of cardiac protection in ischemia and ischemic preconditioning. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(9), 1077-1089.
- Pellieux C, Montessuit C, Papageorgiou IN, & Lerch R. (2009). Angiotensin ii downregulates the fatty acid oxidation pathway in adult rat cardiomyocytes via release of tumour necrosis factor-alpha. *Cardiovascular Research*, 82(2), 341-350.
- Planavila A, Laguna JC, & Vazquez-Carrera M. (2005). Nuclear factor-kappaB activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17464-17471.
- Risérus U, Sprecher D, Johnson T, Olson E, Hirschberg S, Liu A, Fang Z, Hegde P, Richards D, Sarov-Blat L, Strum JC, Basu S, Cheeseman J, Fielding BA, Humphreys SM, Danoff T, Moore NR, Murgatroyd P, O'rahilly S, Sutton P, Willson T, Hassall D, Frayn KN, & Karpe F. (2008). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) delta promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. *Diabetes*, 57(2), 332-339.
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, & Mortensen RM. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular cell*, 4(4), 611-617.
- Schaffer JE. (2002). Fatty acid transport: The roads taken. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 282(2), 239-246.
- Sprecher DL. (2007). Lipids, lipoproteins, and peroxisome proliferator activated receptor-delta. *The American Journal of Cardiology*, 100(11, Supplement 1), S20-S24.
- Sprecher DL, Massien C, Pearce G, Billin AN, Perlstein I, Willson TM, Hassall DG, Ancellin N, Patterson SD, Lobe DC, & Johnson TG. (2007). Triglyceride:High-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor {delta} agonist. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 27(2), 359-365.
- Stanley WC. (2004). Myocardial energy metabolism during ischemia and the mechanisms of metabolic therapies. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 9(1 suppl), S31-S45.
- Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, & McCormack JG. (1997). Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovascular Research*, 33(2), 243-257.
- Stanley WC, Recchia FA, & Lopaschuk GD. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological Reviews*, 85(3), 1093-1129.
- Taha M, & Lopaschuk GD. (2007). Alterations in energy metabolism in cardiomyopathies. *Annals Of Medicine*, 39(8), 594-607.
- Tamm C, Benzi R, Papageorgiou I, Tardy I, & Lerch R. (1994). Substrate competition in postischemic myocardium. Effect of substrate availability during reperfusion on

- metabolic and contractile recovery in isolated rat hearts. *Circulation Research*, 75(6), 1103-1112.
- Tan NS, Michalik L, Noy N, Yasmin R, Pacot C, Heim M, Flühmann B, Desvergne B, & Wahli W. (2001). Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes & Development*, 15(24), 3263-3277.
- Thorpe C, & Kim J. (1995). Structure and mechanism of action of the acyl-coa dehydrogenases. *The FASEB Journal*, 9(9), 718-725.
- Van Bilsen M, Van Nieuwenhoven FA, & Van Der Vusse GJ. (2009). Metabolic remodelling of the failing heart: Beneficial or detrimental? *Cardiovascular Research*, 81(3), 420-428.
- Wagner N, Jehl-Pietri C, Lopez P, Murdaca J, Giordano C, Schwartz C, Gounon P, Hatem SN, Grimaldi P, & Wagner K-D. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor beta stimulation induces rapid cardiac growth and angiogenesis via direct activation of calcineurin. *Cardiovascular Research*, 83(1), 61-71.
- Wang Y-X, Zhang C-L, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H, & Evans RM. (2004). Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR- δ . *PLoS Biology*, 2(10), 294.
- Wargovich TJ, Macdonald RG, Hill JA, Feldman RL, Stacpoole PW, & Pepine CJ. (1988). Myocardial metabolic and hemodynamic effects of dichloroacetate in coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology*, 61(1), 65-70.
- Wielgosz A, Arango M, Bancej C, Bienek A, Johansen H, Lindsay P, Luo W, Luteyn A, Nair C, Quan P, Stewart P, Walsh P, & Webster G. (2009). Suivides des maladies du cœur et des accidents vasculaires cérébraux au canada. *Agence de la santé publique du Canada*, .
- Wisneski JA, Gertz EW, Neese RA, & Mayr M. (1987). Myocardial metabolism of free fatty acids. Studies with 14c-labeled substrates in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 79(2), 359-366.
- Young LH, Russell RR, 3rd, Yin R, Caplan MJ, Ren J, Bergeron R, Shulman GI, & Sinusas AJ. (1999). Regulation of myocardial glucose uptake and transport during ischemia and energetic stress. *The American Journal of Cardiology*, 83(12A), 25-30.
- Yue T-L, Nerurkar SS, Bao W, Jucker BM, Sarov-Blat L, Steplewski K, Ohlstein EH, & Willette RN. (2008). In vivo activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta protects the heart from ischemia/reperfusion injury in Zucker fatty rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 325(2), 466-474.