UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III Année : 2004.

THESE DE SCIENCES

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE TOULOUSE III
SPECIALITE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE & INTEGREE

Présentée et soutenue publiquement par

Pierre PHILIP-COUDERC

Adaptations du système nerveux végétatif & du transcriptome cardiaque au cours de l'obésité

Directeur de thèse : Dr. Philippe ROUET

JURY

Dr. Jane-Lise SAMUEL Directrice de l'U127 INSERM **Rapporteur**

Pr. Alain BERDEAUX Professeur à l'université de Paris XI **Rapporteur**

Dr. Philippe ROUET CR 1 à l'U586 INSERM **Examinateur**

Pr. Michel GALINIER Professeur àe l'université de Toulouse III **Président**

En préambule à ce travail, je tiens à remercier :

Monsieur le Professeur Jean-Louis Montastruc pour son chaleureux accueil au sein de son laboratoire et la confiance qu'il m'a témoigné.

Monsieur le Docteur Dominique Langin, directeur de l'U586 INSERM, pour son accueil et son soutien.

Monsieur le Docteur Philippe Rouet, mon directeur de thèse, pour la transmission de ses connaissances techniques et pour m'avoir donné les armes nécessaires pour réussir dans le travail en équipe.

Monsieur le Professeur Jean-Michel Sénard pour son aide précieuse, sa confiance, sa patience et ses conseils éclairés durant l'élaboration de ce long travail.

Monsieur le Docteur Patrick Verwaerde pour son soutien moral et son aide dans ma recherche.

Monsieur le Docteur Michel Pelat pour ses travaux préliminaires aux thèmes développés importants dans ce travail et sa sympathie.

Madame le docteur Véronique Leberre et monsieur le docteur Sergueï Sokol, du Génopôle de Toulouse, monsieur Jean-José Maoret, de la plate-forme de biologie moléculaire de l'IFR31, pour leur disponibilité et leurs compétences précieuses.

Mademoiselle Sophie Buys, monsieur Atul Pathak, madame Nathalie Laplace, monsieur Jean-Michel Duplantier, madame Marie-Antoinette Tran, madame Marie-Thérèse Canal, madame Véronique De Saint Front, madame Alexia Girard, monsieur Michel Berlan, monsieur Jean Galitzsky, mademoiselle Karine Lolmède, monsieur Cédric Moro, monsieur Bienvenu N'Goundo, ainsi que tout le personnel scientifique et administratif de l'U586 INSERM de Rangueil et du laboraotoire de pharmacologie clinique et médicale de la faculté de médecine.

A mon grand-père et parrain , Pierre Philip, ingénieur physicien CNRS à l'observatoire astronomique du Pic du Midi, A Fred.
A Marie-Françoise Philip, ma mère, A Caroline Abel et A ma famille.

Remerciements aux rapporteurs :

Madame le Docteur Jane-Lise Samuel, directrice de l'U127 INSERM à Paris, monsieur le Professeur Alain Berdeaux, Professeur à l'université de Paris XI, monsieur Jean-Philippe Salier, directeur de l'U78 INSERM à Rouen, pour avoir accepter d'évaluer ce travail de thèse, nous voudrions exprimer notre profonde reconnaissance.

Dans « *Comment je vois le monde* », Albert Einstein décrivait la pensée humaine face à la science ainsi :

« *Face à l'illusion […] de la puissance illimitée de la pensée, existe une autre illusion […], le réalisme simplet, selon lequel les objets « sont » la pure vraisemblance de nos sens. Cette illusion occupe l'activité quotidienne des hommes et des animaux. […] Les sciences s'interrogent ainsi.* »

Et il trouvait un écho dans « *Recherche dans la pensée et la vérité* » du philosophe Bertrand Russel :

« *C'est pourquoi, la science paraît en contradiction avec elle-même, quand elle se considère comme étant extrêmement objective, elle plonge contre sa volonté dans la subjectivité.* »

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION……..…4

Première partie : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. OBESITE & RISQUE CARDIO-VASCULAIRE……...8

II. PHYSIOPATHOLOGIE DU CŒUR DE L'OBESE……...13

II. 1. Historique……...13

II. 2. Anomalies du métabolisme cardiaque……15

II. 2. 1. La glycolyse……15
II. 2. 2. Utilisation du lactate……...18
II. 2. 3. Catabolisme des acides gras……19
II. 2. 4. Métabolisme cardiaque chez l'obèse ……..……21

II. 3. Anomalies du contrôle végétatif……...22

II. 3. 1. Le baroréflexe……23
II. 3. 2. Système orthosympathique & récepteurs β adrénergiques……25
II. 3. 3. Système parasympathique & récepteurs M_2 muscariniques……...28
II. 3. 4. Désensibilisation des récepteurs……31
II. 3. 4. 1. *Désensibilisation des récepteurs β adrénergiques*……31
II. 3. 4. 2. *Désensibilisation des récepteurs M_2 muscariniques*……34
II. 3. 5. Contribution du SNA dans l'HTA chez le chien obèse……..37
II. 3. 6. SNA & leptine chez le rat et les modèles murins transgéniques……39
II. 3. 7. Le système rénine-angiotensine-aldostérone……..42

II. 4. Modifications morphologiques & fonctionnelles du ventricule……43

II. 4. 1. Aspects morphologiques du cœur de l'obèse……..…44
II. 4. 1. 1. *Données échocardiographiques*……44
II. 4. 2. 2. *Infiltrations lipidiques*……...45
II. 4. 2. Aspects fonctionnels du cœur de l' obèse……...46
II. 4. 2. 1. *Fonction systolique*……...…..46
II. 4. 2. 1. 1. *Précharge, postcharge et loi de Frank-Starling*……..……46
II. 4. 2. 1. 2. *Inotropie*……...47
II. 4. 2. 1. 3. *Le stress pariétal*……..48
II. 4. 2. 1. 4. *Dysfonction systolique chez l'obèse*...……..…..48
II. 4. 2. 2. *Fonction diastolique* ……..…48
II. 4. 2. 2. 1. *Physiologie de la diastole*……48
II. 4. 2. 2. 2. *Dysfonction diastolique du VG*……...……....49
II. 4. 2.2. 3. Dysfonction diastolique chez l'obèse……..……50

III. EXPRESSION GENIQUE CARDIAQUE …….51

III. 1. Méthodes actuelles d'analyse du transcriptome……51

III. 2. Régulation de l'expression des gènes de mammifères……..….…52

III. 2. 1. Structure des régions régulatrices d'un gène……52
III. 2. 2. L'appareil de transcription……53
III. 2. 3. Les facteurs de transcription & la régulation transcriptionnelle……54

III. 3. Facteurs de transcription cardiaques et régulations de l'expression génique...….58

III. 3. 1. Les facteurs de transcription de la cardiogénèse……...58
III. 3. 2. Modifications de l'expression génique du cœur hypertrophié……..62
III. 3. 2. 1. *Régulations des flux calciques dans le cœur hypertrophié*……..…64
III. 3. 2. 2. *Les autres courants ioniques dans le cœur hypertrophié*……..…...65
III. 3. 2. 3. *Récepteurs cardiaques dans le cœur hypertrophié*…….....67
III. 3. 2. 4. *Fonctions endocrines cardiaques dans le cœur hypertrophié*…...….68
III. 3. 2. 5. *Protéines contractiles dans le cœur hypertrophié*……...69
III. 3. 2. 6. *Le cytosquelette dans le cœur hypertrophié*……70
III. 3. 2. 7. *Facteurs de transcription, protooncogènes et hypertrophie*… ……..71

III. 4. Profils d'expression génique cardiaque……..……73

Deuxième partie : MATERIELS & METHODES

I. LE MODELE DE CHIEN OBESE HYPERTENDU……77

II. CULTURES CELLULAIRES……78

II. 1. Cultures cellulaires de cardiomyocytes atriaux murins P19……..…78

II. 2. Cultures de cardiomyocytes ventriculaires de rat H9C2……...79

III. BIOLOGIE MOLECULAIRE……79

III. 1. Extraction des ARN……..79

III. 2. Extraction des protéines……..80

III. 3. Dosage ARN & ADN en fluorescence……..…80

III. 4. Dosage des protéines en colorimétrie……..…80

III. 5. *Northern-Blot*……81

III. 6. *Western-Blot*……..……..…82

III. 7. Rétro-transcription……..……84

III. 8. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*……..…84

III. 9. *RT-PCR* quantitative en temps réel……84

III. 10. Séquençage……..…84

III. 11. *Switch Mechanism At the 5' end of RNA Templates SMART™*……...…85

III. 12. Banques soustraites ADNc : *Suppressive Substractve Hybridization (SSH)*…...…87

III. 13. Création d'une banque ordonnée ADNc dans des bactéries recombinantes……89

III. 14. *DNA-microarrays*……90

IV. BIOINFORMATIQUE……..……...…….91

Troisième partie : RESULTATS &DISCUSSION

I. SYSTEME NERVEUX PARASYMPATHIQUE CARDIAQUE CHEZ L'OBESE…..……94

I. 1. Particularités de la voie de transduction muscarinique NO-dépendante……...…94

Publication n° 1

I. 2. Régulation des récepteurs muscariniques M_2 par l'adrénomedulline……..…97

Publication n° 2

II. APPROCHE GENOMIQUE……102

II. 1. Profil de l'expression génique de l'oreillette droite chez le chien obèse hypertendu.....102

Publications n° 3 & 4

II. 2. Evolution du transcriptome ventriculaire et cinétique d'engraissement chez le chien obèse hypertendu…….....……107

Publication n° 5

II. 3. Profil de l'expression génique cardiaque chez l'Homme obèse……...……110

Publication n° 6

SYNTHESE & PERSPECTIVES…….....……..114
BIBLIOGRAPHIE……122
ABREVIATIONS……...……142
RESUME……147

INTRODUCTION

L'intérêt porté par la Médecine à l'obésité au cours des siècles trouve, à l'heure actuelle, toute sa justification dans les chiffres inquiétants fournis par l'épidémiologie : la prévalence de l'obésité double tous les 15 ans, elle n'est plus une maladie propre aux pays industrialisés, elle touche de plus en plus les enfants. Plus que la fréquence, ce sont les données concernant la morbidité liée à l'obésité qui inquiètent. En effet, l'obésité est responsable d'une réduction de la longévité essentiellement au travers d'une augmentation de la morbidité cardio-vasculaire qui est, en général, considérée comme la conséquence de l'hypertension artérielle ou des anomalies endocrino-métaboliques (diabète de type II, dyslipidémies). Cependant, les données épidémiologiques soulignent régulièrement que l'obésité constitue également un facteur de morbi-mortalité indépendant de mort subite ou d'insuffisance cardiaque. Ces observations suggèrent fortement l'existence de liens directs entre le développement excessif du tissu adipeux et le cœur. A cet égard, la mise en évidence des capacités sécrétoires multiples de l'adipocyte et l'impact, parfois encore mal démontré, de certaines « adipokines » sur le système cardiovasculaire soulèvent la question de l'existence d'une authentique cardiopathie de l'obèse ayant une spécificité fonctionnelle, hémodynamique et même transcriptionnelle.

Concernant les adaptations de la transcription des gènes cardiaques au cours de l'obésité, les données restent floues et parcellaires. Des modifications de l'expression des gènes codant pour les récepteurs végétatifs ont été mises en évidence qui pourraient rendre compte des modifications bien connues de la fréquence cardiaque, de la variabilité sinusale et peut-être du risque de troubles du rythme sévères. L'augmentation

de la sécrétion par le tissu adipeux de cytokines à tropisme cardiaque pourrait rendre compte du développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche, puis à terme de la fréquence élevée de l'insuffisance cardiaque. L'HTA volumétrique, typique de l'obésité, n'a certainement pas les mêmes conséquences sur le génome cardiaque de l'HTA barométrique. L'analyse systématique des adaptations géniques cardiaques propres à l'obésité n'a encore jamais été réalisée. Cette stratégie utilisant les méthodes modernes de la biologie moléculaire a pourtant été largement utilisée pour étudier les mécanismes expliquant l'hypertrophie ventriculaire gauche d'origine barométrique, les cardiomyopathies primitives et même l'insuffisance cardiaque congestive.

Les travaux de recherche rassemblés dans cette thèse s'inscrivent dans cette thématique générale qui est également celle de l'Equipe IV (Adaptations cardiaques et végétatives à l'obésité) et de l'Unité INSERM U586 (Unité de recherche sur les obésités) dans laquelle j'ai travaillé. Dans un souci de clarté, ces travaux seront présentés en deux parties.

- La première partie sera consacrée aux données obtenues au laboratoire concernant la régulation du récepteur muscarinique M_2 cardiaque par l'adrénomédulline, un peptide vasoactif jouant un rôle important dans l'homéostasie cardiovasculaire, ainsi que la régulation de la voie de transduction du signal M_2 impliquant les NO synthases dans un modèle d'obésité hypertension obtenu par la manipulation nutritionnelle chez le chien.

- La deuxième partie sera entièrement dédiée à la présentation des résultats, déjà en partie publiés, de l'analyse des régulations transcriptionnelles cardiaques dans le modèle de chien mais également chez l'Homme. Ces travaux montrent la précocité des modifications de l'expression génique cardiaque en réponse au développement de l'obésité, et la cinétique de l'installation des anomalies chez le chien. Ils tentent de faire

la part des régulations dépendantes de l'obésité ou de l'HTA qui lui est si fréquemment associée, par une approche chez l'Homme.

L'exposé de nos travaux expérimentaux sera précédé d'une revue des données épidémiologiques ou portant sur la physiopathologie de la cardiopathie de l'obèse en essayant de dégager les arguments plaidant en faveur de l'existence d'une spécificité de l'atteinte cardiaque.

Première partie :

Données Bibliographiques

I. OBESITE & RISQUES CARDIOVASCULAIRES

De manière générale, l'incidence des maladies cardio-vasculaires telle que l'hypertension artérielle, les maladies des artères coronaires, le risque de mort subite, l'insuffisance cardiaque, l'hypertrophie ventriculaire gauche et les atteintes du système nerveux autonome cardiaque sont plus fréquentes chez les individus obèses que chez les individus minces. Ces affections cardiaques sont regroupées sous la dénomination de cardiomyopathies de l'obèse.

Afin d'évaluer au mieux l'incidence de l'obésité nous allons rappeler l'étendue épidémiologique des pathologies cardio-vasculaires qui lui sont associées.

I. 1.L'OBESITE

Il existe une sorte une courbe dose réponse reliant l'indice de masse corporelle (IMC = poids / taille²) et la mortalité, quasi identique chez les femmes et les hommes. Cette courbe a l'aspect d'un J et montre clairement que la mortalité augmente avec l'IMC par rapport au poids idéal [1] (Fig. 1).

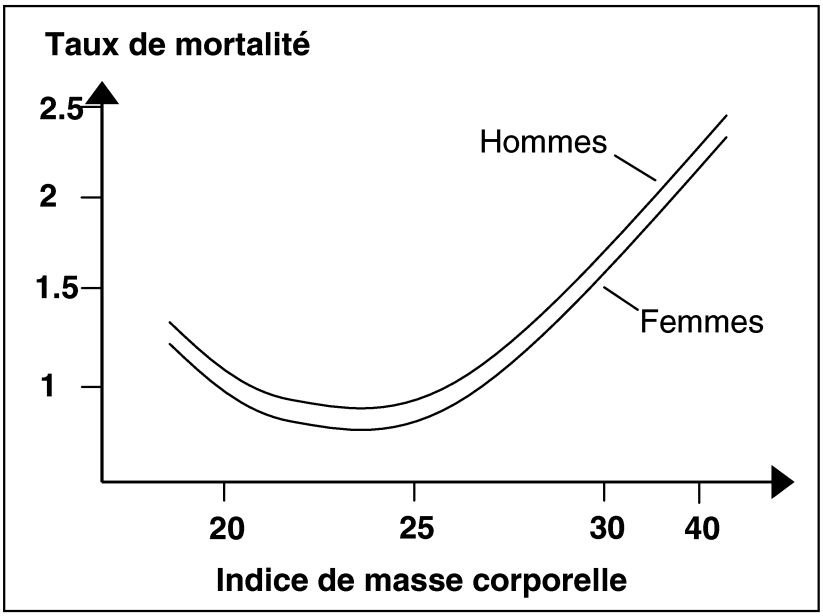


Fig. 1 : Relation entre l'IMC et le taux de mortalité (d'après Bray 1987).

Ce sont essentiellement les études Intersalt, MONICA et NANHES qui ont permis une approche plus globale de l'obésité au niveau mondial. Dans les années 80, l'étude MONICA a évalué que plus de 10 % des adultes d'âge moyen (35-65 ans) étaient obèses. En 1997, l'OMS a estimé dans son rapport que la prévalence de l'obésité en Europe était de 15 à 20% dans une population d'âge moyen [2]. La prévalence de l'obésité et du surpoids est de 2 % au Japon, de 11 % en Grèce, 14 % en Finlande, 28 % en Italie, 32 % aux Pays-Bas, elle s'élève jusqu'à 63 % aux Etats-Unis [3]. En 1999, l'étude NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) révélait que 34 % des américains étaient considérés en surpoids et 27 % étaient obèses [4] (Fig. 2). Encore plus inquiétant, dans le pays le plus peuplé du monde, la Chine, la prévalence du surpoids et de l'obésité est passée de 9.7 % à 14.9 % dans les zones urbaines contre 6.8 % à 8.4 % dans les régions rurales [5].

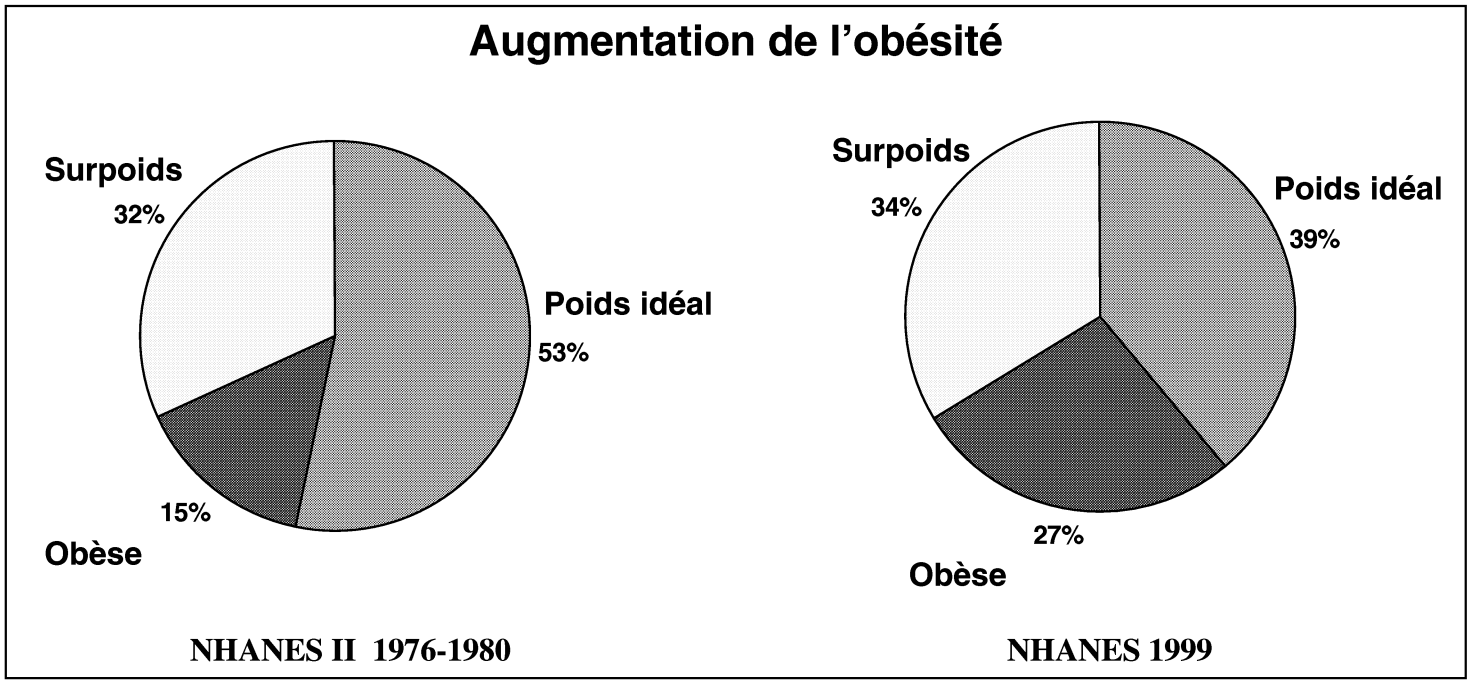


Fig. 2 : L'obésité dans le monde. Etudes NHANES en 1976 et 1999 (d'après Saydah 2001).

En 1999, l'obésité a été évaluée comme étant responsable d'environ 325 000 décès par an aux Etats-Unis [6-8]. Le coût de l'obésité a été estimé selon les pays entre 2 % et 8 % des

dépenses totales de santé [9]. Près de 27 % des maladies cardio-vasculaires sont diagnostiquées chez des individus obèses, et dans 70 % des cas, ces maladies cardiaques sont attribuables à l'obésité. En 1999 aux Etats-Unis, le coût direct de l'obésité était estimé à 70 milliards de dollars et pour 75 % ces coûts sont attribués aux maladies cardiaques, au diabète de type 2 et à l'hypertension [10]. Ces aspects économiques semblent suggérer que les dépenses de santé augmentent avec l'IMC moyen d'une population. En France, en 1992, le coût direct associé à l'obésité était estimé à 11.89 milliards de francs et les coûts indirects à 0.557 milliards de francs ce qui représente 2 % des dépenses de santé.

Mais les études montrent que l'obésité centrale est un paramètre plus fort que l'IMC dans le risque de décès dû à un accident coronaire, même en cas d'un surpoids faible [11-14]. Ceci suggère qu'il peut exister une sous-évaluation de la population dite « à risque » d'un point de vue cardio-vasculaire par rapport aux problèmes de surpoids. Or, Il a été estimé en 2002 qu' à ce rythme aux Etats-Unis, en 2030 90 % des adultes américains seraient obèses [15].

I. 2. OBESITE ET HYPERTENSION ARTERIELLE (HTA)

L'HTA est un facteur de risque reconnu de maladies cardio-vasculaires. La présence d'une HTA augmente d'un facteur 2 les risques de maladies coronaires, 3.8 fois le risque d'AVC et 4 fois le risque d'insuffisance cardiaque congestive [16,17].

Selon l'OMS l'hypertension débute au-delà de 140 / 90 mmHg. Mais pour certaines populations à risque, comme les diabétiques et les obèses, le risque paraît augmenter pour des valeurs de pression artérielle en dessous des valeurs définies comme pathologiques [18]. De nombreuses études épidémiologiques représentatives de différentes populations ont démontré une relation directe entre l'obésité et l'hypertension artérielle : toutes démontrent que le surpoids multiplie par 3 la survenue d'une HTA et que l'obésité la multiplie par 6 [19-27]

I. 3. HYPERTROPHIE VENTRICULAIRE GAUCHE, ARRYTHMIES & INSUFFISANCE CARDIAQUE

Les études sur les frères jumeaux ont rapporté que, dans 60 % des cas, les variations de la masse ventriculaire gauche sont attribuables à des facteurs génétiques héréditaires intrinsèques à chaque individu sans compter les polymorphismes génétiques au niveau du gène de l'enzyme de conversion [28-30]. Les données de l'étude FRAMINGHAM ont clairement démontré que l'HVG est un prédicteur de maladies cardio-vasculaires [31,32]. L'HTA favorise le développement de l'HVG, de l'insuffisance cardiaque (facteur 5), de l'insuffisance coronarienne et augmente le risque de mort subite [33-36]. Ceci est formellement démontré pour l'HVG et pour l'insuffisance cardiaque, qui régressent sous traitement antihypertenseur. La prévalence de l'HVG augmente avec l'âge, la présence d'un diabète, et est 10 fois plus forte chez les patients hypertendus [37-39]. Les résultats des études échographiques systématiques chez des patients normotendus ont permis de montrer une corrélation étroite entre l'IMC et la présence d'une HVG chez les hommes ($r = 0.41$) et chez les femmes ($r = 0.52$) [40-44]. Il a été également montré que toute perte de poids chez les patients obèses hypertendus contribuait directement à une régression de l'HVG [45,46]. Mais l'HVG n'est pas seulement liée à l'IMC, elle dépend aussi de la distribution de la masse adipeuse. Il existe une relation entre la masse cardiaque et la masse adipeuse viscérale intra-abdominale. Récemment, il a été montré que la prévalence de l'HVG était encore plus flagrante chez les patients hypertendus ou obèses si les masses du VG étaient indexées à la masse maigre [47,48]. La prévalence de l'HVG est 16 fois plus élevée chez les obèses (IMC 30 $kg.m^{-2}$) et 6 fois plus forte chez les patients en surpoids ($26 < IMC < 30$) que chez les individus minces [49-51]. Plus généralement, selon les critères de l'étude *FRAMINGHAM,* 65 % des individus en surpoids ont une HVG et 76 % des obèses possèdent une HVG. En définitif, il est admis que le niveau de l' IMC est le meilleur indice prédicteur de la présence d'une HVG au-delà de la mesure de la pression artérielle systolique

et diastolique [52]. Selon la durée et la sévérité de l'obésité, toutes les cavités cardiaques sont dilatées à différents degrés [53].

A terme, les conséquences de l'HTA, l'obésité puis le développement consécutif d'une HVG sont accompagnés par l'apparition d'une insuffisance cardiaque congestive. Chez les individus qui présentent une obésité depuis au moins 25 ans, la probabilité d'apparition d'une insuffisance cardiaque congestive est de 93 % [54].

Les risques d'arythmies sont aussi augmentés chez les individus obèses ou en surpoids. Les patients obèses avec une HVG de type excentrique ont 30 fois plus de contraction ventriculaires prématurées [55]. De plus, la surcharge volumique classiquement présente chez les patients obèses occasionne également une augmentation des fibrillations auriculaires. La durée de l'espace QT mesurée par la valeur QTc est aussi augmentée de 25 % chez les patients obèses. Toutefois, les individus avec une obésité abdominale ont un risque encore plus augmenté que les individus présentant une adiposité périphérique [56]. Enfin, il faut noter qu'il a été estimé que sur 28 patients avec une obésité de type morbide (32 < IMC), 22 succomberont par mort subite. Il est convenu que ces décès sont causés par la dilatation et l'hypertrophie du ventricule gauche qui sont connus comme les déclencheurs d'arythmies [57].

Du point de vue épidémiologique, ce tour d'horizon des pathologies associées à l'obésité met clairement en exergue que l'obésité constitue un facteur de risque cardiovasculaire indépendant de l'HTA ou même du diabète. Le développement même d'une HVG paraît indépendant de la présence ou non d'une HTA et plus spécifiquement associé à l'IMC. C'est pour ces raisons que ce mémoire de thèse entreprend de déterminer au niveau moléculaire s'il existe une spécificité cardiaque de l'obèse.

Nous commencerons par rappeler les caractéristiques moléculaires du cardiomyocyte en les inscrivant dans la physiologie cardiaque. Puis à chaque thème, nous réaliserons un bilan des atteintes physiopathologiques cardiaques spécifiques à l'obésité.

II. PHYSIOPATHOLOGIE DU CŒUR DE L'OBESE

II. 1. HISTORIQUE

Dès l'Antiquité, Celsus et même Hippocrates remarquaient que les hommes corpulents étaient plus sujets à la mort subite que les hommes minces (Sprengell CJ London 1708, Chawick J 1950). L'hypothèse d'une relation entre obésité, cœur et mort subite fut énoncée dès 1806 par Corvisart (Corvisart JN 1806) mais il fallut attendre 1933 pour qu'une publication scientifique établisse pour la première fois un lien entre l'obésité sévère et l'insuffisance cardiaque [58]. Depuis, de très nombreux travaux se sont attachés à décrire les différents aspects des conséquences cardiaques de l'obésité en utilisant des approches variables souvent dépendantes de l'évolution des techniques d'exploration chez l'Homme.

Ainsi dans les années 1960 à 1980 une grande attention a été portée aux caractéristiques hémodynamiques montrant, par exemple, une augmentation significative du volume sanguin et plasmatique total, associée à une augmentation du débit cardiaque chez des patients atteints d'obésité morbide [59] puis chez des patients obèses hypertendus [60]. Ces observations ont été par la suite confirmées et enrichies par la mise en évidence de pressions de remplissage élevées et d'une diminution de la compliance du ventricule gauche [61,62]. Ces caractéristiques sont néanmoins réversibles en partie par une perte de poids [63]. C'est aussi durant cette période que furent développés les modèles de rat obèse Zucker (fa/fa), la souris obèse ob/ob et le rat obèse hypertndu SHR [64-67]. Les modèles de nutrition hyperlipidique chez le chien qui sont plus proches de la pathologie humaine ont aussi été développés à cette période [60].

Une étude pionnière chez des patients obèses insuffisants cardiaques a montré non seulement l'augmentation du débit cardiaque lié à l'obésité (par comparaison aux patients insuffisants cardiaques minces) mais aussi l'hypertrophie des myocytes par analyse

microscopique de biopsie endocardique [68]. Les premières études échocardiographiques et les méthodes radionucléiques ont permis d'identifier une augmentation du volume télédiastolique et un rapport anormal de l'épaisseur des parois en fonction du rayon des chambres ventriculaires, correspondant à une augmentation du stress pariétal [69]. Il a été aussi constaté une diminution fréquente de la fraction d'éjection et du taux de raccourcissement des fibres cardiaques indiquent une dysfonction systolique du VG. Les études Framingham de 1991 ont aussi trouvé un parallèle entre l'augmentation de la masse du VG avec l'IMC [42,70]. Ces dysfonctions diastoliques (diminution des vitesses de remplissage du VG) conduisent à une augmentation de la contribution atriale pour le remplissage du VG [71]. C'est alors que la notion de cardiomyopathie de l'obèse a été postulée. Ces études échocardiographiques ont confirmé l'augmentation de la masse cardiaque chez tous les patients obèses morbides avec ou sans hypertension artérielle [72]. De plus, les types morphologiques d'hypertrophies cardiaques ont été étudiés et classés en HVG excentrique chez les patients obèses hypertendus [73].

Enfin, en 1985 les premières études se penchant sur l'influence de la durée de l'obésité ont mis en évidence une corrélation positive entre la durée de l'obésité et les dimensions du VG, le rayon des chambres cardiaques, l'épaisseur des parois et la présence d'un accident cardio-vasculaire [74]. Les paramètres suivants : épaisseur des parois du VG, stress pariétal en fin de systole et débit cardiaque s'avèrent tous augmentés significativement chez les patients obèses depuis plus de 15 ans comparés à des patients devenus récemment obèses [75].

Mais les modifications hémodynamiques ne peuvent pas expliquer à elles seules les troubles associés au développement d'une hypertrophie cardiaque chez l'obèse. Outre les facteurs génétiques propres à l'obèse, il a été rapidement suggéré que l'insulino-résistance pouvait être un facteur indépendant contribuant à l'augmentation de la masse du VG chez les patients obèses non diabétiques ce qui impliquait dès lors des investigations au niveau moléculaire [76].

II. 2. ANOMALIES DU METABOLISME CARDIAQUE

Le cœur dispose de 2 sources majeures d'énergie : les carbohydrates et les acides gras libres. Dans les périodes de jeûne, entre les repas, les acides gras libres sanguins s'élèvent et deviennent la source privilégiée et principale du cœur au travers de leur dégradation dans la β-oxydation [77,78]. Quand les acides gras sont utilisés, la glycolyse est inhibée et le glucose assimilé est stocké sous forme de glycogène : il s'agit de l'effet économiseur de glucose du cycle de Randle [79].

Dans les périodes de prise alimentaire ou post-prandiales, quand le niveau de glucose circulant est élevé dans le sang, le niveau d'acides gras libre diminue. L'assimilation des acides gras par le cœur diminue et l'inhibition sur la glycolyse décroît. A son tour la glycolyse a un effet directement inhibiteur sur l'oxydation des acides gras libres

Après un repas riche en lipides, la lipidémie postprandiale augmente sous forme d'une augmentation des triglycérides sanguins. Ces triglycérides sont convertis en acides gras libres par la lipoprotéine lipase. Durant l'exercice soutenu, les taux de lactate sanguins augmentent et deviennent par ailleurs la nouvelle source d'énergie. Mais le lactate inhibe la glycolyse et l'assimilation des acides gras, lesquels contribuent respectivement dans l'apport énergétique à hauteur de 15 % et 20 %. Lors d'un jeûne sévère, les corps cétoniques contribuent significativement au métabolisme énergétique cardiaque ou aussi lors des cas d'acidose diabétique. Lors de l'état nourri, le glucose et l'insuline empêchent ce relarguage d'acides gras libres et le glucose devient la source d'énergie majoritaire. La contribution de ces sources d'énergie varie de minute en minute, selon l'activité et selon les apports alimentaires.

II. 2. 1. Assimilation du glucose & glycolyse myocardique

Le glucose est assimilé dans les cellules cardiaques au travers des transporteurs GLUT 4 et GLUT 1 [80]. Aucune énergie n'est requise pour le transport du glucose puisque les

concentrations de glucose dans l'espace extracellulaire sont plus fortes que dans le cytosol. L'assimilation du glucose augmente lorsque le travail cardiaque augmente, lors de l'état postprandial ou durant l'hypoxie voire l'ischémie. Toutes ces conditions contribuent aussi à augmenter la glycolyse. A contrario, l'assimilation du glucose est réduite lorsque le travail musculaire cardiaque est faible, durant les phases de jeûne. De plus, lors des phases post-prandiales, l'insulinémie augmente et contribue à la translocation des transporteurs du glucose GLUT 1 et GLUT 4 vers l'extérieur du sarcolemme [81]. L'insuline stimule aussi la synthèse de glycogène et la synthèse protéique via la PI_3Kinase [82,83]. La transduction du signal insuline est complexe. La PI_3Kinase stimule les docking protéines IRS 1-4 (*Insulin Receptor signal*) et la PK_B vers la GSK-3β (*Glycogen Synthase Kinase*) qui régule la *Glycogen synthase*, mais module aussi la traduction au travers du facteur eIF-4E (*eucaryotic translation Initiation Factor 4E*) via la voie FRAP/mTOR, et la Kinase S6 p70 [84-90] (Fig. 3).

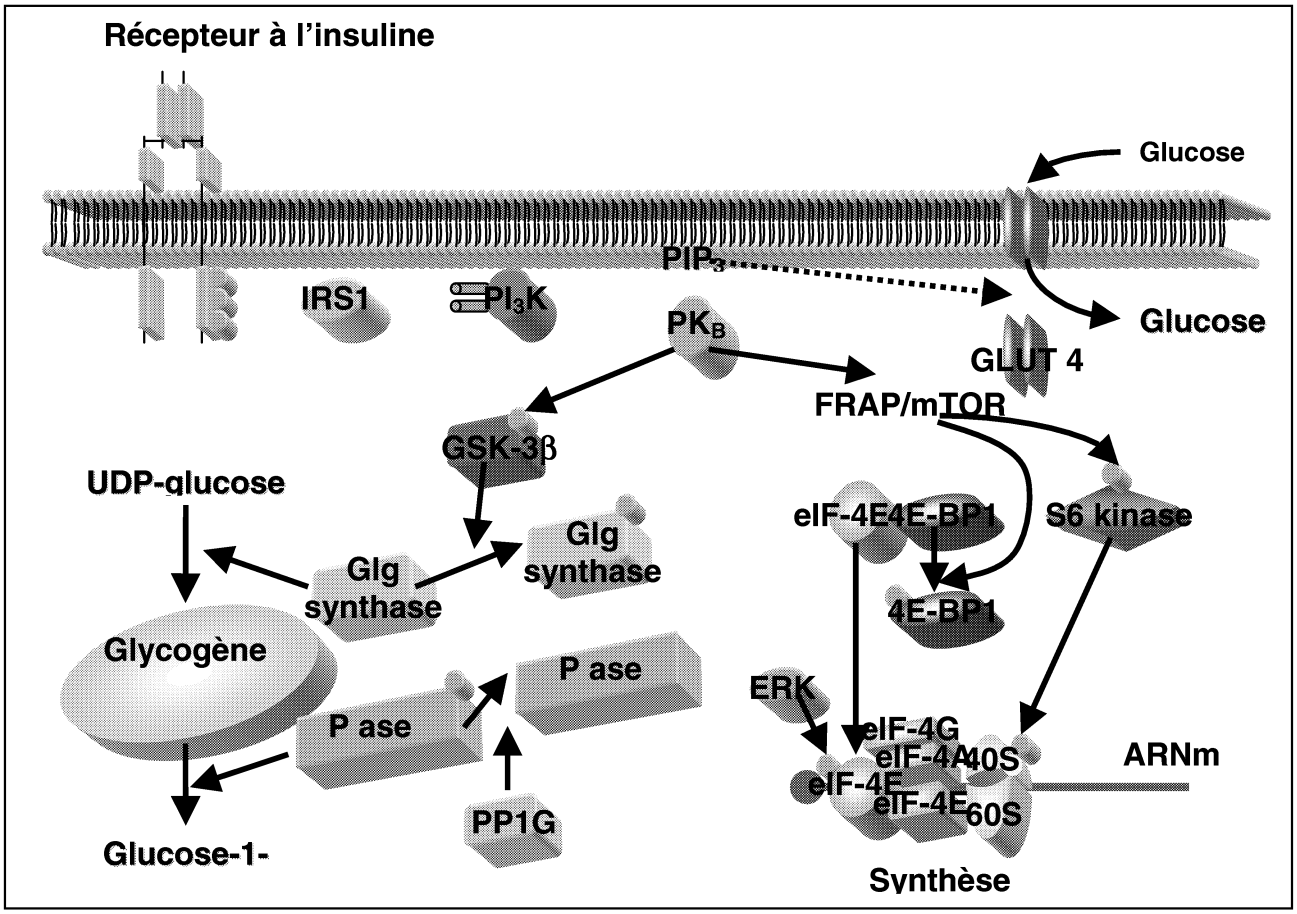


Fig. 3 : Transduction du signal du récepteur à l'insuline. Pase : Phosphatase, Glg : Glycogène. PP1G : Phosphorylase 1 G. GSK-3β : *Glycogen Synthase Kinase*.

Enfin, la glycolyse produit de l'ATP et alimente le cycle de Krebs en phase aérobie. Mais dans le cardiomyocyte, le glucose cytosolique est très rapidement converti en Glucose-6-phosphate. Ainsi, il peut être orienté soit vers le stockage sous forme de glycogène soit catabolisé dans la glycolyse. L'activité de la glycolyse est essentiellement régulée au niveau de PFK-1 (Fructose-1,6-bisphosphate Kinase 1) et de la PDH (Pyruvate deshydrogenase)(Fig. 4). Par exemple, lorsque le travail cardiaque augmente comme sous l'action d'agents inotropes positifs, l'assimilation de glucose augmente, les taux intracellulaires de glycogène diminuent et l'activité de PFK-1 et de la PDH augmente. Alors que l'ischémie a des effets inverses. D'autre part, le Fructose-2,6-bisphosphate, produit par la PFK-2, active la PFK-1 tandis que le Fructose-2,6-bisphosphate inhibe l'activité de la Fructose-1,6-bisphosphatase. Cette molécule a aussi la capacité la capacité de surmonter l'effet inhibiteur de l'ATP et du citrate. La PFK-2 est elle-même activée par l'insuline ou le travail cardiaque [91].

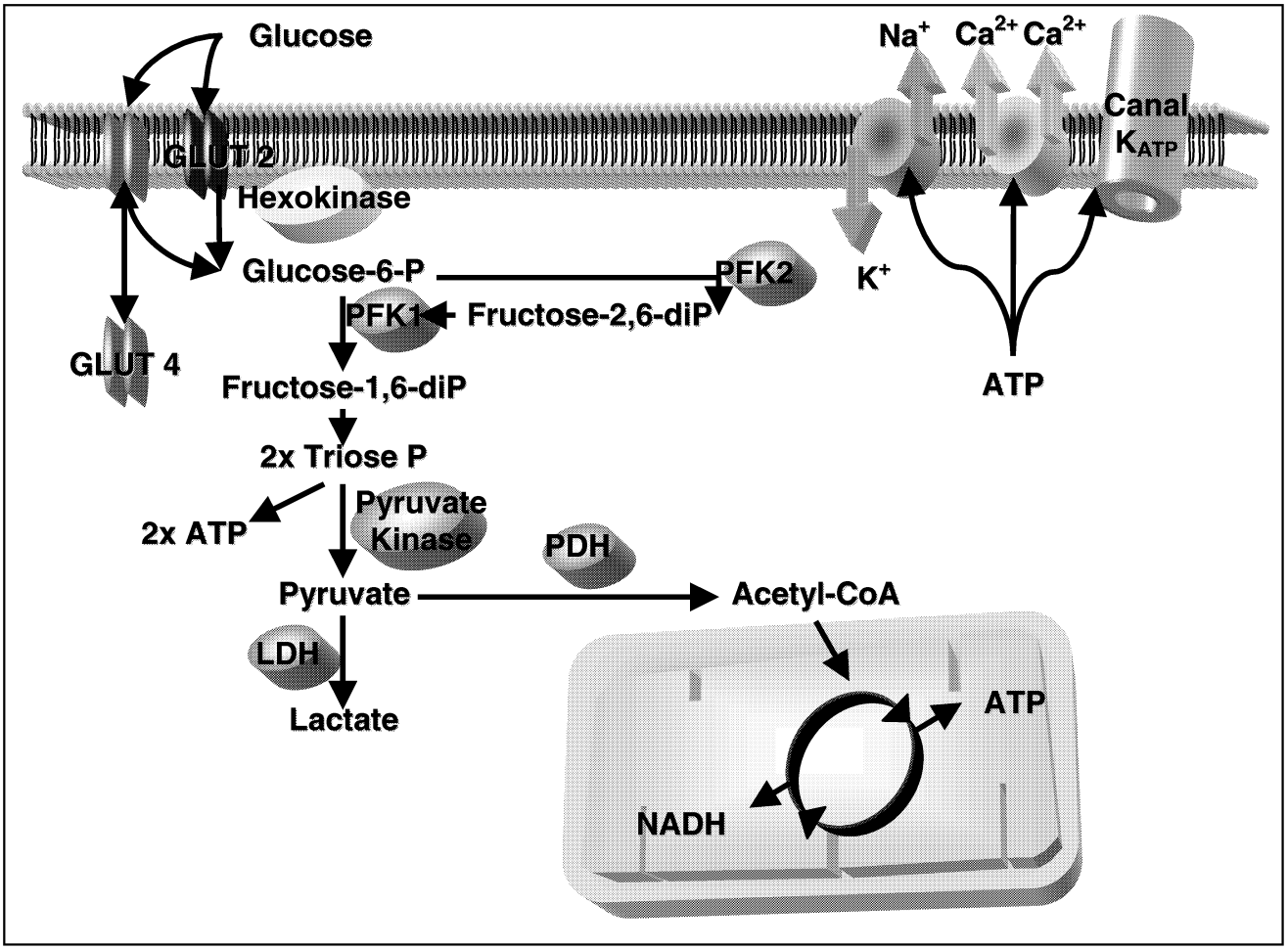


Fig. 4 : La glycolyse. PFK : Phosphofructokinase. PDH : Pyruvate deshydrogenase. LDH : Lactate deshydrogenase.

Néanmoins, durant les conditions normales d'aérobie le cœur consomme principalement des acides gras ou du lactate et la fonction de la glycolyse aérobie dans ces conditions reste une énigme. Mais la glycolyse est une voie énergétique importante pour le cœur puisqu'il peut fournir plus de 30 % des besoins énergétiques lors de la phase post-prandiale. Lorsque le travail cardiaque augmente au cours de l'exercice, le flux de la glycolyse augmente dans les 5 secondes et le glucose provient probablement des stocks de glycogène intracellulaire. Une autre fonction envisagée de la glycolyse dans le cœur serait de maintenir les taux d'ATP nécessaires pour la fonction de la pompe Na^+. Ce rôle a été proposé dans le cadre de l'ischémie au niveau de l'activité des canaux K-ATP sensibles [92,93].

II. 2. 2. Utilisation du lactate

Le cœur a aussi la capacité de métaboliser le lactate. Le lactate provient du pyruvate non métabolisé dans le cycle de Krebs en phase anaérobie. La contribution du lactate dans les besoins énergétiques cardiaques peut s'élever à 60 %. Mais la majeure partie du temps la PDH est inactive mais elle peut être activée lors de l'augmentation du travail cardiaque par les catécholamines [94]. Mais paradoxalement, la PDH et inhibée par le $NADH_2$ produit lors de l'ischémie ou de l'hypoxie ou encore plus simplement lors de l'oxydation des acides gras en aérobie. C'est justement par l'inhibition de la PDH que la glycolyse est inhibée lorsque le cardiomyocyte catabolise les acides gras dans la voie de la β-oxydation seulement en phase aérobie puisque cette étape s'effectue au niveau mitochondrial [95]. Le lactate est donc produit seulement en anaérobie et peut d'ailleurs être utilisé comme un indicateur sanguin d'ischémie cardiaque [96]. Cette capacité particulière du cœur à métaboliser le lactate provient de son activité LDH de type H (ou LDH 1 ou α-hydroxybutyrate deshydrogenase ou lactate deshydrogenase). En cas d'infarctus du myocarde, on estime d'ailleurs l'étendue des lésions

en mesurant les taux de LDH 1 relargués dans le sang 35 à 43 heures après l'apparition des symptômes [97].

II. 2. 3. Catabolisme des acides gras dans le cœur

Les acides gras à longue chaîne constituent la source majeure de production d'ATP dans le cœur adulte alors que dans le cœur fœtal, qui fonctionne dans un environnement relativement hypoxique, le glucose et le lactate sont les sources majeures d'énergie. La transition vers un métabolisme majoritairement basé sur les acides gras débute immédiatement après la naissance avec l'alimentation lactée. Dès lors, le niveau d'expression des gènes codant pour les enzymes mitochondriales de la β-oxydation augmente. Dans le cœur, les capacités de stockage des lipides sont limitées et dans les conditions physiologiques la plupart des acides gras est entièrement oxydée. La β-oxydation se déroule majoritairement dans les mitochondries bien qu'il existe ce type de voie dans les peroxysomes mais à un degré extrêmement faible. Le métabolisme des acides gras par le cœur débute au niveau de la circulation par la liaison des acides gras à l'albumine. Les acides gras traversent le sarcolemme, liés au niveau intracellulaire à des protéines de liaison : *fatty acid binding protein* [98]. Les acides gras à longue chaîne sont assimilés dans le cardiomyocyte au travers de 2 transporteurs : les *fatty acid transporters protein* (FATP) [99] et / ou la *fatty acid translocase* (FAT) / CD36 [100]. Une fois dans le cytoplasme, les acides gras longue chaîne sont pris en charge par un transporteur spécifique du cœur : la *heart-type fatty acid binding protein* (H-FABP) [101]. Les acides gras sont rapidement estérifiés en acyl-coA par une *acyl-coA long chain synthetase* (LCAS) et transportés dans la mitochondrie par la *carnithine palmitoyltranferase I* (CPT I) suivi d'une translocation au travers de la membrane interne par la *carnithine/acyl translocase*. Le taux et l'activité de CPT I constitue l'étape limitante du flux de la β-oxydation et cette enzyme est hautement régulée au niveau transcriptionnel [102-105] et au

niveau post-transcriptionnel via l'effet inhibiteur du malonyl-coA, premier intermédiaire de synthèse des acides gras [106]. Il existe 2 isoformes de la CPT I exprimées dans le cœur, la L-CPT I/CPT I α, qui prédomine au moment de la naissance, et la M-CPT I / CPT I β, qui couvre plus de 90 % de l'activité CPT I dans le cœur adulte [103]. Après la translocation au travers de la membrane interne mitochondriale, les acylcarnithines à longues chaîne sont réestérifiées en dérivés d'acyl-coA par les CPT II puis entrent dans la chaîne de β-oxydation (Fig. 5). La première étape de la β-oxydation est catalysée par les enzymes de la famille des acyl-coA deshydrogénases (AD) spécifiques des acides gras à très longue chaîne (VLCAD), longue chaîne (LCAD), à moyenne chaîne (MCAD) et à courte chaîne (SCAD). Les étapes suivantes reposent sur des hydratations par des enoyl-coA hydratases avec une seconde oxydation par la 3-hydroxyacyl-coA deshydrogénase et un clivage thiolytique par la 3-cetoacyl-coAthiolase qui produit des acetyl-coA et des acyl-coA destinés aux étapes d'oxydation suivantes. La 1ère et la 3ième étape de la β-oxydation génèrent un flux d'électrons qui sont transférés dans la chaîne de transport des électrons ce qui permet de générer un gradient électrogénique destiné à la synthèse de l'ATP en présence d'O_2 (Phosphorylation oxydative). Les acétyl-CoA produits en fin de chaîne sont oxydés via le cycle des acides tricarboxyliques. Ainsi, l'oxydation des acides gras comprend une réaction cyclique (ou hélice de Lynen) avec de grandes capacités de production d'ATP mais lors de consommation d'oxygène supérieures c'est le glucose qui est oxydé. De nombreuses mutations parmi ces enzymes ont été identifiées, comme des mutations dans le gène de la MCAD et la VLCAD qui induisent des déficiences métaboliques d'apparition précoce avec hypoglycémie, dysfonction hépatique et cardiomyopathie à l'origine de mort subite [107]. Des études post-mortem du cœur et du foie de jeunes enfants ayant des déficiences héréditaires dans les gènes responsables de l'oxydation des acides gras révèlent l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans ces tissus.

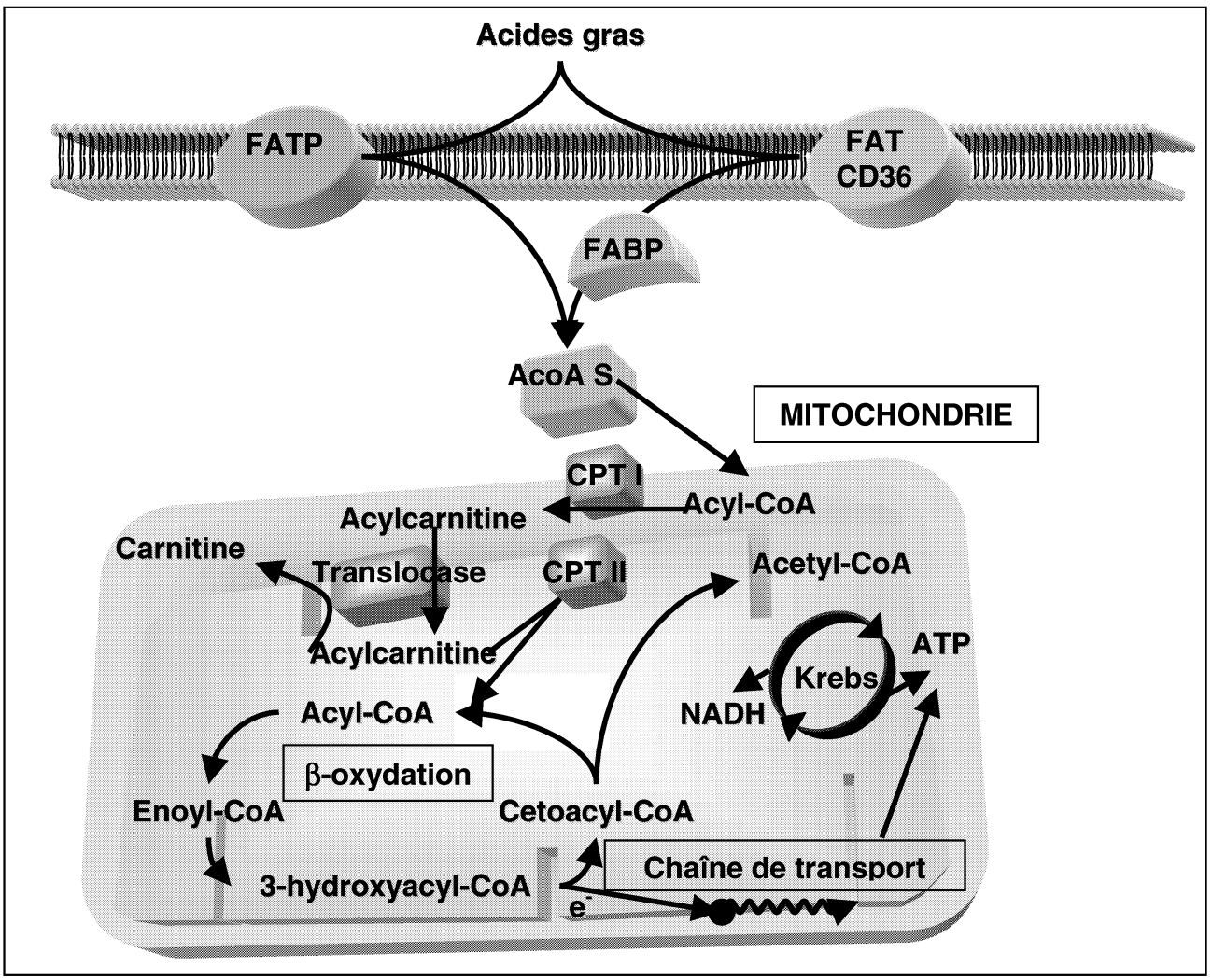


Fig. 5 : La β oxydation. CPT : Carnithine palmitoyltranferase. AcoA S : Acyl CoA synthase FATP : *Fatty acid transporters protein*. FAT : *Fatty acid translocase* FABP : *Fatty acid binding protein*

Les acides gras non activés peuvent être transformés en lipides structuraux ou stockés sous formes de triglycérides et constituent une réserve d'énergie [80]. Enfin, un facteur de transcription contrôle l'expression des gènes de la β oxydation : *Peroxysome Proliferator Activator receptor* α (PPARα) [108].

III. 2. 4. Métabolisme énergétique cardiaque et obésité

Chez le rat Zucker obèse, il a été montré que le pool de triglycérides myocardique endogène des rats Zucker obèses peut fournir de 80 à 90% de l'énergie cardiaque [66,109-111]. Il a même été envisagé qu'il existait un défaut général dans le métabolisme glucidique et lipidique

des cellules cardiaques de rat obèse Zucker. D'autre part, selon le mécanisme d'économie du glucose [79,112] l'augmentation du métabolisme des acides gras produit des taux élevés de citrate et d'acétyl-coA, qui sont des inhibiteurs du métabolisme glucidique. On retrouve justement des taux élevés de citrate dans le cœur des rats obèse Zucker, qui inhibent la phosphofructokinase (PFK-1) [110]. En conséquence, le niveau basal de la PFK-1, ou même sous stimulation adrénergique, reste très bas dans le cœur des rats obèses Zucker [113]. Finalement, l'obésité chez les rats Zucker induit une diminution sévère de la glycolyse et du catabolisme du glycogène. Ainsi, vu que le flux de la glycolyse est très diminué via l'inhibition de la PFK-1, le glucose est préférentiellement converti en glycogène. C'est précisément ce qui a été démontré dans le cœur des rats obèses Zucker, le niveau de glycogène y est plus élevé que dans le cœur de rats minces Zucker [110]. Néanmoins, en dépit de l'altération du métabolisme des acides gras, les niveaux de phosphate de haute énergie dans le cœur des rats obèses Zucker restent à des taux comparables à ceux du cœur de rat mince Zucker [110].

Enfin, les facteurs de transcription de la famille PPAR et PGC 1 (*PPAR γ Coactivator 1*) deviennent des éléments clefs dans le cadre du syndrome X, reliant l'obésité, l'hypertension et le diabète. Leur implication dans les dysfonctions du métabolisme cardiaque de l'obèse, en phase d'hypertrophie notamment, devient de plus en plus évidente [108,114,115].

II. 3. ANOMALIES DU CONTRÔLE VEGETATIF

L'implication du système nerveux autonome (SNA) chez le patient hypertendu et chez l'obèse hypertendu a été largement montrée [116]. Cette implication a été démontrée au travers des anomalies de la variabilité sinusale de patients obèses mais aussi très souvent au travers d'une tachycardie manifeste [117]. Les anomalies de l'activité du SNA cardiaque reposent sur une réalité moléculaire.

Par définition, le système nerveux autonome agit indépendamment de la conscience du système nerveux central. Il se divise en 2 systèmes opposés dans leurs actions et utilisent des neurotransmetteurs différents. Le système orthosympathique, de type adrénergique, a la capacité de sécréter de la noradrénaline qui stimule positivement l'activité cardiaque. Le système parasympathique, ou vagal, s'oppose au système adrénergique en diminuant de manière générale l'activité cardiaque et le neurotransmetteur de ce système est l'acétylcholine.

II. 3. 1. Le baroréflexe

Quand la pression artérielle (PA) augmente de manière excessive, la distension des mécanorécepteurs de l'arc aortique déterminent une augmentation des impulsions vers les centres vasomoteurs du bulbe. En retour, ceux-ci augmentent l'activité vagale, diminuent le rythme et le débit cardiaque et ramènent ainsi la PA à des valeurs normales. Cet enchaînement permet d'expliquer le réflexe de bradycardie observé suite à une élévation de la PA induite pharmacologiquement par infusion de noradrénaline (Fig. 6).

A l'inverse, quand les efférences cardiaques du système orthosympathique sont stimulées (sans que les vaisseaux périphériques ne le soient), c'est l'effet β adrénergique qui prédomine. Le rythme cardiaque augmente brutalement ainsi que la pression ventriculaire gauche et sa contractilité. La PA augmente rapidement puisque le débit cardiaque augmente sans que le diamètre des vaisseaux ne change. Pendant l'exercice, la stimulation du système β-adrénergique cardiaque est accompagnée par des effets vasculaires de type α adrénergique qui conduisent à une vasoconstriction rapidement contrebalancée par les effets β adrénergiques périphériques vasodilatateurs.

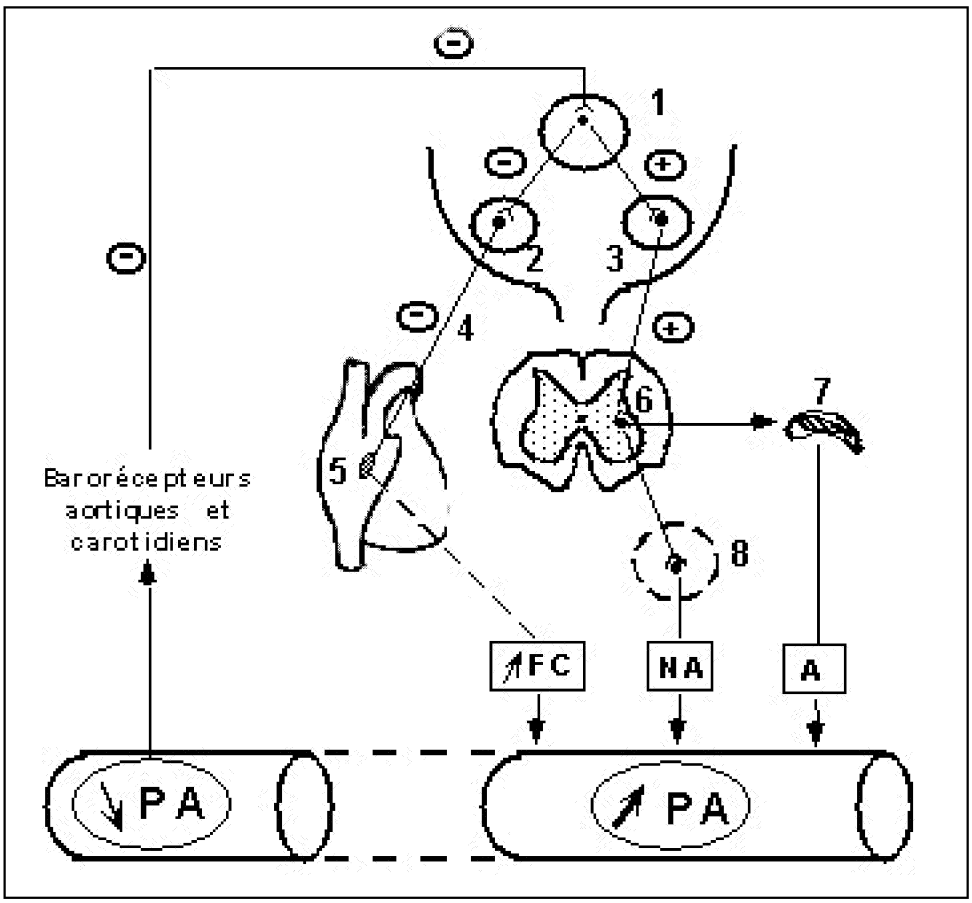


Fig. 6 : Fonctionnement de l'arc baroréflexe (d'après Beaune & Staat).

Les barorécepteurs aortiques et carotidiens perçoivent toute diminution de la PA et vont exercer un effet inhibiteur sur le centre bulbaire cardiovasculaire [1]. Ceci a pour conséquences :

• l'inhibition partielle du noyau viscéro-moteur dorsal du pneumogastrique [2], point de départ des fibres parasympathiques du nerf vague [4] aboutissant au nœud sinusal [5]. Cette inhibition du parasympathique cardiaque entraîne donc une tachycardie.

• l'activation du centre vasomoteur bulbaire [3] qui stimule, via la corne latérale de la moelle [6] :

- les surrénales [7] libérant de l'adrénaline [A],

- les chaînes ganglionnaires sympathiques libérant de la noradrénaline [NA] par la fibre post ganglionnaire.

Tachycardie et libération de catécholamines vasoconstrictrices aboutissent à une augmentation réflexe des valeurs de la PA.

II. 3. 2. Système orthosympathique et récepteurs β adrénergiques cardiaques

Le système orthosympathique innerve le tissu nodal, les oreillettes et le myocarde ventriculaire. Au niveau post-synaptique, le neuromédiateur est la noradrénaline. Néanmoins, selon l'intensité et la fréquence de l'influx nerveux, la noradrénaline peut être accompagnée de divers co-neurotransmetteurs tels que le Neuropeptide Y (NPY), le PYY , l'ATP ou des opioïdes.

Les récepteurs β adrénergiques sont prédominants au niveau cardiaque. C'est en particulier le sous-type β1-adrénergique qui prédomine tandis que le sous-type β2-adrénergique est présent dans des proportions moindres [118]. Chez l'Homme, il existe une population substantielle de récepteurs β 2 adrénergiques dans l'oreillette. Dans le VG de l'Homme, cette population a été évaluée à 20 % des récepteurs β [119]. Ces 2 sous-types sont impliqués dans la réponse inotropique positive. De plus, les 2 sous-types de récepteurs coexistent dans une même cellule ventriculaire [119]. La densité des récepteurs β1 varie selon les cavités cardiaques. Par exemple, cette densité est 7 à 8 fois plus élevée dans le nœud sinusal que dans l'oreillette ou dans le nœud atrio-ventriculaire [120]. Le sous-type β3-adrénergique a été cloné et mis en évidence au niveau cardiaque mais dans des proportions très faibles [121].

D'une manière générale, la transduction du signal β adrénergique se caractérise par une production d'AMPc cytoplasmique. En effet, les récepteurs β1 et 2 sont couplés positivement à l' adényl cyclase (AC) via une protéine G de type α s.

Suite à la stimulation β1–adrénergique, l'ensemble de cette séquence aboutit dans le cœur à une succession d'effets inotropes positifs, chronotropes positifs, dromotropes et relaxants dans un délai de 15 secondes [122].

- L'effet inotrope positif : Quand les récepteurs β1-adrénergiques sont stimulés, il en découle une augmentation du rythme cardiaque et de la force de contraction. La liaison de la noradrénaline sur les récepteurs β induit un changement de conformation du récepteur et la protéine G α s lie le GTP. La sous-unité αs active alors l'AC et hydrolyse le GTP en GDP. L'AC ainsi activée produit alors de l'AMPc qui va jouer le rôle de second messager pour activer la PK_A. Cette dernière phosphoryle les canaux Ca^{2+} de type L au niveau de l'extrémité C terminale dans la sous-unité α 1 [123]. Les canaux Ca^{2+} L ainsi activés laissent passer massivement le Ca^{2+} dans l'espace sarcoplasmique. Cette variation de concentration calcique intracellulaire déclenche à son tour un changement de conformation des récepteurs à la ryanodine à la surface du réticulum sarcoplasmique (RS) ce qui induit suramplification de l'augmentation de Ca^{2+} sarcoplasmique via les récepteurs à la ryanodine du RS. La troponine C possède un site spécifique de liaison au Ca^{2+}. Sous stimulation β–adrénergique, les taux intracellulaires de Ca^{2+} peuvent être multipliés localement par 100. L'équilibre étant rompu, le Ca^{2+} se fixe avec une plus forte affinité à la troponine C, pour des concentrations intracellulaires en Ca^{2+} voisines de 10^{-5} mol.l-1 [124,125]. Il en résulte un déplacement de la tropomyosine et une interaction actine / myosine entraînant la contraction des myofilaments [126-129]. De plus, il a été rapporté que les taux croissants de Ca^{2+} intracellulaires favorisent l'activité ATPase de la myosine [130]. La PK_A contribue également à activer le métabolisme énergétique cardiaque comme la glycolyse la lipolyse et le cycle de Krebs. Tous ces paramètres contribuent à l'augmentation de la force de contraction (Fig. 7).

- L'effet lusitropique :

La PK_A agit également sur la troponine I ce qui entraîne une diminution de la sensibilité de la troponine C pour le Ca^{2+} [131]. Les myofilaments sont alors moins sensibles à l'action du Ca^{2+}. De plus, la PK_A phosphoryle également le phospholamban ce qui lève l'inhibition sur la

pompe du RS, SERCA-2, et donc favorise le repompage du Ca^{2+} du cytosol vers le RS (Fig. 8).

D'un point de vue pharmacologique, la différence dans la magnitude de la réponse adrénergique d'un tissu dépend de sa densité en récepteurs β. Par exemple, les agonistes β1–adrénergiques comme la dobutamine ont un effet plus inotrope positif que chronotrope puisque les ventricules ont une plus grande densité β 1 que le nœud sinusal qui possède les 2 types β1 et 2. A l'inverse, les agonistes β 2 adrénergiques causent majoritairement une tachycardie.

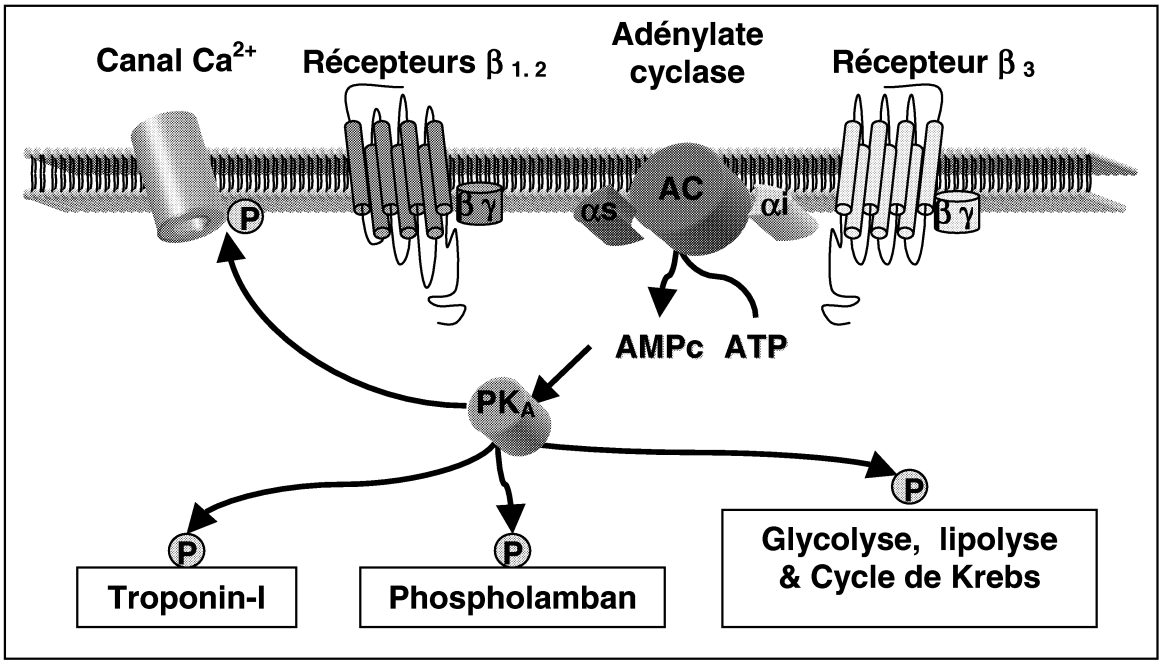


Fig. 7 : La transduction du signal des récepteurs β adrénergiques.

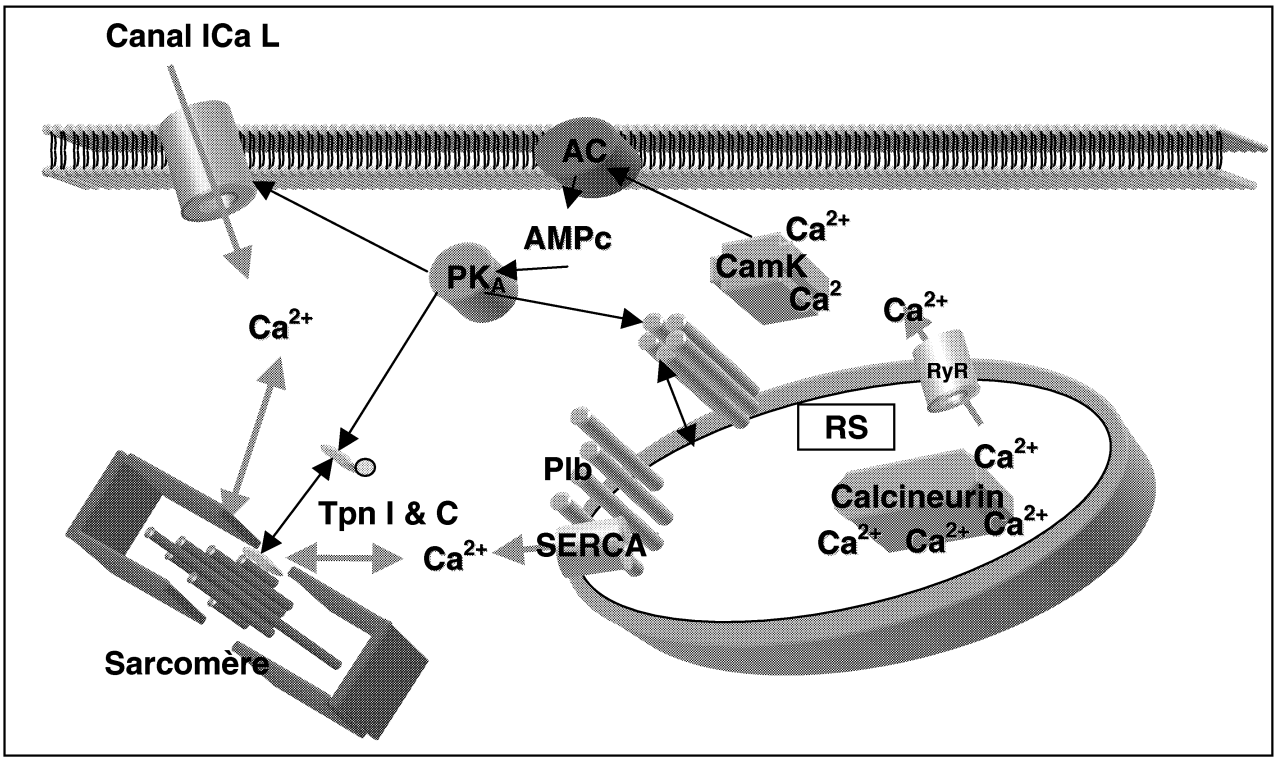


Fig. 8 : Mécanisme de SERCA 2 et du Phospholamban (Plb) dans la gestion du Ca^{2+}. RS : Réticulum sarcoplasmique, Cam K : Calmoduline kinase. Tpn : Troponine. RyR : Recepteur à la ryanodine. AC : Adénylate cyclase. PK_A : Protéine kinase A.

II. 3. 3. Système parasympathique et récepteurs muscariniques cardiaques

L'acétylcholine est le neurotransmetteur du système nerveux parasympathique. Au niveau du cœur de tous les mammifères, c'est le sous-type M_2 qui prédomine. Au niveau atrial, l'acétylcholine diminue la force de contraction endogène ou induite par une stimulation β adrénergique [132,133]. Mais au niveau ventriculaire, cette action inotrope et chronotrope négative n'est observable qu'après une stimulation β–adrénergique. Les différences d'effets, observées entre le ventricule et l'oreillette, pourraient être liées à l'innervation parasympathique plus développée au niveau des nœuds sino-atrial et atrio-ventriculaire qu'au niveau du VG [132].

La stimulation des récepteurs M_2 diminue l'activation de l'AC préstimulée par la noradrénaline. En effet, d'une part le récepteur M_2 est couplé à la protéine α i inhibitrice sur l'AC, et d'autre part les sous-unités β–γ de la protéine Gi se dissocient pour stimuler l'activité GTPase. Dans le tissu nodal, l'acétylcholine active les canaux potassiques rectifieurs retardés

soit par l'intermédiaire des sous-unités α i, soit par l'intermédiaire des sous-unités β–γ [134]. Il en résulte une hyperpolarisation, un ralentissement de la fréquence cardiaque, une diminution de la durée du potentiel d'action, une diminution du courrant calcique ICa L et une réduction de la force de contraction [132]. Au niveau ventriculaire, la réceptivité muscarinique semble moins importante que dans l'oreillette. En effet, malgré une densité en récepteurs M_2 similaire, la transduction du signal est différente et particulièrement au niveau du couplage de la protéine G [135].

Il a été montré que la stimulation des récepteurs M_2 conduit non seulement à la réduction des concentrations en AMPc intracellulaire mais aussi à l'augmentation du GMPc intracellulaire [136]. La conséquence est une inhibition des canaux Ca^{2+} de type L par l'intermédiaire de l'activation d'une protéine kinase GMPc dépendante [137,138] et une ouverture des canaux K^+ rectifieurs retardés. En outre, il apparaît évident que les récepteurs cholinergiques sont liés à l'activation de la guanylate cyclase, tout comme les récepteurs β–adrénergiques sont couplés à l'AC. En général, l'AMPc et le GMPc ont des effets opposés dans le cœur, par exemple l'AMPc induit l'ouverture des canaux calciques de type L tandis que le GMPc s'oppose à cet effet au travers de l'activation de PK_G induisant des phosphorylations inhibitrices sur ce canal [139].

Dans le myocarde, la production de GMPc stimule la PK_G ce qui induit un effet chronotrope et inotrope négatif [138]. La stimulation cholinergique induit l'activité de la NO synthase constitutive [140]. La production endogène de NO engendre la stimulation de la Guanylate cyclase cytosoluble (GC). Le GMPc ainsi produit active la PK_G ce qui conduit à la diminution des courants calciques de type L [140] (Fig. 9). Il a été également rapporté que le GMPc ainsi produit pourrait aussi activer une phosphodiestérase de type 2 ou 3 [140]. Cette enzyme ayant pour rôle de dégrader l'AMPc, ceci expliquerait le mécanisme intracellulaire par lequel l'acétylcholine s'oppose aux effets β–adrénergiques cardiaques.

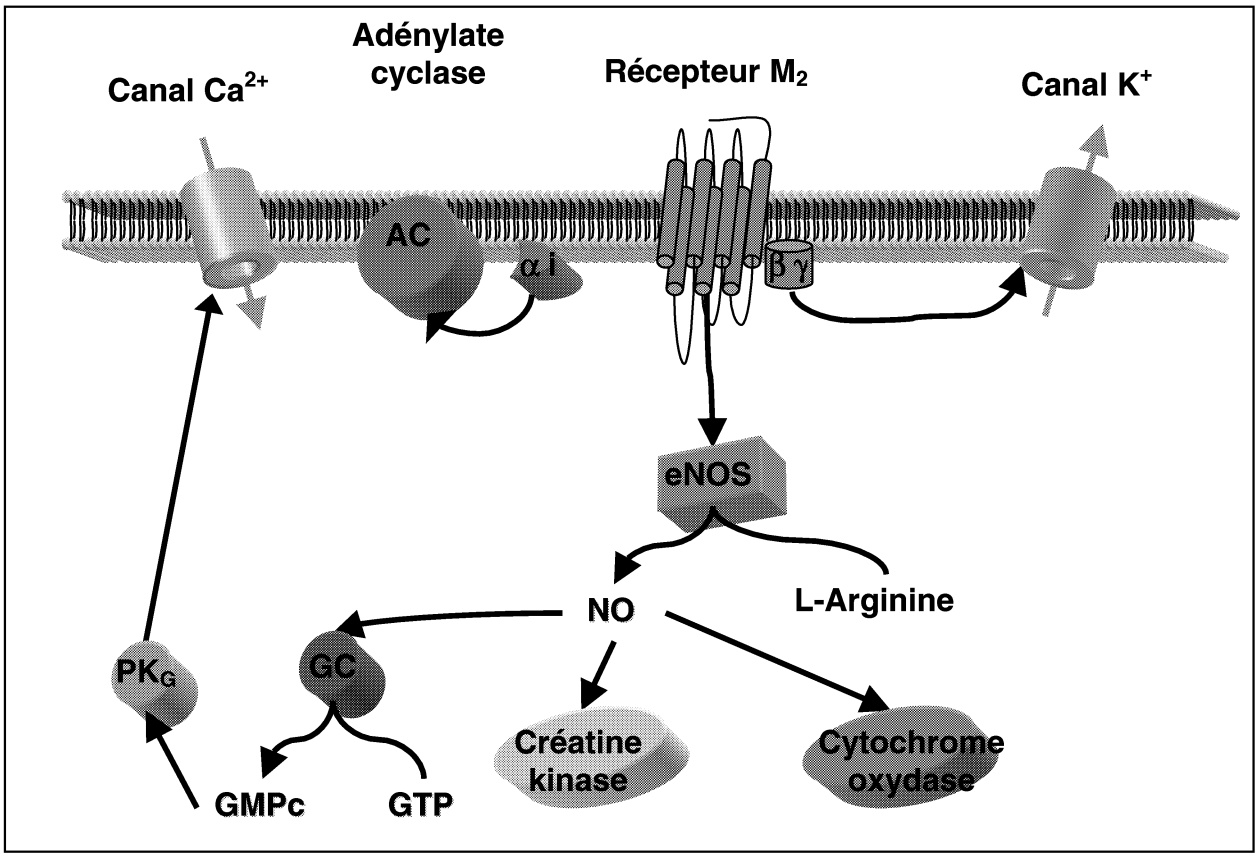


Fig. 9 : La transduction du signal des récepteurs M_2 muscariniques. NOS : NO synhase. GC : Guanylate cyclase, PK_G : Protéine kinase G.

Les 3 principales sources endogènes de NO au niveau cardiaque sont :

- La nNOS (NOS 1 ou neuronale) est exprimée dans les cellules du nœud sinusal [141] et participe à la régulation de la rythmicité cardiaque.
- La eNOS (NOS 3 ou endothéliale) est majoritaire dans le cœur [140,142]. Son rôle dans le contrôle de la fonction cardiaque reste néanmoins plus obscur et reste sujet à controverses y compris chez la souris knock-out pour le gène de la NOS 3 [143].
- La iNOS (NOS 2 ou inductible) est exprimé dans le cœur en cas de choc septique, de cardiomyopathies dilatées [144] et chez les insuffisants cardiaques [145].

L'effet majeur de la transduction NO-dépendante demeure la stimulation de GC cytosoluble, ce qui a permis d'émettre l'hypothèse que l'acétylcholine induirait une augmentation de GMPc via l'activation de la NOS 3 [146]. D'un point de vue physiopathologique il est intéressant de noter que dans le modèle de rat SHR ou dans le

modèle induit de chien obèse hypertendu entraîne une augmentation de l'expression de la NOS 3 au niveau atrial. Enfin, un lien entre les anomalies métaboliques cardiaques de l'obèse et les eNOS pourrait avoir été identifié au travers de l'association de polymorphismes dans les gènes PPAR γ 2 et eNOS chez les patients hypertendus [147].

Enfin, l'acétylcholine réduit la phosphorylation induite par une stimulation β adrénergique (isoprénaline) de protéines régulatrices cardiaques comme le phospholamban ou la troponine I [148]. Ainsi, il a été émis l'hypothèse que la stimulation muscarinique pouvait activer des phosphatases. Et justement, il a été montré que l'acétylcholine pouvait augmenter l'activité phosphatase intracellulaire, ce qui contribue à la déphosphorylation des canaux Ca^{2+} de type L et donc participe à l'effet chronotrope négatif [132].

II. 3. 4. Désensibilisation des récepteurs

La diminution du nombre de récepteurs résulte d'un mécanisme en 3 temps :

- L'internalisation suivie de la destruction du récepteur dans les lysosomes.
- La diminution des taux de synthèse du récepteur.
- L'augmentation de la dégradation par des protéases non lysosomiales.

La modification de l'expression joue aussi un grand rôle dans la modification de la densité des récepteurs et contribue à la sur-expression ou la sous-expression. Mais la part du niveau d'expression et de la dégradation dans la régulation des taux de récepteurs restent encore mal définies [149].

II. 3. 4. 1. Désensibilisation des récepteurs β-Adrénergiques

Une exposition accrue des cardiomyocytes aux catécholamines conduit à la désensibilisation de ces derniers. Tout d'abord, une stimulation excessive des récepteurs β-

adrénergiques est suivie d'un découplage de l'AC. Le mécanisme impliqué est basé sur des phosphorylations spécifiques de l'extrémité C-terminale des récepteur β-adrénergiques qui induit un découplage des protéines Gs liant les récepteurs β-adrénergiques à l'activité AC. Ces phosphorylations impliquent la PK_A et la β–ARK [150-152]. La β–ARK produit des phosphorylations indépendantes des taux d'AMPc, contrairement à la PK_A. La β–ARK induit des phosphorylations au niveau C-terminal du récepteur β–adrénergique menant à l'interaction du récepteur β–adrénergique avec la β–arrestine au détriment de son interaction avec la protéine Gs. Cette dissociation des récepteurs β–adrénergiques avec la protéine Gs est à l'origine de la diminution initiale de l'affinité des récepteurs pour leur agoniste. Puis, l'activation de la β–arrestine contribue à l'internalisation du récepteur, et enfin, si l'exposition excessive aux catécholamines se poursuit, il peut s'en suivre un adressage du récepteur au lysozome et sa dégradation (Fig. 10). Néanmoins, les formes mutées du récepteur ne possédant pas les sites de phosphorylation pour ces 2 kinases peuvent être séquestrées lors d'une stimulation soutenue, ce qui laisse le mécanisme de désensibilisation incomplètement élucidé [153,154]. Enfin , un autre mécanisme reste encore non élucidé, la répression sélective des récepteurs β1 et β2 [155]. Lors d'une stimulation β adrénergique chronique durant 24 h, la densité des récepteurs β1 a diminué de moitié tandis que cette diminution concerne 80 % des récepteurs β2.

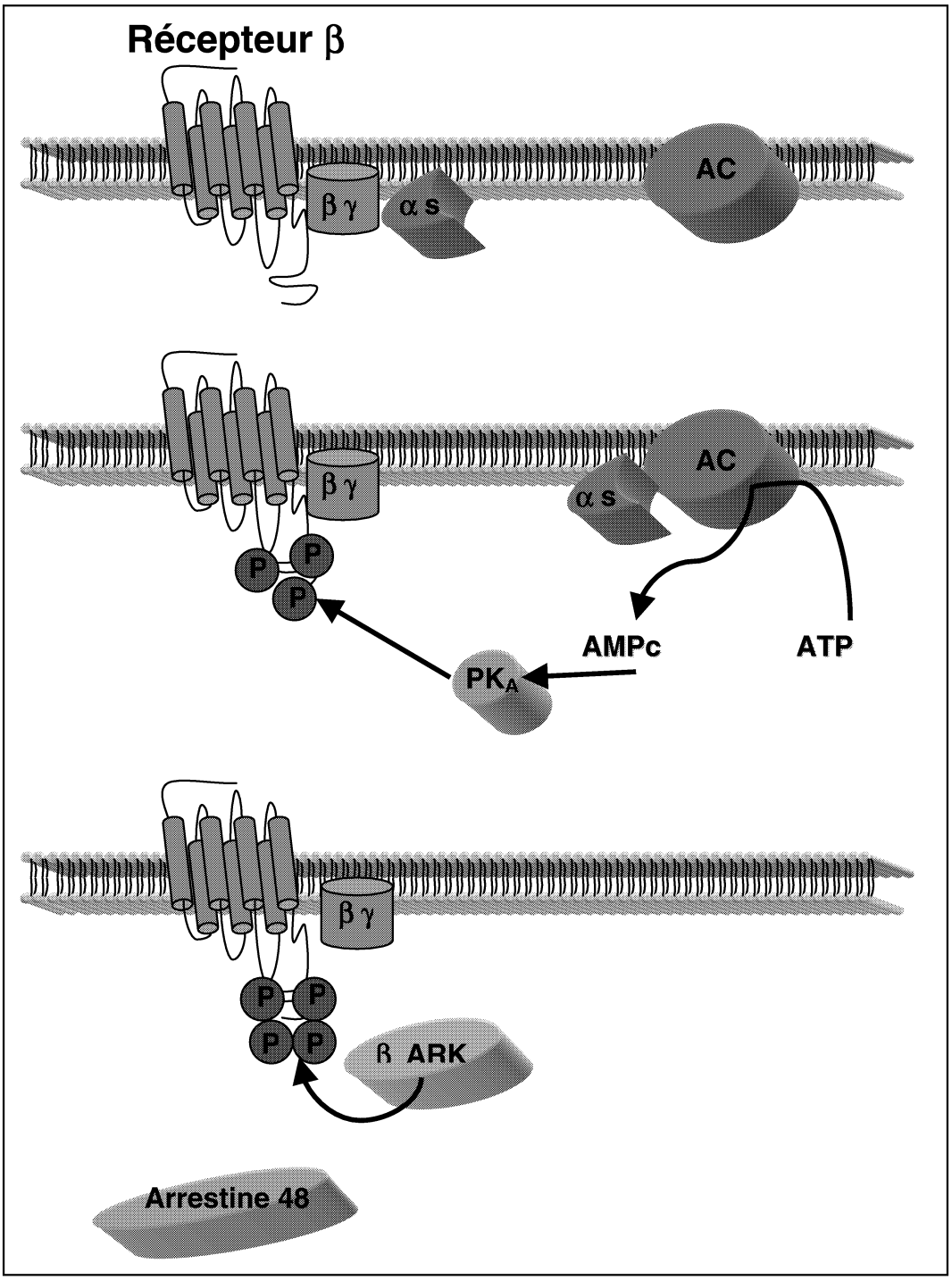


Fig. 10 : Mécanisme de désensibilisation des récepteurs β adrénergiques.

AC : Adénylate cyclase. PKA : Protéine kinase A. β ARK : β adrenergic receptor kinase.

II. 3. 4. 2. Désensibilisation des récepteurs M_2 muscariniques

Outre les mécanismes de désensibilisation communs à tous les récepteurs à 7 domaines transmembranaires y compris les récepteurs M_2, il a été décrit dans le cas des récepteurs muscariniques M_2 une transduction du signal particulière.

En effet, la désensibilisation des récepteurs est un processus réversible qui se décompose, dans un premier temps, en un découplage du récepteur à 7 domaines transmembranaire de sa protéine G et de son effecteur, puis l'internalisation du récepteur et son éventuelle dégradation accompagnée des régulations de l'expression du gène codant pour le récepteur correspondant [156].

Pour les récepteurs muscariniques M_2 la première étape de leur désensibilisation s'effectue au travers de la phosphorylation des résidus serine et thréonine de la troisième boucle intracytoplasmique. Si pour la désensibilisation des récepteurs β–adrénergiques, la PK_A était impliquée , il a été montré dans le cas des récepteurs M_2 que plusieurs kinases sont mobilisées. La PK_A et la PKc jouent ce rôle de même que GRK2 ET GRK 3 qui font partie des *G protein coupled receptors kinases* [157].

La régulation homologue des récepteurs muscariniques correspond à une régulation induite par une stimulation soutenue par l'agoniste. Parmi les travaux concernant ce sujet il n'a pas été montré de régulation homologue allant jusqu'à diminution des taux d'ARNm codant pour le récepteur M_2. Néanmoins, les données sont différentes selon le type cellulaire. Dans les fibroblastes ce type de régulation n'a pas pu être mis en évidence mais dans le cas des cellules embryonnaires de cœur de poulet il semble que cette régulation aille jusqu'à la diminution des taux d'ARNm. Ces dernières données laissent quand même apparaître la possibilité qu'au niveau cardiaque, un blocage pharmacologique des récepteurs muscariniques par l'atropine entraîne une augmentation des taux d'ARNm codant pour le récepteur M_2 [157].

La régulation hétérologue correspond à une régulation impliquant les phénomènes de *cross-talk* faisant intervenir les voies de transduction d'autres récepteurs. Ainsi, dans les cellules embryonnaires de poulet, les taux de récepteurs M_2 peuvent être diminués suite à une stimulation concomitante de la PLc et de l'AC. Tandis qu'une stimulation aiguë des cellules HEL299 par le procatérol (agoniste β2 adrénergique) induit une surexpression des récepteurs muscariniques. Mais cette même stimulation au procatérol effectuée de manière prolongée entraîne une diminution de l'expression des récepteurs muscariniques. Les mécanismes de transduction du signal intracellulaire vers les zones promotrices des gènes muscariniques semblent passer par les PK_A et PKc [157]. Ces différences de régulation de l'expression des récepteurs muscariniques semblent être influencées non seulement par les durées de stimulation mais aussi par le type cellulaire considéré et même par le sous-type considéré (M_1, M_2,M_4).

Les voies de transduction du signal des régulations hétérologues empruntent les voies MAP-Kinases vers des gènes cibles dits précoces qui sont pour la plupart des facteurs de transcription (ex : c-jun). L'implication des MAP-Kinase ERK, dans la diminution de l'expression génique des récepteurs muscariniques a été clairement mise en évidence par l'utilisation d'inhibiteurs de la voie MAP-Kinase, qui abolissent cette régulation [157]. Ainsi, de nombreuses cytokines comme le PDGF, le TGF β1 qui ont la capacité d'activer ERK 1 ET 2 ont un effet inhibiteur sur la transcription des récepteurs M_2. Ces résultats ont été obtenus dans des modèles cellulaires HEL 299 et les cellules embryonnaires cardiaques de poulet préalablement stimulées par le TGF β1. La voie de transduction du signal TGF β est complexe et emprunte plusieurs voies : la voie prépondérante étant la voie des Smad, mais aussi les MAP-Kinases, la voie PI3-Kinase et même la PK_A. Enfin, d'autres cytokines semblent avoir cette capacité régulatrice sur l'expression de M_2 : l'interleukine 1β et le TNF α (Fig. 11). Les voies de transduction du signal empruntées passent en plus par les JNK-

Kinases. Ces régulations, dites hétérologues, impliquent un tel degré de complexité au niveau des voies de transduction et au niveau des facteurs de transcription intermédiaires, qu'il est encore pour le moment difficile à appréhender vu les redondances tantôt synergiques ou opposées. Mais il est indéniable que les voies de transduction des cytokines jouent un rôle crucial dans la régulation au niveau du promoteur de nombreux gènes cardiaques et en particulier au niveau du récepteur muscarinique.

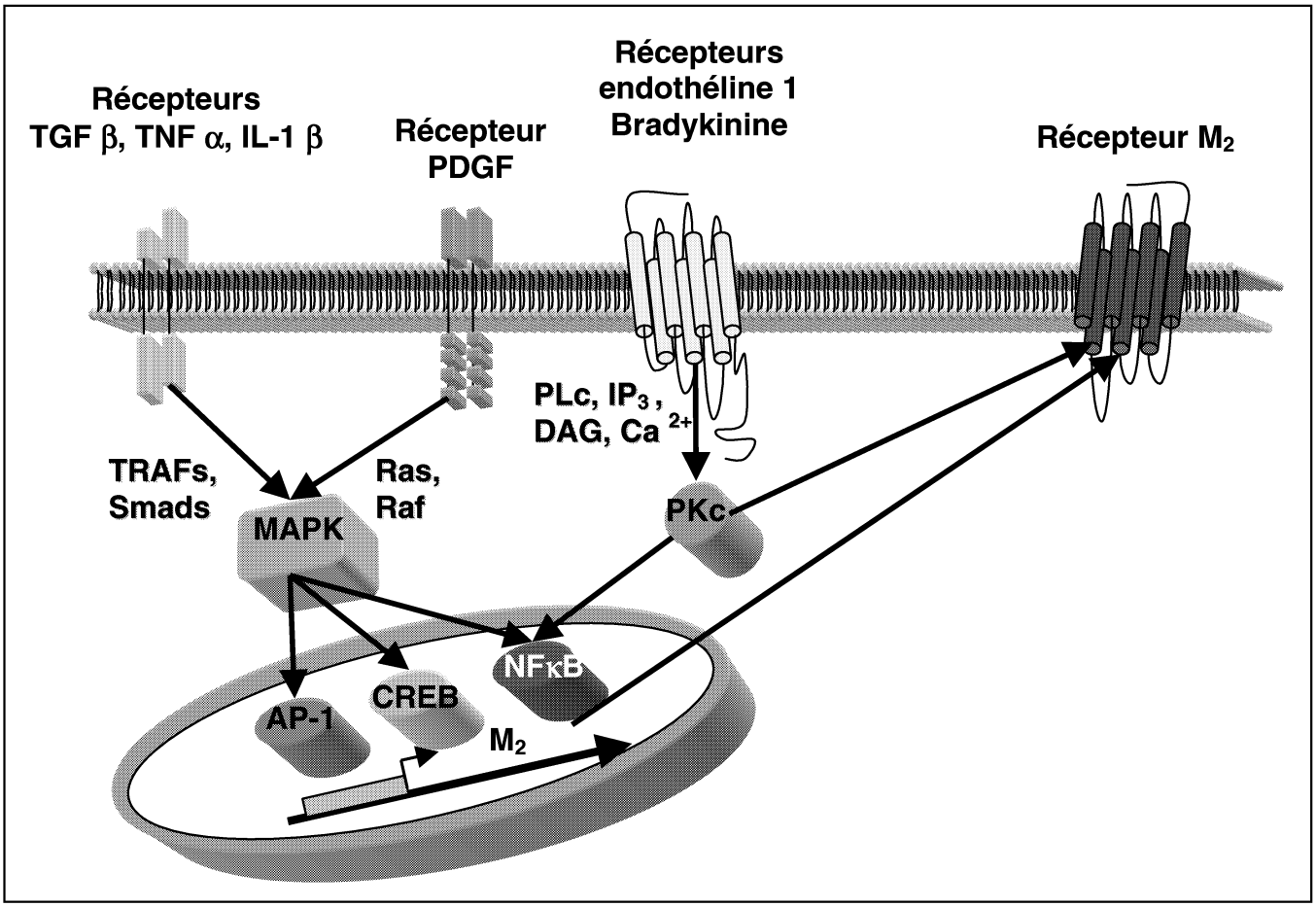


Fig. 11 : Mécanismes de régulations hétérologues des récepteurs M_2 muscariniques (d'après Haddad & Roussel 1998).

II. 3. 5. Contribution du système nerveux sympathique dans l'HTA chez l'obèse

L'activité du système nerveux sympathique est plus élevée chez les individus obèses ou hypertendus [158,159]. Tout d'abord, l'apport calorique élevé augmente le turn-over de la noradrénaline dans les tissus périphériques et augmente les taux plasmatiques de noradrénaline au repos [116]. Des méthodes microneurographiques ont confirmé l'augmentation de l'activité sympathique chez des sujets obèses hypertendus comparés à des sujets minces [160]. La clonidine. agoniste $\alpha 2$, réduit l'activité sympathique plus particulièrement chez les chiens obèses [161]. Dans le modèle de chien en régime gras, le blocage α et β adrénergique diminue plus la pression artérielle chez les chiens obèses que chez les chiens minces [162].

Les médiateurs potentiels de l'activation sympathique dans l'obésité regroupent : une activation des nerfs rénaux afférents par une stimulation des mécanorépteurs secondaire à l'augmentation de la pression intrarénale, l'hyperinsulinémie, les acides gras, l'angiotensine II et l'hyperleptinémie [163,164].

L'obésité est aussi associée à une intolérance au glucose et une hyperinsulinémie en phase postprandiale [165]. Ces taux élevés d'insuline favorisent la rétention sodée et l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique. Chez l'Homme et dans le modèle de chien en régime hyperlipidique, l'hyperinsulinémie chronique induit une augmentation de la pression artérielle et de la pression de natriuérèse [165]. Mais des injections d'insuline à des taux semblables à ceux rencontrés chez l'obèse ont tendance à réduire la pression artérielle à cause de l'effet vasodilatateur périphérique de l'insuline [165]. De plus, l'insuline ne semble pas non plus potentialiser l'effet presseur d'autres substances comme la noradrénaline ou l'angiotensine II [165]. Les effets de l'insuline ont été aussi testés directement au niveau central par injection dans la circulation cérébrale. Aucun effet pouvant conduire au développement d'une hypertension artérielle n'a pu être mis en évidence [166]. Ces différentes

études montrent que l'hyperinsulinémie (quelque soit la voie d'injection) n'explique pas l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique associée à l'obésité.

Les taux élevés d'acides gras non-estérifiés (AGNE) ont été évoqués comme étant capables de contribuer à l'augmentation de la pression artérielle chez le sujet obèse [167]. En effet, les taux d'AGNE doublent chez l'obèse par rapport aux sujets minces. Une injection d'acides gras dans la veine porte ou directement dans le courant systémique induit une augmentation de la pression artérielle et du rythme cardiaque chez le rat et ces effets sont abolis par des bloquants du système adrénergique [168]. Ces effets passeraient par une stimulation des voies nerveuses afférentes du foie et stimulent l'activité du système nerveux sympathique.

L'activité de la rénine est significativement augmentée chez la plupart des obèses en dépit d'une rétention sodée marquée et d'une augmentation du volume de fluide extracellulaire [162,169]. De plus, l'angiotensine aurait un rôle dans la réabsorption sodée et induirait une augmentation de la pression de natriurèse ce qui participe à l'hypertension chez l'obèse. D'ailleurs, des traitements antagonistes de l'angiotensine II stoppent la rétention sodée, l'expansion volumique et l'augmentation de la pression artérielle associée au régime hyperlipidique chez le chien obèse. L'administration d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion atténue l'hypertension chez le chien obèse et chez les jeunes patients obèses [170,171]. Bien qu'il soit considéré que l'angiotensine II ait des effets direct sur le système nerveux central, les mécanismes de l'activation du système nerveux sympathique par l'angiotensine II restent inconnus. Des injections d'angiotensine II (à de faibles concentrations : 0.5 ng.kg-1) dans l'artère vertébrale augmentent la pression artérielle d'environ 10 mmHg tandis que des doses identiques dans la circulation générale n'induisent une augmentation que de 4 mmHg [172].

II. 3. 6. Système nerveux sympathique et leptine

La découverte des effets de la leptine sur le système nerveux central a initié la recherche d'une possible relation moléculaire entre le système nerveux sympathique et l'obésité [173]. Les taux plasmatiques de leptine, sécrétée très majoritairement par le tissu adipeux, croissent de manière proportionnelle avec l'adiposité. La leptine franchit la barrière hémato-encéphalique par un système de transporteur pour agir sur ses récepteurs au niveau des régions latérales et médianes de l'hypothalamus afin de réguler la balance énergétique en diminuant l'appétit et en augmentant la dépense énergétique au travers de la stimulation sympathique. De multiples études ont montré que l'injection intraveineuse ou intracerebroventriculaire de leptine augmentait l'activité sympathique de manière dose dépendante en 2-3 heures dans les reins et les surrénales [174,175]. Mais l'administration de leptine n'a que peu d'effet sur la pression artérielle même à de fortes doses [176]. L'absence d'effet presseur de la leptine peut être dû à ses effets vasodilatateurs au travers de sa capacité à stimuler la eNOS [177].

Au niveau de l'hypothalamus la leptine a pour effet de diminuer la formation de NPY (Neuropeptide Y) [178]. Les injections de NPY miment une déficience en leptine qui se manifeste par une hyperphagie, une diminution de la thermogénèse du tissu adipeux brun et l'obésité. Néanmoins, l'étude des souris KO ob/ob et des souris NPY-/NPY- ont permis de déduire que la leptine doit agir sur d'autres cibles pour induire la satiété. L'administration de fortes doses de NPY dans les noyaux hypothalamiques ou dans *l'area postrema* provoque une augmentation de la pression artérielle alors que des injections dans le noyau du tractus solitaire ou dans le noyau caudé ou le noyau ventrolatéral induisent une diminution de la pression artérielle [179]. Mais vu que la leptine diminue la formation de NPY, il devient difficile de comprendre le rôle de la leptine dans le développement de l'hypertension artérielle chez l'obèse.

Des travaux plus récents suggèrent que la voie de la proopiomelanocortine (POMC) interagirait avec la leptine pour stimuler l'activité du système nerveux sympathique [180]. La leptine augmente l'expression de POMC dans le noyau arqué. Ainsi, dans le cas de l'obésité il est possible que les taux élevés de leptine stimulent l'expression de POMC et donc de α-MSH qui agiraient sur des neurones exprimant le récepteur MC4-R, ce qui diminuerait la prise alimentaire et augmenterait l'activité sympathique. Des études récentes suggèrent que les récepteurs MC4-R auraient un rôle déterminant dans la médiation de l'effet de la leptine sur l'activité du système nerveux sympathique. En effet, des antagonistes MC4-R abolissent l'augmentation de l'activité sympathique rénale induite par des injections icv de leptine [174,181]. Donc la leptine activerait le système nerveux sympathique au travers de différents noyaux du système nerveux central.

Il existe bien d'autres neuropeptides sécrétés par l'hypothalamus : les orexines, la *melanin-concentring hormone* et l'hyposecretine qui contrôlent l'appetit et l'homéostasie énergétique [178]. Ces derniers interagissent avec la leptine en influençant donc non seulement l'appétit mais aussi l'activité sympathique, la thermogenèse et la pression artérielle. Mais à long terme, l'injection de leptine dans les carotides conduit bien à une augmentation de la pression artérielle chez le rat non obèse en 12 jours [182]. La montée de la pression artérielle sous leptine est lente d'autant plus qu'elle induit aussi une diminution de la prise alimentaire qui contribue à l'inverse à réduire la pression artérielle. Le modèle de souris transgénique surexprimant la leptine développe lui aussi une légère hypertension comparable à l'injection chronique de leptine [183]. La leptine conduit à l'augmentation de la pression artérielle et du rythme cardiaque au travers de l'activation sympathique puisqu' un traitement α et β-bloquant abolit cet effet [182]. Mais il est aussi possible que ce soit le simple fait de la diminution de la prise alimentaire et de la perte de poids vu que le traitement combiné α et β-bloquant n'abolit pas l'effet de la leptine sur la satiété.

Enfin, le fait que l'injection chronique de leptine à des taux semblables à ceux de l'obèse induise chez des rats non obèses une hypertension et une augmentation de l'activité sympathique montre bien que la leptine serait le lien entre obésité et anomalies de l'activité sympathique. Mais dans le cas de l'obèse il est possible qu'il devienne peu à peu résistant à la leptine au niveau hypothalamique. Ce qui induirait alors une résistance à la satiété, et une diminution de l'activité sympathique. Et justement, l'Homme obèse avec des taux élevés en leptine continue à se suralimenter. Ce qui signifierait que l'Homme obèse développe soit une résistance à la leptine, soit que le transport au travers de la barrière hémato-encéphalique diminue, soit que d'autres facteurs contrent l'effet de la leptine au niveau de l'hypothalamus. Il existe des cas où effectivement des souris en régime hyperlipidique développent une obésité et une diminution du transport hémato-encéphalique de la leptine ce qui conduit à une résistance à la leptine au niveau central mais pas au niveau périphérique [184]. Un autre exemple montre la résistance à la leptine chez l'obèse : des injections icv de leptine chez des rats minces augmentent l'activité sympathique au niveau lombaire tandis que chez des rats en régime hyperlipidique ces injections icv ont des effets mineurs en comparaison aux rats minces [185]. Ces observations corroborent bien l'existence d'une résistance à la leptine chez l'obèse. Mais les données actuelles ne permettent pas de savoir si la résistance à la leptine se limite à l'activité sympathique rénale et donc de conclure catégoriquement sur l'effet de la leptine sur la pression artérielle ou le rythme cardiaque chez le sujet obèse.

Il est intéressant de voir que les taux plasmatiques de leptine sont aussi élevés chez des patients hypertendus essentiels. Ainsi, il a été démontré que les taux plasmatiques de leptine et la pression artérielle étaient corrélés après ajustement sur l'IMC [186]. Le rythme cardiaque et les taux de leptine sont également corrélés après ajustement sur l'IMC et l'âge. La pression artérielle systolique et les taux plasmatiques de leptine se trouvent aussi corrélés après ajustement sur l'IMC chez les femmes et les hommes non hypertendus mais pas chez

les hommes hypertendus [187]. En fait, la plupart des données suggérant une corrélation entre la leptine et la pression artérielle chez les hommes hypertendus est associée principalement au degré d'adiposité. Finalement, l'activation sympathique ne permet pas d'expliquer totalement l'hypertension chez l'obèse. Il faut replacer le rôle du système nerveux sympathique dans un contexte pathologique où coexistent d'autres anomalies tant au niveau parasympathique que dans le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (Fig. 12).

II. 3. 7. Le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone

L'activité plasmatique de la rénine a été montrée comme étant inchangée voire diminuée proportionnellement à l'IMC [60,188]. Il a été suggéré que l'aldostérone pouvait aussi jouer un rôle dans le syndrome obésité-hypertension. Le rapport de l'aldostérone plasmatique sur l'activité plasmatique de la rénine augmente avec le poids puisque l'activité rénine chute progressivement [188]. Il en résulte une augmentation du sodium total et de l'eau [188,189]. Les obèses ont des taux plasmatiques en aldostérone plus élevés malgré les taux plasmatiques en rénine inchangés [190].

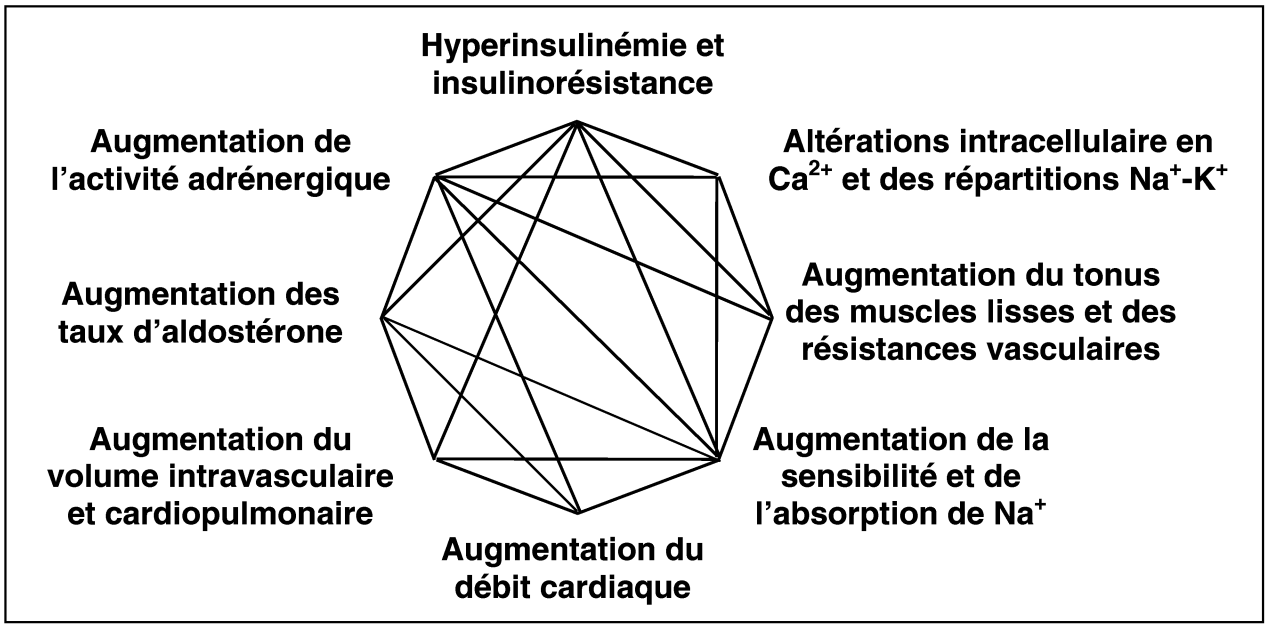


Fig. 12 : Mécanismes physipahlogiques impliqués dans l'HTA de l'obèse (d'après Reisen 1995).

Les modifications de l'activité du SNA se répercutent sur le volume sanguin et en définitive contraignent le cœur à fournir un travail plus important ce qui peut contribuer au déterminisme des modifications morphologiques et fonctionnelles cardiaques.

II. 4. MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES & FONCTIONNELLES DU VENTRICULE

L'augmentation rapide de poids corporel induit une augmentation du volume sanguin, de la consommation globale d'O_2, du flux sanguin régional, du débit cardiaque, du rythme cardiaque et de la pression artérielle chez l'obèse [59,62,69,191-196]. Les modifications hémodynamiques se répercutent sur les parois cardiaques qui répondent à leur tour en changeant leur architecture suivant la loi de Laplace (Fig. 13).

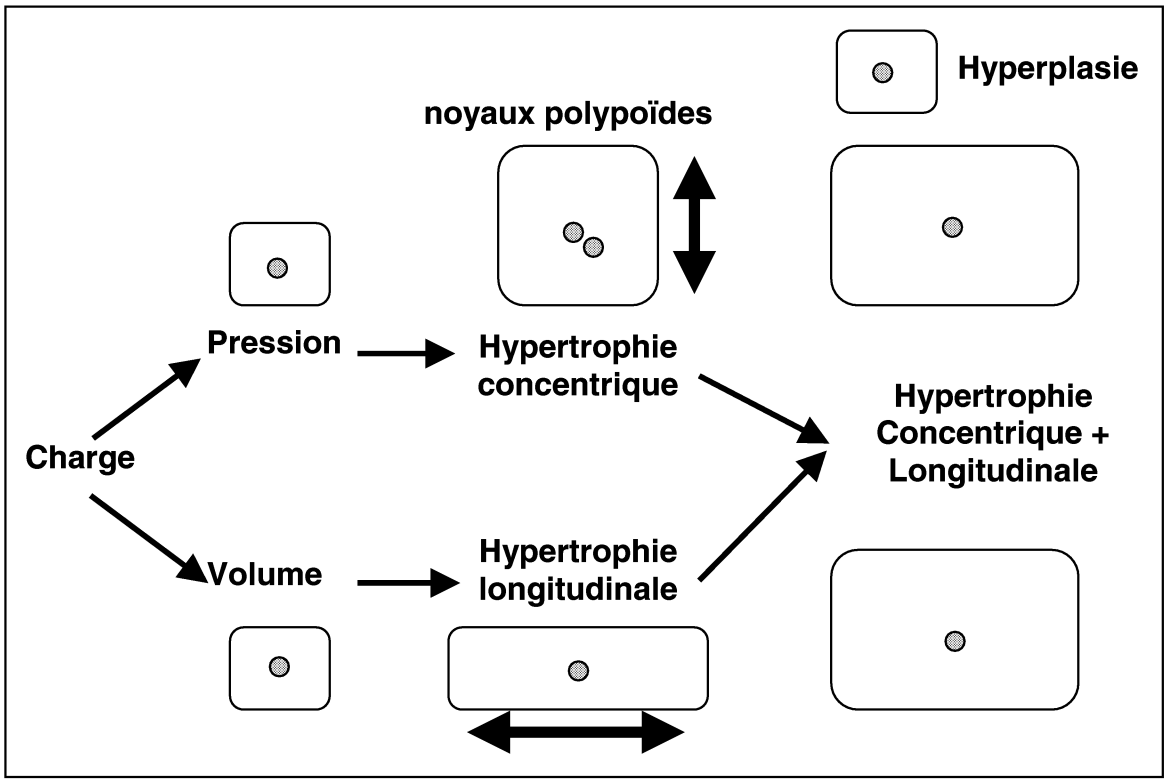


Fig. 13 : Charge de pression *vs* volume. Différences initiales de la forme des cardiomyocytes en réponse à une surcharge de pression (HTA) ou de volume (obésité) (d'après Opie 1998).

II. 4. 1. Aspects morphologiques

II. 4. 1. 1. Données échocardiographiques

Afin d'évaluer le degré de l'HVG, la masse du VG est indexée soit sur la surface corporelle soit sur la taille au carré. Or, la normalisation par rapport à la surface corporelle considère de fait que l'obésité est un facteur physiologique. Ceci a pour effet de sous-estimer le degré de l'HVG chez l'obèse. La normalisation par la taille (taille $^{2.7}$) est donc plus appropriée chez les patients obèses [197].

Chez les sujets obèses, les forts volumes circulants favorisent l'augmentation des volumes ventriculaires et de la pression de remplissage [198]. L'augmentation de la précharge conduit donc à une dilatation des oreillettes et des ventricules et à l'augmentation du stress pariétal et par conséquent accroît la postcharge [73]. Chez l'obèse, le VG s'adapte en augmentant sa masse musculaire et en épaississant ses parois, autrement dit par hypertrophie du VG [199-201]. Les études échocardiographiques chez des patients obèses normotendus et hypertendus montrent que la surcharge volumique induit une augmentation du diamètre des 4 chambres cardiaques et du diamètre de la racine aortique [50,60].

Le cœur de l'obèse s'adapte par dilatation des chambres cardiaques. Il doit épaissir ses parois pour normaliser le stress pariétal et afin d'augmenter les unités contractiles [42]. Cette adaptation caractéristique des obèses normotendus est dite HVG de type excentrique [73,189,198,202]. Chez les patients hypertendus, le stress pariétal augmente et ne cause pas de dilatation cardiaque mais induit une augmentation de l'épaisseur des parois [203]. Cette réponse constitue une adaptation à l'augmentation de la postcharge et cause une HVG de type concentrique. La coexistence de l'obésité et de l'hypertension augmente la précharge et le volume de fin de diastole et donc la pression de remplissage du VG. Ces changements prennent place dans un cœur déjà altéré par une augmentation de la postcharge produite par l'hypertension artérielle. Le cœur réagit à ces stress cumulés par une HVG de type excentrico-

concentrique, ce qui augmente le risque de développer une insuffisance cardiaque congestive [204,205]. Enfin, la présence d'une HVG constitue en soit un risque supplémentaire de développer des arythmies cardiaques (notamment des fibrillations atriales) [39,206]. De plus, des études ont montré l'existence d'une infiltration de cellules mononucléaires, dans et autour du nœud sino-atrial, avec une adiposité marquée au niveau du système de conduction [207]. Ceci serait susceptible d'expliquer le taux élevé de mort subite chez les patients obèses morbides [57,208].

Enfin, quelques études se sont penchées sur l'effet de la perte de poids, en particulier au décours de la pose d'un anneau gastroplastique qui induit une perte de poids élevée. Ces pertes de poids substantielles produisent une diminution significative des dimensions internes du VG en diastole. Il n'y a pas de variation significative dans l'épaisseur de la paroi septale. La masse du VG est elle aussi diminuée. De plus, la perte de poids est aussi corrélée avec une diminution de la pression artérielle systolique et du stress pariétal en fin de systole. Ces changements morphologiques améliorent des conditions de charges du VG [46]. Par contre, le simple contrôle de la pression artérielle par un β bloquant n'induit pas de changement dans la morphologie cardiaque. Donc, chez l'obèse, l'effet de la perte de poids sur les paramètres morphologiques cardiaques s'avère indépendant de la pression artérielle systolique ou du rythme cardiaque [45]. Ces données ont été confirmées, quelque soit le mode de perte de poids, chez des patients obèses morbides ou modérément obèses normo ou hypertendus. Ces effets sur le volume des cavités ou l'épaisseur des parois cardiaques semblent liés à la réduction de la précharge et de la postcharge [27,209].

II. 4. 1. 2. Infiltrations lipidiques

L'infiltration lipidique cardiaque résulte de l'insinuation du tissu adipeux épicardique dans la paroi ventriculaire et dans la paroi atriale. Ces infiltrations lipidiques apparaissent le plus souvent au niveau du VD et plutôt au niveau des régions périvasculaires. Ce fut une

cause possible pour expliquer la mort subite, les fibrillations atriales ou des dysfonctions du tissu nodal [210,211]. Au cours d'autopsies, l'incidence de l'infiltration lipidique a pu être évaluée à 3 %. L'obésité n'a pas été identifiée jusqu'à maintenant comme étant un facteur prédictif d'une éventuelle infiltration lipidique. Un seul cas a été rapporté chez un patient obèse où l'infiltration lipidique cardiaque était clairement avérée au travers de biopsies cardiaques. De plus, ce patient avait une athérosclérose coronaire importante nécessitant un pontage [212]. Néanmoins, de plus en plus d'études s'intéressent à nouveau à la surcharge lipidique et à la lipotoxicité tissulaire notamment cardiaque chez des patients obèses, diabétiques ou insuffisants cardiaques et dans le modèle de souris obèse ob/ob [213,214]. Ce type d'affection serait une des origines des dysfonctions diastoliques de l'obèse.

II. 4. 2. Aspects fonctionnels

II. 4. 2. 1. Fonction systolique

II. 4. 2. 1. 1. Précharge, postcharge et loi de Frank-Starling

La loi de Starling est associée à celle de Frank (1895). Le premier a montré que la longueur de l'étirement régissait la force et la rapidité de la contraction consécutive. Frank a établi que le volume de remplissage influençait le degré de l'inotropisme. Ainsi, sous des observations à priori différentes Frank et Starling ont montré que la contractilité du cœur se régule de manière autonome selon le niveau de remplissage, indépendamment même de l'innervation. Toute augmentation du volume de remplissage augmente la précharge et induit un étirement accru des fibres musculaires cardiaques au niveau de l'oreillette droite et du VG.

La postcharge est la pression que le VG doit surmonter pour qu'il y ait éjection dans l'aorte. De manière générale, la pression artérielle est donc un bon index de la postcharge.

Lors de l'HTA, la postcharge augmente, ce qui augmente également le stress pariétal cardiaque.

Néanmoins, précharge et postcharge ne sont pas indépendantes. En effet, lorsque la précharge augmente la pression intraventriculaire est plus grande et la distension des sarcomères est elle aussi plus grande. Ainsi, la contraction suivante sera plus forte ce qui augmentera la postcharge. A l'inverse, lors du développement d'une insuffisance cardiaque, la contractilité du VG diminue, les résistances vasculaires périphériques augmentent et de plus en plus de sang reste dans le VG en fin de contraction, ce qui a pour effet d'augmenter la précharge. Donc postcharge et précharge sont liées dans un sens comme dans l'autre.

II. 4. 2. 1. 2. Inotropie

L'augmentation de la contractilité résulte d'une vélocité de contraction plus grande et en adéquation avec la force développée, ce qui conduit au développement d'une tension plus élevée. La contractilité constitue un régulateur important de la demande en O_2. Toute augmentation de l'inotopisme se traduit par une augmentation de l'interaction entre les ions Ca^{2+} et les protéines contractiles. La relation entre la force et la vélocité est de type hyperbolique ce qui suggère qu'il existe une force élastique passive qui contribue à la charge sur cardiomyocyte isolé [215]. Cette force passive de type hyperbolique correspondrait typiquement aux propriétés physiques de la Titine qui constitue les extrémités du sarcomère [216]. Toute augmentation de la contractilité passe par l'augmentation d'AMPc et par l'activité de la PK_A qui phosphoryle la Troponine I et C et contribuerait ainsi à leur rapprochement ce qui correspond majoritairement aux mécanismes moléculaires d'une activation β–adrénergique [215].

II. 4. 2. 1. 3. Stress pariétal

Le stress des parois cardiaques est évalué par la loi de Laplace :

$$\text{Stress pariétal} = \frac{\text{Pression x Rayon}}{\text{2 x épaisseur}}$$

Ainsi, quand l'épaisseur de la paroi augmente (comme lors de l'hypertrophie ventriculaire gauche) le stress pariétal diminue créant un phénomène compensateur de l'HTA. Dans le cas de l'insuffisance cardiaque, le cœur au contraire se dilate ce qui augmente le rayon de la chambre ventriculaire et donc le stress pariétal augmente ainsi dramatiquement.

II. 4. 2. 1. 4. Dysfonctions systoliques chez l'obèse

Au repos, la fraction d'éjection du VG est significativement réduite chez l'obèse [217,218]. Les facteurs à l'origine des modifications de la fonction systolique sont : la sévérité de l'obésité, le degré de charge et la masse du VG, la durée de l'obésité [75,219]. La fraction de raccourcissement du VG diminue aussi avec la sévérité de l'obésité, la durée de l'obésité, les dimensions internes du VG, la masse du VG et la pression artérielle [75]. Mais ces dysfonctions systoliques ne s'observent que chez les obèses sujets à une HVG [220].

II. 4. 2. 2. Fonction diastolique

II. 4. 2. 2. 1. Physiologie de la diastole

Les facteurs cellulaires influençant la relaxation du ventricule sont la diminution des taux calciques intracellulaires qui requièrent de l'ATP pour la phosphorylation du phospholamban, l'élasticité du tissu cardiaque (un cœur hypertrophié est par exemple moins élastique et se relaxe plus lentement), la phosphorylation de la troponine I augmentant la

relaxation [221]. Et enfin la relaxation est influencée par la charge systolique puisque plus la charge systolique est grande plus la relaxation doit être rapide [222,223].

Il existe une hypothèse métabolique qui pourrait expliquer les troubles de la relaxation. En effet, un déficit en ATP lors du début de la diastole empêcherait le repompage actif du calcium vers le réticulum sarcoplasmique [224]. D'ailleurs, lors de troubles métaboliques comme l'hypothyroïdie, la relaxation cardiaque est plus lente alors que cette durée de relaxation diminue lors d'une hyperthyroïdie [225].

Le remplissage des ventricules se fait principalement passivement avec une contribution présystolique des oreillettes [226]. D'autre part, les oreillettes sont le senseur des variations volumiques cardiaques et qui en cas de *strech* intense relargue l'ANP. Les oreillettes contiennent des mécanorécepteurs qui contribuent à l'activation des décharges du nœud sinusal et au développement de la tachycardie (cas de l'exercice par exemple). De plus, par rapport aux ventricules, les oreillettes ont des myocytes plus petits avec un potentiel d'action plus court avec des sous-types de myosine fœtaux plus importants. Les oreillettes ont aussi une plus grande aptitude à activer les voies phosphatidylinositol, ce qui explique l'effet inotrope sous angiotensine II plus marqué au niveau atrial [227]. Enfin, la repolarisation atriale plus rapide est due aux courants potassiques sortants (comme Ito et IK Ach) [228].

II. 4. 2. 2. 2. Dysfonctions diastoliques du VG

Plus la pression systolique du VG augmente, plus le temps de relaxation augmente en parallèle [229]. Dans le cœur hypertrophié, suite à une hypertension chronique il se développe des dysfonctions diastoliques [230]. Le mécanisme n'est pas totalement élucidé mais il paraît relié à l'état de fibrose qui accompagne la plupart du temps le cœur hypertrophié [231]. Expérimentalement, il a été montré qu'il existait dans le cœur hypertrophié et hypertendu, une

diminution de la contractilité et de la relaxation étroitement liées aux dysfonctions du réticulum sarcoplasmique [224]. Il a été montré que les dysfonctions de la relaxation étaient associées à un remplissage plus tardif avec une augmentation de la contribution des oreillettes pour le remplissage des ventricules [232].

II. 4. 2. 2. 2. Dysfonctions diastoliques chez l'obèse

Chez l'obèse normotendu au repos, la durée de la relaxation du VG est augmentée et la contribution auriculaire pour le remplissage du VG est plus forte [70,199,219,233]. Les facteurs influençant la diastole sont la sévérité de l'obésité, les conditions de charge et la masse du VG, la durée de l'obésité [75]. D'autres facteurs sont corrélés aux dysfonctions diastoliques chez l'obèse : les dimensions internes du VG en diastole, la pression artérielle systolique, le stress pariétal. Les dysfonctions diastoliques apparaissent progressivement avec les changements morphologiques du VG (HVG excentrique chez l'obèse).

III. EXPRESSION GENIQUE CARDIAQUE

III. 1. METHODES ACTUELLES D'ANALYSE DU TRANSCRIPTOME

La génomique correspondait originalement à la science qui se cantonnait à la cartographie, au séquençage et à l'analyse des génomes comme le séquençage complet d'un organisme par exemple [234]. Dès que la génomique a été en mesure de montrer qu'elle pouvait faire émerger de nouvelles cibles pharmacologiques, son intérêt n'a cessé de grandir.

La génomique a donc suivi 2 phases : la génomique structurale et la génomique fonctionnelle. Alors que la première est a son apogée, la seconde n'est qu'à ses débuts. La génomique structurale a été basée sur le séquençage haut débit tandis que la génomique fonctionnelle paraît se reposer principalement sur le profil d'expression génique à grande échelle avec la technologie des *DNA-microarrays* ainsi qu'un grand nombre de nouvelles technologies destinées à élucider la fonction des gènes telles que les ARN antisens, les SiRNA, et les technologies dites *perturbagen (KnockOut KO, Knock In KI).*

La génomique structurale a été basée, au travers du projet international HUGO (*Human Genome Project*), sur le séquençage des 3.2 10^9 nucléotides du génome humain depuis 1990. Cette approche a permis de révéler une première grande découverte : le génome humain n'est constitué que d'environ 24 500 gènes contre les 100 000 estimés auparavant [235,236]. Cette approche a permis d'identifier rapidement des milliers de gènes inconnus et autant de cibles pharmacologiques potentielles [237,238].

C'est à partir de là que la génomique fonctionnelle à pu prendre tout son essor. La nouvelle question était alors : comment approcher et élucider la fonction de ces milliers de nouveaux gènes ? La combinaison des approches bioinformatiques et la technologie des *DNA-microarrays* s'est développée afin de sélectionner et de transformer les milliers de données en

groupes de gènes selon leur fonction présumée et leurs variations d'expression afin de rendre ces données plus conceptuelles [239].

III. 2. REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DE MAMMIFERES

L'expression des gènes est principalement régulée au niveau de l'initiation de la transcription. La régulation de l'expression des gènes repose sur la liaison de facteurs de transcription au niveau de séquences proximales, en amont du gène, le promoteur. ou au niveau de zones stimulatrices plus distantes nommées *enhancer*. La plupart des facteurs de transcription interagissent avec la RNA polymérase au niveau du promoteur pour former le complexe d'initiation de la transcription. Les facteurs de transcription se lient à de courtes séquences d'ADN appelées éléments de réponse qui stimulent généralement la transcription mais plus rarement la diminue. Les facteurs de transcription ont des structures protéiques communes : comme les motifs *Zn finger*, *leucine zipper*, les structures *helix-loop-helix* … Le contrôle de l'expression peut être aussi réalisé au niveau du transcrit primaire par des *splicing* alternatifs ou la dégradation des ARN ou au niveau de l'initiation de la traduction. En ce qui concerne la répression de l'expression génique, dite *silencing*, elle se réalise principalement au niveau de la compaction de l'ADN au travers de la condensation de l'hétérochromatine et de la méthylation. Enfin, le niveau de synthèse d'une protéine peut être régulé au niveau de la traduction.

III. 2. 1. Structure des zones régulatrices d'un gène

Chaque gène est régulé séparément et possède son propre promoteur. La plupart du temps, les séquences responsables de la régulation de l'expression du gène se trouvent en 5' du gène. Mais certains gènes sont régulés en groupe parce que leur promoteur est sous le contrôle du même facteur de transcription. Le promoteur en lui-même s'étend sur une

centaine de base et les *enhancers* sont en général plus amont entre -1 et -10 kbp (la 1ière base transcrite étant le point +1). La plupart des promoteurs, mais pas tous, ont la même structure avec une séquence commune un motif TATA (TATA box) généralement localisé 30bp en amont du départ de la transcription. Cette boîte lie la plupart des éléments d'initiation de la transcription et la RNA polymérase. Un autre élément classique du promoteur est en général situé à 75bp et représenté par la séquence CAAT (CAAT box) à laquelle se fixe aussi une famille spécifique de facteurs de transcription. Enfin à 90 bp apparaît la plupart du temps une séquence contenant GC sur laquelle se fixe le facteur de transcription ubiquitaire SP1 (Fig. 14). Sorti de ces généralités, un grand nombre de facteurs de transcription, répondant aux hormones, aux facteurs de croissance, peuvent se lier sur les séquences *enhancer* ou le promoteur [240].

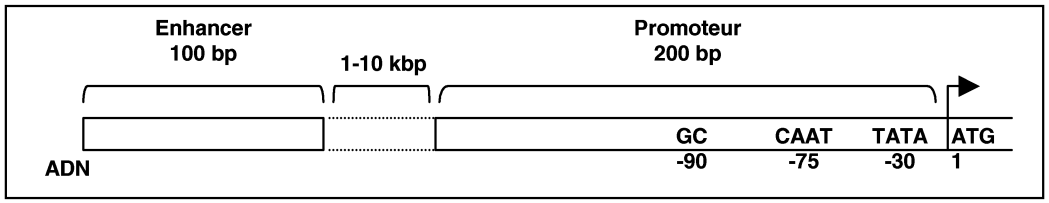


Fig. 14 : Structure classique des zones régulatrices d'un gène.

III. 2. 2. L'appareil de transcription

Il y a 3 types de RNA polymérases. La RNA polymérase qui catalyse la synthèse des ARNm est la RNA polymérase II. Cette enzyme de 500 kD est constituée de 8 à 14 sous-unités. La sous-unité la plus grande (220 kD) est impliquée dans l'activité catalytique et phosphorylable dans sa partie C-terminale. La polymérase seule n'est pas capable de reconnaître le promoteur. Son initiation dépend de l'association avec des facteurs de transcription. L'initiation du complexe se fait grâce à l'assemblage de facteurs de transcription de base : TFIIA et TFIIB qui sont généralement toujours requis [241,242]. La *TATA binding protein* (TBP) s'associe à la TATA box puis TFIIA et TFIIB se lient à cette dernière.

Ainsi ce complexe minimal est prêt pour initier l'attachement de la RNA pol II. Puis d'autres sous-unités se lient à ce complexe primaire : TFIIE, TFIIH, TFIIJ. TFIIH possède une activité hélicase ATP dépendante qui permet de dérouler l'ADN devant la RNA pol II [243]. C'est ensuite l'intervention de divers facteurs de transcription qui va conditionner le niveau de transcription.

III. 2. 3. Les facteurs de transcription & la régulation transcriptionnelle

Un facteur de transcription (FT) est défini comme étant une protéine qui se lie à l'ADN et qui stimule la formation et stabilise le complexe d'initiation. Tous ces facteurs interagissent entre eux et / ou avec la RNA pol II. La plupart des facteurs de transcription se lient à l'ADN sous forme dimèrique. Les FT ont une affinité pour une (parfois plusieurs) séquence spécifique dite *Response Element*. Les domaines de liaison à l'ADN sont caractéristiques et se répartissent majoritairement dans 3 grandes familles : les domaines Zn finger, leucine zipper et helix-loop-helix (dites aussi homéoprotéines) [244].

Les domaines *Zn finger* se retrouvent dans de nombreux FT généraux tel que Sp1. On retrouve aussi la famille des récepteurs aux stéroïdes et hormone thyroïdes : récepteurs aux oestrogènes, aux glucocorticoïdes, progestérones, minéralocoticoïdes, androgènes, thyroïdes, vitamine D et acides rétinoïques [245].

Dans la famille des FT à *leucine zipper* on retrouve les FT dits gènes précoces c-Fos et c-Jun qui s'hétérodimérisent et AP-1 [246].

Enfin, parmi la famille des FT à helix-loop-helix on retrouve principalement des gènes impliqués dans les processus développementaux : MyoD, E12, E47 [247].

Il existe 4 modes principaux d'activation des FT : la phosphorylation par des kinases spécifiques, la liaison à un ligand spécifique (récepteurs nucléaires), le retrait de l'inhibiteur endogène (ex : NFκB et IκB) et la synthèse *de novo* du FT (ex : synthèse de c-Fos).

Si l'on se concentre sur la voie désormais la plus connue : l'activation par phosphorylation avec des kinases spécifiques. Cette voie d'activation des FT correspond à celle des stimulations des récepteurs membranaires aux hormones et facteurs de croissance à tyrosine kinase qui activent une série de kinases cytoplasmiques vers le noyau [248]. On retrouve dans ce type d'activation des FT les récepteurs à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), *PDGF (Platelet-derived Growth Factor*) et IGF (*Insulin-like Growth Factor*) qui convergent tous vers l'activation des MAP Kinases. Ces dernières sont capables de phosphoryler les FT SRF (*Serum Response Factor*) et TCF (*Ternary Complex Factor*). Ces FT contrôlent la transcription des gènes dits précoces requis pour le passage de la phase S du cycle cellulaire.

On retrouve aussi dans ce type d'activation des FT par phosphorylation : la PK_A [249,250]. Cette dernière est activée par l'AMPc produit par l'Adénylate Cyclase, elle-même régulée par des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG : récepteurs β-adrénergiques…). La PK_A phosphoryle le FT CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*). Ce FT ainsi activé se fixe sur les gènes à boîte CRE (*cAMP Response Element*). CREB favorise la transcription de la somatostatine, des gènes de la néoglucogénèse dans le foie, et c-Fos dans les fibroblastes.

La PKc est aussi impliquée dans l'activation des FT qui contrôlent des gènes de la prolifération et de la différenciation [251]. Ce sont encore les RCPG qui activent cette kinase via la PLc (Phospholipase C) qui produit du DAG (diacylglycérol) qui active directement les PKc. Cette kinase est transloquée dans le noyau où elle peut phosphoryler les FT c-Fos, c-Jun et AP-1.

La *Calcium-Calmodulin Kinase* active elle aussi des FT. C'est le Ca^{2+} qui cette fois est au centre des régulations. Outre les nombreuses fonctions de second messager Ca^{2+}, il active également la calmoduline qui active à son tour le FT CPT qui se fixe sur la boîte CAAT mais aussi CREB, ATF-1 (*Activating transcription Factor 1*), c-Fos et SRF [252].

Mais il existe en plus un haut degré de complexité entre ces voies puisqu'elles établissent des communications croisées.

Enfin, le contrôle de la transcription est aussi régi par la structure de l'ADN. L'ADN est organisé autour des histones pour former la chromatine. Dans l'hétérochromatine, l'ADN est hautement condensé ce qui le rend relativement résistant aux nucléases. Mais surtout, dans cette forme, les gènes sont rendus silencieux. Un bon exemple de la régulation par hétérochromatinisation est l'inactivation d'un des 2 chromosomes X dans les cellules femelles. Ainsi, un des 2 chromosomes est rendu inactif par compaction de l'ADN. Et les cellules filles conservent cette empreinte parentale. Mais au contraire, dans l'euchromatine, l'ADN est moins compacté ce qui le rend plus accessible à la transcription et aussi plus sensible aux nucléases. Ainsi dans ces régions, les FT se fixent plus facilement et de manière plus stable à l'ADN. La démonstration de gènes régulés par l'organisation de la chromatine au cours du développement a été faite pour les gènes de globines dont l'expression évolue depuis le fœtus jusqu'à l'adulte. Le niveau de transcription des gènes est aussi régulé par l'acétylation des histones. Ceci modifie la compaction de l'ADN et rend les zones régulatrices des gènes accessibles aux FT [253]. Il existe aussi des systèmes de méthylation des cytosines de l'ADN qui rendent les gènes inactifs. Au cours du développement embryonnaire, de très nombreux gènes sont déméthylés afin de rétablir leur expression pour le développement de l'embryon [254]. Ces méthylations réduisent considérablement la fixation des FT sur leur site comme CREB, Myc, E2F, NFκB et d'autres. On observe la déméthylation de nombreux gènes dans le cadre de tumeurs cancéreuses.

Le niveau d'expression d'un gène peut aussi être régulé par le *splicing* des pré-ARNm. On estime que 5% des pré-ARNm sont régulés par mécanismes de *splicing* alternatif [255]. Un bon exemple est le gène de la fibronectine. Ce gène n'est exprimé que par les fibroblastes et les hépatocytes mais sous 2 formes différentes. Les fibroblastes produisent une protéine qui

interagit avec des récepteurs cellulaires de surface. Alors que les hépatocytes produisent une protéine dépourvue de cette région et qui reste soluble dans le sérum. Cette différence repose sur un splicing alternatif qui excise la région codant pour la liaison aux récepteurs membranaires dans les hépathocytes. Un autre exemple est le splicing alternatif d'un même gène pour synthétiser le FT CREB et son inhibiteur compétitif CREM. Les 2 protéines proviennent du même gène mais CREM est rendu inactif par excision du domaine d'activation par phosphorylation ce qui ne l'empêche pas de se fixer à l'ADN.

Il existe aussi une régulation complexe sur les pré-ARNm et les ARNm par les ARNnm (non-messagers). Les ARNnm correspondent aux *small nucleolar RNA* (snoRNA), *small nuclear RNA* (snRNA), *micro RNA* (miRNA), *ribosomal RNA* (rRNA), *transfert RNA* (tRNA) [256]. Ce sont les snoRNA et les miRNA qui attirent le plus l'attention. Puisque ces ARN ont la capacité d'interagir avec des ARNm cibles par complémentarité de séquence, comme des ARN anti-sens. Ils participent aux modifications post-transcriptionnelles des rRNA [257]. Les miRNA se lient aux ARNm pour réguler leur expression (silencing) [258-262]. Les gènes cibles de ces miRNA sont encore peu connus mais il est avancé que ces éléments pourraient faciliter un basculement rapide dans l'expression des gènes. Des ARNnm ont déjà été identifiés et associés à des pathologies. Par exemple, on connaît déjà des ARNnm associés à des dérégulations du système nerveux central, des pathologies génétiques et des cancers. Le syndrome de Prader-Willi, associé à un retard mental et une obésité, est lié à des délétions dans la région q11-q13 du chromosome 15 paternel qui contient l'ARNnm IPW. Cette région contient également le snoRNA MBII52 qui s'exprime uniquement dans le cerveau et dont la cible présumée serait la sérotonine.

III. 3.FACTEURS DE TRANSCRIPTION CARDIAQUES ET REGULATIONS DE L'EXPRESSION GENIQUE

III. 3. 1. Les facteurs de transcription de la cardiogénèse

Le cœur prend son origine dans les territoires mésodermiques latéraux. D'un point de vue cellulaire, chez les vertébrés, les cellules dédiées au territoire cardiaque sont activées dans cet ordre : spécification des *primordiums* dans les territoires mésodermiques latéraux (gauches et droits), diversification des lignages cellulaires cardiaques, puis quand le programme myogénique est activé les 2 groupes de cellules migrent en position ventrale afin de fusionner (chez les invertébrés la migration et la fusion des *primordiums* se fait en position dorsale). C'est l'activation d'une série de FT et de facteurs de croissances sécrétés par les territoires voisins qui induisent la cardiogénèse et la migration de ces 2 groupes de cellules. Ce fut d'abord l'étude du développement du cœur de la drosophile qui a permis d'identifier ces protéines et de trouver leurs homologues chez les vertébrés.

La spécification du territoire péricardique est dirigée par une famille de facteurs de croissances de la famille TGF β (*Transforming Growth Factor* β). En effet, c'est la protéine BMP 4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*), exprimée par l'ectoderme, qui induit le développement du cœur dans le mésoderme [263-265]. Le facteur de croissance FGF 4 (*Fibroblast Growth Factor 4*), exprimé par l'endoderme antérieur, agit en coopération avec BMP 4 pour spécifier la région péricardique dans le domaine antérieur du mésoderme [266]. Sous cette stimulation, les cellules mésodermiques expriment les FT Nkx 2.5, Nkx 2.3 et Nkx 2.7 [267,268]. D'ailleurs la perte de fonction du gène Nkx 2.5 perturbe gravement la cardiogénèse et l'injection d'ARNm codant pour Nkx 2.5 et Nkx 2.3 chez le xénope provoque l'élargissement du territoire cardiaque [269,270]. Les mécanismes des différents lignages des cellules cardiaques demeurent pour leur part peu connus chez les vertébrés puisque l'on n'a

pas encore identifié les homologues moléculaires de la drosophile. Néanmoins, les facteurs de croissances de la famille Wnt paraissent jouer un rôle à cette étape.

La différentiation des cellules cardiaques débute par l'activation des FT de la famille MEF 2 (FT à boîte MADS). Ces FT sont directement activés par les FT de la famille Nkx [271]. D'ailleurs chez la souris, l'invalidation de MEF2-C perturbe la cardiogénèse comme l'invalidation de Nkx 2.5 [272]. Puis ce sont les FT GATA 4, 5 et 6 qui s'expriment juste avant la fusion des *primordiums* [265]. On retrouve les éléments de réponse aux FT GATA dans le promoteur des gènes ANP, BNP, MHC et troponin C [273-275]. On retrouve l'élément de réponse aux FT MEF2 dans le promoteur des gènes MKC, MLC-2, MHC, ANP et la myoglobine [276,277].

Dans les ventricules, les FT de type bHLH (*basic helix-loop-helix*) dHAND / HAND 2 et eHAND / HAND 1 sont exprimés principalement dans le VG et le VD primitif [278]. La délétion du FT dHAND provoque d'ailleurs une hypoplasie du VD. Là encore l'expression préalable de Nkx 2.5 semble indispensable sinon les futurs ventricules n'expriment pas le FT eHAND [279]. L'expression des FT dHAND et Nkx 2.5 induit l'expression d'un autre FT : irx 4 gène à homéobox (comme Nkx 2.5) dont l'expression est cantonnée aux ventricules [280,281]. Enfin, MEF2C paraît indispensable au développement correct des ventricules [272]. Les délétions ou la mutation des récepteurs nucléaires RXRα et RARγ, des FT c-myc, N-myc, WT-1, NF-1, TEF-1, TBX 5 et Hox 1 et 5 semblent indiquer que tous ce FT sont aussi impliqués dans la cardiogénèse puisque leur inactivation induit soit une hypoplasie des cardiomyocytes (RAR et RXR), soit une hypertrophie (c-myc, WT-1, Hox 1, 5), soit une malformation du septum interventriculaire (TBX 5, NF-1, TEF-1) [282-290] (Fig. 15).

En ce qui concerne les oreillettes, bien peu de choses sont connues sur les mécanismes moléculaires spécifiques à ce territoire cardiaque, le récepteur nucléaire orphelin COUP-TFII est exprimé précocement et spécifiquement au niveau des oreillettes et semble indispensable

[291]. Les récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque (RXR, RAR)ont été aussi impliqués dans la spécification cellulaire auriculaire et dans les zones atrio-ventriculaires [292]. Et le FT Nkx 2.8 est exprimé de manière dynamique : d'abord dans tout le cœur et ensuite dans les oreillettes pour finir dans les arcs branchiaux [293].

Afin de supporter l'augmentation de la charge hémodynamique croissante les chambres cardiaques doivent s'agrandir et les parois s'épaissir. Pour cela, les cardiomyocytes prolifèrent. La neureguline est sécrété par l'endocarde et se lie à ses récepteurs nucléaires Erb2 et Erb4 [294]. Le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et l'angiopoietine 1, sécrétés par l'endocarde, semblent eux aussi jouer un rôle indispensable dans le développement cardiaque [295,296].

La formation de valves cardiaques, de type mésenchymateux, est aussi régi par un programme génétique particulier. Cette partie du cœur est sous le contrôle des facteurs de croissance de la famille du TGF β [297]. Les FT Smad 6 et NF-ATc sont indispensables dans le développement des valves et les calcineurines semblent jouer un rôle indispensable dans la transduction de ces signaux [298-300].

Enfin la formation des connexions vasculaires partant du cœur sont aussi régies par l'expression de facteurs de croissances et de FT particuliers. L'endotheline 1 et la transduction du signal au travers des récepteurs ETA détermine l'expression correcte des FT dHAND et eHAND et la formation correcte de l'arche aortique [301-303]. De plus, la mutation de la neurophiline 1 induit les mêmes perturbations que celles de l'endothéline 1, ce qui laisse supposer que l'endothéline 1, le FT d HAND et la neurophiline 1 empruntent la même voie [304,305]. La délétion d'un autre FT : Forkhead Mfh1 cause une hypoplasie de l'arche aortique, ce qui l'implique potentiellement dans le développement de l'aorte [306]. De même pour Pax 3, les récepteurs aux acides rétinoïques RAR et RXR et TFAP2B, leur délétion semble les impliquer dans les processus développementaux de l'aorte [307-309].

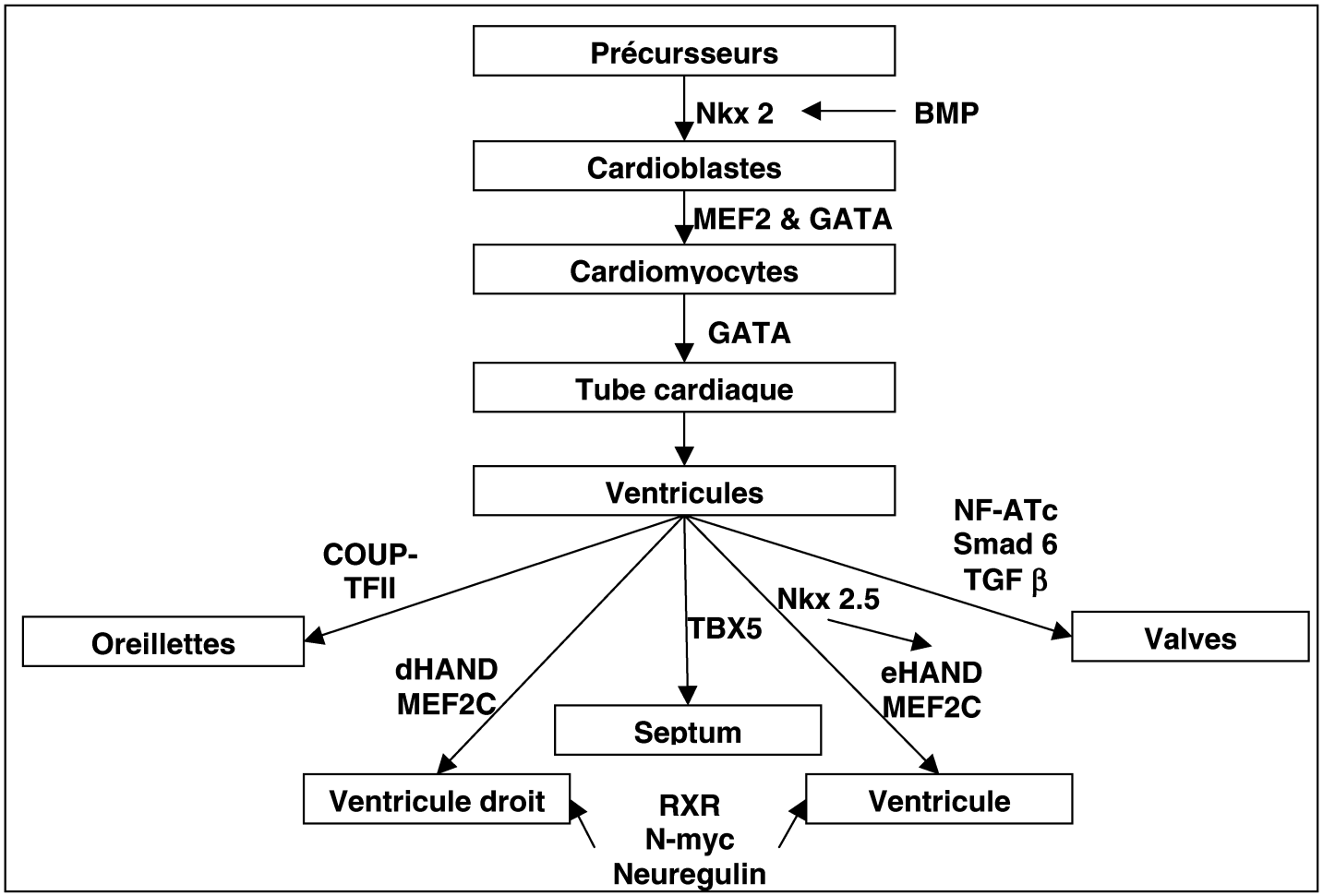


Fig. 15 : Les facteurs de transcription cardiaques.

Ce passage en revue de FT indispensables au développement cardiaque, permet de replacer ces éléments moléculaires et leur rôle potentiel au cours d'un contexte pathologique où les gènes fœtaux sont fréquemment réexprimés.

III. 3. 2. Modifications de l'expression génique du cœur hypertrophié

En réponse à des stimulations mécaniques et hémodynamiques, les myocytes s'adaptent à l'augmentation de la charge en modifiant l'expression de leurs gènes pour reproduire souvent un profil d'expression de type fœtal [310,311] (Tab. 1). Comme lors de la vie néonatale, le nombre et la taille de cellules cardiaques en division augmente [311,312]. De plus, le taux d'ARN et la synthèse protéique augmentent très rapidement (en 2 heures) sous l'augmentation de la charge de travail [313].

Le taux total de protéine, de myosine et de collagène (mais pas de la myoglobine) est augmenté après seulement 3 heures d'augmentation de la pression aortique. Dès 1965, il a été mis en évidence qu'après seulement 30 minutes de surcharge barométrique apparaissait de nombreux polysomes dans le myocarde, preuve d'une traduction accrue [314]. Le marquage radioactif des protéines totales et de myosine sous surcharge barométrique (par sténose aortique) atteint un pic à 5 et 6 jours et retourne aux valeurs basales passées 2 à 3 semaines. Cette accumulation de protéines totales et de myosine est liée à une augmentation du métabolisme protéique [315]. Mais d'autres approches au niveau du transcriptôme sont apparues récemment et ont permis de caractériser plus globalement les changements moléculaire du cœur hypertrophié.

Sarcomère
↓ activité myosin ATPase
Réexpression des isoformes ββ des chaînes lourdes de myosine
Réexpression atriale des chaînes légères de myosine (phénotype fœtal)
Protéines membranaires
Changement des sous-unités α2 en α3 des pompes Na^+/K^+ ATPase
↑ expression des échangeurs Na^+/Ca^{2+}
↑ durée du potentiel d'action
↓ du courrant Ito
↓ des taux de récepteurs β1 adrénergiques et M2 muscariniques
Protéines du réticulum sarcoplasmique
↓ des taux de récepteurs à la ryanodine
↓ des taux de SERCA-2
↓ des taux de phospholamban
Métabolisme énergétique
↓ des taux de myoglobine
↑ de l'expression des protéines mitohondriales (DNA loops)
Changement vers l'isoforme B de la créatine kinase
Changement vers l'isoforme MM de la lactate déshydrogénase
Mise en place d'un métabolisme anaérobique

Tab. 1 : Modifications de l'expression génique dans le cœur hypertrophié (d'après Swynghedauw 1982).

III. 3. 2. 1.Régulations des flux calciques dans le cœur hypertrophié

L'augmentation du Ca^{2+} cytosolique est un signal majeur conduisant à l'hypertrophie. Il y a dans le cœur de l'insuffisant cardiaque et dans le cœur hypertrophié une diminution de l'expression de la pompe SERCA-2 concomitante à une diminution des taux en phospholamban. La diminution de l'expression de SERCA-2a est considérée comme l'un des meilleurs marqueurs de la surcharge cardiaque chronique [316,317]. La réduction de la concentration de cette enzyme est progressive et reliée à la survenue d'une insuffisance cardiaque.

Il existe 2 formes de canaux-récepteurs à la ryanodine intracellulaires au travers desquels le calcium est relargué du réticulum sarcoplasmique vers le sarcoplasme. Dans le cœur hypertrophié, l'affinité de ces récepteurs pour la ryanodine s'avère diminuée et il a été également montré une diminution des taux d'ARN [318]. Et des études de *binding* avec de la ryanodine radioactive ont révélé une augmentation d'un facteur 2 dans le nombre de sites de haute affinité suggérant que durant l'insuffisance cardiaque d'autres facteurs régulent les propriétés d'affinité de ces récepteurs.

L'entrée de calcium est normale dans le cœur hypertrophié à part aux stades finaux de l'insuffisance cardiaque. Mais la sortie de calcium du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire est principalement assurée par l'échangeur Na^+/Ca^{2+} et la Na^+/K^+ ATPase. Les modifications au niveau de la pompe Na^+/K^+ sont spécifique de l'espèce considérée. Chez le rat, il apparaît un déplacement de la forme $\alpha 2$ (adulte) vers la forme $\alpha 3$ (fœtale). Chez le rat, l'isoforme $\alpha 3$ a une affinité plus faible pour le sodium que la forme 2 [319,320]. Chez l'Homme, le déplacement se fait de la forme $\alpha 1$ vers la forme $\alpha 3$. L'activité ATPase de la forme $\alpha 3$ est réduite et la sensibilité au sodium est aussi plus faible. Donc chez l'Homme comme chez le rat la sensibilité au sodium diminue et il s'en suit une légère accumulation de sodium intracellulaire. L'activité de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} est en revanche sujette à de nombreuses

controverses [321,322]. Il est maintenant bien accepté qu'il existe chez l'Homme une augmentation de la densité de cet échangeur durant le développement de l'hypertrophie compensatoire et dans les stades finaux de l'insuffisance cardiaque [322]. Mais d'un point de vue électrophysiologique cette augmentation serait compensée par la légère augmentation de Na^+ intracellulaire.

III. 3. 2. 2. Les autres courants ioniques dans le cœur hypertrophié

L'augmentation de l'intervalle QT dans l'ECG et de la durée globale du potentiel d'action ont été montrées sur cardiomyocyte isolé et dans le cœur hypertrophié et celui de l'obèse. Ces modifications dans la repolarisation paraissent être une réponse d'adaptation aux modifications ioniques [323]. La surcharge mécanique produit un déficit élevé des courants précoces transitoires sortant potassiques Ito, même si l'on normalise par rapport à la surface totale de la cellule [324]. Cette modification suggère un changement dans l'expression génique des canaux potassiques. Les gènes Kv ont effectivement une diminution de leur expression de l'ordre de 50 % pouvant être à l'origine de la diminution du courant potassique et donc de l'augmentation de l'intervalle QT [325] (Tab. 2). En ce qui concerne la densité et le nombre de canaux calciques, ils demeurent inchangés mais il existe une modification dans la présence des isoformes. Lors de l'insuffisance cardiaque, la densité des canaux calciques peut varier, ce qui est attribué à un effet direct des catécholamines plasmatiques. Les échangeurs Na^+/K^+, qui génèrent un courrant entrant dépolarisant, ont une activité prolongée ce qui a pour conséquence d'allonger aussi les courants calciques. Les courants calciques I_f et I_{CaT} et l'isoforme $\alpha 3$ Na^+/K^+ ATPase sont tous spécifiques du nœud sinusal et sont tous anormalement exprimés au niveau ventriculaire lors d'une surcharge mécanique ce qui suggère que les ventricules acquièrent un certain degré d'automatisme. Il existe aussi un réarangement de la distribution des connexines dans le cœur hypertrophié avec un

changement d'expression des isoformes 43 vers l'isoforme 40, ce qui constitue le substrat moléculaire pour expliquer l'augmentation de la susceptibilité du cœur hypertrophié envers l'ischémie.

	Homme	Modèles
ECG		
Intervalle QT	↑	↑
Electrophysiologie		
Capacitance membranaire	↑	↑
Durée du potentiel d'action	↑	↑
Potentiel de repos	=	=
Courant calcique transitoire		
Durée	↓	↑
Pic maximum	↓	=
Courant de repos	↑	↓
Etude de patch-clamp		
Courants K+ sortant		
Ito	↓	↓
Iks	=	↓
Ik1	↓	?
Ik_{ATP}	↓	?
Courants entrant		
I_{Na}	=	?
I_{CaL}	↓	=
I_{Na-Ca}	?	?
Courant pace-maker		
I_{CaT}	?	**présent**
Canaux ioniques		
Taux ARN et protéines codant pour les canaux K+		
Kv 4.2	↓	?
Kv 1.4 et 2.1	↓	?

Tab. 2 : Modifications de l'expression génique et de l'électrophysiologie des canaux ioniques (d'après Swynghedauw 1998).

III. 3. 2. 3. Récepteurs cardiaques dans le cœur hypertrophié

Les études sur le cœur hypertrophié ont montré qu'en dépit de taux plasmatiques en catécholamine normaux et diminués dans le myocarde, le taux d'ARNm codant pour les récepteurs β-adrénergiques et la densité de ces récepteurs s'avère plus faible de 30%, ce qui suggère une répression hétérologue. Mais ce gène n'est pas régulé par le stress mécanique [326]. Les taux d'ARN codant pour les récepteurs muscarniques sont diminués [326]. Or chez le rat, le rapport récepteurs muscariniques / récepteurs β1-adrénergiques reste inchangé. Dans l'insuffisance cardiaque, les taux élevés de catécholamine induisent une régulation homologue qui conduit à la diminution de la densité des récepteurs β-adrénergiques. Mais dans l'insuffisance cardiaque, il a été montré une augmentation de l'ordre de 75 % des protéines Giα-2. L'augmentation de ce type de protéine G au cours de l'insuffisance cardiaque serait causée par les taux élevés de catécholamines plasmatiques [327]. Ainsi, au cours du développement d'une hypertrophie cardiaque compensatoire, la diminution des récepteurs β-adrénergiques, l'augmentation d'activité des échangeurs Na^+/Ca^{2+} et la diminution de SERCA-2a seraient destinés à atténuer les effets inotropiques des forts taux plasmatiques en catécholamines. Ceci préfigure les changements présents lors de l'insuffisance cardiaque déclarée où l'on retrouve les mêmes protéines impliquées avec les mêmes sens de variations mais amplifiés (ex : SERCA-2) ou des variations suspectes dans le cœur hypertrophié et confirmées dans le cœur en insuffisance (pompe Na^+/K^+). De plus, lors de l'insuffisance cardiaque d'autres protéines suivent des variations d'expression ou d'activité destinées aussi à atténuer l'inotropie cardiaque (ex : diminution des Canaux Ca^{2+} de type L).

Les récepteurs à l'angiotensine II sont exprimés à des taux relativement faibles au niveau cardiaque comparé au récepteurs β-adrénergiques. Au cours de l'hypertrophie compensatoire après un infarctus, il y a une augmentation de la densité des récepteurs ATR1 et 2 d'un facteur 3 à 4 avec une augmentation des taux d'ARNm avec une diminution de la

vélocité des myocytes [328]. Au cours de l'hypertrophie cardiaque compensatoire sans infarctus, il y a aussi une augmentation des récepteurs ATR au niveau ventriculaire mais sans changement dans le rapport ATR1/ATR2. En revanche, l'insuffisance cardiaque est accompagnée par une perte de densité des récepteurs ATR1 mais sans changement pour ATR2[329]. Cette diminution a été corrélée à la diminution des récepteurs β1-adrénrgiques suggérant que les 2 voies puissent être reliées par l'augmentation plasmatique de leurs agonistes respectifs [330].

III. 3. 2. 4. Fonctions endocrines cardiaques dans le cœur hypertrophié

Les 2 sécrétions endocrines cardiaques principales sont l'ANP (*Atrial Natriuretic Peptide*) et l'angiotensine II. Ces sécrétions sont augmentées durant le développement de l'hypertrophie cardiaque et les taux de catécholamine cardiaques sont diminuées.

L'ANP est exprimé à des taux anormalement élevés au niveau atrial et ventriculaire. Son expression et sa sécrétion sont activées par la surcharge atriale et ventriculaire [331]. L'expression de l'ANP, du BNP et du CNP sont aujourd'hui considérés comme les meilleurs marqueurs biologiques de la surcharge ventriculaire et prédicteurs d'une insuffisance cardiaque. Une surexpression du BNP est plus particulièrement reconnue comme étant un marqueur de la surcharge ventriculaire qui s'accentue lors de l'émergence de l'insuffisance cardiaque et de nombreux types de cardiomyopathies hypertrophiques. Les niveaux circulants de NO sont presque doublés dans le cadre d'une cardiomyopathie dilatée. L'ARNm et la protéine iNOS ne sont pas présent en temps normal dans le cœur de l'Homme. Mais elle est coexprimés avec l'ANP dans le cœur des patients insuffisants cardiaques, sans pour autant qu'on en connaisse la cause.

Les taux d'ARNm de la prépro-endothéline 1 et les taux en protéine de l'endothéline 1 sont significativement augmentés dans de nombreux modèles d'insuffisance cardiaque. Cette

upregulation est significativement corrélée à la pression ventriculaire en fin de diastole. Chez l'Homme, l'élévation plasmatique d'endothéline 1 est significative chez les patients ayant une insuffisance cardiaque modérée (NYHA classes III & IV). Par ailleurs, les taux d'endothéline 1 évoluent de la même manière chez l'obèse et aussi dans les cas d'insulinorésistance [332].

Enfin, le TNF α est une cytokine proinflammatoire qui a des effets proapoptotiques et un effet inotrope négatif. Mais les taux plasmatiques du TNF α et de l'IL-6 sont normaux chez les patients avec une hypertrophie cardiaque compensatoire alors qu'ils sont très augmentés chez l'insuffisant cardiaque. Le TGF β, exprimé à des taux anormalement élevés chez l'obèse, est bien identifié d'une part pour son action stimulatrice de la synthèse de collagène sur les fibroblastes et d'autre part pour les modifications d'expression des récepteurs M_2, β2 adrénergiques, NpRA, RyR 2 et la pompe SERCA 2 dans les cardiomyocytes [333].

III. 3. 2. 5. Protéines contractiles dans le cœur hypertrophié

Il y a un changement d'expression des isoformes des chaînes lourdes de myosine (*MHC*). Normalement, chez le rat les isoformes αα prédominent au niveau des ventricules, tandis que chez l'Homme c'est exclusivement l'isoforme ββ (forme lente des *MHC*) qui est présent. Dans le ventricule de rat en surcharge barométrique, il y a rapidement un changement de l'isoforme αα pour l'isoforme ββ-*MHC*, ce qui corrèle avec la baisse de vélocité [334,335]. L'augmentation des taux d'ARNm ββ-*MHC* précède l'augmentation des taux de la protéine correspondante, ce qui montre que cette régulation est transcriptionnelle. Mais chez l'Homme vu que l'isoforme dominant au niveau ventriculaire est déjà la ββ-*MHC* cette variation n'a que peu d'importance [336,337]. Mais au niveau atrial, dans toutes les espèces animales les cardiomyocytes atriaux ont une vélocité plus rapide que ceux des ventricules due à

l'abondance en isoforme αα-*MHC*. Or une surcharge barométrique au niveau atrial induit une diminution de l'expression des *MHC*-αα.

Les oreillettes humaines en surcharge possèdent alors en plus de leur composition normale en chaînes légères de myosine spécifiques du niveau atrial, les sous-types ventriculaires *MlC1v* et *MlC2v*. De plus, dans de nombreuses formes de cardiomyopathies chez l'Homme, les ventricules s'enrichissent en isoformes embryonnaires de *MlC*, qui sont exprimés normalement au niveau atrial, et dans des proportions correspondant au degré du stress pariétal [338,339].

III. 3. 2. 6. Le cytosquelette dans le cœur hypertrophié

La surcharge mécanique induirait une augmentation très précoce de l'expression de l'actine entre le 2ième et 4ième jours après le début de la surcharge mécanique [340]. De plus, le réseau de microtubules et la concentration en tubuline s'avèrent augmentés lors d'une surcharge barométrique dans les ventricules du chat. Tandis qu'une surcharge volumétrique n'occasionnerait aucun changement. Ces modifications dans la composition des microtubules et du cytosquelette imposeraient une charge supplémentaire sur le raccourcissement du sarcomère, ce qui retarderait le développement de ce dernier [341].

Il y a aussi d'autres protéines du cytosquelette qui peuvent jouer un rôle dans le maintient d'un certain raidissement du cardiomyocyte. L'expression de la titine est augmentée dans les modèles d'hypertrophie cardiaque et d'insuffisance cardiaque et elle pourrait contribuer aux anomalies de la contractilité. L'expression de la desmine, qui forme les filaments intermédiaires, est également augmentée. Les quantités de vinculine des cardiomyocytes sont aussi augmentées dans le cadre de la cardiomyopathie dilatée. Ces changements pourraient être destinés au maintient de la forme de la cellule pour compenser la perte de matériel contractile [342].

III. 3. 2. 7. Facteurs de transcription, oncogènes et hypertrophie

Certains modèles d'hypertrophie cardiaque chez des souris transgéniques utilisent des oncogènes ou des facteurs de transcription [343] (Tab. 3).

Gène	Phénotype
Protooncogènes	
c-myc	**Hyperplasie des cardiomyocytes** **Hypertrophie cardiaque** **Augmentation de la sensibilité à la T3**
P21- c-ras	**Hypertrophie & dysfonction diastolique**
v-fps (tyrosine kinase)	**Fibrose cardiaque & hypertrophie**
IL-6 & IL-6 Receptor	**Hypertrophie cardiaque & troubles de la relaxation**
Facteurs de transcription musculaires	
bmyf-5	**Hypertrophies des 4 cavités**
MyoD	**Insuffisance cardiaque**

Tab. 3 : Facteurs de transcription & protooncogènes dans le cœur hypertrophié (d'après Swynghedauw 1996).

Les contraintes mécaniques constituent les premiers inducteurs de l'hypertrophie et conduisent directement à la surexpression de protooncogènes. Les premières équipes qui procédèrent à ces manipulations chez la souris pour générer une hypertrophie et un modèle pathologique cardiaque, utilisèrent le promoteur de l'ANP devant l'oncogène viral *large T-antigen* de SV40. Ces animaux présentent à 21 jours une hyperplasie atriale bilatérale, plus marquée dans l'oreillette droite, une arythmie, et aussi un index mitotique plus élevé au niveau des ventricules [344].

L'oncogène *c-myc*, vu son implication précoce dans les mécanismes de surcharge mécanique, a été aussi utilisé parmi les premiers chez la souris transgéniques pour générer une

hypertrophie [345]. Dans les souris *c-myc*, il y a une surexpression d'un facteur 20 ce qui conduit au doublement du nombre de cardiomyocytes. Leur cœur est presque 2 fois plus gros (46 %) et il y a aussi une hyperplasie myocytaire. La réponse de croissance est aussi augmenté sous isoprotérénol et T_3.

Les souris surexprimant l'oncogène v-fps sont des modèles de fibrose cardiaque. De même, la surexpression de p21 ras et de l'interleukine 6 (ou du récepteur) conduisent au développement d'une hypertrophie ventriculaire.

A l'opposé, les modèles *knock-out* associés aux cardiopathies et aux dystrophies musculaires, similaires aux pathologies humaines, ont ciblé le gène Sox-4, ce qui conduit à une insuffisance cardiaque dès le 14ième jour avec une anomalie du développement de l'endocarde, des valves et du septum. Ces effets sont beaucoup plus délétères que la surexpression des protooncogènes *c-myc, c-ras ou c-fps.*

Enfin, les souris KO pour PPAR α (*Peroxysomes Proliferator Activator Receptor* α) présentent de profonds troubles du métabolisme lipidique cardiaque et une accumulation lipidique dans le cœur [346]. Dans le cœur hypertrophié, le niveau d'expression de PPAR α se trouve réduit au même niveau qu'au stade fœtal et l'ensemble des enzymes de la β oxydation qu'il contrôle chutent aussi [347]. Tandis que l'expression du TF COUP-TF, qui antagonise PPAR α, se trouve augmenté.

IV. 4. Profils d'expression génique cardiaque

La recherche biomédicale utilise à présent de plus en plus les techniques de profil d'expression génique pour caractériser le pattern moléculaire d'une maladie d'origine multifactorielle comme l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque. Voyons les types d'approches et les apports récents de ces techniques dans la recherche cardiovasculaire.

Des études se sont attachées à définir le profil transcriptionnel du cœur de l'Homme adulte normal. Ces études ont pu estimer que le cœur humain exprimait environ 10 000 gènes. Un catalogue de 2077 gènes distincts, propres aux conditions physiologiques, a pu être établi. 600 gènes ont été considérés comme fortement exprimés, 226 moyennement exprimés et 1251 faiblement exprimés. 91 % de ces gènes sont exprimés dans au moins 5 autres tissus. 67 % correspondent à des gènes connus et 33% sont des gènes inconnus [235,348].

Les *DNA-microarrays* ont déjà été utilisés pour définir le profil de l'expression génique cardiaque dans divers contextes pathologiques cardiaques. Cette approche a permis de définir les particularités de l'expression géniques du cœur de rat ou de souris après un infarctus. La plupart des modèles d'infarctus du myocarde développent une réponse inflammatoire et une fibrose réparatrice élevée avec une hypertrophie de la zone encore viable [349-351]. Stanton et coll. ont criblés une banque de 7 000 ADNc de VG. Les auteurs ont choisit un seuil arbitraire de surexpression ou répression de 1.8 fois. 700 gènes ont été sélectionnés pour leurs variations significatives. Cette étude a révélée l'implication du gène *Osteblast specific factor-2* dans un groupe de gène impliqués dans la matrice extracellulaire (collagène, laminine, fibronectine). Enfin, de nombreux gènes de la β oxydation étaient réprimés [351]. Shel et coll. ont utilisés la technique des banques soustraites (SSH) pour comparer le cœur en développement et le cœur après un infarctus. Les banques d'ADNc, enrichies en gènes surexprimés ou réprimés au cours de l'infarctus, étaient constituées de 3 744 clones. Le séquençage a permis d'identifier 1 963 gènes non mitochondriaux . Des gènes déjà connus

pour leur implication après un infarctus ont été identifiés comme : les peptides natriurétiques, le collagène III et l'ostéopontine mais d'autres gènes ont pu être impliqués : p41-ARC, Cathepsin B, EF-1 α, Egr-1 et 3, p18ink4, Bcl-x [349]. La plupart du temps la technique de PCR en temps réel est utilisée pour confirmer ces variations de taux d'ARNm.

D'autres recherches se sont attachées à l'effet des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (ACE) sur le transcriptome de cœurs infarcis [352]. Ces traitements ont impliqué la thrombospondine-4, le cytochrome P450 2E1 ce qui montrait que les inhibiteurs ACE avaient un effet significatif sur le phénotype cardiaque passant par une modification de l'expression génique.

D'autres études ont établi le profil transcriptionnel du cœur hypertrophié de souris [353]. Hwang et coll. ont comparé la fréquence d'apparition des gènes entre une banque de 77 692 EST cardiaques et des EST de 3 ventricules hypertrophiés humains. Seuls 64 gènes ont été identifiés surexprimés dans le cœur hypertrophié de l'Homme [354]. Friddle et coll. ont utilisé une banque d'ADNc de 4 000 gènes et identifiés 55 gènes dont les variations étaient significatives. Ces études ont confirmé que la transcription de gènes du métabolisme était augmentée : ATP synthase et cytochrome C oxydase mais ont aussi identifié des gènes impliqués dans le développement cardiaque : IGF 2, JAK 3 et Id1 mais aussi de manière plus surprenante : les prostaglandines D synthase et l'antigène CD59.

Enfin, la majeure partie des études utilisant les *DNA-microarrays* en cardiologie s'est penchée sur le profil d'expression génique du cœur en état d'insuffisance [355,356]. Yang et coll ont utilisé une banque de 7 085 cDNA et identifié 230 gènes différentiellement exprimés pour 714 gènes détectés. Tan et coll. ont utilisé une banque d'ADNc de 6 606 gènes et identifiés 103 gènes différentiellement exprimés. Ces études ont identifié l'implication de gènes du cytosquelette : SLIM1, des MLC2, la β-actine ainsi que des gènes du métabolisme : ATP

synthase, SDH Fp, TIM17 et des gènes de la synthèse protéique et des facteurs de transcription : EF-2, eIf4AII, HBZ17.

Il est ainsi évident que la promesse de la génomique fonctionnelle tient dans l'identification de gènes dont l'expression est corrélée à une pathologie.

Deuxième partie :

Matériels & méthodes

I. LE MODELE DE CHIEN OBESE HYPERTENDU

Ce modèle a été choisi pour sa proximité avec l'étiologie de l'obésité humaine. Il constitue le modèle le plus proche de l'Homme vis à vis du métabolisme énergétique et de la sphère cardiovasculaire. C'est notamment l'absence de tissu adipeux brun (propre aux rongeurs et aux lagomorphes) qui font que le chien est plus proche du métabolisme énergétique de l'Homme. Le modèle du chien obèse fut initialement proposé par Rocchini et coll en 1987 puis développé par le Pr Hall en 1992 avec des Beagle-Harrier sous régime hyperlipidique, hypercalorique, hypersodé et devenant obèses, hypertendus et insulinorésistant dans une cinétique et des troubles quasi identiques à ceux de l'Homme [190,357]. Ce modèle a été développé depuis 1995 au laboratoire de pharmacologie du Pr Montastruc par le Dr Verwaerde avec la particularité d'un régime normosodé ce qui constituait la dernière étape pour être au plus près des conditions humaines [117,358].

Pour les études au niveau atrial et ventriculaire comparé, ce sont les cœurs des chiens élevés au cours de la thèse de sciences de Michel Pelat qui ont été utilisés. Tandis que ce type d'approche a pu être complété par une étude cinétique d'engraissement en collaboration avec le laboratoire du Pr Hall JE, Université du Mississipi Jackson USA, qui nous a gracieusement fournit les VG de 25 Beagle-Harrier engraissés de 9 à 35 semaines.

Vu que ces travaux de mise au point et d'élevage des chiens faisaient partis des travaux précédents des Docteurs Michel Pelat et Patrick Verwaerde, je ne ferai que rappeler les paramètres indispensables de ces animaux.

La ration d'engraissement est un mélenge de 40 % de croquettes *Royal Canin*® et de 60% de gras de bœuf cru dont la teneur en sodium s'avère comprise entre 23 et 49 mmol.jour, ce qui correspond aux besoins sodiques quotidiens d'un chien [359,360]. Cette ration permet de couvrir l'ensemble des besoins vitaminiques, minéraux, protidiques et glucidiques d'un chien

[359,360] et de réaliser un apport hypercalorique par un excès de lipides à longues chaînes saturées

L'augmentation de masse grasse des chiens est dans ces conditions essentiellement imputable à une hypertrophie adipocytaire et se manifeste préférentiellement par un accroissement de la circonférence abdominale ce qui le rapproche d'une obésité androïde [358,361].

Les chiens développent dans ces conditions une hypertension artérielle systolo-diastolique systémique de type volodépendante, sans contribution pulmonaire [358]. Cette HTA est accompagnée d'une augmentation durable du débit et de la fréquence cardiaque. De plus, une HVG apparaît à partir de la 20ième semaines d'engraissement [358]. En ce qui concerne les résistances vasculaires périphériques, elles diminuent au début du développement de l'HTA, puis en état d'obésité et d'HTA, elles redeviennent conformes aux valeurs mesurées avant le régime [358].

Au plan endocrinométabolique, ces chiens développent une hyperinsulinémie et une insulinorésistance, une hypertriglycéridémie, une hypercholestérolémie sans modification de la glycémie [358].

II. CULTURES CELLULAIRES

II. 1. Cultures de cardiomyocytes atriaux murins P19

Les cellules P19 sont des cellules souches tumorales issues de tératocarcinômes murins qui une fois différenciées en cardiomyocytes deviennent spontanément battantes. Elles possèdent des propriétés très proches des cellules atriales pace-maker. Elles sont cultivées dans le milieu *αMEM Invitrogen*® enrichi de 2.5 % DE SVF, 7.5 % DE SVD et de 1 % de Pénicilline-Streptomycine (5 mg.ml). Les cellules sont placées à 37 °C dans une atmosphère de 5 % de CO_2. La différentiation en cardiomyocytes est induite par addition de milieu

αMEM enrichi de 0.8 % de DMSO, 10 % SVF, et 1 % de Pénicilline-Streptomycine (5 mg.ml) dans des boîtes de Pétri pour cultures bactériennes. Au 4ième jour, les cellules regroupées en embryoïdes sont transférées dans des boîtes de cultures cellulaire avec du milieu αMEM, 10 % de SVF et 1 % de Pénicilline-Streptomycine (5 mg.ml). Les jours de différentiation sont comptés à partir du 7ième jour de transfert dans les boîtes de culture. Aux 7ième et 15ième jours, après 24 h de déprivation SVF, les cellules sont incubées en présence des différents traitements.

II. 2. Cultures de cardiomyocytes ventriculaires de rats H9C2

Les cellules H9C2 sont des cellules cardiaques tumorales de rat typiques des cardiomyocytes ventriculaires. Elles sont cultivées en présence de milieu *DMEM GLUTAMAX™ Invitrogen®* enrichi de 10 % SVF et 1 % de Pénicilline-Streptomycine (5 mg.ml^{-1}).

III. BIOLOGIE MOLECULAIRE

III. 1. Extraction des ARN

Les tissus ou cellules sont conservés dans l'azote liquide dès le prélèvement puis stockés à –80 °C. Seul les tissus sont broyés au préalable avec le système *Ultrathurax®* dans la solution *TRIzol™*. Puis l'extraction de type phénolique est effectuée selon les instructions *TRIzol™ reagent Invitrogen®.* Dans l'optique d'une RT-PCR quantitative les ARN sont préalablement traités à la DNase *DNA-free™ Ambion®* afin de rester le plus quantitatif possible des transcrits seuls.

III. 2. Extraction des protéines

Les tissus ou cellules sont conservés dans l'azote liquide dès le prélèvement puis stockés à –80 °C. Seul les tissus sont broyés avec le système *Ultrathurax*® au préalable dans le tampon de lyse avec inhibiteur de protéases de mammifères *Mammalian Cell Lysis Kit Sigma*® (Tris-HCl EDTA, NaCl, SDS, DOC, Igepal CA-630, Protease inhibitor cocktail). Puis les débris cellulaires insolubles sont précipités par centrifugation à 10 000 g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines solubles est conservé à –20 °C.

III. 3. Dosage ARN et ADN en fluorescence

Les ARN sont dosés en fluorescence à l'aide de l'intercalent *Ribogreen*™ *Molecular Probe*® selon une gamme préétablie en accord avec les instructions du fournisseur. De même pour les ADNc et ADN, ils sont dosés avec l'intercalent fluorescent *Picogreen*™ *Molecular Probe*® selon les instructions du fournisseur. Les échantillons sont placés dans un fluorimètre *Ascent Labsystem*® sous une longueur d'onde d'excitation de 502 nm et la longueur d'onde d'émission se situe vers 523 nm.

III. 4. Dosage des protéines en colorimétrie

Les protéines sont dosées par colorimétrie à l'aide du kit de réactifs *BioRad*® selon une gamme préétablit en accord avec les instructions du fournisseur. La lecture colorimétrique est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre *Labsystem*® à 680 nm. Ce dosage repose sur la méthode du Biuret.

III. 5. *Northern-blot*

- **Migration**

Les ARN totaux issus de l'extraction et dosés sont déposés selon la dose désirée avec un marqueur de taille *RNA Ladder MIB Fermentas*® dans gel d'agarose 1 % MOPS 1x BET pour 45 min de migration à 100 $V.cm^{-1}$. Puis le gel est lavé pendant 45 min dans une solution 20x SSC.

- **Transfert**

Il s'agit d'un transfert par capillarité dans une solution 20x SSC sur une membrane nylon *S&S NYTRAN*™ *SuPerCharge Schleicher & Schuell*® pendant 12 h. La membrane est ensuite lavée rapidement dans une solution 2x SSC. Puis les membranes sont cuite dans un four UV afin de lier les ARN de manière covalente (*crosslink*) au nylon.

- **Marquage de la sonde**

Les sondes d'ADNc sont réalisées selon la méthode de *Random priming : Rad Prime*™ *Invitrogen*® en présence de dATP-[γP^{32}], dTTP, dGTP, dCTP des ADNc à marquer dénaturés et du fragment de Klenow dans son tampon. La sonde ADN est purifiée sur colonne de silice *Nucleospin*™ *Clontech*®.

- **Préhybridation & hybridation**

Les membranes sont préhybridées en présence d'ADN de sperme de saumon dénaturé dans une solution d'hybridation *QuickHyb*® *Stratagene*® pendant 2 h à 65 °C ou *ULTRAhyb*™ *Ambion*® pendant 2 h à 50 °C. La phase d'hybridation est effectuée immédiatement après à 65 °C (la température peut être ajustée en se plaçant 5 à 10 °C en dessous du Tm de la sonde : $Tm = 81.5 + 16.6 (\log[Na^+]) + 0.41 (\% GC) - (600/N)$) durant 12 h avec la sonde préalablement dénaturée en l'incubant 3 min à 90 °C.

- **Lavages**

Puis la solution d'hybridation contenant la sonde est éliminée et on effectue 2 lavages dans une solution 2x SSC 0.1 % SDS à 60 °C pendant 15 min suivi de 2 lavages dans une solution 0.1x SSC 0.1 % SDS à 60 °C pendant 15 min.

- **Exposition**

Puis la membrane est exposée dans une cassette de Phosphorimager pour être lue sur l'appareil *445 Si* ou *Storm 860 Molecular dynamics*®.

III. 6. *Western-blot*

- **Migration**

Les échantillons sont dénaturés à 95 °C pendant 5 min en présence de bleu de dénaturation et de β-mercaptoethanol. Les échantillons sont ensuite placés dans les puits d'un gel de polyacrylamide à 1.5 % de concentration puis dans le gel de migration entre 10 et 15 % pour 1 h 30 de migration à 120 V et 95 mA dans un système *BioRad*®.

- **Transfert**

Il s'agit d'un électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose à 85 V et 250 mA durant 1 h 30 à 2 h dans un système *BioRad*®.

- **Fixation**

Les membranes de nitrocellulose comportant les protéines sont fixées dans une solution d'acide acétique et d'isopropanol durant 5 min puis rincées 3 fois 5 min dans l'eau.

- **Visualisation au Ponceau**

La quantité du chargement en protéine dans chaque couloir est vérifiée par coloration des protéines au rouge Ponceau.

- **Préhybridation**

Les membranes de nitrocellulose sont préhybridées dans une solution de Tween TBS avec 3 % de protéine de lait pendant 2 h.

- **Immunodétection : Hybridation anticorps primaire, secondaire**

Les membranes saturées sont mises en présence de l'anticorps à une dilution variant de 1 / 3000ième à 1 / 10 000ième dans une solution de Tween TBS.

- **Lavages**

Après incubation en présence de chaque anticorps les membranes sont lavés 3 fois 5 min dans une solution de Tween TBS et au dernier lavage dans du TBS.

- **Révélation en enzymochimioluminescence (ECL)**

L'anticorps secondaire étant couplé à la peroxydase, il est possible de révéler son activité enzymatique par chimioluminescence en présence d'un réactif (luminol) dont l'hydrolyse libère de la lumière dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps secondaire hybridé. Cette étape est réalisée avec le système commercialisé par *Pierce® Super Signal™ West Pico Chemiluminescent Substrate*.

III. 7. Rétro-transcription

La réverse transcription consiste à rétrotranscrire les ARN en ADNc afin soit de récupérer l'ADNc d'un gène d'intérêt ou en vue d'une RT-PCR pour déterminer la présence voire même la quantité d'un transcrit (PCR quantitative). Cette étape est réalisée en présence de réverse transcriptase virale (MMLV) *SuperScipt™* ou *Thermoscript™ Invitrogen®* avec des dNTP, du DTT, des *random primers* et / ou des oligodT et le tampon préconisé.

III. 8. *Polymerase chain reaction (PCR)*

Les PCR sont réalisées en présence des amorces adéquates (sens et anti-sens), de dNTP 10 mM, de MgCl2 50 mM, de Taq polymérase *Invitrogen*® avec son tampon et de l'ADNc cible. Les phases de dénaturation, *annealing* et élongation sont réalisées dans un thermocycler *TGradient*™ *Biometra*®.

III. 9. *RT-PCR* quantitative en temps réel

Après réverse transcription de 1 µg d'ARN avec l'enzyme *Thermoscript*™ *Invitrogen*® pendant 1 h à 42°C, la PCR est réalisée en plaque 96 puits en présence de l'intercalent fluorescent *SYBR green*® dans le système *Taqman*™ *5700 Applied Biosystem*®. La quantification des ADNc repose sur la fluorescence du *SYBR green*® intercalé dans les doubles brins naissant en fin de chaque cycle. La fluorescence est analysée à chaque fin de cycle et grâce à une gamme étalon, il est possible d'extrapoler la quantité du transcrit avant la *PCR* en se plaçant dans la zone proportionnelle linéaire de l'amplification *PCR*.

III. 10. Séquençage

Les réactions de séquençages sont basées sur la méthode de Sanger avec des dideoxynucléotides couplés à un fluorochrome différent pour chaque base. Ces réactions sont réalisées selon le protocole du kit *Dye Terminator* ou *Big Dye Terminator v2* ou *v3* ou *v3.1* par *Applied Biosystem*® dans un thermocycler *TGradient*™ *Biometra*®. Puis les séquences sont purifiées par précipitation à l'acétate de sodium et éthanol et dénaturées. Les séquences sont analysées dans un séquenceur *ABI 373* ou *ABI 310 Applied Biosystem*®.

III. 11. *Switch Mechanism At the 5' end of RNA Templates SMART™*

La technique *SMART™ Clontech®* permet de générer suffisamment de matériel ADNc pour les travaux prévus (Fig. 16). Dans un premier temps, il s'agit d'une réverse transcription (RT) des ARNm en ADNc à partir d'extraits d'ARN totaux. Puis on ajoute une amorce (*CDS primer*) qui correspond à un oligonucléotide polydT qui s'hybride avec la queue polyA des ARNm. Après appariement, l'élongation de cette amorce est réalisée par la réverse transrciptase. (*SuperScript™ Invitrogen®*) en présence de dNTP aboutissant à l'obtention d'un hétéroduplex ADNc/ARNm. La réverse transcriptase possède une activité terminale transférase qui ajoute préférentiellement quelques cytosines (dCTP). Cette propriété est utilisée dans l'étape suivante pour hybrider sur l'ADNc naissant une autre amorce en 3'munie d'un polyG. La présence de séquences connues flanquant ainsi chaque ADNc permet ensuite de les amplifier non sélectivement par *PCR* et en respectant les proportions originelles des transcrits ARNm. Pour cela, le respect d'un nombre minimal de cycles PCR permet de conserver la linéarité de l'amplification et donc les proportions relatives des différentes espèces d'ARNm. La relation linéaire entre le nombre de cycle et la concentration ADNc est vérifiée par fluorescence *Picogreen™ Molecular Probe®*.

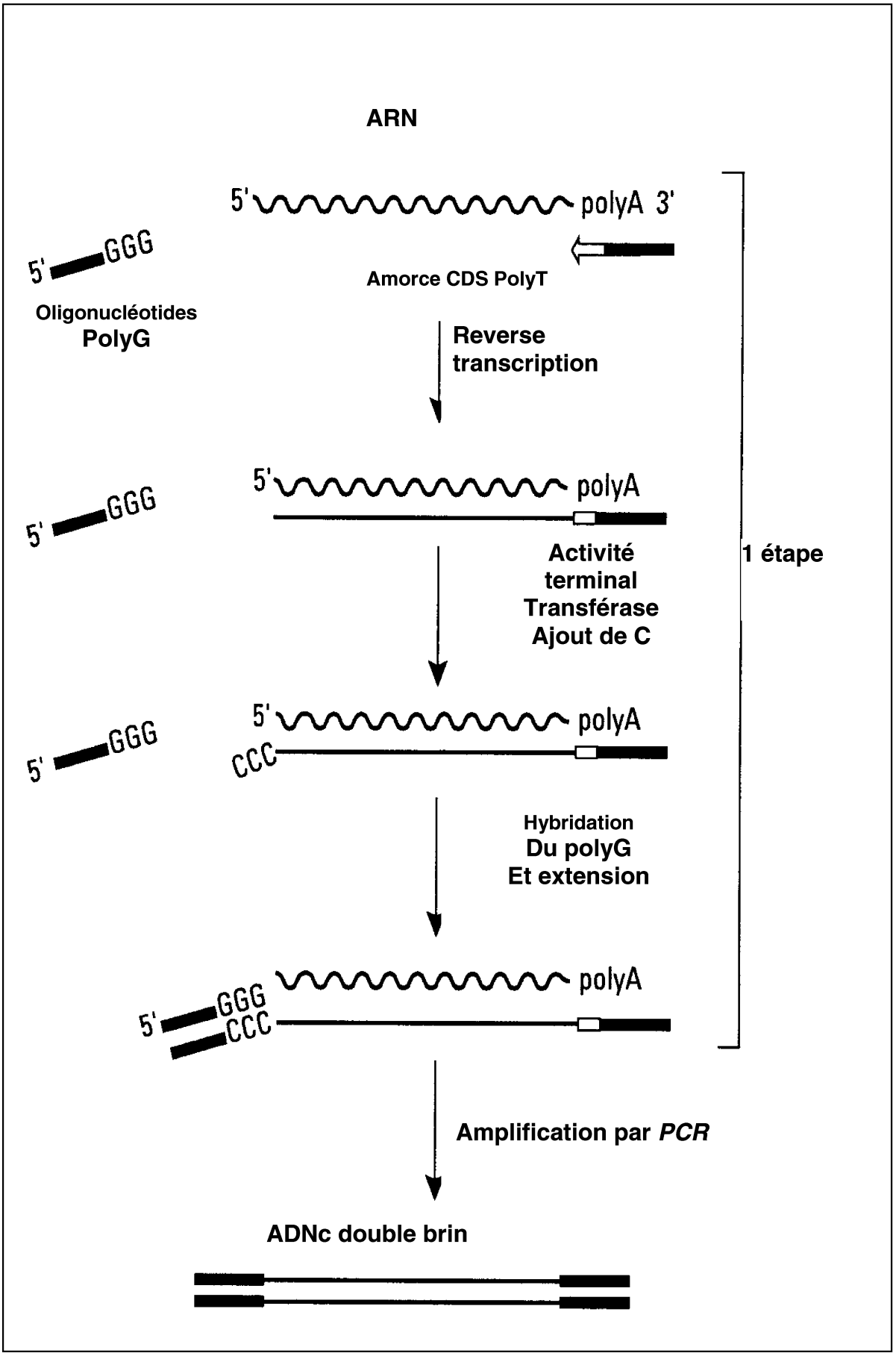


Fig. 16 : Principe du *SMART*.

III. 12. Banques soustraites ADNc : *Suppressive Substractive Hybridization (SSH)*

La méthode *SSH* commercialisée est la *PCR-Select differential screning Clontech®*. Cette méthode comprend plusieurs étapes successives : ligation des adaptateurs, hybridation des ADN test (*tester*) et conducteurs (*driver*), *PCR* sélective (Fig. 17)[362].

Selon le sens de la soustraction, il est possible d'enrichir une banque ADNc en ADNc induits ou réprimés correspondant à un phénotype donné. La soustraction utilise 2 échantillons d'ADNc, le groupe test et le groupe conducteur. Par exemple, si l'on veut cloner des ADNc correspondant à des gènes induits chez l'obèse, les ADNc test seront ceux de l'obèse et les ADNc conducteurs seront ceux des patients normaux. Les ADN test sont divisés en 2 populations et munis d'adaptateurs différents (1 & 2). Chaque population est ensuite mélangée avec un large excès d'ADNc conducteurs, dénaturés puis renaturés lentement. Cette étape piège les ADNc présents en quantités équivalentes dans l'échantillon test et conducteur. Puis une deuxième étape d'hybridation entre les 2 populations d'ADNc test (saturés en ADNc conducteurs à la première hybridation) permet d'obtenir des molécules hybrides comportant à la fois les adaptateurs 1 et 2. En principe, seul les 2 brins d'ADN test munis d'adaptateurs différents (1 & 2) pourront ensuite être amplifiés de manière exponentielle par la PCR sélective. Les molécules munies d'adaptateurs identiques ne peuvent pas être amplifiées étant donné qu'il y a reconnaissance moléculaire des extrémités complémentaires et donc formation d'une structure secondaire dite en « épingle à cheveux ».

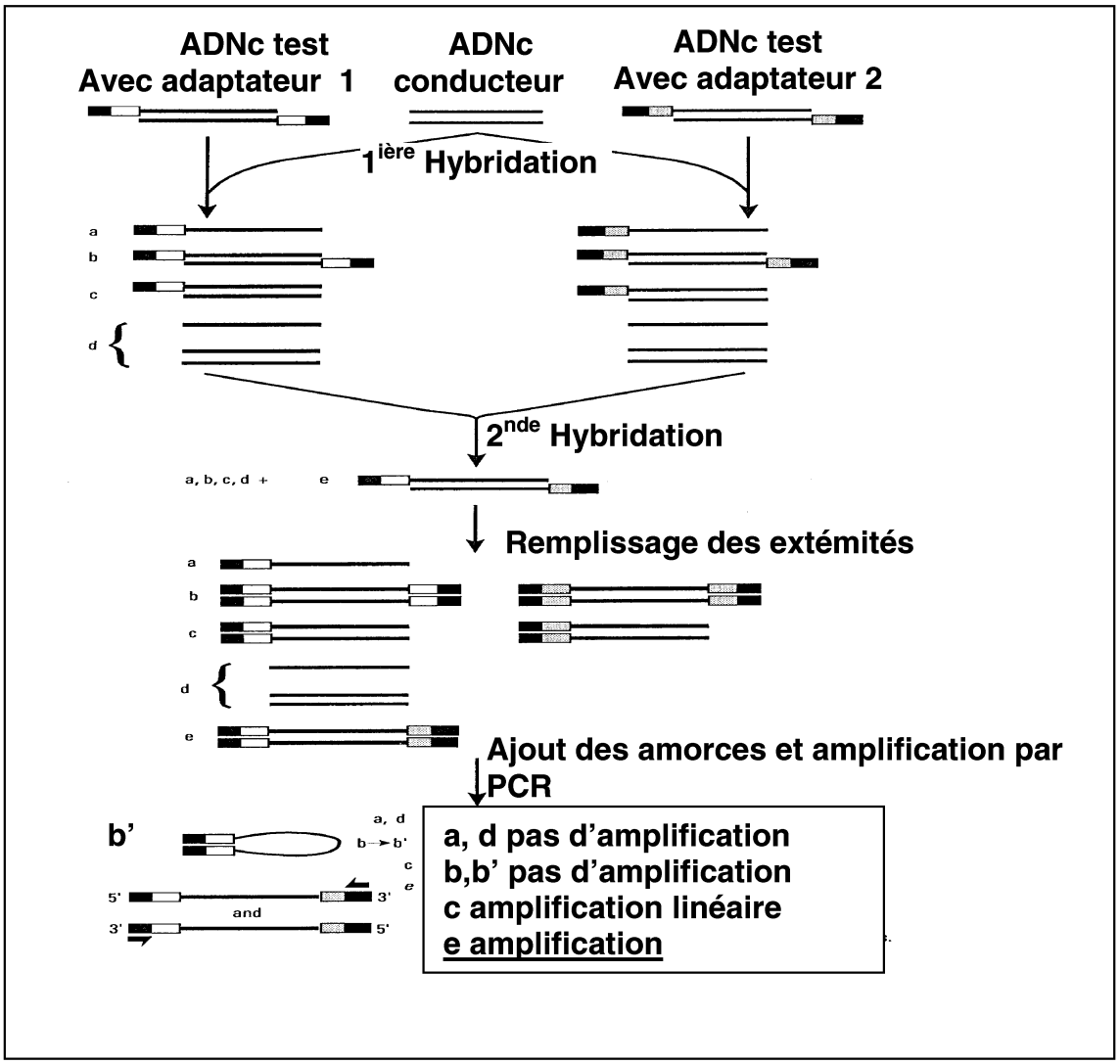


Fig. 17 : Principe de la *SSH*

III. 13. Création d'une banque ordonnée d'ADNc dans des bactéries recombinantes

Les ADNc de la banque *SSH* sont liés dans le vecteur plasmidique *pGEM-T*™ *Promega*® par la ligase du bactériophage T4. Ce vecteur est particulièrement adapté au clonage de produits de *PCR* car une fois linéarisé il possède des extrémités –T simples brins empêchant sa recircularisation et surtout complémentaires des produits de PCR dotés de –A à leurs extrémités. Puisque la Taq polymérase possède une activité terminale transférase qui ajoute préférentiellement des dATP en fin de matrice.

Ce plasmide contient le gène de résistance à l'ampicilline (ce qui constituera le premier crible de sélection des bactéries transformées) et un promoteur flanqué de la région du gène LacZ codant pour la β-galactosidase (β-gal). L'insertion d'un ADNc inactivant le gène LacZ permet de repérer les bactéries transformées étalées sur milieu contenant un substrat chromogène : le X-gal. Les plasmides ayant intégré un insert ou non conduisent respectivement à l'obtention de colonies blanches (gène inactivé) ou bleues (gène lacZ intact).

Les bactéries transformées sont de souche $DH_{5\alpha}$ électrocompétentes et définies par le génotype : F^- ϕd*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(r_K^-, m_K^+) *pho*A *sup*E44λ^- *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 de chez *Invitrogen*®.

III. 14. *DNA microarrays*

Pour les études cliniques avec les déchets post-opératoires de cœurs humains nous avons utilisés des filtres comportant 11 500 dépôts d'ADNc humains (*GF 200* et *GF 201*) commercialisés par *Research Genetics*®.

- **Spotting**

Cette étape a été réalisée au Génopôle de Toulouse sur *microarrayeur BioGrid Robotics®*.

- **Marquage des cibles**

Selon les études, cette étape a été réalisée soit sur des ADNc de la banque *SSH* par *Random Priming* avec le kit *Rad Prime™ Invitrogen®* soit par RT avec du dATPαS, dCTP, dTTP, dGTP et des oligodT avec la réverse trascriptase MMLV du kit *GF* commercialisé par *Ambion®* spécialement dédié aux filtres *GF 200* et *GF 201* de *Research Genetics®*. Les sondes complexes ADN sont purifiées sur colonne de silice *Nucleospin™ Clontech®*.

- **Préhybridation & hybridation**

La préhybridation est réalisée en présence d'ADN de sperme de saumon dénaturé dans une solution *ULTRArray Hyb Buffer™ Ambion®* pour les membranes *Research Genetics®* ou *ExpressHyb™ Clontech®* (toutes deux à base de SSC) pour les microarrays issus des banques d'ADNc *SSH*.

- **Déshybridation**

Les filtres nylons ont l'avantage de pouvoir être déshybridés et réutilisés de manière performante puisque la totalité du signal radioactif est éliminée et le spot garde 95 % de son intégrité après 5 cycles d'hybridation-déshybridation. Nous utilisons le système *StripEZ™* commercialisé par *Ambion®*. Ce système repose sur le marquage des sondes avec des dCTPαS qui permet la dégradation ultérieure des sondes, à température ambiante, par une réaction d'oxydo-réduction et leur déshybridation à 68 °C.

IV. BIOINFORMATIQUE

• Analyse de l'image

L'image est acquise par révélation dans une casette *Phosphorimager Imageqant Molecular Dynamics*® après exposition entre 1 à 5 jours selon le marquage (P^{32} ou p^{33}). Puis cette image est analysée ave le logiciel *X-Dot Reader*™ *COSE*®. Ce logiciel repose sur un algorithme qui nécessite d'une part d'indiquer la géométrie de la grille (nb de colonne et de lignes, écart moyen entre 2 spots en X et Y) puis de choisir l'algorithme le plus adapté à la forme des spots. Ensuite le logiciel adapte lui-même la grille en recherchant les spots dans l'image. Puis chaque spot est quantifié ainsi que le bruit de fond local pour donner une valeur corrigée et normalisée par rapport au signal moyen de l'ensemble de la membrane :

$$sel_i = I_{moy} - fd_i / C_N \qquad \text{avec} \quad C_N = \Sigma_i^N I_{moy} - fd_i / N$$

fd : Bruit de fond local

C_N : Indice de normalisation

sel_i : quantification corrigée localement et normalisée

Une fois la quantification réalisée nous pouvons confronter les données 2 à 2 sous tableur *Excel*™ pour chaque spot.

• Analyse des données

Les données ainsi obtenues sont encore susceptibles de contenir des artéfacts inérant au très grand nombre de mesures simultanées, même avec un test de Student classique avec un risque α de 1% est susceptible de génèrer 100 mesures erronées pour 10 000 mesures. L'algorithme *Significance Analysis of Microarrays (SAM)* [363] est une méthode qui peut résoudre ce problème puisqu'il évalue le pourcentage de chance qu'il s'agisse de vrais positifs et de faux positifs pour chaque mesure. Ce système repose sur le système statistique de permutations des données.

- ***Clustering***

L'analyse en *cluster* permet de découper un jeu de donées en sous-groupes homogènes. La première méthode dite classification hiérarchique est basée sur le rapprochement des points les plus proches selon le calcul de distances euclidienne entre les points :

$$d(x,y) = \Sigma^{m}_{i=1} (x_i - y_i)^2$$

Le logiciel *Cluster* [364] est basé sur cette approche et permet d'identifier des gènes corégulés dans différentes situations ou régulés de manière opposés.

- **Alignement de séquences**

Les alignements de séquences pour comparaison simultanée de plusieurs séquences sont réalisés avec l'algorythme *MULTALIGN* disponible en ligne sur internet au site de l'*INRA*.

Les recherches de motifs sont réalisées avec l'algorythme *MEME* disponible sur internet au site de l'institut *Pasteur*.

- **Recherche d'amorces pour la PCR**

Les recherches des séquences des régions codantes des gènes par espèce ou les confrontations de séquences sont réalisées avec l'algorythme *BLAST* disponible sur internet au site *NCBI*.

Les recherches d'amorces pour PCR sont réalisées avec le logiciel *Primers Express*™ *Applied Biosystem*®.

Troisième partie :

Résultats & Discussion

I. PARTICULARITES DU SYSTEME NERVEUX PARASYMPATHIQUE CARDIAQUE CHEZ L'OBESE

I. 1. Particularités de la voie de transduction muscarinique NO-dépendante

La contribution du système nerveux autonome dans le cadre de l'hypertension artérielle a été classiquement attribuée à une suractivité de la composante orthosympathique. Chez l'obèse, il existe une augmentation transitoire de l'activité orthosypathique et une diminution précoce et durable de l'activité parasympathique [358]. Ainsi, les actions cardiomodératrices du système parasympathique s'avèreraient diminuées [117,358]. Ces travaux permettaient d'envisager un rôle du système parasympathique dans la diminution de l'efficacité du baroréflexe qui pourrait rendre compte de la tachycardie observée chez l'obèse.

Des études récentes ont donné une origine moléculaire à cette diminution de l'activité parasympathique cardiaque : une diminution de la densité en récepteurs muscariniques de type M_2 au niveau de l'oreillette droite dans un modèle de chien rendu obèse et hypertendu par un régime hyperlipidique et hypercalorique sans supplément en sel [365]. Il en a été déduit que cette diminution du nombre et de la fonctionnalité des récepteurs M_2 dans les cardiomyocytes pouvait expliquer l'abolition du rythme circadien cardiaque et des modifications de l'effet chronotrope de la méthylscopolamine. Les modifications de la variabilité sinusale ont pu être aussi corrélées aux variations d'expression de la eNOS. [366].

Or, les récepteurs muscariniques M_2 cardiaques, en plus d'être couplés négativement à l'adénylate cyclase via la protéine Gi, s'avèrent aussi reliés à une voie de transduction NO-dépendante via la eNOS [140]. Cette dernière est responsable, en partie, des effets chronotropes et inotropes négatifs des agonistes muscariniques [144]. La diminution d'expression du récepteur M_2, nous a conduit à étudier le niveau d'expression des éléments intracellulaires de la voie de signalisation M_2-eNOS. Ainsi, nous nous sommes attachés à identifier les variations

d'expression de l'ensemble des NOS (nNOS, iNOS et eNOS) et de la guanylate cyclase cytosoluble (GC) tant au niveau des transcrits (ARNm) que de la protéine. Ce travail montre que la eNOS et la GC sont régulées au niveau des ARNm et au niveau protéique pour la eNOS. Par contre, nous n'avons pas pu mettre en évidence de variations de l'expression des iNOS. Les ARNm de la nNOS n'étaient as détectables dans l'OD. A l'opposé des récepteurs M_2, la eNOS est surexprimée et s'oppose à l'excès des signaux inotropes et chronotropes positifs des catécholamines. Nous avons dosé les taux de GMPc dans l'OD des chiens afin d'apprécier l'état fonctionnel des GC. Les taux de GMPc s'avèrent augmentés dans l'OD des chiens obèses hypertendus, ce qui tend à montrer qu'il existe une augmentation de l'expression et de la fonctionnalité des GC. L'utilisation d'un inhibiteur des NOS (L-NAME), nous a permis d'apprécier la contribution et l'état fonctionnel des NOS *in vivo*. Comme cela a déjà été montré, le L-NAME augmente la PA et il est bradychardisant mais dans des proportions bien plus importantes chez le chien obèse hypertendu. L'analyse spectrale nous a permis d'identifier une augmentation des très basses fréquences (VLF < 40-50 mHz) de la variabilité de la fréquence cardiaque chez les chiens obèses hypertendus sous L-NAME. Ceci suggère une contribution accrue des systèmes neuro-humoraux dans le cadre de l'hypertension artérielle secondaire à l'obésité. Donc, il existe dans l'OD du chien obèse hypertendu des systèmes compensatoires qui tendent à maintenir l'homéostasie cardiovasculaire.

Nous avons pu ainsi donner une base moléculaire à l'augmentation des très basses fréquences chez le chien obèse hypertendu. La surexpression de la eNOS et de la GC cytosoluble expliqueraient en partie cette hyperactivité. Néanmoins, l'origine exacte de ce phénomène pourrait être mécanique ou liée aux nombreuses cytokines sécrétées par le tissu adipeux. Ce travail au niveau moléculaire, physiologique et pharmacologique s'inscrit dès lors dans un cadre de génomique fonctionnelle.

CARDIAC NITRIC OXYDE SYNTHASE EXPRESSION IN AN EXPERIMENTAL HYPERTENSION-RELATE OBESITY

PELAT M, PHILIP-COUDERC P, VERWAERDE P, REY A, MERIAL C, BOULOMIE A, LAFONTAN M, MONTASTRUC JL, SENARD JM

Soumis à *Fundamental clinical pharmacology.*

Increased NO signaling relates to heart rate variability in obesity-related Hypertension

Michel PELAT PhD[#]*, Pierre PHILIP-COUDERC*, Jean Louis MONTASTRUC MD PhD*, Philippe ROUET, PhD*, Patrick VERWAERDE DVM PhD*, Jean Michel SENARD MD PhD*.

#Current address: Department of Pharmacology and Therapeutics, FATH 5349, School Of Medicine, University Catholic of Louvain, 53 Av E. Mounier, B-1200 BRUSSEL, BELGIUM

* INSERM U586, Laboratoire de Pharmacologie Médicale et Clinique, Faculté de Médecine, 37 allées Jules Guesde 31073 TOULOUSE Cedex, FRANCE.

Author for correspondence : Pr JM SENARD, Laboratoire de Pharmacologie Médicale et Clinique, INSERM U317, Faculté de Médecine, 37 allées Jules Guesde 31073 TOULOUSE Cedex, FRANCE.

e-mail : senard@cict.fr

Phone : **33 .5.61.14.59.61**

Fax : ***33 .5.61.25.51.16***

Total word count : 5010

Abstract(247 words)

***Objective*:** To investigate the functional status of heart NO-signaling pathway in a model of obesity-related arterial hypertension.

***Design* :** *To perform this* study 6 dogs were submitted to high-fat diet (HFD) for 9 weeks and 6 *controls* dogs submitted *to a normal diet during the whole period*.

***Methods*:** The effect of non-selective nitric oxide synthase (NOS) inhibition (L-NAME, 10mg/kg, iv) on short-term heart rate spectral variability (HRV) using fast Fourier transformation in the very low frequency range (VLF: 4-50 mHz) was investigated in 6 obese hypertensive and in 6 normal dogs. Expression levels of mRNA encoding NOS isoforms and cytosoluble guanylyl cyclase (cGC) (quantitative real-time PCR) and levels of cGMP (enzyme immunoassay) were measured on right atrium.

***Results*:** Under basal conditions, VLF contribution to HRV was significantly lower in obese-hypertensive than in normal dogs (8.6±0.1 vs 10.6±1.2 nu). L-NAME administration increased the VLF relative energy in both groups, but with a significantly larger rise in obese-hypertensive than in normal dogs (Δ%: +67.3±8.3 vs +41.8±15.0, $p < 0.001$). The basal levels of cGMP in atrium were significantly higher in HFD than in controls. Concurrently, qPCR indicated a 2-fold overexpression of eNOS mRNA and a 3-fold overexpression of cGC mRNA in right atria from HFD dogs vs controls.

Conclusions : Obesity-related hypertension is associated with overexpression of eNOS and cGC and increased levels of cGMP in right atrium. These biochemical adaptations to HFD relate to changes in HRV. They also suggest a role for NO in buffering heart rate oscillations.

Key Words :Obesity-related hypertension, eNOS, guanylyl cyclase, atrium, heart rate,

spectral variability.

Introduction

In obesity-related hypertension promoted by high-fat diet (HFD) in dogs (1), one prominent characteristic, a part from arterial hypertension and endocrine and metabolic changes, is the very rapid installation of tachycardia (2),(3). As for blood pressure (BP), the increase in heart rate (HR) is thought to be related to both an increased sympathetic activity and withdrawal of parasympathetic tone thus resulting in a shift of the sympathovagal balance toward hyperadrenergic state. In fact, in a previous work we reported that changes in HR were associated with a decreased parasympathetic drive to the heart (4). We also found in the same model, post-synaptic alterations in cardiac muscarinic receptors and a specific down-regulation in right atrial M_2-cholinergic receptors (4). Another striking finding of this work was that chronotropic response to N-methylscopolamine after autonomic blockade was shifted to the right in animals fed HFD for 9 weeks. This unexpected finding can hardly be explained by M_2 receptors down-regulation at heart level since, if relevant, maximal chronotropic responses to muscarinic blockade would be achieved with lower drug concentrations than in controls. This paradoxical response, also found with atropine in patients with autonomic failure (5) never was satisfactorily explained even taking into account pre-synaptic and central effects of muscarinic antagonists. Thus, the relevance of the changes in muscarinic receptivity to explain the decrease in heart rate variability (HRV) in this model remains in doubt.

One putative explanation for the discrepancies between reduced M_2 receptor number and hyposensitivity to muscarinic blockade could reside in modifications in NO production in sinoatrial node. In fact, there are many evidences indicating that constitutive nitric oxide

synthase (NOS) is expressed in cardiac myocytes (6) and that the locally-produced NO plays a role in the vagal control of HR (for review see (7)). The mechanisms by which NO influences vagal activity is not entirely understood but may be due to cGMP-mediated inhibition of I_{Ca} and L-Ca^{2+} channels directly (8) or indirectly via stimulation of cGMP-stimulated cAMP phosphodiesterase (9). Moreover, it is now well established that cardiac M_2-cholinergic receptors act through both a cyclic AMP- and a NO-dependent pathways (10); (11) and that muscarinic stimulation reduces HR and contractile response to ß-adrenergic stimulation (10). Even if HR is unchanged by myocyte-specific overexpression of endothelial NOS in mice (12) recent data indirectly suggest increased heart functionality of eNOS in HFD. Heart rate acceleration associated with chronic hyperleptinemia in rats is potentiated by inhibition of NO synthesis by L-NAME (13). Hyperinsulinemia and dyslipidemia which are key metabolic features of our experimental model have been shown to have complex effects on the expression of proteins involved in NO synthesis and production (14-16).

Thus, the aim of the present study was to investigate the functional status of the NO-dependent pathway in hearts from dogs made obese and hypertensive by an *ad libitum* HFD for 9 weeks. For such purpose, we investigated *in vivo* the effects of a non-selective NOS inhibitor (N-nitroL-arginine methylester, L-NAME) on HRV using fast Fourier transformation. Concurrently, we performed an *in vitro* approach to evaluate the expression of both GC and NOS isoforms as well as GMPc production in right atrium.

Methods

Animals and general procedure

Twelve adult beagle dogs initially weighing between 10-12 kg were included in this study. They were all submitted to a light-dark cycle of 12 hours. A totally implantable telemetry measurement system (Data Science International, St. Paul, MN, USA) which

allows continuous and long-term recording of BP and HR was surgically installed under general anaesthesia (1 mg/kg, i.m. acepromazine plus 10 mg/kg, i.v. tiletamine-zolazepam) before the beginning of the study. After a recovery period (3 weeks), the dogs were randomized into two different groups. The control group (n=6) was fed with 19.5± 2.2 g/kg of normal canine diet (Royal Canin M25^{TM}) during the whole experimental period. After the baseline period (3 weeks), the second group (named HFD group, n=6) was fed *ad libitum* with a high-fat diet for 9 weeks. As previously described (3), the hypercaloric hyperlipidic diet (containing about 42 % of saturated fatty acids longer than C_{16}) was normal canine diet (19.5± 2.2 g/kg) mixed with uncooked beef fat. At the end of experimental period, right atria from normal and obese-hypertensive dogs were harvested, precisely dissected, cleaned in phosphate buffered saline, frozen in N_2 and stored at -80°C until processing. All animal procedures were performed in accordance with the official regulations of the French Ministry of Agriculture for animal experimentation and conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH, Publication N° 85-23, revised 1996).

Hemodynamic measurements

In individual cages, a receiver unit (RLA2000, Data Science International, St. Paul MN, USA) was used to detect and amplify the signal from each implantable transmitter and convert it into a series of digital pulses to be decoded and evaluated by computer. Heart rate signals were digitized at 500 Hz for each cycle and extracted at 2Hz and then stored in a compatible IBM-PC for off-line analysis. In basal conditions, arterial BP and HR were measured between 09.00h and 10.00h in quiet and unrestrained animals.

Heart rate variability analysis and L-NAME challenge

Spectral analysis of short-term heart rate variability (HRV) was used as an evaluation

index of the baroreflex-dependent autonomic activity (14) (15). Direct spectral analysis using a fast Fourier transform algorithm on sequences of 512 points was performed using the software PRX (Notocord Systems, Igny, France) on HR recordings. In accordance to literature (15-16) the area under the curve was calculated for the total spectrum, very low frequency band (VLF: 4-50 mHz). Results are expressed in normalized units (nu) which represent the relative contribution of the selected band to total HRV.

In order to investigate *in vivo* the function of heart muscarinic NO-dependent pathway, the effect of a non-selective NOS inhibitor, (L-NAME, 10 mg/kg i..v.), on HRV was evaluated in both control and HFD groups. The L-NAME dose was chosen in accordance to literature in order to test the consequences of maximal acute NOS inhibition (17). In quiet conditions, conscious dogs were placed on a Pavlov table, fifteen minutes after stabilization of BP and HR, L-NAME was administered as an intravenous bolus. Arterial BP and HR were continuously recorded for further analysis.

Real time -PCR mRNA quantification.

Two ug of DNAse I treated (DNAfree, Ambion) total RNA were retrotranscribed in the presence of random primers and Superscript II enzyme (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Gene specific primers were designed using Primer Express software (Applied Biosystems) based on sequencing data from National Center for Biotechnology Information databases, U.S.A. Primers sequences were as follow: Human 18S forward: CGCCGCTAGAGGTGAAATTC and reverse: TCCGACTTTCGTTCTTGATTAATG; Dog eNOS forward CACCAGGAAGAAAACCTTTAAGGA and reverse CTCGGAGCCATAGAGGATTGTC; Dog iNOS forward: ACATCAGGTCGGCCATCAC and reverse: GTAGCCAGCATAGCGGATGAG; human nNOS forward: CCTTGGTGGACCTGAGCTATG and reverse: CAGGGCCCCTCAGAATGAG; Dog brain

Guanylate cyclase forward: CGCTCTGACCACATCCAAGA and reverse: TGGAAATAAAAAGCCAGAAATGG. Real time PCR reactions were carried out with Sybergreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a GenAmp 5700 apparatus. Standard curve method was used for relative quantification of the PCR products and gene expressions were normalized to 18S RNA quantification.

Determination of cyclic GMP in right atrium

Frozen right atria were individually ground in a pestle and mortar with ice-cold 5% v/v trichloroacetic acid plus 100µM 3-isobutyl-1-methylxantine (IBMX). After centrifugation at 1500 g for 10 min at 4° C, trichloroacetic acid was extracted by washing supernatants three times with water-satured ether . The remaining ether was evaporated by heating the samples to 70°C for 5min. Cyclic GMP contents were measured using an enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical Company, Spi-Bio, Massy, France). Absorbance was read at 405 nm. A standard curve was drawn for each assay. Each mean value of duplicates was normalized by total protein content, determined as described above. Under basal conditions cyclic GMP accumulation was determined in right atria from normal and obese-hypertensive dogs.

Statistical analysis

All results are depicted as mean ± standard error of the mean (S.E.M). All statistical comparisons were performed after examination of homoscedasticity. Statistical comparisons were performed when required by unpaired or paired Student-t test. A p value less than 0.05 was considered as significant. The linear regression between two parameters was also determined with one-way ANOVA. The intraclass coefficient derived from the within pair and the between-pair mean square was computed. A value of $p < 0,05$ was considered significant.

Results

Body weight, systolic and diastolic blood pressures and heart rate (Table 1)

During baseline period, HR and arterial BP values were not significantly different in control and HFD groups. In HFD group, 9 weeks of HFD induced a significant increase in body weight. This weight gain was associated with a significant increase in arterial BP and in HR. In the control group, body weight, HR, systolic and diastolic BP remained unchanged during the whole experimental period.

Effect of non-selective NOS inhibitor on systolic blood pressure and heart rate (figure 1)

The effects of acute NOS inhibition are shown in Figure 1. In control dogs, NOS inhibition resulted in an increase in systolic BP (Fig 1A) and a decrease in HR (Fig 1B), as expected. In HFD dogs, NOS inhibition produced much smaller and non significant changes in systolic BP (Figure 1A) but similar decrease in HR than in controls (Fig 1B).

Effect of non-selective NOS inhibitor on short-term heart rate variability (Fig 2)

In basal condition, the relative contribution of VLF to basal short-term HRV were significantly lower in obese-hypertensive than in normal dogs (Fig 2). A significant correlation was found between the relative contribution of the VLF band to HRV and the levels eNOS mRNA in atrium ($r= 0.966$, $p= 0.0012$).

The effects of acute NOS inhibition are shown in Figure 2 and 3. In control dogs, NOS inhibition resulted in an increase in HRV variability in the VLF band (Fig 2), and a decrease in HF range as expected (not shown). In HFD dogs, NOS inhibition produced much

bigger changes in HRV variability in the VLF band (Fig 2) and a much smaller decrease in HF range (not shown). Furthermore, the statistical relationship between eNOS mRNA levels and VLF found in basal condition disappeared after L-NAME administration (r= 0.537, p= 0.4271).

Nitric oxide synthases and guanylyl cyclase mRNA levels (Fig 3A, B, C)

Quantitative real-time -PCR experiments (qPCR) were performed to measure changes in atrial NOS related to HFD. qPCR failed to identify significant expression of nNOS mRNA in atria preparation whereas it was present in cortex tissue thus indicating that lack of heart expression was not due to primers specificity. The levels of iNOS mRNA were similar in both groups. By contrast, when compared to controls, the levels of mRNA encoding eNOS were significantly higher (2-fold induction) in atria from HFD dogs (Fig 3B).

Similar experiments with mRNA encoding ß-guanylyl cyclase revealed a 3-fold significant increase in HFD dogs.

Cyclic GMP levels in right atrium (Fig 4)

The basal tissue levels of cyclic GMP in right atrium were found to be significantly higher in dogs submitted to 9 weeks of HFD than in controls.

Discussion

The main result from the present study is that both eNOS and GC mRNA are over-expressed and cGMP production is increased in right atrial myocardium from dogs made obese and hypertensive by HFD. The differences in VLF contribution to HRV and effects of NOS blockade in HFD dogs strongly suggest that NO participates to HRV buffering HR periodic oscillations within the very low range.

Our results allow to understand the paradox that exists between the reduced number of atrial M_2 muscarinic receptors and the decreased response to N-methylscopolamine in this model. In fact, overexpression of both eNOS and sGC mRNA was associated with increased production of cGMP in this tissue. Despite in transgenic eNOS knockout (18) or myocyte-specific overexpressing mice (12) no change in basal HR was identified, there are many evidences indicating that constitutive nitric oxide synthase (NOS) is expressed in cardiac myocytes (19), and that locally-produced NO plays a role in the vagal control of HR (20). In the context of HFD-induced hypertension and tachycardia, it was recently shown that L-NAME potentiates the chronotropic effects of chronic increase in leptin plasma levels (13). Thus, from a pathophysiological point of view, tonic increased NO signaling in HFD dogs can be considered as a counter-regulatory phenomenon which finality could be to limit the consequences on HR of the decreased vagal drive and down-regulation of M_2 muscarinic receptors. Both nNOS and eNOS have been implicated in the modulation of the parasympathetic input to the heart at the pre-synaptic and post-synaptic levels, respectively (21) The lack of nNOS expression in our preparations together with increased eNOS expression suggest that post-synaptic eNOS is the isoform playing a critical role in parasympathetic tone.

The relevant mechanism to explain changes in eNOS was beyond the aim of the study but this point desserves some comments in the context of HFD-induced obesity hypertension. In fact, several transcriptional and/or posttranscriptional mechanisms have been reported as able to increase eNOS expression (30,31). Cytokines (i.e. leptin) as well as insulin (22) which levels increase in the obese state, can up-regulate eNOS expression (for review see (23)). Increased stretching due to atrium dilatation secondary to volume overload (24) or to increased beating rate (25) may also be involved. Finally, hypercholesterolemia, a characteristic of HFD-induced models of obesity hypertension, displays complex effect on NOS expression (23), but also on vascular sGC (26). Endothelial production of nitrogen oxides is increased, at least in early stages of hypercholesterolemia, and eNOS up-regulation has been reported in vascular endothelium in rabbit atherosclerotic aorta (27). However, other data indicate that hypercholesterolemia up-regulates caveolin-1, an endogenous eNOS inhibitor, and reduces NO bioavailability–(28), (29), (30). Furthermore, OX-LDL by stimulating protein kinase C by stimulating NAD(P)H oxidase in endothelium also generate superoxide (31) and subsequently reduce NO bioavailability by the formation of the powerful oxidant peroxynitrite($ONOO^-$) (32) (33) Whatever the exact mechanism underlying these changes, they are specific of eNOS since qPCR experiments failed to find any substantial expression of nNOS mRNA or change in iNOS mRNA in control and HFD groups thus reproducing results obtained in pacing-induced heart failure in dogs (25).

Inhibition of NOS activity with L-NAME was realized in order to appreciate the functional consequences of the increased NO signaling. We first investigated BP and HR changes after acute administration of an effective dose of L-NAME. As previously reported in rats chronically treated with leptin plus L-NAME (12), BP increase was similar in both groups but was not significant in HFD. Once again, this may be due to hypercholesterolemia-related decrease in eNOS activation secondary to increased caveolin-1 expression (29), (30).

Concerning HR, L-NAME administration, as expected, transiently lowered HR in control group. By contrast, it determined a marked and long-lasting bradycardia in HFD dogs thus confirming that increased NO production at atrium level is able to tonically limit the chronotropic effect of sympathetic hyperactivity in this model. We then investigated the role of NO in the control of HRV. Three frequency bands of interest are described for HRV. High frequency one is related to the parasympathetic drive and is synchronous to respiratory rate (14); (34). Low frequency band is considered as a mix of both parasympathetic and sympathetic influences (35). The VLF band defined between 4 and 50 mHz, although not fully understood, appears to reflect the intrinsic properties of the vessels and the neuro-humoral regulation of the cardiovascular system (14), (36). In previous experiments we reported that HFD is associated with a decrease in HRV in the high frequency range and with an increase in the low frequency range for systolic BP (3). Our present result confirm these changes (data not shown) but also indicate that HRV in the VLF range is decreased in HFD dogs when compared to controls before any drug administration. A decreased energy in VLF has been previously reported in obese women upon acute cold exposure and was interpreted as a defective sympathetic responsiveness and alterations in basal metabolic rate (37). Our results suggest an alternative explanation and an inhibitory action of NO in VLF range of HRV. This is supported by the relationship between VLF energy and eNOS mRNA levels and also by the larger increase in VLF after L-NAME in HFD dogs. Several recent studies in eNOS knockout mice (18) or in rats (38) have demonstrated that vascular NO buffers BP variability in the same frequency range. L-NAME experiments show that changes in HRV are associated with significant modifications in both BP and HR in control group whereas only HR is significantly modified in HFD group. The similar BP increase in both groups (+21. 7 ± 8.1 vs 21.7 ± 3.2 mmHg, $P>0.05$ in control and HFD dogs respectively) after NOS inhibition allows to exclude a differential effect on HRV via baroreflex. In the same way, despite HR

response to L-NAME resulted in bradycardia and increased VLF in both groups, the amplitude of the response was significantly larger in HFD. Thus, despite evident limitations owing to experimental design which do not allow to discard the role of differential nervous system effects, it seems reasonable to propose that al least part of larger increase in VLF of HRV is related to overexpression of both eNOS and sGC in atrium.

An other important finding of our study is the lack of detection of nNOS isoform in dogs atria, despite a cortical detection. This finding contrasts with studies performed in dog left ventricle (39). The role played by nNOS in HR response to cholinergic activation was putatively controversial until recent report from Choate et al (40) who demonstrated that in mouse atria, neuronal NO facilitated vagally-induced bradycardia via a presynaptic modulation of neurotransmission. However, some differencies with specie are probable. In fact, if nNOs inhibition also dramatically reduces the vagally mediated bradycardia in the ferret and guinea pig (41), it only has a modest effect in dog (42) , and remains without effect in rabbits and in guinea pigs (43)

In conclusion, the present results show that obesity-related hypertension is associated with a functional increase in cardiac NO-signaling pathway through eNOS. They also demonstrate that eNOS up-regulation contributes to modulation of HRV mainly by buffering its oscillations in the VLF range, and could reinforce cardiac vagal control of heart rate. Nevertheless, the exact mechanisms underlying the atrial eNOS and sGC over-expression remain to be elucidated.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), paris, FRANCE. Moreover, we would like to express special thanks to Nathalie Troislouche–

Laplace and Jean-Michel Duplantier for their excellent technical assistance.

Reference List

(1) Rocchini AP, Katch V, Schork A, Kelch RP. Insulin and blood pressure during weight loss in obese adolescents. Hypertension 1987; 10(3):267-273.

(2) Truett AA, Borne AT, Poincot MA, West DB. Autonomic control of blood pressure and heart rate in obese hypertensive dogs. Am J Physiol 1996; 270(3 Pt 2):R541-R549.

(3) Verwaerde P, Senard JM, Galinier M, Rouge P, Massabuau P, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M, Montastruc JL. Changes in short-term variability of blood pressure and heart rate during the development of obesity-associated hypertension in high-fat fed dogs. J Hypertens 1999; 17(8):1135-1143.

(4) Pelat M, Verwaerde P, Merial C, Galitzky J, Berlan M, Montastruc JL, Senard JM. Impaired atrial M(2)-cholinoceptor function in obesity-related hypertension. Hypertension 1999; 34(5):1066-1072.

(5) Mathias CJ, Bannister R. Investigations of autonomic disorders. In Autonomic failure: a text book of clinical disorders of the autonomic nervous system. New York: 2003: 255-290.

(6) Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Kobzik L, Lowenstein CJ, Lamas S, Kelly RA, Smith TW, Michel T. Induction of NO synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1 beta and IFN-gamma. Am J Physiol 1995; 268(3 Pt 2):H1293-H1303.

(7) Zanzinger J. Role of nitric oxide in the neural control of cardiovascular function. Cardiovasc Res 1999; 43(3):639-649.

(8) Mery PF, Lohmman SM, Walter U, Fischmeister R. Ca2+ Current is regulated by cGMP dependent Kinase in mammalian cardiac myocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991; 88(4): 1197-1201.

(9) Hartzell HC, Fischmeister R. Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca2+ current in single heart cells. Nature 1986; 323(6085):273-275.

(10) Hare JM, Keaney JF, Jr., Balligand JL, Loscalzo J, Smith TW, Colucci WS. Role of nitric oxide in parasympathetic modulation of beta-adrenergic myocardial contractility in normal dogs.

(11) Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. Circ Res 1996; 79(3):363-380.

(12) Brunner F, Andrew P, Wolkart G, Zechner R, Mayer B. Myocardial contractile function and heart rate in mice with myocyte- specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase.

(13) Kuo JJ, Jones OB, Hall JE. Inhibition of NO synthesis enhances chronic cardiovascular

and renal actions of leptin. Hypertension 2001; 37(2 Part 2):670-676.

(14) Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. Science 1981; 213(4504):220-222.

(15) Just A, Wagner CD, Ehmke H, Kirchheim HR, Persson PB. On the origin of low-frequency blood pressure variability in the conscious dog. J Physiol 1995; 489 (Pt 1):215-223.

(16) Verwaerde P, Senard JM, Mazerolles M, Tran MA, Damase-Michel C, Montastruc JL, Montastruc P. Spectral analysis of blood pressure and heart rate, catecholamine and neuropeptide Y plasma levels in a new model of neurogenic orthostatic hypotension in dog. Clin Auton Res 1996; 6(2):75-82.

(17) Sherman AJ, Davis CA, III, Klocke FJ, Harris KR, Srinivasan G, Yaacoub AS, Quinn DA, Ahlin KA, Jang JJ. Blockade of nitric oxide synthesis reduces myocardial oxygen consumption in vivo. Circulation P 1997.

(18) Stauss HM, Godecke A, Mrowka R, Schrader J, Persson PB. Enhanced blood pressure variability in eNOS knockout mice. Hypertension 1999; 33(6):1359-1363.

(19) Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90(1):347-351.

(20) Feron O, Smith TW, Michel T, Kelly RA. Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. J Biol Chem 1997; 272(28):17744-17748.

(21) Paterson D. Nitric oxide and the autonomic regulation of cardiac excitability. The G.L. Brown Prize Lecture. Exp Physiol 2001; 86(1):1-12.

(22) Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin.

(23) Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). FASEB J 1998; 12(10):773-790.

(24) Hall JE, Brands MW, Dixon WN, Smith MJ, Jr. Obesity-induced hypertension. Renal function and systemic hemodynamics. Hypertension 1993; 22(3):292-299.

(25) Khadour FH, O'Brien DW, Fu Y, Armstrong PW, Schulz R. Endothelial nitric oxide synthase increases in left atria of dogs with pacing-induced heart failure. Am J Physiol 1998; 275(6 Pt 2):H1971-H1978.

(26) Laber U, Kober T, Schmitz V, Schrammel A, Meyer W, Mayer B, Weber M, Kojda G. Effect of hypercholesterolemia on expression and function of vascular soluble guanylyl cyclase. Circulation 2002; 105(7):855-860.

(27) Kanazawa K, Kawashima S, Mikami S, Miwa Y, Hirata K, Suematsu M, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M. Endothelial constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium- dependent vascular relaxation. Am J Pathol 1996; 148(6):1949-1956.

(28) Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. J Clin Invest 1999; 103(6):897-905.

(29) Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. Circulation 2001; 103(1):113-118.

(30) Pelat M, Dessy C, Desager JP, Massion PB, Feron O, Balligand JL. Rosuvastatin Decreases Caveolin-1 and Improves NO-Dependent Heart Rate and Blood Pressure Variability in Apolipoprotein E(-/-) Mice in vivo. Circulation. In press.

(31) Jiang F, Gibson AP, Dusting GJ. Endothelial dysfunction induced by oxidized low-density lipoproteins in isolated mouse aorta: a comparison with apolipoprotein-E deficient mice. Eur J Pharmacol 2001; 424(2):141-149.

(32) Wever RM, van Dam T, van Rijn HJ, de Groot F, Rabelink TJ. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. Biochem Biophys Res Commun 1997; 237(2):340-344.

(33) Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. J Pathol 2000; 190(3):244-254.

(34) Elghozi JL, Laude D, Girard A. Effects of respiration on blood pressure and heart rate variability in humans. Clin Exp Pharmacol Physiol 1991; 18(11):735-742.

(35) Pagani M, Rimoldi O, Malliani A. Low-frequency components of cardiovascular variabilities as markers of sympathetic modulation. Trends Pharmacol Sci 1992; 13(2):50-54.

(36) Ponchon P, Elghozi JL. Contribution of humoral systems to the short-term variability of blood pressure after severe hemorrhage. Am J Physiol 1997; 273(1 Pt 2):R58-R69.

(37) Matsumoto T, Miyawaki T, Ue H, Kanda T, Zenji C, Moritani T. Autonomic

responsiveness to acute cold exposure in obese and non-obese young women. Int J Obes Relat Metab Disord 1999; 23(8):793-800.

(38) Nafz B, Just A, Stauss HM, Wagner CD, Ehmke H, Kirchheim HR, Persson PB. Blood-pressure variability is buffered by nitric oxide. J Auton Nerv Syst 1996; 57(3):181-183.

(39) Piech A, Massart PE, Dessy C, Feron O, Havaux X, Morel N, Vanoverschelde JL, Donckier J, Balligand JL. Decreased expression of myocardial eNOS and caveolin in dogs with hypertrophic cardiomyopathy. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 282(1):H219-H231.

(40) Choate JK, Danson EJ, Morris JF, Paterson DJ. Peripheral vagal control of heart rate is impaired in neuronal NOS knockout mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 281(6):H2310-H2317.

(41) Conlon K, Kidd C. Neuronal nitric oxide facilitates vagal chronotropic and dromotropic actions on the heart. J Auton Nerv Syst 1999; 75(2-3):136-146.

(42) Elvan A, Rubart M, Zipes DP. NO modulates autonomic effects on sinus discharge rate and AV nodal conduction in open-chest dogs. Am J Physiol 1997; 272(1 Pt 2):H263-H271.

(43) Sears CE, Choate JK, Paterson DJ. Effect of nitric oxide synthase inhibition on the sympatho-vagal contol of heart rate. J Auton Nerv Syst 1998; 73(1):63-73.

Legend of figures

Figure 1 : A) Systolic Blood Pressure (SBP) in HFD (close columns) and control groups (open columns) before and after acute L-NAME (NO synthase inhibitor N^{w} -nitro L-arginine methyl ester, 10mg/kg i.v) administration. *p<0.05 versus control.

B) Heart Rate(HR) in HFD (close columns) and control groups (open columns). Before and after acute L-NAME administration. *p<0.05 versus control # p<0.05 vs HFD at baseline

Figure 2 : Heart rate variability in the very low frequency (VLF: 4-50 mHz) range in HFD (close columns) and control groups (open columns). **A)** Before L-NAME administration and **B)** after acute L-NAME (NO synthase inhibitor N^{w} -nitro L-arginine methyl ester, 10mg/kg i.v) administration. Results are expressed as mean±sem in normalized units (see methods for details). *p<0.05 versus control.

Figure 3 : Results from real-time quantitative PCR measuring in right atrium the levels of mRNA encoding eNOS (A) , iNOS (B) and soluble guanylyl cyclase (C) in 6 controls (open columns) and 6 HFD (close columns) groups. Details for primers used can be found in methods. Values are mean± SEM *p<0.05, versus control group.

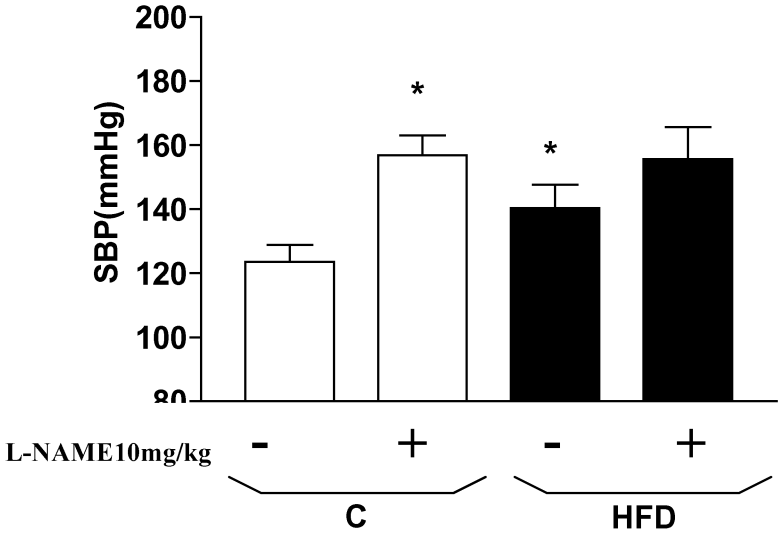
Figure 4 : Basal cyclic GMP levels in right atria from control and HFD groups. Values are mean±SEM from 6 separate experiments *p<0.05, versus control group.

Table 1 : Values of body weight, heart rate, systolic and diastolic blood pressures measured in both control and high-fat diet (HFD) groups, before (week 0) and after 9 weeks of normal or high-fat diet. Values are expressed as mean ± S.E.M. Statistical comparisons were performed using Student's paired t test. * depicts a significant intra-group difference. A p value less than 0.05 was considered as significant.

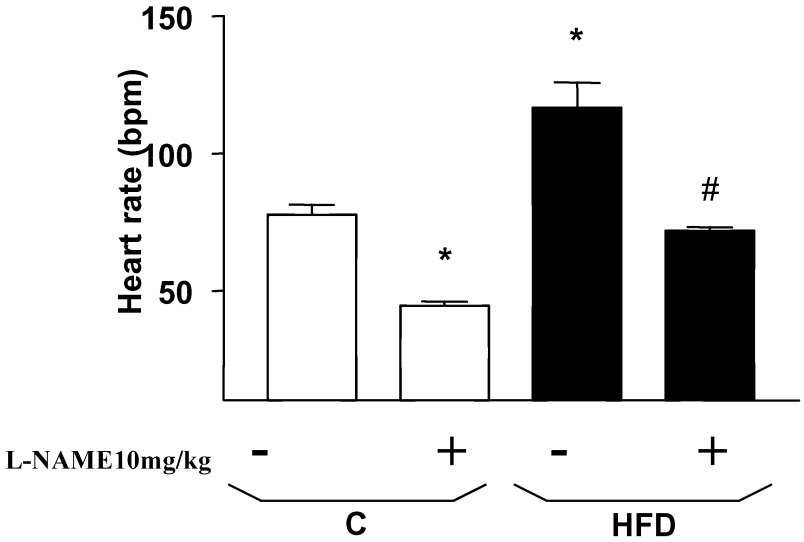
	Control group (n=6)		HFD group (n=6)	
Weeks	0	9	0	9
Body weight (kg)	10.0 ± 0.2	10.2 ± 0.2	10.3 ± 0.2	12.8 ± 0.5 *
Heart rate (bpm)	82 ± 4	83 ± 3	85 ± 4	95 ± 2 *
Systolic blood pressure (mmHg)	145 ± 4	147 ± 3	143 ± 4	163 ± 5 *
Diastolic blood pressure (mmHg)	83 ± 5	81 ± 3	79 ± 4	91 ± 2 *

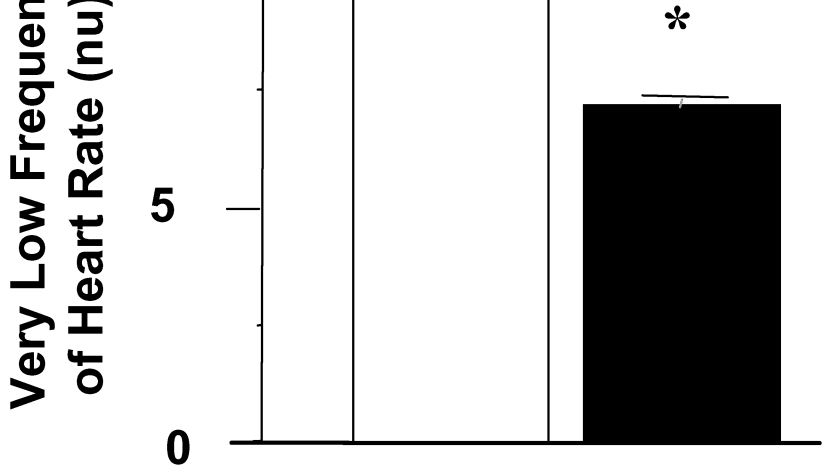
Figure 1

A


200
180
160
140
120
100
80
SBP(mmHg)
*
*
L-NAME10mg/kg
-
+
-
+
C
HFD

B


150
100
50
Heart rate (bpm)
*
*
#
L-NAME10mg/kg
-
+
-
+
C
HFD


Very Low Frequen
of Heart Rate (nu)
5
0
*

B)

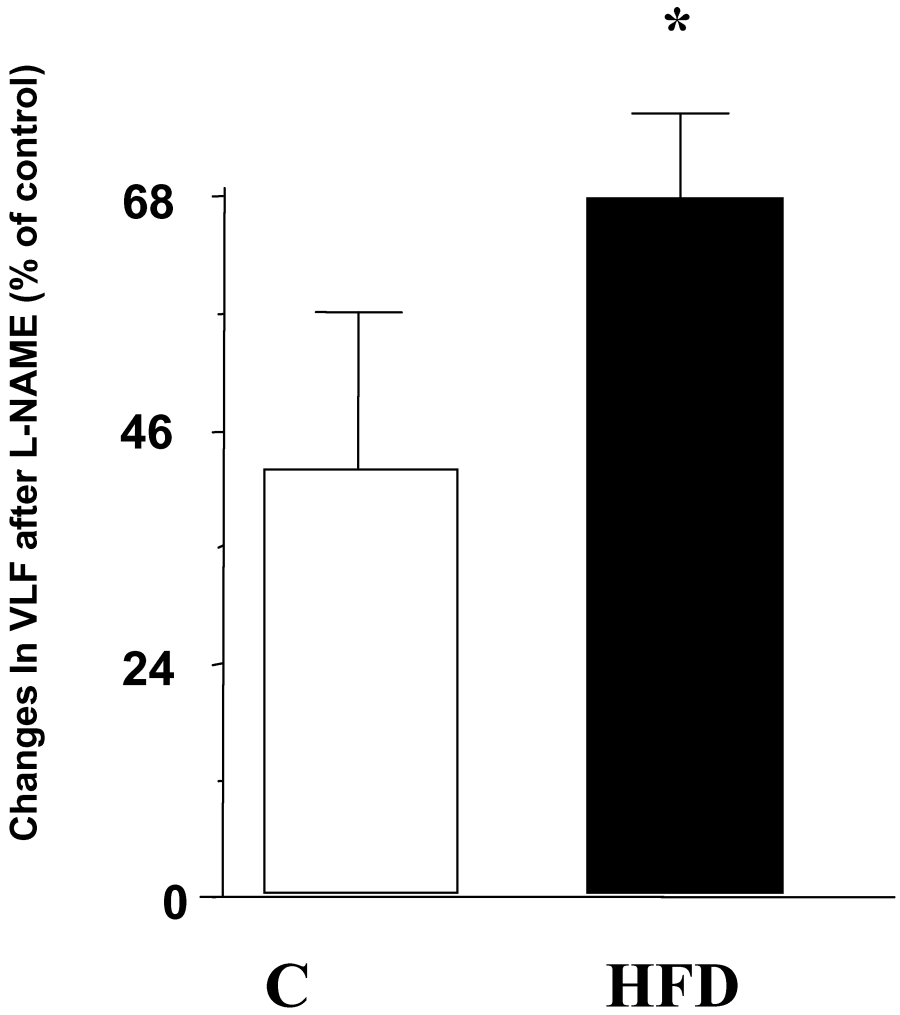
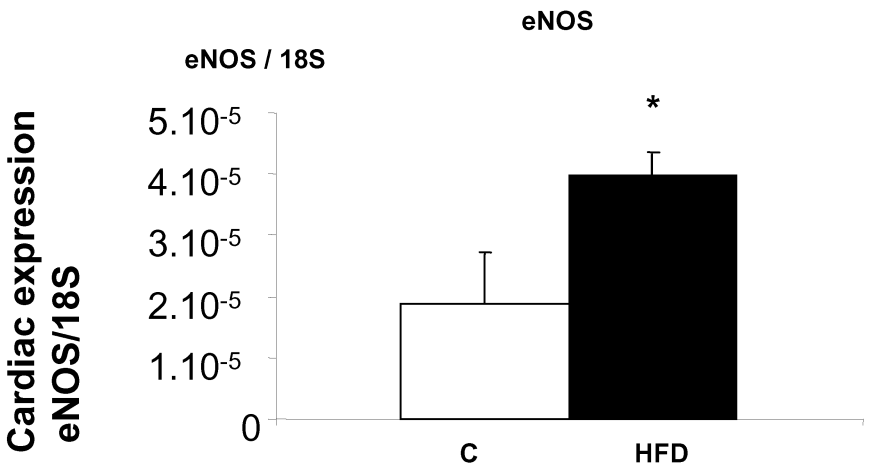
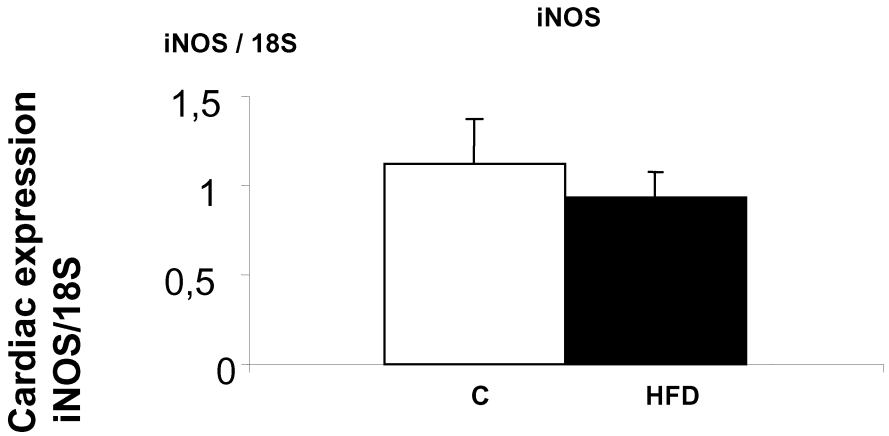

Changes In VLF after L-NAME (% of control)
68
46
24
0
*
C
HFD

Figure 3

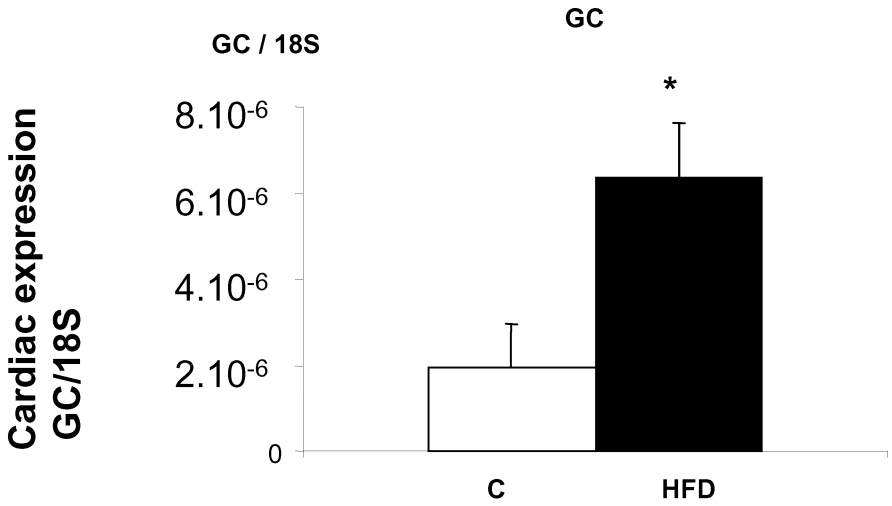
A

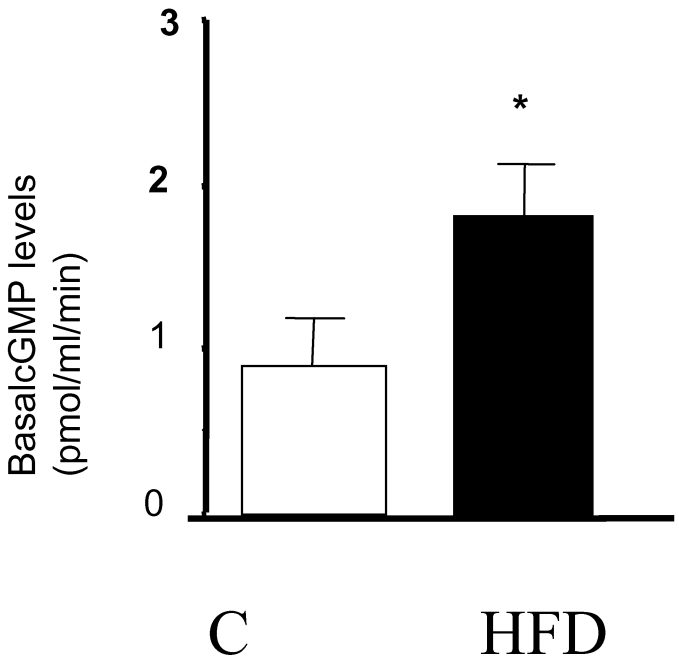

eNOS
eNOS / 18S
Cardiac expression eNOS/18S
5.10-5
4.10-5
3.10-5
2.10-5
1.10-5
0
*
C
HFD

B


iNOS
iNOS / 18S
Cardiac expression iNOS/18S
1,5
1
0,5
0
C
HFD

C


GC
GC / 18S
Cardiac expression GC/18S
8.10-6
6.10-6
4.10-6
2.10-6
0
*
C
HFD


3
2
1
0
*
BasalcGMP levels
(pmol/ml/min)
C
HFD

I. 2. Régulations des récepteurs muscariniques M_2 par l'adrénomedulline

L'adrénomedulline (AM) a été découverte en 1993 dans les phéochromocytomes humains en recherchant l'origine des taux élevés en AMPc dans ce tissu malin [367]. Il s'agit d'un peptide de 52 acides aminés issu du clivage du précurseur préproadrénomedulline de 185 acides aminés [368]. Dans des conditions physiologiques, l'AM est exprimée majoritairement dans les surrénales et à un niveau moindre dans le cœur, les poumons et les reins [369].

L'AM est un peptide vasodilatateur puissant dont la concentration plasmatique augmente au cours de nombreuses maladies cardiovasculaires, de troubles rénaux et du choc septique. Les souris avec une délétion hétérozygote du gène de l'AM développent une hypertension associée à une augmentation des lésions vasculaires [370].

On retrouve des taux plasmatiques élevés d'AM au cours du développement de l'insuffisance cardiaque [371]. Les niveaux d'AM sont corrélés à la sévérité de l'insuffisance cardiaque. Ces taux sont aussi corrélés à la pression dans les capillaires pulmonaires et inversement corrélés à la fraction d'éjection du VG. Après un infarctus du myocarde, les taux plasmatiques d'AM augmentent immédiatement et ces taux persistent durant 3 semaines après l'infarctus [372]. Chez les patients avec une hypertension essentielle, les taux plasmatiques d'AM sont plus élevés et étroitement corrélés à la pression artérielle [368]. On retrouve aussi des taux plasmatiques d'AM élevés chez les patients diabétiques, asthmatiques, souffrant d'hyperthyroïdie, ou après une intervention chirurgicale cardiaque [373-375].

Au niveau cardiaque, l'expression de l'AM est rapidement induite par la surcharge de pression et indépendamment de l'angiotensine II ou de l'endothéline 1 [376]. La surcharge volumique induit aussi une augmentation rapide des taux plasmatiques d'AM indépendamment des taux de rénine ou d'aldostérone. Les taux d'ARNm codant pour l'AM augmentent aussi dans le VG dans ces conditions [377].

Dans les cardiomyocytes en culture, l'AM inhibe l'hypertrophie via la diminution de récepteurs ATR 1 à l'angiotensine II [378]. De manière cohérente, elle réduit la masse du VG et le remodelage cardiaque, diminue le diamètre des cardiomyocytes, limite la fibrose interstitielle et s'oppose aux effets prolifératifs induits par l'angiotensine II [221,379]. En retour l'angiotensine II stimulerait l'expression de l'AM [380]. *In vitro*, le stress mécanique et les agents hypertrophiants (angiotensine II, endothéline 1) induisent une augmentation de la sécrétion d'AM par le cardiomyocyte et le fibroblaste cardiaque [381]. L'AM réduit la mitogénèse des cardiomyocytes et des fibroblastes et la synthèse de collagène via une voie AMPc dépendante [381,382].

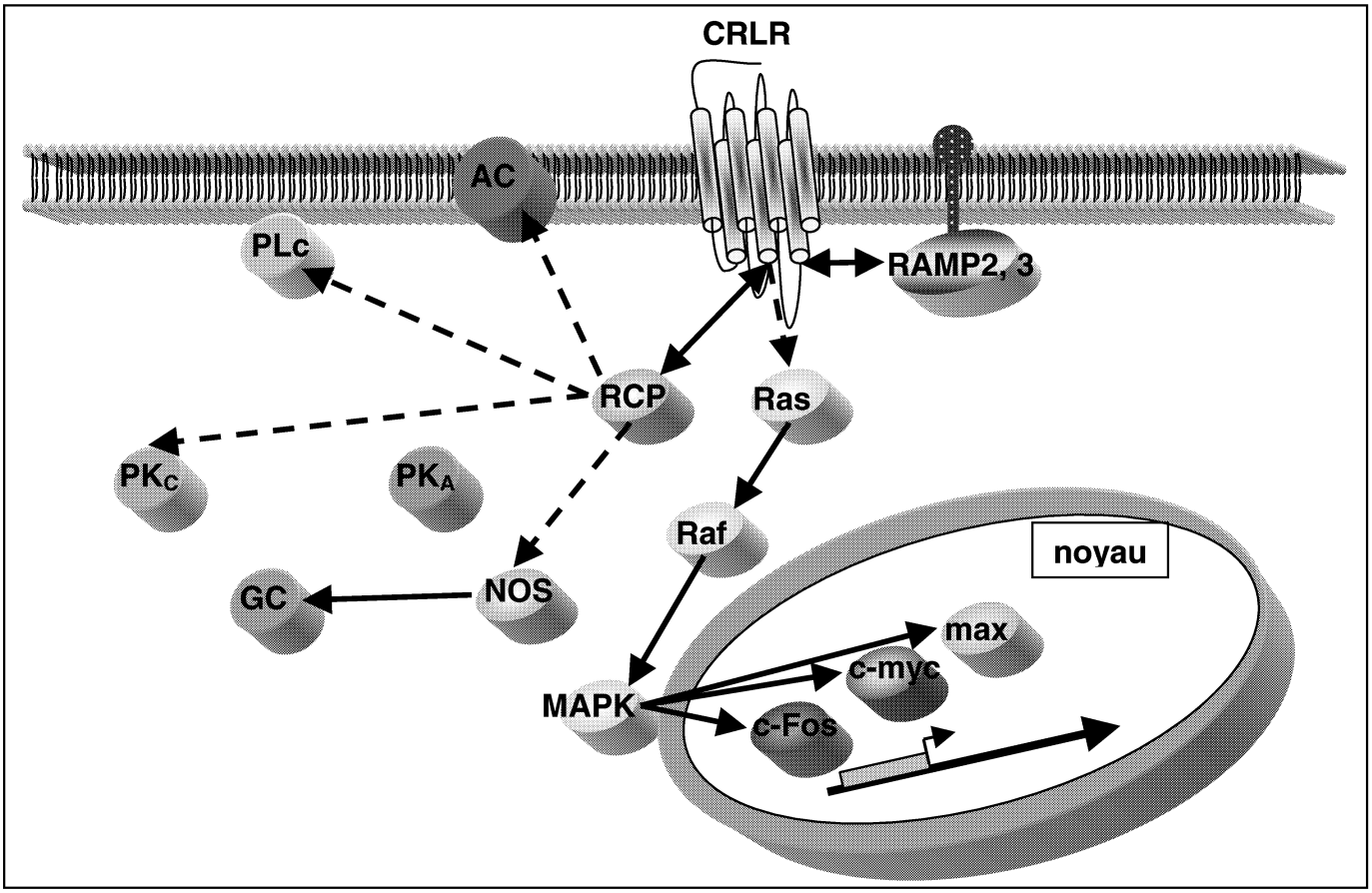


Fig. 18 : Transduction du signal de l'adrénomedulline. AC : Adénylate cyclase, PLc : Phospholipase C, CRLR : Récepteur au CGRP (*Calcitonine gene related peptide*), RAMP : *Receptor-Activity Modifying Protein*, RCP : *Receptor Component Protein,* PK : Protéine kinase, GC : Guanylate cyclase, NOS : *Nitric oxyde synthase*, MAPK : *Mitogen activating protein kinase*.

Il existe plusieurs hypothèses sur la structure du récepteur de l'AM. Le consensus actuel présente 2 types de récepteurs : Le récepteur de l'AM serait le récepteur G10d, un *chemokine-like receptor* [383]. Mais la combinaison du CRLR (Récepteur au CGRP) et des RAMP 2 ou 3 (*Receptor-Activity Modifying Protein*) est aussi capable de constituer un récepteur de l'AM [384]. Au niveau intracellulaire, le RCP (*Receptor Component Protein*) potentialise la transduction du signal vers différentes voies. Parmi les seconds messagers on retrouve l'AMPc et la voie PK_A, le Ca^{2+}, la voie des NOS, la voie des MAPK, et la voie des PKc [385-389] (Fig. 18).

Nous avons vu qu'il existait dans le cœur de l'obèse des mécanismes destinés à compenser les effets délétères de la diminution des récepteurs M_2. Les modifications de l'expression des récepteurs M_2 sont retrouvées dans plusieurs pathologies cardiaques de type hypertrophiques [132,365]. Les études sur l'origine de ces régulations et contre-régulations au niveau de l'expression des récepteurs M_2 ont montré que les voies impliquées étaient multiples et qu'elles impliquaient plusieurs cytokines [157]. Au vu des taux élevés de l'AM chez les patients hypertendus ou diabétiques et de son action potentielle directe sur le cardiomyocyte, nous avons envisagé d'évaluer les effets potentiels de l'AM sur la lignée pluripotente P19 qui se différencie en cardiomyocytes proches des cellules P du nœud sinusal de l'OD. Ainsi, nous avons évalué les effets potentiels de l'AM sur l'expression du récepteur M_2 dans un modèle proche des cellules du nœud sinusal.

La première partie de ce travail confirme que les cellules souches P19 constituent un modèle d'étude *in vitro* proche des cardiomyocytes auriculaires spontanément battant. 30 à 40 % des cellules expriment les marqueurs majeurs des cardiomyocytes auriculaires (GATA 4, Nkx 2.5, ANP) de manière durable (15 jours) sans dédifférentiation. Une fois différenciées sous DMSO, ces cellules expriment les récepteurs de l'AM (CRLR et L1/G10), les différents

effecteurs (RAMP 1, 2, 3) et les récepteurs M_2 muscariniques. Nous montrons que ces récepteurs sont fonctionnels.

Puis, nous montrons que l'AM induit la surexpression des ARNm des récepteurs M_2 de manière dose-dépendante. D'autres équipes ont montré que les effets de l'AM étaient accrus par le facteur H. Nous montrons que les effets de l'AM envers l'expression des récepteurs M_2 sont potentialisés par le facteur H. Enfin, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs CRLR ($CGRP_{8-37}$) n'abolit pas les effets de l'AM alors que l'antagoniste AM_{22-52} les abolit totalement. Ceci suggère que cette signalisation passerait par les récepteurs L1/G10.

Ces travaux *in vitro* nécessitent des confirmations *in vivo*. Vu la controverse sur le rôle des récepteurs L1/G10 comme récepteur de l'AM, la réalisation de KO ou de *Knock-Down* par *SiRNA* permettraient de trancher sur la voie de signalisation qu'emprunte ce phénomène.

ADRENOMEDULLIN UPREGULATES M_2-MUSCARINIC RECEPTORS IN CARDIOMYOCYTES FROM P19 CELL LINE

BUYS S, SMIH F, PATHAK A, PHILIP-COUDERC P, VERWAERDE P, MONTASTRUC JL, ROUET P, SENARD JM

British Journal of Pharmacology 2003, 139 : 1219-1227

British Journal of Pharmacology (2003) 139, 1219–1227 © 2003 Nature Publishing Group All rights reserved 0007–1188/03 $25.00
www.nature.com/bjp

Adrenomedullin upregulates M_2-muscarinic receptors in cardiomyocytes from P19 cell line

[1]Sophie Buys, [1]Fatima Smih, [1]Atul Pathak, [1]Pierre Philip-Couderc, [1]Patrick Verwaerde, [1]Jean-Louis Montastruc, [1]Philippe Rouet & *,[1]Jean-Michel Senard

[1]INSERM U586, Laboratoire de Pharmacologie Médicale et Clinique, Faculté de Médecine, 37 allées Jules Guesde, 31073 Toulouse Cedex, France

1 The effects of AM on expression of muscarinic (M) receptors from P19-derived cardiomyocytes were examined.

2 RT–PCR experiments revealed expression of M_1–M_4 receptor genes. Immuno-histochemistry indicated that M_2 expression is restricted to contractile cells. Carbachol inhibition of isoprenaline-induced increase in beating rate was prevented by atropine and methoctramine (pA_2: 8.1). Inhibition of [^{3}H]-NMS binding by atropine (pK_i: -8.4 ± 0.2) and methoctramine (pK_i: -8.3 ± 0.2) suggests that M_2 is the functional expressed isoform.

3 [^{3}H]-NMS binding and semiquantitative RT–PCR studies showed a dome shaped time course of M_2 expression with a maximum at 7 days of differentiation followed by a progressive decline.

4 AM concentration-dependently upregulated M_2 receptor mRNA during late differentiation stages in P19 cells but also in rat atrial cardiomyocytes. This effect was potentiated by factor H. AM (100 nM) plus factor H (50 nM) treatment of P19 cells for 24 h significantly increased [^{3}H]-NMS-specific binding (B_{max}: 81 ± 7 vs 31 ± 6 fmol mg^{-1} prot). The effect of AM on mRNA levels was prevented by AM receptor antagonist AM_{22-52} (1 μM) but not by CGRP antagonist, $CGRP_{8-37}$ (1 μM).

5 The mRNA levels encoding CRLR receptor declined with culture duration, whereas those encoding L1/G10D receptor remained stable.

6 Our findings demonstrate that AM regulates M_2 receptors expression in cardiomyocytes probably through a mechanism involving L1/G10D receptors. The '*in vivo*' significance of this phenomenon remains to be demonstrated.

British Journal of Pharmacology (2003) **139,** 1219–1227. doi:10.1038/sj.bjp.0705350

Keywords: P19 cells; muscarinic receptors; adrenomedullin; L1/G10D receptor

Abbreviations: AM, adrenomedullin; CGRP, calcitonin gene-related peptide; CRLR, calcitonin receptor-like receptor; GPCR, G protein-coupled receptor; [^{3}H]-NMS, [^{3}H]-*N*-methylscopolamine; IUPHAR, International Union of Pharmacology; RAMP, receptor-associated modifying protein

Introduction

Reduced heart rate variability has been shown to be associated with an increased risk of cardiac death in patients suffering from various heart diseases (La Rovere *et al.*, 1998; Galinier *et al.*, 2000; Sevre *et al.*, 2001) and also in the elderly (Dekker *et al.*, 1997; Kikuya *et al.*, 2000). Because of its prognostic significance, understanding the pathophysiological mechanisms involved in the decrease in heart rate variability in these conditions and the search for drugs able to normalize or to enhance heart rate variability is relevant.

Various experiments have shown that vagal nerve stimulation (Hedman *et al.*, 1995) or presynaptic muscarinic receptor pharmacological blockade increase heart rate variability (La Rovere & De Ferrari, 1995). However, these approaches lack simple applicability in humans and also assume preserved functionality of cardiac muscarinic receptors and overall of the M_2 subtype (Caufield, 1993; Stengel *et al.*, 2000). Concerning this aspect of the question, a decrease in heart M_2 receptors has been reported in left ventricular hypertrophy (Mansier *et al.*, 1993), in the elderly (Brodde *et al.*, 1998) and in obesity (Pelat *et al.*, 1999). Thus, a more promising appproach would be, starting from the mechamisms accounting for M_2 muscarinic receptor downregulation, which are still far from understood (Haddad & Roussel, 1998), to search for factors able to correct or to prevent heart M_2 muscarinic receptor decline.

One candidate for such an effect is AM. This 52-amino-acid peptide, originally isolated from human pheochromocytoma (Kitamura *et al.*, 1993), belongs to the calcitonin family of peptides and exhibits potent vasorelaxing and natriuretic actions. Elevated plasma levels of AM are found in arterial hypertension, myocardial infarction and heart failure (Hinson *et al.*, 2000; Jougasaki *et al.*, 2001). In the heart , AM inhibits cardiac fibrosis (Zhang *et al.*, 2000) and was also shown to prevent cardiomyocyte hypertrophy induced by angiotensin II (Tsuruda *et al.*, 1998; Luodonpää *et al.*, 2001), phenylephrine or endothelin (Autelitano *et al.*, 2001). These data together with those from mice lacking (Shindo *et al.*, 2001) or overexpressing AM (Shindo *et al.*, 2000) currently suggest that AM is involved in mechanisms that compensate cardio-

*Author for correspondence; E-mail: senard@cict.fr
Advance online publication: 23 June 2003

vascular changes. Most of the biological actions of AM are mediated by GPCRs formed by heterodimerization of CRLRs with one RAMP resulting in various protein complexes named $CGRP_1$ ($CRLR/RAMP_1$), AM_1 ($CRLR/RAMP_2$) and AM_2 ($CRLR/RAMP_3$), following the recent recommendations of IUPHAR (Poyner *et al.*, 2002). Furthermore, two additional proteins, canine orphan receptor (RDC1) and L1/G10D, have been reported to be involved in the mediation of some AM effects (Kapas *et al.*, 1995; Kapas & Clark, 1995) despite available data are being quite controversial, making these receptors still considered as orphans.

Despite numerous investigations of the role of AM in the heart, its effect on gene expression remains poorly understood. Because of the prominent role of muscarinic M_2 receptors in heart rate control, we decided to investigate the putative role of AM on the regulation of muscarinic receptor expression in cardiomyocyte-like cells derived from the totipotent murine P19 cell line. In this cell line, which has been extensively used to study mechanisms of cardiogenesis (Grepin *et al.*, 1997), the presence of muscarinic receptors was never reported. Therefore, the first part of the study focuses on the pharmacological and functional characterization of M_2 muscarinic receptors in differentiated P19 cells. The second part shows that AM is able to upregulate M_2 expression by a mechanism more probably involving L1/G10D receptor but not CRLR/RAMPs receptor complexes.

Methods

Cell culture

Totipotent murine P19 cells were cultured as previously reported (Skerjanc, 1999). Briefly, the cells were first cultured in minimal essential medium (MEM) supplemented with 2.5% fetal bovine (FBS) and 7.5% newborn calf serum (NBCS) at 37°C under 5% CO_2. Embryoid bodies were obtained by cultivating 10^5 cells ml^{-1} in MEM supplemented with 10% FBS and 0.8% dimethyl sulfoxide (DMSO) on Petri dishes for 4 days. Embryoid bodies were then replated into tissue culture dishes with MEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin mix (1 mg ml^{-1}). The differentiation days were counted after this seeding. As preliminary experiments indicated that the percentage of cells that developed the spontaneously beating phenotype was dependent on the quality of serum (data not shown), all experiments were carried out using ATCC serum. Under these conditions, spontaneous beating was observed from the seventh day of culture. As previously described, the beating rate and percentage of beating cells reached a maximun at day 9 and remained stable until at least 15 days of culture.

Isolated cardiac myocytes were prepared from the atria of Wistar rats weighing 250 g as previously described (Schwarzfeld & Jacobson, 1981).

Immunohistochemistry

Cells were fixed in methanol for 1.5 min and incubated with rabbit anti-M_2 and mouse anti-desmin antibodies. Then, anti-M_2 antibodies were detected with anti-rabbit antibody coupled to rhodamine and anti-desmin antibodies were detected with anti-mouse antibody coupled to FITC. Each antibody was incubated for 1 h at 37°C and washed with phosphate-buffered saline solution.

mRNA extraction and relative quantitative RT–PCR

Total RNA was extracted from P19 cells and rat cardiomyocytes using Trizol reagent (Invitrogen) following the instructions of the manufacturer and then treated with RNAse-free DNAse to eliminate genomic DNA. RNA was quantified using a fluorometer (Fuoroscan, Lab System, Inc.) after addition of 100 μl ribogreen (0.5%) in TE buffer (10 mM Tris hydroxymethyl aminoethane and 5 mM EDTA).

For reverse transcription (RT), 2.5 μg total RNA were retrotranscribed at 42°C for 60 min in a Biometra ThermalCycler in a reaction mixture containing 1 μl (200 U) SuperScript II reverse transcriptase, 2 μl random primers (50 μM), 4 μl 5 × First-Strand Buffer, 2 μl DTT (0.1 M), 2 μl dNTP (10 mM).

A total of 25 PCR cycles were chosen for PCR product quantification since it was found to be in the PCR linear range for all the genes tested (data not shown). For the M_1, M_2, M_3, M_4 and M_5 muscarinic receptors, $RAMP_{1,2}$, CRLR and L1 receptors, $GATA_4$, α-cardiac actin, MLC-2a, MLC-2b and Nkx 2.5, PCR was performed in 50 μl of a reaction mixture containing 5 μl PCR buffer 10 ×, 1.5 μl $MgCl_2$ (50 mM), 1 μl dNTP (10 mM), 2 μl of each primer (100 nM), 0.5 μl *Taq* polymerase, 34 μl water and 4 μl cDNA. For M_2, after heating to 94°C for 4 min, denaturation, annealing and elongation were carried out at 94°C for 45 s, 54°C for 60 s and 72°C for 90 s, respectively. The reaction was repeated for 25 cycles followed by a final elongation step of 7 min at 72°C. Annealing was performed at 58°C for M_3 and $RAMP_3$, whereas for α-MHC and β-MHC the annealing reaction was carried out at 60°C. All other cDNA were amplified in cycles set with a 54°C annealing temperature. Primer sequences are displayed in Table 1.

The expression level of mRNA encoding the ribosome 18S subunit was monitored as an internal control and used to normalize the variation of mRNA levels in semiquantitative RT–PCR experiments. PCR was performed with competimers (Ambion) and 5 μCi [γ-^{33}P]dATP. Incorporated radioactivity in the PCR product was revealed with a Si445 phosphorimager (Molecular Dynamics) and quantified with ImagequaNT software (Molecular Dynamics).

Real-time PCR mRNA quantification

A measures of 2 μg of DNAse I-treated (DNAfree, Ambion) total RNA was retrotranscribed in the presence of random primers and Superscript II enzyme (Invitrogen, France) according to the manufacturer's protocol. Gene-specific primers were designed using Primer Express software (Applied Biosystems) based on sequencing data from the National Center for Biotechnology Information databases, U.S.A. Primer sequences were as follows: mouse AM: forward CCTGGACGAGCAGAACACAA and reverse TGGCGGTAGCGTTTGACA; mouse M_2: forward ATGGCGGCCTGGAACAC and reverse CCTCCCCTTGAACACAGGTTT; mouse 18S: forward TCGTATTGCGCCGCTAGAG and reverse TGAAAACATTCTTGGCAAATGC. Real-time PCR reactions were carried out with Cybergreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a GenAmp 5700 apparatus. The standard curve method was used for the relative quantification

Table 1 Sequences of primers used during RT-PCR experiments

Target		*Sequence*
M_1 mouse	S	CTGGTTTCCTTCGTTCTCTG
	AS	GCTGCCTTCTTCTCCTTGAC
M_2 mouse	S	GGCAAGCAAGAGTAGAATAAA
	AS	GCCAACAGGATAGCCAAGATT
M_3 mouse	S	GTGGTGTGATGATTGGTCTG
	AS	TCTGCCGAGGAGTTGGTGTC
M_4 mouse	S	AGTGCTTCATCCAGTTCTTGTCCA
	AS	CACATTCATTGCCTGTCTGCTTTG
M_5 mouse	S	CTCATCATTGGCATCTTCTCCA
	AS	GGTCCTTGGTTCGCTTCTCTGT
RDC-1	S	CCGCTATCTCTCCATCACCTACTTC
	AS	GTCCTTCTCCTCTTCATACCACTCA
L1	S	AGCGCCACCAGCACCGAATACG
	AS	AGAGGATGGGGTTGGCGACACAGT
CRLR	S	TGCTCTGTGAAGGCATTTAC
	AS	CAGAATTGCTTGAACCTCTC
$RAMP_1$	S	GACTGGGGAAAGACCATACAGA
	AS	CTCCTCCAGACCACCAGTGCA
$RAMP_2$	S	GGACGGTGAAGAACTATGAG
	AS	ATCATGGCCAGGAGTACATC
$RAMP_3$	S	TGGAAGTGGTGCAACCTGTC
	AS	CACGGTGCAGTTGGAGAAGA
GATA 4	S	CTGTCATCTCACTATGGGCA
	AS	CCAAGTCCGAGCAGGAATTT

S-sense; AS = antisemse.

of the PCR products and gene expression was normalized to 18S RNA quantification.

Binding studies

All binding experiments were performed with crude membranes obtained as previously described (Pelat *et al.*, 1999) using [^{3}H]-NMS, a nonspecific muscarinic antagonist. All incubations were performed at 25°C for 30 min. For saturation experiments, a fixed concentration of membranes were incubated with increasing [^{3}H]-NMS concentrations (from 0.1 to 3 nM) and nonspecific binding was defined using methoctramine (20 μM). The reaction was stopped by the addition of incubation buffer followed by rapid filtration through Whatmann GF/C filters. The filters were then washed twice with ice-cold incubation buffer. The radioactivity retained on the filters was measured with a Packard-scintillation counter. Data were analysed with a Scatchard plot allowing B_{max} and K_d calculations.

For inhibition binding studies, a fixed concentration of [^{3}H]-NMS (2 nM) was incubated in the presence of increasing concentrations (ranging from 10 pM to 10 μM) of methoctramine, atropine or pirenzepine. Buffers used and incubation procedures, rapid filtration and measurement of radioactivity retained on filters were as described above. Inhibition curves were analysed using Prism software. pK_i and K_i values were calculated from IC_{50} values according to Cheng & Prusoff (1973) for competitive interactions taking into account the concentration and K_d of tritiated ligand. Slope factor (Hill coefficient, n_H) was calculated from a one-site receptor interaction model. The decision to fit data according to a one- or a two-site model was moreover taken after comparison of the residual sum of squares from both analysis.

Functional assessment of muscarinic receptors on P19 cells

These experiments were carried out on fully 9-day differentiated cells, that is, at the time when the maximum number of beating cells was reached. For each dish, the mean resting beating rate was counted on at least five different groups of cells and only those with a stable beating rate were retained for functional studies. The cells were first stimulated by addition of 10 μM isoprenaline, a β-adrenoreceptor agonist, which induced a rapid (15 s to reach maximal effect) and lasting (15 min) two-fold increase in beating frequency. At 2 min after isoprenaline stimulation, six cumulative concentrations of carbachol (from 1 nM to 10 μM) alone or of carbachol plus a fixed concentration (10 μM) of muscarinic antagonist (atropine or pirenzepine) were added at 2 min intervals and mean beating rate calculated during the second minute of drug exposure. Similar experiments were performed using three different concentrations of methoctramine (0.1, 1 and 10 μM) in order to calculate pA_2 for this antagonist. Analysis of dose–response curves was carried out from at least six experiments for each experimental condition performed in four independent cultures of P19 cells using Prism software (GraphPad Software Incorporated).

Drugs and reagents

Alpha minimum essential medium (αMEM), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), NBCS, penicillin and streptomycin, oligo(dT), 5 × First-Strand Buffer, dithiothreitol (DTT), deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP), Superscript II, PCR buffer 5 ×, *Taq* DNA polymerase, random primers, Hanks' medium and laminin were purchased from Invitrogene, Inc. Competimers and deoxyribonuclease (Rnase-free DNAse) were from Ambion. P19 cells, FBS and DMSO were from ATCC, Inc., ATCC: Virginia, U.S.A. Mouse adrenomedullin, $CGRP_{8-37}$, ADM_{22-52} were purchased from Cal Biochem, Inc., Cal Biochem: Meudon, France. deoxyadenosine 5′-[γ^{33P}] triphosphate (dATP), [^{3}H]-NMS were from NEN, Inc., NEN: Perkin Elmer, Life Science, Cartaboeuf, France. Ribogreen was from Molecular probes and random primers were purchased from Amersham, Inc. Anti-M_2, anti-rabbit and anti-mouse antibodies from Alomon, Inc; primers from Genset, Inc., Genset: Prolico, Paris, France. TriZOL reagent, cytosine β-D-arabino-furanoside, collagenase, protease, carbachol, pirenzepine, methoctramine, atropine, isoprenaline, anti-desmine antibodies and from Sigma, Sigma: St Quentin Fallavier, France.

Satistical analysis

Student's test was used for comparison between two variables. Multiple comparisons were made with one-way ANOVA. All data are expressed as mean ± s.e.m., and P-values of <0.05 were considered significant.

Results

Muscarinic receptor characterization of P19-derived cardiomyocytes

The presence of mRNA encoding M_1, M_2, M_3 and M_4 receptors in P19 cells at full differentiation stage (9 and 15 days) was demonstrated by RT–PCR experiments whereas no mRNA encoding the M_5 subtype was found at the cycle number sufficient to detect expression of other muscarinic receptor subtypes (Figure 1a).

In order to assess if the encountered mRNA were able to encode functional muscarinic proteins, we measured both spontaneous and isoprenaline-stimulated beating rate in cardiomyocyte-like cells derived from P19 cells after 9 days of differentiation. The spontaneous beating rate of resting P19 cells was stable over at least 30 min under our experimental conditions (52 ± 10 bpm). Addition of isoprenaline (10 μM) to the medium was followed by a rapid and long-lasting significant increase in the beating rate (120 ± 13 bpm, $P < 0.001$). The effects of isoprenaline were reversed, in a concentration-dependent manner by carbachol, a nonspecific muscarinic agonist. When cells were pretreated with a fixed concentration of atropine (10 μM) prior to carbachol addition, the effects of carbachol were no longer observed, whereas no significant change in response to carbachol occurred with pretreatment by 10 μM pirenzepine (Figure 1b). In this same experimental setting, methoctramine (0.1, 1 and 10 μM) shifted the carbachol curve to the right in a concentration-dependent way and the pA_2 value calculated for methoctramine was 8.1 (plot not shown). Results of inhibition experiments of [^{3}H]-NMS binding by atropine, methoctramine and pirenzepine are depicted in Figure 1c. Curves obtained with atropine (n_H: 0.98 ± 0.01) and methoctramine (n_H: 0.99 ± 0.01) were clearly monophasic and pK_i values (atropine: -8.4 ± 0.2 and methoctramine: -8.3 ± 0.2) compatible with binding to M_2 as well as to M_4 receptors. Unexpectedly, pirenzepine hardly inhibited [^{3}H]-NMS binding even at the highest concentration used making the estimated curve characteristics difficult to interpret. According to n_H values (0.486 ± 0.121) and F-test, inhibition curves obtained with pirenzepine were analyzed using a two-site model, which allowed to determine the presence of 15.3% receptors with high affinity for pirenzepine (K_{ihigh}: 0.6 ± 0.2 nM) while the K_{ilow} for the remaining population was > 10 μM. Saturation experiments of [^{3}H]-NMS using methoctramine (20 μM) to assess nonspecific binding in membranes ($n = 10$) from 9 days differentiated P19 cells indicated the presence of 57 ± 5 fmol mg^{-1} protein and a K_d value of 1.0 ± 0.2 nM.

As only 30–40% of cells were beating after 9 days of differentiation, we undertook immunohistochemical experiments to define the cellular expression of M_2 receptors. The percentage of cells stained after incubation with an anti-M_2 antibody was similar to the percentage of beating cells (not

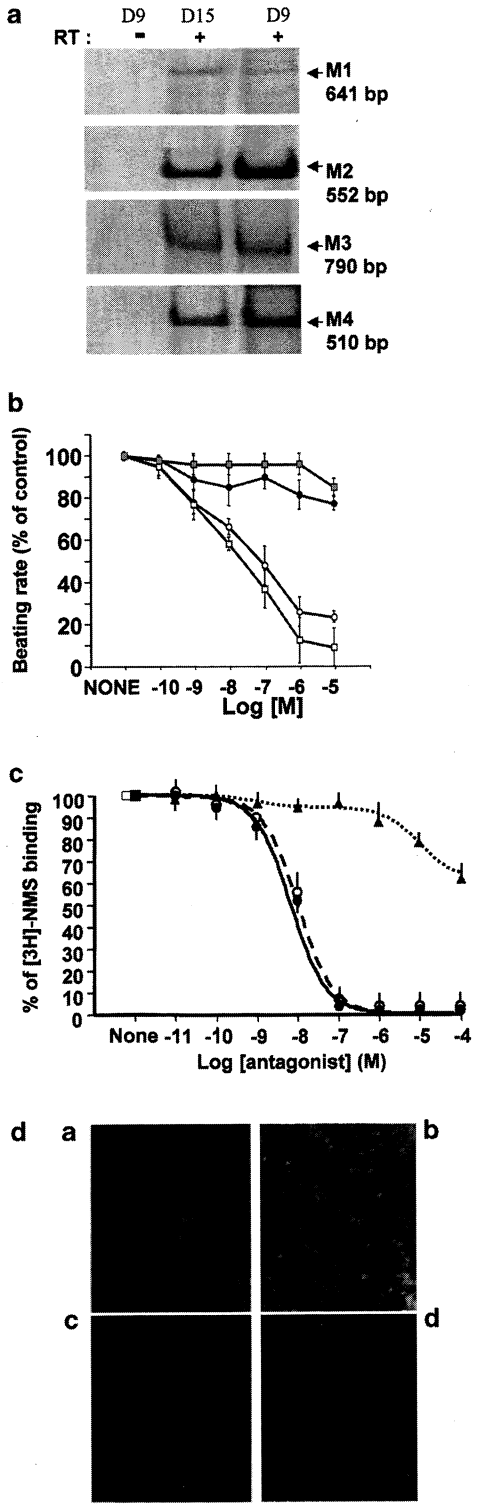


Figure 1 Characterization of muscarinic receptors on P19-derived cardiomyocytes. (A) RT–PCR analysis of mRNA expression for muscarinic receptors M_1–M_4 in P19 differentiated cardiomyocytes. D9 and D15 indicate 9 and 15 days of differentiation respectively. (–) is a control PCR without reverse transcription of the mRNA. Band sizes are indicated. (B) Inhibition of the isoprenaline-induced increase in beating rate by increasing concentrations of carbachol alone ($n = 8$, open squares) or in the presence of a fixed concentration (10 μM) of atropine ($n = 8$, filled squares), methoctramine ($n = 12$, filled circles) or pirenzepine ($n = 8$, open circles). (C) Inhibition of [^{3}H]-NMS binding by atropine ($n = 6$, filled line), methoctramine ($n = 6$, hatched line) and pirenzepine ($n = 6$, dotted line). (D) Top: Colocalization of M_2 muscarinic receptor and desmin by immunofluorescent staining of P19 differentiated cardiomyocytes (representative example of four experiments). M_2 is revealed by a rhodamine-coupled antibody (a) and desmin is revealed by a FITC-coupled antibody (b). Bottom: negative controls: c and d.

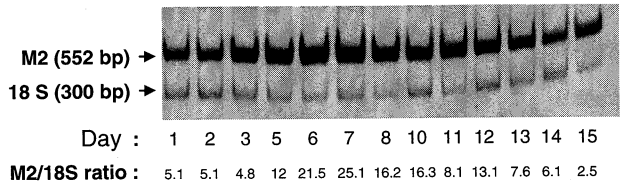


Figure 2 Time course expression of M_2 muscarinic receptor mRNA in P19 cells during differentiation. Semiquantitative RT–PCR were performed from day 1 (D1) to day 15 (D15). 18S mRNA are used as internal standard. Values of M2/18S ratio are depicted on bottom line of the figure.

shown). Moreover, M_2 immunostaining was strictly superposable on immunostaining for desmin (Figure 1d).

Evolution of M_2 expression according to cell differentiation

In RT–PCR experiments, the expression level of mRNA encoding the M_2 receptor was dome shaped. Expression was detected from the first day of differentiation, which increased until day 7 and then progressively declined (Figure 2). This pattern of evolution was also seen when measuring protein expression during [^{3}H]-NMS saturation experiments ($n=4$). The B_{max} measured on day 1 (24 ± 5 fmol mg^{-1} protein) reached 57 ± 5 fmol mg^{-1} protein at day 7 and returned to values comparable to day 1 after 15 days of culture (26 ± 6 fmol mg^{-1} protein).

The way in which M_2 expression varied over time is probably not due to cell dedifferentiation since the levels of expression of RNA encoding MHC, MLC or cardiac transcription factors Nkx2.5 (data not shown) and GATA4 (Figure 6) remained stable until at least day 15.

Effect of AM on M2 muscarinic receptor expression

This was assessed at two different times (9 and 15 days of differentiation) by measuring the levels of M_2 receptor mRNA using real-time PCR with ribosome 18S as control. No change in M_2 mRNA levels was seen at day 9 (data not shown). By contrast, a 24-h incubation of 15 days differentiated P19 cells with AM led to a concentration-dependent increase in M_2 receptor mRNA levels reaching 50% at 1 μM AM (Figure 3a). As factor H has been shown to bind AM and to potentiate its cellular effects (Pio *et al.*, 2001), we investigated the consequence of adding factor H to the cell culture media on M_2 mRNA levels. When combined with AM (100 nM), factor H (50 and 200 nM) concentration-dependently potentiated the effect of AM leading to a larger increase in the M_2 mRNA levels than observed with AM alone (Figure 3b). Factor H alone failed to modify M_2 mRNA levels (Figure 3b). Saturation experiments carried out on crude membranes from 15 days differentiated P19 cardiomyocytes using [^{3}H]-NMS confirmed that exposure of cells to AM plus factor H induced a significant increase in B_{max}, thus reflecting M_2 protein upregulation (81 ± 7 vs 31 ± 6 fmol mg^{-1} protein in controls, $P<0.05$) without significant modification of K_d values (0.9 ± 0.3 vs 0.8 ± 0.2 nM).

Upregulation of mRNA encoding M_2 receptors by AM (100 nM) and potentiation by factor H (50 nM) was also found in isolated myocardial cells from rat atrium confirming that the effect is not limited to the P19 cell line (Figure 3C). Potentiation of AM effects by factor H was less pronounced in rat atrial cells than in P19-derived cardiomyocytes.

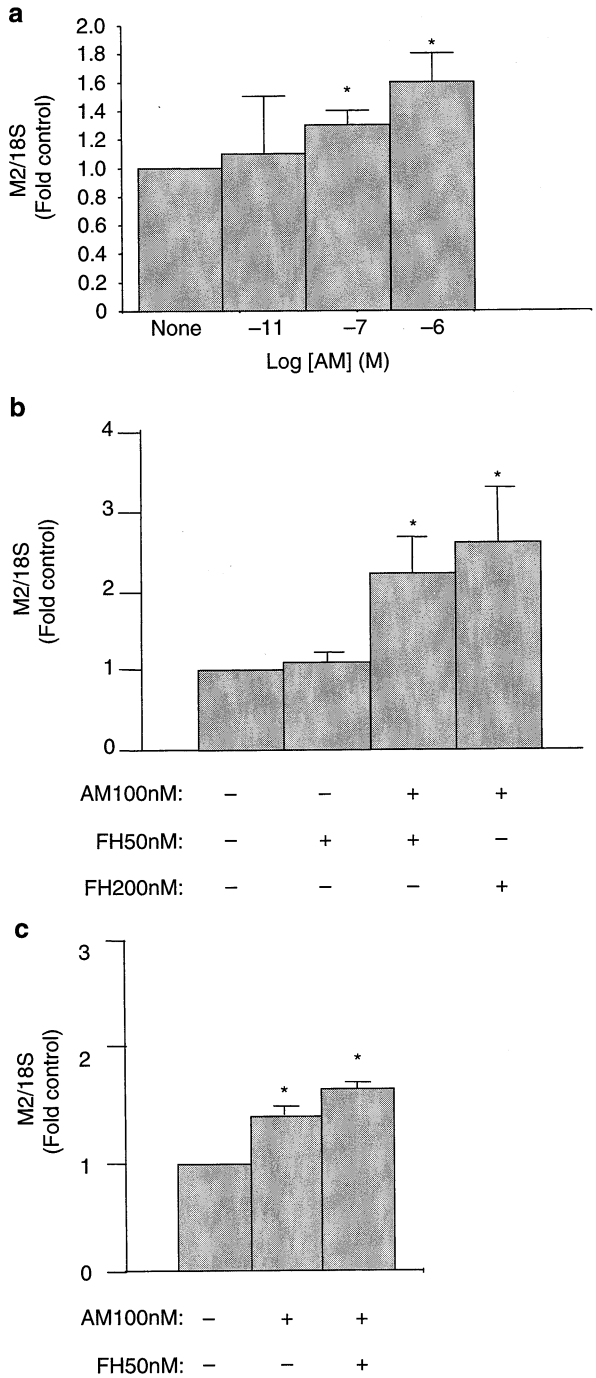


Figure 3 Effects of AM with or without factor H on M_2 muscarinic receptor mRNA expression in P19 cardiomyocytes and rat atrial cardiomyocytes. Mean$\pm$s.e.m. of six separate experiments using real-time quantitative PCR with 18S mRNA used as standard for normalization. *$P<0.05$ vs control values. (a) Effect of increasing AM concentrations on 15 days differentiated P19 cardiomyocytes. Statistical analysis was performed using ANOVA. (b) Effect of two concentrations of factor H added to a fixed concentration of AM. (c) Effect of AM alone or associated with factor H on isolated rat atrial cardiomyocytes.

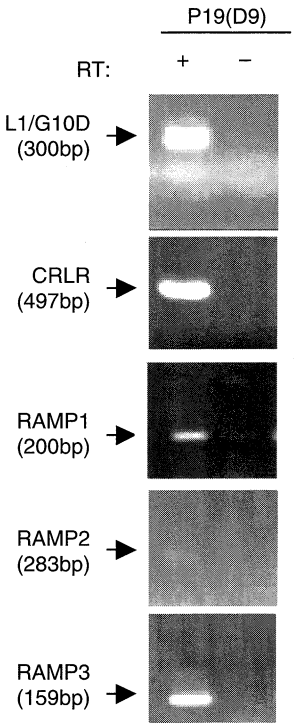


Figure 4 RT–PCR analysis of mRNA expression from L1/G10D and CRLR receptors and $RAMP_{1-3}$ proteins. Sizes of the bands are indicated between parentheses.

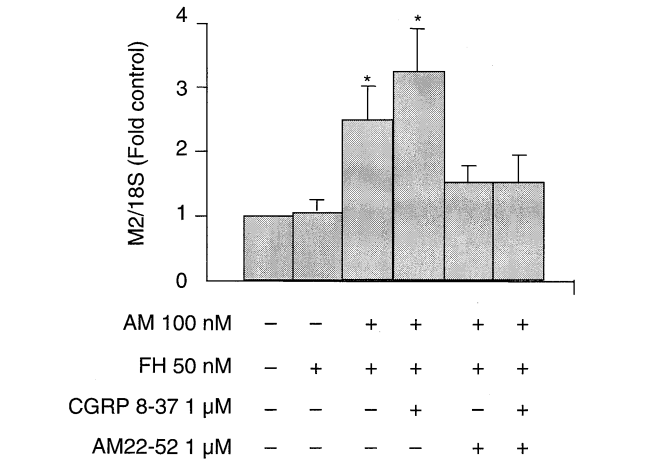


Figure 5 Effect of antagonists of L1/G10D (AM_{22-52}) and CRLR ($CGRP_{8-37}$) receptors on the induction of M_2 mRNA expression by AM plus factor H. Experiments were monitored by real-time PCR in P19 cardiomyocytes (D15 of differentiation) using 18S RNA as standard for normalization. Mean±s.e.m. of three independent experiments.*$P<0.05$.

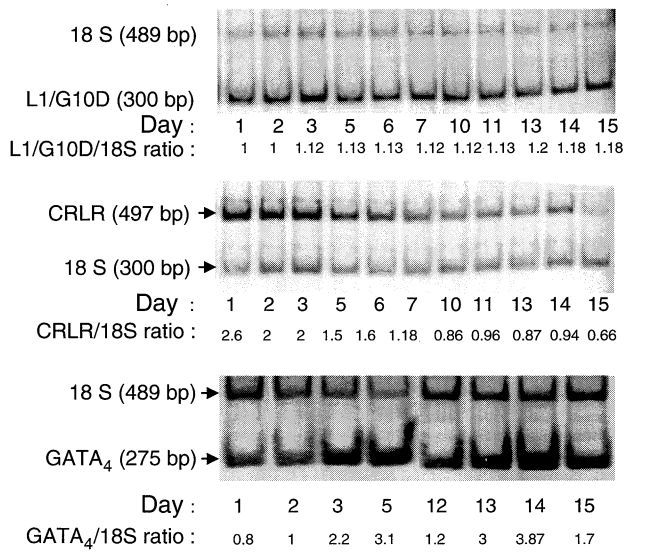


Figure 6 Temporal evolution of L1/G10D and CRLR receptors and of GATA4 mRNAs in P19 cells during culture from day 1 (D1) to day 15 (D15). Results of semiquantitative RT–PCR analysis using 18S mRNA as internal standard. For L1/G10D and CRLR the value of ratio of expression over 18S expression is provided at each time.

Analysis of AM receptors involved in increased M_2 expression

We first looked for potential receptors able to bind AM. RT–PCR experiments identified the presence of both CRLR and L1/G10D receptors (Figure 4) but not of RDC1 (data not shown). Moreover, significant amounts of $RAMP_1$, $RAMP_2$ and $RAMP_3$ mRNA (Figure 4) were also detected, leading to a complex situation in which AM effects on M_2 receptors could be mediated either by the various CRLR-RAMP receptor complexes ($CGRP_1$, AM_1 and AM_2) or by L1/G10D receptor as well. Cell pretreatement with a CGRP antagonist, $CGRP_{8-37}$ (1 μM) failed to antagonize the AM-induced increase in M_2 mRNA, whereas pretreatment with AM_{22-52} (1 μM) or with a mixture of both antagonists prevented it (Figure 5). Moreover, CRLR expression progressively declined starting from day 5 and its expression was dramatically reduced after 15 days of differentiation (Figure 6). In contrast, normalization of levels of L1/G10D receptor mRNA by 18S mRNA levels indicated that expression of L1/G10D receptor remained unchanged with culture time (Figure 6). Thus, it can be proposed that AM-induced increase in M_2 expression is probably not mediated by the classical AM receptors but could result from interaction of AM with orphan L1/G10D receptor.

Discussion

The main results of the present study first clearly indicate the presence of a fully characterized M_2 receptor on P19-derived cardiomyocytes. They also demonstrate that AM is able to upregulate muscarinic M_2 receptor expression during late differentiation stages probably through a pathway involving L1/G10D receptor.

Totipotent P19 cells have been shown to differentiate into spontaneously beating cardiomyocyte-like cells under suitable cell culture conditions (Skerjanc, 1999). Extensive data are available on the phenotypic characteristics of these cells, which can be considered as a suitable model of nodal cells (Wobus *et al.*, 1994). We found a higher percentage of beating cells (30–40%) than previously reported (Grepin *et al.*, 1997), and this can be explained by careful choice of appropriate serum. P19 cells differentiate into spontaneously beating myocytes that express cardiac-specific transcription factors GATA-4 and Nkx2.5 as well as the various isoforms of heavy and light

chains of myosin and ANP (Grepin *et al.*, 1997). However, the question of their ability to express muscarinic receptors has not been resolved although this is an important point. Only one work investigated the presence of M_2 receptors using classical pharmacological methods and concluded their absence (Wobus *et al.*, 1994). In the present work, we definitively show that cardiomyocytes derived from P19 cells express mRNA for four of the five known muscarinic receptors. Despite this wide expression pattern, only the M_2 subtype seems to be functional as assessed by suppression of the carbachol-induced reversion of chronotropic effects of isoprenaline by methoctramine and atropine pretreatment. This result is in accordance with those obtained in M_2 or M_4 receptor knockout mice showing that in isolated atria, carbachol-induced bradycardia is abolished in M_2 receptor knockout mice, whereas it is only slightly decreased in M_4 knockout ones (Stengel *et al.*, 2000). A striking result from functional experiments was the inability of pirenzepine to prevent carbachol-induced reversion of isoprenaline effects on beating rates. One possible explanation could be that, as reported in pig atria by Daeffler *et al.* (1999), pirenzepine behaves as an inverse agonist at M_2 muscarinic receptors. The lack of selective antagonists does not allow to exclude definitively the expression of a functional M_4 receptor in P19-derived cardiomyocytes. In fact, binding experiments indicated that pK_i values for atropine and methoctramine are compatible with binding at both M_2 and M_4 receptors. Whatever the case, concerning M_2 receptor, which is considered as the main effector of parasympathetic nervous system in the heart (Caufield, 1993), its expression was confirmed by immunohistochemistry and was shown to be limited to beating cells that also exhibit positive staining for desmin antibodies whereas nonbeating cells did not. Interestingly, radioligand binding studies and RT–PCR indicated that M_2 expression varied with the number of days of differentiation. The expression level, which is low on poorly differentiated cells, progressively increases and reaches maximal levels shortly before the cells arrive at their maximal differentiation state and beating rate. The mechanisms accounting for this temporal pattern of M_2 expression were not the topic of the present work. However, it seems unlikely that this pattern is due to a loss of cardiomyocyte-like differentiation, since the percentage of beating cells and their beating rate as well as the expression of specific cardiac transcription factors $GATA_4$ and Nkx2.5 in our experimental conditions, remained unchanged even in late days of culture. A decline of cardiac M_2 expression during aging has been reported in humans, even in the absence of left ventricular hypertrophy (Brodde *et al.*, 1998). This observation needs further experiments to be elucidated. It also explains why we tested the effects of AM not only in fully mature but also in late differentiated P19 cells.

The rationale for starting the present study was based on the report that AM is able to prevent the myocardial hypertrophy induced by angiotensin II, phenylephrine or endothelin (Tsuruda *et al.*, 1998; Autelitano *et al.*, 2001) and to inhibit the angiotensin II-induced increase in ANP and BNP gene expression in rat neonatal ventricular cardiomyocytes (Luodonpää *et al.*, 2001). We show that AM *per se* increases, in a dose-dependent manner, mRNA encoding M_2 receptors in P19-derived cardiomyocytes. This effect on mRNA is dependent on the status of the cells, since it is only observed in late differentiation stages and was confirmed at the protein level in binding experiments with [^{3}H]-NMS, which indicate a large increase in M_2 receptor density. The effect of AM is not limited to P19 cells since it also was observed in isolated cardiomyocytes from adult rat atrium cells suggesting that it is a relevant effect.

As previously reported, factor H potentiated the cellular effect of AM (Pio *et al.*, 2001) thus explaining why most experiments were carried out in the presence of factor H. The role of factor H desserves some comments. This 150-kDa glycoprotein present in human plasma (Whaley & Ruddy, 1976) is an important regulator in the activation of the complement system (Zipfel, 2001). It was also shown as the major AM binding protein in human plasma able to bind almost half of the total plasma AM (Pio *et al.*, 2001) but the details of the interactions between AM and factor H are not yet entirely known. This point may be important for the discussion of the physiological relevance of our findings. As reviewed by Hinson *et al.* (2000) the plasma concentrations of AM in healthy humans (1–10 pM) or even in pathophysiological conditions such as cardiac failure (around 100 pM, Pousset *et al.*, 2000) remain far lower from those able to induce upregulation of M_2 receptor in our '*in vitro*' study. However, the significance of plasma AM levels may be questioned since most of published data have measured free AM and not factor H-bound fraction, which seems the most active one. The mechanisms by which factor H potentiates AM biological action are not known but one possibility is that through its binding to cell surface, factor H will modulate AM bioavaibility leading to high concentrations of AM at the proximity of its receptors. Whatever the case, using the same concentrations of factor H as we did, it was shown that the concentration of AM able to induce proliferation of breast cancer cell line T-47D (Pio *et al.*, 2001) or to increase cAMP production on Rat2 cells was in the same range as those able to upregulate M_2 receptors in our study.

The mechanisms by which AM achieves its effect on cardiomyocytes are not fully understood. Recent data suggest that AM signalling depends on combination of CRLR and $RAMP_2$ (Autelitano & Ridings, 2001) resulting in AM_1 receptor (Poyner *et al.*, 2002) and that antihypertrophic action is mediated by cAMP in cultured neonatal rat ventricular myocytes (Luodonpää *et al.*, 2001). However, the presence of other putative receptors able to bind AM including RDC1 (Autelitano, 1998) and L1/G10D (Cormier-Regard *et al.*, 1998) in rat cardiac myocytes has also been reported even if their characterization has not been achieved, making them still considered as orphans (Poyner *et al.*, 2002). Our results indicate that in P19-derived cardiomyocytes, RDC1 is not expressed, thus limiting the mediation of AM-induced upregulation of M_2 receptors to CRLR/RAMP complexes (AM_1 and AM_2) or to L1/G10D receptors.

The signalling pathways that participate in the AM-induced M_2 muscarinic receptor regulation probably do not involve CRLR/RAMP complexes. In fact, as previously reported in other models, P19 cells express CRLR as well as the three isoforms of RAMPs (Autelitano, 1998; Husmann *et al.*, 2000) but two points from the present study make the involvment of this pathway unlikely. First, AM-induced upregulation of M_2 receptor expression was limited to long-term-cultured P19-derived cardiomyocytes and the follow-up of CRLR expression indicated that CRLR expression declines during culture and is very low in late differentiation stages. Second, AM-

induced upregulation of M_2 expression was not reversed by $CGRP_{8-37}$, a reasonable antagonist of AM responses mediated *via* CRLR receptors (Han *et al.*, 1997).

In the present study, we found that P19-derived cardiomyocytes express L1/G10D receptor. Concerning cardiac cells, it has been shown that L1/G10D is expressed in rat ventricular myocytes with higher expression level in embryonic and neonatal than in adult hearts (Cormier-Regard *et al.*, 1998) and in human hearts (Hanze *et al.*, 1997). However, the exact physiological significance of L1/G10D receptor remains a matter of controversy. In fact, despite initial reports considering L1/G10D as an AM receptor (Kapas *et al.*, 1995), later attempts to further characterize these receptors were unsuccessful (Kennedy *et al.*, 1998). We propose that L1/G10D receptor participate in the AM-induced upregulation of M_2 receptors in view of various arguments. The first is that, as discussed above, $CGRP_{8-37}$, which has only weak antagonistic properties against L1/G10D-mediated AM responses (Kapas *et al.*, 1995), failed to prevent AM-induced upregulation of M_2, whereas AM_{22-52} totally blocked it. The second is that its expression level does not depend on the time of the culture by contrast to that we observed for CRLR. However, we cannot exclude that a not yet described AM receptor different from L1/G10D and CRLR complexes with RAMPs will mediate the AM effects in our experimental model. Further experiments are needed to definitively prove that L1/G10D is able to mediate AM responses.

To conclude, the present work completes the pharmacological characterization of P19 cells and describes for the first time the presence of a functional muscarinic M_2 receptor in these cardiomyocyte-like cells. It also proves that, apart from inhibition of myocyte hypertrophy, AM upregulates expression of the M_2 muscarinic receptor. The relevance of this '*in vitro*'AM effect, in both P19 and adult rat atrial isolated cells remains, however, to be demonstrated '*in vivo*' in pathophysiological conditions associated with M_2 receptor downregulation and decreased heart rate variability such as, for instance, heart failure or obesity.

References

AUTELITANO, D.J. (1998). Cardiac expression of genes encoding putative adrenomedullin/calcitonin gene-related peptide receptors. *Biochem. Biophys. Res .Commun.*, **250**, 689–693.

AUTELITANO, D.J. & RIDINGS, R. (2001). Adrenomedullin signalling in cardiomyocytes is dependent upon CRLR and RAMP2 expression. *Peptides*, **22**, 1851–1857.

AUTELITANO, D.J., RIDINGS, R. & TANG, F. (2001). Adrenomedullin is a regulated modulator of neonatal cardiomyocyte hypertrophy *in vitro*. *Cardiovasc. Res.*, **51**, 255–264.

BRODDE, O.E., KONSCHAK, U., BECKER, K., RUTER, F., POLLER, U., JAKUBETZ, J., RADKE, J. & ZEKOWSKI, H.R. (1998). Cardiac muscarinic receptors decrease with age. *In vitro* and *in vivo* studies. *J. Clin. Invest.*, **101**, 471–478.

CAUFIELD, M.P. (1993). Muscarinic receptor: characterization, coupling and function. *Pharmacol. Ther.*, **58**, 319–379.

CHENG, Y.C. & PRUSOFF, W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 3099–3118.

CORMIER-REGARD, S., NGUYEN, S.V. & CLAYCOMB, W.C. (1998). Adrenomedullin gene expression is developmentally regulated and induced by hypoxia in rat ventricular cardiac myocytes. *J Biol. Chem.*, **273**, 17787–17792.

DAEFFLER, L., SCHMIDLIN, F., GIES, J.P. & LANDRY, Y. (1999). Inverse agonist activity of pirenzepine at M2 muscarinic acetylcholine receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 1246–1252.

DEKKER, J.M., SCHOUTEN, E.G., KILOOTWIJK, P., SWENNE, C.A. & KROMBOUT, D. (1997). Heart rate variability from short electrocardiographic recordings predicts mortality from all casues in middle-aged and elderly men. *The Zutphen study. Am. J. Epidemiol.*, **145**, 899–908.

GALINIER, M., PATHAK, A., FOURCADE, J., ANDRODIAS, C., CURNIER, D., VARNOUS, S., BOVEDA, S., MASSABUAU, P., FAUVEL, J.M., SENARD, J.M. & BOUNHOURE, J.P. (2000). Depressed low frequency power of heart rate variability as an independent predictor of sudden death in chronic heart failure. *Eur. Heart J.*, **21**, 475–482.

GREPIN, C., NEMER, G. & NEMER, M. (1997). Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development*, **124**, 2387–2395.

HADDAD, E.B. & ROUSSEL, J. (1998). Regulation of the expression and function of the M_2 muscarinic receptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, **19**, 322–327.

HAN, Z.Q., COPPOCK, H.A., SMITH, D.M., VAN NOORDEN, S., MAKGOBA, M.W., NICHOLL, C.G. & LEGON, S. (1997). The interaction of CGRP and adrenomedullin with a receptor expressed in the rat pulmonary vascular endothelium. *J. Mol. Endocrinol.*, **18**, 267–272.

HANZE, J., DITTRICH, K., DOTSCH, J. & RASCHER, W. (1997). Molecular cloning of a novel human receptor gene with homology to the rat adrenomedullin receptor and high expression in heart and immune system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **240**, 183–188.

HEDMAN, A.E., HARTIKAINEN, J.E.K., TAHVANAINEN, K.U.O. & HAKUMAKI, M.O.K. (1995). The high frequency compoent of heart rate variability reflects cardiac parasympathetic modulation rather than parasympathetic tone. *Acta Physiol. Scand.*, **155**, 267–273.

HINSON, J.P, KAPAS, S. & MITH, D.M. (2000). Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocrinol. Rev.*, **21**, 138–167.

HUSMANN, K., SEXTON, P.M., FISCHER, J.A. & BORN, W. (2000). Mouse receptor acitvity-modifying proteins 1,2 and 3: amino acid sequence, expression and function. *Mol. Cell Endocrinol.*, **162**, 35–43.

JOUGASAKI, M., GRANTHAM, A., REDFIELD, M.M. & BURNETT, J.C. (2001). Regulation of cardiac adrenomedullin in heart failure. *Peptides*, **22**, 1841–1850.

KAPAS, S., CATT, K.J. & CLARK, A.J. (1995). Cloning and expression of cDNA encoding a rat adrenomedullin receptor. *J. Biol. Chem.*, **270**, 25344–25347.

KAPAS, S. & CLARK, A.J. (1995). Identification of an orphan recepor gene as calcitonin gene-retated peptide receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **217**, 832–838.

KENNEDY, S.P., SUN, D., OLEYNEK, J.J., HOTH, C.F., KONG, J. & HILL, R.J. (1998). Expression of the rat adrenomedullin receptor or a putative human adrenomedullin receptor does not correlate with adrenomedullin binding or functional response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244**, 832–837.

KIKUYA, M., HOZAWA, A., OHOKUBO, T., TSUJI, I., MICHIMITA, M., MATSABURA, M., OTA, M., NAGAI, K., ARAKI, T., SATOH, H., ITO, S., HISAMICHI, S. & IMAI, Y. (2000). Prognosis significance of blood pressure and heart rate variabilities: the Ohasama study. *Hypertension*, **36**, 901–906.

KITAMURA, K., KANGAWA, K., KAWAMOTO, M., ICHIKI, Y., NAKAMURA, S., MATSUO, H. & ETO, T. (1993). Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **192**, 553–560.

LA ROVERE, M.T., BIGGER, J.T., MARCUS, F.I., MORTARA, A., SCHWARTZ, P.J. & for the ATRAMI (Autonomic tone and reflexes after myocardial infarction) investigators. (1998). Baroreflex sensitivity and heart rate varibility in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet*, **351**, 478–484.

LA ROVERE, M.T. & DE FERRARI, G.M. (1995). New potential uses for transdermal scopolamine (hyoscine). *Drugs*, **50**, 769–776.

LUODONPÄÄ, M., VUOLTEENAHO, O., ESKELINEN, S. & RUSKOAHO, H. (2001). Effects of adrenomedullin on hypertrophic responses induced by angiotensin II, endothelin-1 and phenylephrine. *Peptides*, **22**, 1859–1866.

MANSIER, P., CHEVALIER, B., BARNETT, D.B. & SWYNGHEDAUW, B. (1993). Beta-adrenergic and muscarinic receptors in compensatory cardiac hypertrophy of the adult rat. *Pfuggers Arch.*, **424**, 354–360.

PELAT, M., VERWAERDE, P., MERIAL, C., GALITSKY, J., BERLAN, M., MONTASTRUC, J.L. & SENARD, J.M. (1999). Impaired atrial M_2-cholinoceptor function in obesity-related hypertension. *Hypertension*, **34**, 1066–1072.

PIO, R., MARTINEZ, A., UNSWORTH, E.J., KOWALAK, J.A., BENGOECHEA, J.A., ZIPFEL, P.F., ELSASSER, T.H. & CUTTITTA, F. (2001). Complement factor H is a serum-binding protein for adrenomedullin, and the resulting complex modulates the bioactivities of both partners. *J. Biol. Chem.*, **276**, 12292–12300.

POUSSET, F., MASSON, F., CHAVIROSKAIA, O., ISNARD, R, CARAYON, A., GOLMARD, J.L., LECHAT, P., THOMAS, D. & KOMAJDA, M. (2000). Plasma adrenomedullin, a new independent predictor of prognosis in patients with chronic heart failure. *Eur. Heart J.*, **21**, 1009–1014.

POYNER, D.R., SEXTON, P.M., MARSHALL, I., SMITH, D.M., QUIRION, R., BORN, W., MUFF, R., FISCHER, J.A. & FOORD, S.M. (2002). International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol. Rev.*, **54**, 233–246.

SCHWARZFELD, S. & JACOBSON, S. (1981). Isolation and development in cell culture of myocardial cells of the adult rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **13**, 563–575.

SEVRE, K., LEFRANDT, J.D., NORDBY, G., OS, I., MULDER, M., GANS, R.O.B., ROSTRUP, M. & SMIT, A.J. (2001). Autonomic function in hypertensive and normotensive subjects. The importance of gender. *Hypertension*, **37**, 1351–1356.

SHINDO, T., KURIHARA, H., MAEMURA, K., KURIHARA, Y, KUWAKI, T., IZUMIDA, T., MINAMINO, N., JU, K.H., MORITA, H., OH-HASHI, Y., KUMADA, M., KANGAWA, K., NAGAI, R. & YAZAKI, Y. (2000). Hypotension and resistance to lipolysaccharide-induced shock in transgenic mice overexpressing adrenomedullin in their vasculature. *Circulation*, **101**, 2309–2316.

SHINDO, T., KURIHARA, Y., NISHIMATSU, H., MORIYAMA, N., KAKOKI, M., WANG, Y., IMAI, Y., EBIHARA, A., KUWAKI, T., JU, K.H., MINAMINO, N., KANGAWA, K., ISHIKAWA, T., FUKUDA, M., AKIMOTO, Y., KAWAKAMI, H., IMAI, T., MORITA, H., YAZAKI, Y., NAGAI, R., HIRATA, Y. & KURIHARA, H. (2001). Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation*, **104**, 1964–1971.

STENGEL, P.W., GOMEZA, J., WESS, J. & COHEN, M.L. (2000). M_2 and M_4 knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 877–885.

SKERJANC, I.S. (1999). Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cells. *Trends Cardiovasc. Med.*, **9**, 139–143.

TSURUDA, T., KATO, J., KITAMURA, K., KUWASAKO, K., IMAMURA, T., KOIYAWA, Y., TSUJI, T, KANGAWA, K. & ETO, T. (1998). Adrenomedullin: a possible autocrine or paracrine inhibitor of hypertrophy of cardiomyocytes. *Hypertension*, **31**, 505–510.

WHALEY, K. & RUDDY, S. (1976). Modulation of the alternative complement pathways by beta 1H globulin. *J. Exp. Med.*, **144**, 1147–1163.

WOBUS, A.M., KLEPPISCH, T., MALTSEV, V. & HESCHELER, J. (1994). Cardiomyocyte-like cells differentiated *in vitro* from embryonic cells P19 are characterized by functional expression of adrenoceptors and Ca^{2+} channels. *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **30**, 425–434.

ZHANG, J.J., YOSHIDA, H., CHAO, L. & CHAO, J. (2000). Human adrenomedullin gene delivery protects against cardiac hypertrophy, fibrosis and renal damage in hypertensive Dahl salt-sensivitve rats Hum. *Gen. Ther.*, **11**, 1817–1827.

ZIPFEL, P.F. (2001). Complement factor H: physiology and pathophysiology. *Semin. Thromb. Hemost.*, **27**, 191–199.

(Received October 25, 2002
Revised March 25, 2003
Accepted April 30, 2003)

II. APPROCHE GENOMIQUE

II. 1. Profil de l'expression génique de l'oreillette droite chez le chien obèse hypertendu

Le cœur de l'obèse est soumis à de nombreuses contraintes imposées par le développement excessif du tissu adipeux (TA). D'une part, le TA sécrète de nombreuses hormones et peptides qui agissent de manière délétère sur le cœur et le système nerveux autonome cardiaque (angiotensine II, TGF β, TNF α, prostaglandines et prostacyclines, PAI-1, IL-6, IL- 4…). D'autre part, le développement excessif du TA augmente la volémie ce qui contraint le cœur à subir une augmentation de charge. Ces modifications ont un impact sur la structure cardiaque (HVG de type excentrique), sur la fonction (tachycardie, augmentation du débit, dysfonction systoliques et diastoliques) et l'expression des récepteurs végétatifs. Sous ces modifications phénotypiques, il y a des modifications des niveaux d'expression des gènes en réponse aux changements environnementaux (gain de poids, augmentation de la volémie, augmentation de la pression artérielle, rôle des nutriments dépendants du type d'alimentation,…). Les signaux que reçoit le cœur sont très nombreux et souvent encore insoupçonnés. Pour cela nous avons privilégié le modèle du chien obèse car la constitution de la sphère cardiovasculaire du chien s'avère très proche de celle de l'Homme et car c'est le modèle qui se rapproche le plus de l'obésité abdominale telle qu'elle est observée chez l'Homme. Afin d'évaluer ces modifications dans leur globalité, nous avons étudié les modifications des taux d'ARNm dans l'OD de chiens obèses.

L'ensemble de ces modifications peut être maintenant apprécié par les techniques de génomique fonctionnelle. Ces techniques permettent l 'analyse globale des taux d'ARNm des gènes exprimés dans un tissu donné. Cette nouvelle approche a montré son efficacité dans l'étude de situations pathologiques telles que les cancers [390,391] ou les maladies infectieuses

[392]. Dans l'étude des maladies cardiovasculaires cet outil s'est révélé performant dans l'étude du phénotype moléculaire de l'infarctus du myocarde (chez le rat) et a permis d'identifier les modifications transcriptionnelles caractérisant l'HVG dans un modèle de souris [349,353].

Parmi les méthodes disponibles, et en absence d'outils moléculaires de ce type chez le chien, nous avons choisi l'approche des banques soustraites d'ADNc. Cette technique permet de créer des banques d'ADNc enrichies en ADNc représentatifs des gènes surexprimés ou sous-exprimés dans le tissu étudié et dans un contexte physiopathologique précis. L'une des applications les plus célèbres de la soustraction d'ADNc a été le clonage de la Dystrophine responsable de la myopathie de Duchenne (Kunkel LM Latt SA PNAS). Les plus récentes évolutions de cette technique sont l'analyse par différence de représentation (*RDA*), l'Hybridation Soustractive et Suppressive (*SSH*) et les *Mirror Orientation Selection* (*MOS*) [362,393,394]. La combinaison de la *SSH* et l'agencement des clones ADNc en banques ordonnées (*microarrays*) permet la quantification des variations d'expression des gènes. L'utilisation de ces techniques a déjà fait preuve son efficacité dans la compréhension de mécanismes physiopathologiques de l'inflammation , des néphropathies diabétiques et dans le cancer du sein [395-397]. Dans le domaine de l'obésité, la *SSH* a récemment permis d'identifier la résistine, une nouvelle hormone sécrétée par l'adipocyte et expliquant en partie l'insulinorésistance musculaire de l'obèse [398].

Le travail de la publication *Hypertension 2003* a pour but d'étudier les modifications précoces des taux d'ARNm au niveau de l'oreillette droite bien avant l'installation de l'HVG dans un modèle de chien rendu obèse hypertendu par 9 semaines de régime hyperlipidique et hypercalorique. Cette étude permet d'approcher l'influence complexe du tissu adipeux sur le tissu myocardique à un stade très récemment stabilisé au niveau du poids et de la pression artérielle. A ce stade, les chiens sont toujours sous alimentation hyperlipidique mais leur poids et leur pression artérielle n'augmentent plus depuis environ 1 semaine. Ce travail de

recherche de gènes candidats a permis de sélectionner des gènes connus mais dont le rôle au niveau cardiaque n'avait jamais été décrit ainsi que des gènes nouveaux. De manière générale, les gènes connus identifiés préfigurent très précocement le phénotype cardiaque observable vers la 20ième semaine. Ce travail tend à montrer que les régulations géniques sont très précoces et que les mécanismes qui se mettent en place sont, en partie, destinés à compenser l'augmentation de charge. En ce qui concerne les gènes nouveaux, une 12^{aine} de gènes dont la fonction est encore inconnue ont pu être impliqués dans cette pathologie par leurs variations d'expression. 2 de ces gènes (PPR1 & PPR2) ont plus particulièrement attiré notre attention après l'analyse bioinformatique de leur séquence traduite en protéine. PPR1 possède une région peptide signal et une région Apo B, ce qui la place potentiellement dans le cycle des apolipoprotéines de type HDL (*High Density Lipoprotein*). PPR2 possède un domaine de liaison à l'ADN de type homéoprotéine et un domaine de localisation nucléaire (NLS), ce qui la place potentiellement dans la classe des facteurs de transcription à homéodomaine (généralement impliqués dans les processus développementaux comme Nkx 2.5).

Ces travaux donnent des pistes nouvelles. Il est cependant difficile de déterminer quelle est la part de l'obésité ou de l'hypertension artérielle qui est à l'origine de ces modifications. Il est aussi possible que le choix du régime (hyperlipidique) ait une influence au travers d'un certain type d'acides gras ou de divers nutriments. Enfin, en comparant le profil transcriptionnel du VG, nous avons pu remarquer que ces variations sont souvent spécifiques de l'OD à ce stade d'engraissement des chiens. Nous avons envisagé que les modifications de l'expression génique propres à l'OD soient liées au caractère « senseur » de l'oreillette aux variations de volumes. Il est aussi difficile de déterminer si ces variations sont les conséquences des modifications hémodynamiques et des taux de cytokines plasmatiques ou si elles sont à l'origine des changements cardiaques observés plus tard dans ce modèle.

CARDIAC TRANSRIPTOME ANALYSIS IN OBESITY-RELATED HYPERTENSION

PHILIP-COUDERC P, SMIH F, PELAT M, VIDAL C, VERWAERDE P,

PATHAK A, BUYS S, GALINIER M, SENARD JM, ROUET P

Hypertension 2003, 41 (3) : 414-421

Cardiac Transcriptome Analysis in Obesity-Related Hypertension

Pierre Philip-Couderc, Fatima Smih, Michel Pelat, Cyril Vidal, Patrick Verwaerde, Atul Pathak, Sophie Buys, Michel Galinier, Jean-Michel Senard, Philippe Rouet

Abstract—Obesity is associated with volumetric arterial hypertension and with early increase in heart rate and decreased heart rate variability. The consequences of obesity-related hypertension on heart gene regulation are poorly known and were investigated in a model of obesity-related hypertension induced by high fat diet in dogs. When compared with control animals (n=6), a 9-week high fat diet (n=6) provoked significant weight gain and increased blood pressure load and heart rate but failed to significantly change left ventricular mass assessed by echocardiography. Subtractive hybridization of dog heart cDNA libraries were used to generate sublibraries containing differentially expressed cDNAs that were in turn spotted onto membranes to create custom microarrays. Hybridizations of these microarrays with complex probes representing mRNAs expressed in right atria and left ventricles from obese hypertensive and control dogs were performed. Thirty-eight differentially expressed genes were identified; altered expression was confirmed by Northern blot analysis in 15. In addition, real-time quantitative polymerase chain reaction confirmed differential expression for 80% of the randomly chosen tested genes. Once identified, transcripts were categorized into groups involved in metabolism, cell signaling, ionic regulation, cell proliferation, protein synthesis, and tissue remodeling. In addition, we found a set of 11 cDNAs encoding proteins with unknown functions. This study clearly shows that obesity-related hypertension, lasting for only 9 weeks, causes marked changes in gene expression in right atrium as well as the left ventricle that may contribute to early functional changes in heart function and to long-term structural changes such as left ventricular hypertrophy and remodeling. (***Hypertension*. 2003;41:414-421.**)

Key Words: obesity ■ hypertension, arterial ■ heart rate ■ heart ■ dogs

Obesity is the most prevalent nutritional disorder in developed countries[1] and plays an important role in cardiovascular morbidity through multiple mechanisms,[2] including well-known risk factors such as hypertension,[3] diabetes,[4,5] and dyslipidemia.[6–8] Moreover, as suggested for leptine and arterial hypertension,[9] a direct interaction of adipose tissue, through its multiple secretions, with the cardiovascular system could also be involved in the pathophysiology of cardiovascular disorders associated with obesity. Previous studies have shown that overweight is associated with increased cardiac output[10] and resting heart rate and with decreased heart rate variability,[11] which is considered to be a prognostic indicator of cardiovascular mortality in humans.[12,13] Obesity is also associated with structural changes in the heart, including eccentric and concentric hypertrophy,[14] thus explaining the increased risk of cardiac failure.[15] However, the molecular mechanisms underlying these changes in cardiac function and structure are poorly understood. We and others have developed a dietary model of obesity-related hypertension that closely mimics the cardiovascular, hormonal, and metabolic abnormalities found in human obesity.[11,16,17] This model is produced by feeding dogs ad libitum a hypercaloric, high fat diet (HFD) that induces abdominal obesity, hyperinsulinemia and insulin resistance, and arterial hypertension within a few weeks. Left ventricular hypertrophy (LVH) also develops but only after 20 weeks of HFD.[11,18] In this model, parasympathetic drive to the heart is blunted and atrial but not ventricular M_2-muscarinic receptors are downregulated shortly after starting HFD .[19] In addition, we found an upregulation of endothelial nitric oxide synthase specifically in the atrium (Pelat et al, unpublished results). These observations suggest that HFD induces a set of molecular alterations that could be distinct and earlier in the atrium than in ventricle.

Currently, very little is known about early cardiac molecular mechanisms induced by obesity-related hypertension, especially shortly after weight gain acquisition and before major structural changes in the heart have occurred. Therefore, we investigated, at the transcriptome level, the early changes in cardiac gene expression in the dog model of obesity-related hypertension before observable LVH. We prepared dog heart cDNA libraries and used subtractive hybridization to generate sublibraries and microarrays containing differentially expressed cDNAs[20–22] and compared the patterns of regulation in the right atrium and the left ventricle.

Received September 25, 2002; first decision October 16, 2002; revision accepted January 10, 2003.

From INSERM U586, Faculté de Médecine, Laboratoire de Pharmacologie Médicale et Clinique, Toulouse Cedex, France.

Correspondence to Philippe Rouet, INSERM U586, Faculté de Médecine, Laboratoire de Pharmacologie Médicale et Clinique, 37 Allées Jules Guesde. 31073 Toulouse Cedex. France. E-mail Philippe.rouet@toulouse.inserm.fr

© 2003 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at http://www.hypertensionaha.org DOI: 10.1161/01.HYP.0000057573.32425.95

Methods

Animals and General Procedures

Twelve adult Beagle-Harrier dogs (Harlan SA, France), 22±3 months of age, were included in the study. An implantable telemetry measurement system (Data Science International) allowing long-term recording of blood pressure (BP) and heart rate (HR) was surgically installed in the femoral artery under general anesthesia (1 mg/kg acepromazine plus 10 mg/kg tiletamine-zolazepam) at least 15 days before the beginning of the experiment. After recovery, animals were randomized into 2 groups. A resting period of 4 weeks was given before the initiation of HFD to determine the normal canine diet intake (Royal Canin M25, Royal Canin) required to maintain constant body weight. The control group was fed a normal canine diet. The HFD group was fed ad libitum a hypercaloric hyperlipidic diet (normal canine diet mixed with uncooked beef fat). Body weight, BP, and HR were measured twice per week during the whole study.

After 9 weeks of HFD, cardiac echocardiography was performed as previously described[11] to detect LVH or cardiac failure. Telesystolic and telediastolic diameters and wall thickness of left ventricle were measured from time-movement recordings by Devereux's method.[23] Telesystolic and telediastolic volumes (cm^3) of the left ventricle were calculated according to Cube's method. Left ventricular mass (g) was evaluated by Devereux's formula.[23] Septum and posterior wall thickness ratio were calculated as an index of ventricular asymmetry. Left ventricular function was evaluated by means of left ventricular ejection fraction (%), defined as the ratio between the difference of telediastolic and telesystolic volumes and telediastolic volume.

At the end of the experiment, animals were anesthetized, and surgery was quickly performed. Right atrium and left ventricle tissue samples were frozen in liquid nitrogen and maintained at −80°C until RNA preparation.

All animal procedures were performed according to the guidelines of the French Ministry of Agriculture.

Blood Pressure and Heart Rate Measurement

A receiver unit (RL 200) was used to monitor and amplify signal from each implantable transmitter and to convert it into a series of digital pulses to be decoded and evaluated by computer.[24] Systolic and diastolic BP and HR were obtained from the femoral artery pressure waveform. BP and HR signal were digitalized at 500 Hz. Systolic and diastolic BP were computed for each cycle and extracted at 2 Hz, then stored in a compatible IBM-PC for analysis. BP and HR measurements were performed between 9 and 10 AM on quiet, unrestrained animals in their individual cages.

RNA Extraction and Generation of Differentially Expressed cDNA

RNA was extracted by disrupting tissues in Trizol reagent (Invitrogen) and prepared according to recommended procedures (Clontech). We used 500 ng of total RNA to produce cDNA that was polymerase chain reaction (PCR)-amplified with a SMART PCR cDNA synthesis kit (Clontech). Amplification linearity was checked by fluorescent monitoring of the PCR products using PicoGreen (Molecular Probes) and a plate fluorometer (Fluoroscan, Labsystems). To generate enriched cDNA libraries for differentially expressed genes, the PCR-select cDNA subtraction kit reagents and protocol (Clontech) were used. Two separate subtractions, obese-control to enrich for genes upregulated in obese, and the reciprocal control-obese to enrich for genes upregulated in control (ie, downregulated in obese), were performed as follows: In a first subtraction, cDNAs from obese dogs were used as "tester" and control cDNA as "driver" to generate a library containing upregulated genes in the obese phenotype. In the reciprocal reaction, we used cDNA from obese dogs as "driver" for subtraction, enriched the resulting library in downregulated genes. Subtraction reaction efficiency was checked by agarose gel electrophoresis. Subtracted products were ligated to pGEM-T vector DNA (Promega) and electroporated in DH5-α Electromax-competent cells (Invitrogen). This established a library of potentially upregulated and downregulated cDNAs. The complexity of these libraries was determined to be ≈1000, so ≈1200 cDNA of each library were PCR-amplified from bacterial clones and spotted in duplicates onto nylon membranes at Toulouse Genomic Core Facilities with a BioRobotics apparatus.

DNA Array Hybridization and Expression Analysis

Labeling with α-[^{32}P]-dATP (NEN) of unsubtracted cDNA from obese hypertensive or control dogs, hybridization to the membranes, and washes were performed as described in the PCR-select differential screening kit manual (Clontech). Membranes were exposed for ≈1 to 3 hours in a cassette and revealed with a Storm 860 PhosphorImager (Molecular Dynamics). Signal intensity was analyzed with X-dot reader software (COSE) and normalized to the mean intensity from all the measured values. Since cDNA subtraction generally enriches up to ≈9% of differential expressed cDNA in the library,[25] and that subtraction was done to enrich in upregulated and reciprocally to enrich in downregulated sequences, differentially expressed cDNA will not affect dramatically the overall signal of a membrane. Considering the large number of clones screened and that the percentage of differentially expressed genes was expected to be <10%, global normalization has been considered as appropriate[26,27] and preferred to normalization with housekeeping genes, which is sometimes used successfully with lower numbers of clones.[28] In addition, because housekeeping gene expression can also vary significantly,[29] the use of housekeeping genes to normalize expression data could have led to erroneous conclusions.[30] Results are shown as ratio of obese/control of the mean from 10 normalized measurements. Expression was considered as induced (ratio>1.2; ↑) and repressed (ratio<0.8; ↓).

DNA Sequencing and Sequence Analysis

PCR products (200 to 1500 bp) were directly sequenced according to the Applied Biosystems AmpliTaq FS dye terminator kit and loaded on an ABI 373 automated sequencer that provided an average of ≈400 bases of good quality sequence. Sequence homologies were searched with an on-line BLAST server (NCBI) set with default parameters. Gene identity was given if BLAST probability values were $<10^{-30}$. The probability value is the smallest sum probability that by chance one would observe a matched score as high as the observed high score when searching the database with a random sequence of the same size as the query sequence. This value allowed identification sequences of at least 83% homology to known human or rodent sequences.

Verification of mRNA Levels by Northern Blot Analysis

Twenty micrograms of total RNA was loaded per lane, and Northern blot analysis was performed with the use of standard procedures. PCR products from differentially expressed genes were used as probes and labeled with α-[^{32}P]-dATP according to the NEB blot kit manual (New England Biolabs). Quickhyb solution (Stratagene) was used for overnight hybridization, and washes were done as recommended. Membranes were exposed 6 to 24 hours in a PhosphorImager cassette, and exposure was analyzed in a SI445 PhosphorImager (Molecular Dynamics). Band intensity was determined with the use of ImageQuant software (Molecular Dynamics).

Real-Time Quantitative PCR

Primers were designed with the use of Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems). Oligos sequences were as follows: Cytochrome oxidase subunit 1: AGGAATAGATGTAGACACACGAGCAT and CTCCCGTTGGAATAGCGATAAT; Matrix metalloproteinase-9: CCCTTGAACACGCATGACAT and AAGCGGTCCTGGCAGAAGTA: Lectomedin-3: ATTGCCAGCGGCGAATAC and GGGCGGTCTCGTTATGGTTA; NRF2: GCAGGGTGATTTTCTTCCTTATGA and CTGTGGACCGTGTGTTGACAA; β-actin: GACCCAGATCATGTTCGAGACTT and AGCCTGGATGGCCACGTA; ANP: TGGAC-

TABLE 1. Cardiovascular Parameters and Body Weight

	Control Group (n=6)		HFD Group (n=6)	
Monitored Parameters	Before Diet	After 9 Weeks Regular Diet	Before Diet	After 9 Weeks HFD
Systolic blood pressure, mm Hg	143±4	148±4	145±4	161±5*
Mean blood pressure, mm Hg	100±4	102±5	101±3	115±5*
Diastolic blood pressure, mm Hg	79±5	80±5	79±2	92±3*
Heart rate, bpm	78±6	82±4	81±3	96±4*
Left ventricular mass, g	ND	ND	67.3±3	71.0±7
Body weight, kg	11.5±0.5	12.0±0.5	12.0±0.7	14.9±0.5*

Data are mean±SEM. HFD indicates high fat diet.
*$P<0.05$.

CATTTGGAAGAAAAGATG and CGGCTCACTGAGCACTTGTG; tensin: GGTATCTGCCGTCAGGTCATC and CAGCTTGGCCTGGCATTT; VDAC 2: ATTTGGTTTTGGGTTGGTGAAA and TTAGATGAACCGGACGTTGAAA; ALS 2: TTCCACAAAAACAAAGGGTGAA and TCTACACTCTATTGACCTCAGCACAA; NADH dehydrogenase: GTGAAGTCCCCTCCCAATACC and GCGAGGCTTGATATTGCTAGTATG; hsp70: TGGCACACTGGACCCTGTAG and CCCACCAAGACAATATCATGGA; SERCA2: TCGAACCTTCCCACAAGTCAA and TCACACCATCCCCAGTCATG; 18 S: CGCCGCTAGAGGTTGAAATTC and TCCGACTTTCGTTCTTGATTAATG.

One microgram of DNAse I–treated (DNAfree, Ambion) total RNA was retrotranscribed in the presence of random primers and Thermoscript enzyme (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Real-time PCR reactions were carried out with Sybergreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a GenAmp 5700 apparatus (Applied Biosystems). The standard curve method was used for relative quantification of the PCR products, and gene expression was normalized to 18 S RNA quantification.

Statistical Analysis

All results are depicted as mean±SEM. Multiple comparisons (Table 1) were analyzed by ANOVA, followed, when appropriate, by the Dunnett post hoc test with Statview 4.5 software (Abacus Concepts). Single comparisons (Table 2 and echocardiographic parameters on Table 1) were performed by means of unpaired Student *t* test, with a value of $P\leq0.05$ considered significant. Preliminary microarray experiments independent from the present study but using the same methods allowed us to calculate that 8 hybridizations were necessary to reach enough statistical power to detect a significant variation of expression of at least 20% with a risk of error of 5%. Therefore, we performed 10 experimental hybridizations on our custom microarrays to ensure sufficient statistical power.

Results

Body Weight, Blood Pressure, and Heart Rate

Body weight, BP, and HR were similar in the 2 groups before starting the diet. After 9 weeks of HFD, significant increases in BP, HR, and body weight were observed in the HFD group compared with the control group (Table 1). Echocardiography indicated absence of difference in wall thickness, ejection fraction (data not shown), and in left ventricular mass (Table 1) between the 2 groups at the end of the experiment.

Identification of Differentially Expressed Genes in Atrium

RNA from 6 atrial tissue samples from each group were pooled to provide average complex probes to screen our subtracted libraries. According to our statistical analysis and criteria, we found ≈200 genes that were differentially regulated with at least 20% of variation in expression in atria from obese dogs compared with control animals. BLAST homology searches of sequenced clones identified 32 single known genes with identifiable function and 13 new genes that were potentially altered in atria of obese compared with lean dogs (Table 2). A Student *t* test with microarray data revealed statistically relevant significance for differential expression of 29 known genes and 11 new genes. Four of these 40 genes (β-actin, Myoferlin, β-hemoglobin, and Tensin) were found to be not differentially expressed in Northern blot experiments. Lectomedin-3 and VDAC2, which were not found to be statistically differentially expressed by microarray analysis, were found to be differentially expressed by Northern blot analysis. Therefore a total of 38 genes can be considered as differentially expressed in atria.

To assemble a molecular physiological view of the adaptation processes, we organized genes into groups representing cellular functions (Table 2). These functions included extracellular matrix remodeling processes, cytoskeletal structure, nuclear and sarcolemma structure, energy metabolism, ionic flux, cell proliferation, stress response, signal transduction, hormones, and proteins associated with translation. We also found 11 new genes of unknown function that will require further investigation.

Northern analysis confirmed differential expression for 15 genes of 20 tested, and loading was controlled for by means of 18 S rRNA hybridization. A difference of expression of at least 20% was detectable in the 15 genes from atria of dogs subjected to HFD (Table 2). Two genes, sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2) and β-hemoglobin, which were found to be downregulated in the microarrays, were found to be upregulated by Northern blot analysis in 2 separate trials (Table 2 and data not shown).

Quantitative PCR performed on cDNA obtained from each animal confirmed expression of 12 genes of 15 randomly chosen in the known gene list (Table 2). Expression of 3 genes (Tensin, ALS 2, and NRF2) displayed high variability, and differential expression was not statistically relevant. Interestingly, real-time PCR confirmed downregulation of SERCA-2.

TABLE 2. Identity of Differentially Expressed Genes and Induction Ratio

		Atria				Ventricle		
Genes	Accession No.	MA Mean±ESM	NB		qPCR Mean±ESM	MA Mean±ESM	NB	
Remodeling								
Matrix metalloproteinase-9 mRNA	AF169244	2.60±0.01*	1.96	↑	5.22 ± 0.64*	1.28±0.04*		↑
N-Acetyl Galactosamin Transferase	AL078646	0.77±0.05*	0.11	↓		1.10±0.05		→
Lectomedin-3	AF307080	1.24±0.03	1.43	↑	4.49 ± 2.25*	1.01±0.05		→
Structure								
β-Actin	BC002409	0.63±0.02*	0.88	↓	0.58 ± 0.24*	1.12±0.14		→
γ Nonmuscle actin	X60733	0.73±0.04*		↓		0.61±0.05		↓
Myoferlin	XM011919	1.43±0.05*	1.10	↑		0.64±0.04*		↓
Tensin	AF225896	0.79±0.03*	0.0.86	↓	0.31 ± 0.18	1.31±0.15		↑
Metabolism								
Cytochrome C Oxydase subunit I	AF028189	1.54±0.05*	2.75	↑	6.06 ± 2.31*	1.79±0.02*		↑
Cytochrome C Oxydase subunit VII	HSCOX7BM	1.49±0.04*		↑		1.56±0.04*		↑
NADH Dehydrogenase	U41443	1.25±0.05*	2.75	↑	3.15 ± 1.17*	1.12±0.04		→
ATP Synthase F0 subunit	NC002008	1.51±0.05*	1.90	↑		1.89±0.005*		↑
VDAC 2	AF268462	1.20±0.03	4.46	↑	5.57 ± 1.71*	1.05±0.01		→
Ionic current								
Phospholamban	Y00399	1.36±0.05*	2.79	↑		0.93±0.01	1.05	→
SERCA-2	U94345	0.75±0.02*	2.49	↓	0.58 ± 0.13*	0.95±0.15	1.05	→
Na/K ATPase isoform 3	AF286374	0.71±0.05*	0.44	↓		1.03±0.05	1.01	→
Proliferation								
Nucleophosmin	BC003670	1.47±0.04*	1.99	↑	3.04 ± 1.06*	1.02±0.05	1.09	→
MAPK6	L77964	1.45±0.05*	4.60	↑	3.47 ± 1.43*	0.87±0.07	1.16	→
Transcription-translation								
Ribosomal RNA 12S	AY012152	1.71±0.04*		↑		0.92±0.08		→
Ribosomal RNA 16S	AY011186	1.60±0.05*		↑		1.04±0.08		→
L-41 ribosomal protein	U22229	1.42±0.05*		↑		1.09±0.08		→
NRF2	AF323119	1.40±0.04*		↑	9.57 ± 4.49	1.04±0.05		→
Elongation factor-1 γ	XM_7259	1.51±0.03*		↑		0.97±0.07		→
Miscellaneous								
ALS 2	NM015049	0.68±0.02*	0.80	↓	0.23 ± 0.16	0.81±0.04		↓
ANP	BF514976	2.60±0.02*		↑	7.16 ± 3.07*	1.12±0.05		→
β Hemoglobin	XM_006558	0.69±0.02*	1.22	↓		1.20±0.09		↑
Casein kinase 2 α 1	X60733	0.73±0.04*		↓		0.61±0.05*		↓
Coatomer protein subunit β	XM_006211	0.78±0.05*		↓		0.71±0.04*		↓
HSP 70	U73744	1.45±0.04*	2.36	↑	3.22 ± 0.62*	0.97±0.04		→
PIG F	AC018682	0.74±0.05		↓		0.91±0.10		→
Proteasome regulatory ATPase	AF227504	1.52±0.05*		↑		1.92±0.08*		↑
TRABID protein	AJ252060	0.80±0.03*		↓		1.02±0.05		→
TRIP-1	U36764	0.48±0.02*	0.08	↓	0.45 ± 0.20*	1.05±0.10	1.06	→
New genes								
Homo sapiens brain my 025 mRNA	AF061264	1.45±0.05*	1.62	↑		1.62±0.06*		↑
Homo sapiens α gene sequence	AF203815	2.65±0.04*		↑		1.19±0.05		→
Homo sapiens chromosome 7 clone RP11–305M3	AC009244	1.86±0.02*		↑		0.75±0.15*		↓
Homo sapiens hypothetical protein mRNA FLJ13188	XM_011941	0.75±0.04*		↓		0.50±0.15*		↓
Homo sapiens cDNA FLJ0448	AK000455	0.79±0.05*		↓		0.96±0.16		→
Human DNA sequence from clone RP11–106H11 on chromosome 13	AL157758	1.38±0.05*		↑		1.29±0.08*		↑
Human DNA sequence from clone RP11–417F21	AC018682	0.80±0.04		↓		0.91±0.10		→
Homo sapiens host cell factor homolog	BC002335	1.21± 0.05*		↑		0.57±0.03*		↓
Homo sapiens similar to nonfunctional folate	XM_013033	0.77±0.05*		↓		1.31±0.15		↑
1E2 No sequence homology		1.28±0.05		↑		0.87±0.29		↓
3O10 No sequence homology		1.61±0.10*		↓		1.20±0.29		↑
3O7 No sequence homology		1.41±0.01*		↑		1.07±0.05		→
3O22 No sequence homology		1.61±0.03*		↑		0.61±0.03*		↓

MA indicates microarrays; NB, Northern blot; and qPCR, quantitative real-time PCR.

Identification of Differentially Expressed Genes in Ventricle

Differentially expressed genes identified in the atrium were also tested in left ventricle samples by the use of our cDNA microarrays. This experiment revealed differential expression for 14 genes of 38. Of the 24 genes that showed no differential expression in ventricles of obese compared with lean dogs, 6 genes were randomly selected for Northern blot analysis. Results obtained with microarrays were confirmed by Northern blot for 6 of 6 genes (Table 2).

Discussion

Although obesity is recognized as a cause of major cardiovascular diseases such as heart failure,[15] the molecular mechanisms involved in left ventricular hypertrophy and remodeling are poorly understood. In the present study, we applied gene expression profiling as a technique to identify potential candidate genes that may play a role in the pathophysiology of changes in cardiac structure and function in an experimental model of obesity and arterial hypertension induced by a 9-week HFD regimen in dogs. We identified 38 genes that were differentially expressed in the atria of obese dogs compared with lean dogs, and 15 of these were confirmed by Northern blot analysis. Many of these differentially expressed genes are known to be involved in multiple cell functions, including extracellular matrix remodeling processes, cytoskeletal structure, nuclear and sarcolemma structure, energy metabolism, ionic flux, cell proliferation, stress response, signal transduction, hormones, and proteins associated with translation. Moreover, as further discussed below, we found in several instances that expression of genes that were differentially expressed in atria was not significantly modified in ventricles of obese dogs. This different pattern of regulation between right atrium and left ventricle could be explained by several factors. The first one is the precocity of the analysis. We deliberately chose a short period of exposure to HFD. This choice was made to get information in a rather stable condition, that is, at the end of the dynamic phase of weight gain and of endocrine and metabolic changes induced by fat diet[11] but before the occurrence of significant changes in left ventricular mass reflecting LVH, which needs longer exposure to HFD to develop.[18] The second factor explaining the differences in atrium and ventricle responses to obesity-related hypertension is the volumetric character of the arterial hypertension in this experimental model. As previously reported by our group, obesity-related hypertension induced by short-term HFD is associated with an increase in right auricular pressures without changes in peripheral arterial resistances.[11] Finally, the present findings indicating more prominent changes in atrium genes pattern of expression could be relevant to explain early changes in atrial function such as tachycardia and decreased HR variability[11] or modification in M_2-muscarinic receptors.[18]

Previous studies have provided considerable evidence that in dogs, HFD closely mimics cardiovascular and metabolic changes observed in obese humans.[31] Although this model has provided important information about some of the physiological events that underlie the mechanisms of arterial hypertension and of other cardiovascular adaptations to obesity, a molecular understanding of these processes has been limited by the lack of tools for functional genomic studies in dogs. To our knowledge, there have been no previous reports of cardiac gene expression profiling in obese dogs. This contrasts to the large amount of data available concerning gene regulation in other experimental models of ventricular overload or of cardiac failure in rodents. Therefore, we prepared our own dog cDNA arrays with a focus on differentially expressed genes using a subtractive-hybridization approach (SSH).[20] The use of cDNA microarrays to further screen such libraries has been shown to be efficient,[32] and these new tools will be of great importance in future studies. SSH cannot be considered as exhaustive but enriches rare, differentially expressed transcripts by $>$1000-fold.[20] One major advantage of the combined approach of SSH and cDNA microarrays is the identification of differentially expressed genes without the availability of already-cloned dog cDNA. The use of custom-made cDNA arrays allowed us to perform enough hybridizations to gain accuracy for monitoring gene expression and to assess variations as small as 20% in transcript level. This low threshold for detection of changes in gene expression, which required a high degree of repeatability in 10 microarray hybridizations, for each experiment, is important because many physiological variables change by 20% or less in the early phases of obesity and structural changes in the heart and blood vessels are modest.[33] Therefore, one might also expect modest changes in expression of many genes involved in the early stages of cardiovascular adaptation to an HFD, thus requiring sensitive and repeatable methods of detection. Using 10 microarray hybridizations that were highly repeatable for each experiment, we found 38 genes that were upregulated or downregulated in atria from dogs made obese and hypertensive by HFD. Confirmation was obtained in almost half of them with Northern analyses (15 successful confirmations out of 20 Northern blots) and with a high success rate by quantitative PCR (12 confirmations out of 15 randomly chosen genes), thus indicating, as previously reported, that microarrays can be reliable indicators of altered gene expression. In addition, quantitative PCR evaluated individual variability as low for expression of 80% of the tested genes and further confirmed differential expression for 2 genes (VDAC and Lectomedin-3) that were not statistically differentially expressed with microarray analysis. Despite this measure of reliability, microarrays can also generate some artifacts, as shown in our comparison of expression profiles between microarrays and Northern blots for SERCA2 and β-hemoglobin. Even taking into account limitations, our data globally show that in a dietary model of obesity produced by feeding dogs ad libitum an HFD, gene-regulated reprogramming occurs. The importance of these early mRNA level modifications for the pathophysiology of cardiovascular morbidity related to obesity-related hypertension remains to be elucidated. In the same way, the respective roles of increased fat mass and of hypertension in theses genic adaptations will need further studies, which could, for instance, investigate the pattern of gene expression in hearts from transgenic obese mice without arterial hypertension.

The qualitative aspects of our findings and their relevance for the pathophysiology of heart changes related to HFD deserves some comments in view of the differences observed between atrium and ventricle changes in pattern of gene expression. A first set of genes was found to exhibit similar regulation in both right atrium and left ventricle, suggesting that weight gain and arterial hypertension induced by HFD are associated with early and diffuse cardiac reprogramming. Among the genes that belong to this group, we found induction of MMP-9. Overexpression of MMP-9, a gelatinase B whose substrates include gelatin, collagen IV, V, and XIV, aggrecan, elastin, entactin, and vibronectin,[34] as previously reported in LVH in humans.[35] These genes could be involved in the pathophysiological mechanisms leading to the genesis and progression of heart failure. We also found upregulation, in both chambers, of mRNA levels encoding proteins of the mitochondria respiratory chain such as cytochrome C oxidase subunit I and VIIb, NADH dehydrogenase, and ATP synthase F0 subunit. These changes probably reflect increased energy and ATP consumption secondary to the increased venous return and cardiac preload as well as to arterial hypertension. Similar positive regulations of ATP synthesis have also been described in left ventricular mitochondria from spontaneously hypertensive rats.[36,37] These findings showing that even if more marked in atrium, gene expression pattern changes also concern left ventricle, contrasts with the absence of major ventricular macroscopic alterations and of increased left ventricular mass measured with echocardiography after 9 weeks of an HFD. However, one can speculate that we detected initial molecular changes in the extracellular matrix that will participate in tissue remodeling that is usually seen after 20 weeks of an HFD.[18]

A second group of genes was differentially regulated in the atria from obese dogs but not in ventricle. This feature could be explained by the specific function and structure of the atria, which acts as a volume sensor[38] that is prone to distension by volume overload, a key feature of obesity-related hypertension.[17] Interestingly, mRNA from genes involved in cardiac excitation-contraction coupling such as phospholamban (PLB) and SERCA-2 were found to be differentially regulated in the atria from obese dogs. This regulation may contribute to the marked increase in heart rate and may be a consequence of decreased baroreflex efficiency observed in obese dogs.[11] Thyroid hormones, which are also increased during caloric overfeeding,[39] have also been shown to increase PLB mRNA levels.[40] However, the relevance of these changes to explain changes in atrial gene expression in obesity-related hypertension remains to be elucidated. In obese dogs, we also observed a specific 9-fold reduction of *N*-acetyl galactosaminyl transferase mRNA levels in atrium by Northern blot analysis, whereas its expression was not significantly modified in left ventricle. This enzyme, which mediates acquisition of carbohydrate side-chains in *O*-glycosidic linkage to either threonine or serine, modifies the structure of polypeptide backbone and heavily *O*-glycosylated proteins involved in cell interactions such as mucin glycoproteins.[41] In addition, *O*-glycans function as ligands for receptors mediating tumor cell adhesion.[42] The levels of mRNA encoding lectomedin-3 were also found to be upregulated. This protein harbors a galactose binding domain and is a G-protein–coupled receptor that also regulates cell adhesion by means of an inside-out effector signaling pathway. Overexpression of this protein can promote adhesion to ligands present in the extracellular matrix or on opposing cells resulting in chemotaxis and extravasation.[43] Such proteins have recently been identified and may be triggered by cell-cell or cell-matrix interactions that implicate them in planar polarization during organogenesis.[43] The last gene from this group is atrial natriuretic peptide, whose induction has been considered an index for cardiac remodeling toward a fetal pattern.[44]

Reorganization of tissue structure is often concomitant with cell proliferation.[45] We observed the expression of a set of genes that have not yet been studied in heart. First of all, nucleophosmin (NPM), which is known to accumulate in nuclei of exponential growing HeLa cells[46] and is strongly upregulated during estrogen-induced cell proliferation in MCF-7 breast cancer cells,[47] was upregulated in atria of obese dogs. NPM has several potentially important roles in regulating cell function and signaling. Specifically, NPM is a chaperone for nuclear import of proteins.[48,49] This feature lends itself to chromatin dynamics[50] and plays an important role in the regulation of cellular mitogenesis. In this same group of genes, we found upregulation of mRNA levels for ERK-3, a mitogen-activated protein kinase present in the nucleus.[51] ERK3, also called p97, is activated by protein kinase C[52] and is responsive to different growth factors, implying a mechanism for specificity in cellular signaling[53] in response to activation of the p38 pathway.[54] As expected in a situation of tissue growth, we observed upregulation of RNA levels encoding ribosomal proteins and elongation factor-1γ, a protein involved in mRNA translation. Taken together, these changes in gene expression are in accordance with a situation of cell proliferation in response to extracellular stimuli associated with an HFD. These findings point toward several potential molecular pathways that may offer a better understanding of the mechanisms involved in atrial and ventricular adaptations to a long-term HFD.

We also found 11 cDNA sequences representative of mRNA coding for new proteins of unknown functions to be differentially expressed in atria and in ventricle after 9 weeks of an HFD. Analysis of the encoded proteins and their functions will be undertaken in future works.

Perspectives

Our work shows that HFD-induced obesity not only is associated with arterial hypertension and other important cardiovascular changes but also causes early profound and specific modifications of the cardiac transcriptome both at the atrium and at the ventricular level. However, because obesity is associated in our model with arterial hypertension, it is not possible to conclude that changes observed are specific to obesity-related hypertension. Further studies in experimental models of obesity without changes in blood pressure are therefore necessary.

Since we focused on modifications that occur early after the installation of obesity and hypertension, the observed changes constitute one basis for the study of the mechanisms

linking the increase in fat mass and myocardium. In fact, the search for the potential mechanisms that initiate alterations in cardiac gene expression secondary to HFD represents an important area for further studies that could be fruitful for a better understanding of the pathophysiology of obesity-related cardiovascular morbidity.

Acknowledgments

The authors thank Veronique Leberre, Cécile Tonon, and Serguei Sokol (Toulouse Genomic Core Facilities), Jean-José Maoret (INSERM IFR 31), and Nathalie Laplace (Service de Pharmacologie, Paul Sabatier University), respectively, for their excellent technical assistance in microarray spotting, data analysis, DNA sequencing, and laboratory logistics; and Peter J. Romanienko (National Institutes of Health, Bethesda, Md) and John. E. Hall (University of Mississippi Medical Center, Jackson) for critical reading of the manuscript.

References

1. Seidell JC, Flegal KM. Assessing obesity: classification and epidemiology. *Br Med Bull*. 1997;53:238–252.
2. Bray GA. Health hazards of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1996;25:907–919.
3. Kannel WB. Fifty years of Framingham Study contributions to understanding hypertension. *J Hum Hypertens*. 2000;14:83–90.
4. Hall JE, Brands MW, Hildebrandt DA, Mizelle HL. Obesity-associated hypertension: hyperinsulinemia and renal mechanisms. *Hypertension*. 1992;19(suppl I):I-45–I-55.
5. Laakso M, Lehto S. Epidemiology of risk factors for cardiovascular disease in diabetes and impaired glucose tolerance. *Atherosclerosis*. 1998; 137:S65–S73.
6. Pelkonen R, Nikkila EA, Koskinen S, Penttinen K, Sarna S. Association of serum lipids and obesity with cardiovascular mortality. *BMJ*. 1977;2: 1185–1187.
7. Ascaso JF, Sales J, Merchante A, Real J, Lorente R, Martinez-Valls J, Carmena R. Influence of obesity on plasma lipoproteins, glycaemia and insulinaemia in patients with familial combined hyperlipidaemia. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997;21:360–366.
8. Nicholas SB. Lipid disorders in obesity. *Curr Hypertens Rep*. 1999;1: 131–136.
9. Hall JE, Hildebrandt DA, Kuo J. Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system. *Annu Rev Nutr*. 2001;21:1–21.
10. Redon J. Hypertension in obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2001;11: 344–353.
11. Verwaerde P, Senard JM, Galinier M, Rouge P, Massabuau P, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M, Montastruc JL. Changes in short-term variability of blood pressure and heart rate during the development of obesity-associated hypertension in high-fat fed dogs. *J Hypertens*. 1999;17: 1135–1143.
12. Kikuya M, Hozawa A, Ohokubo T, Tsuji I, Michimata M, Matsubara M, Ota M, Nagai K, Araki T, Satoh H, Ito S, Hisamichi S, Imai Y. Prognostic significance of blood pressure and heart rate variabilities: the Ohasama study. *Hypertension*. 2000;36:901–906.
13. Carney RM, Blumenthal JA, Stein PK, Watkins L, Catellier D, Berkman LF, Czajkowski SM, O'Connor C, Stone PH, Freedland KE. Depression, heart rate variability, and acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001; 104:2024–2028.
14. Alpert MA, Hashimi MW. Obesity and the heart. *Am J Med Sci*. 1993; 306:117–123.
15. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med*. 2002;347:305–313.
16. Rocchini AP, Moorehead C, Wentz E, Deremer S. Obesity-induced hypertension in the dog. *Hypertension*. 1987;9(suppl III):III-64–III-68.
17. Hall JE, Brands MW, Dixon WN, Smith MJ Jr. Obesity-induced hypertension: renal function and systemic hemodynamics. *Hypertension*. 1993; 22:292–299.
18. Massabuau P, Verwaerde P, Galinier M, Fourcade J, Rouge P, Galitzky J, Senard JM, Berlan M, Bounhoure JP, Montastruc JL. Left ventricular repercussion of obesity-induced arterial hypertension in the dog. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1997;90:1033–1035.
19. Pelat M, Verwaerde P, Merial C, Galitzky J, Berlan M, Montastruc JL, Senard JM. Impaired atrial M(2)-cholinoceptor function in obesity-related hypertension. *Hypertension*. 1999;34:1066–1072.
20. Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:6025–6030.
21. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*. 1999;21:10–14.
22. Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics*. 1999;21:33–37.
23. Devereux RB, Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man: anatomic validation of the method. *Circulation*. 1977;55:613–618.
24. Gelzer AR, Ball HA. Validation of a telemetry system for measurement of blood pressure, electrocardiogram and locomotor activity in beagle dogs. *Clin Exp Hypertens*. 1997;19:1135–1160.
25. Rebrikov DV, Britanova OV, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Tarabykin VS, Lukyanov SA. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:E90.
26. Marton MJ, DeRisi JL, Bennett HA, Iyer VR, Meyer MR, Roberts CJ, Stoughton R, Burchard J, Slade D, Dai H, Bassett DE Jr, Hartwell LH, Brown PO, Friend SH. Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nat Med*. 1998;4: 1293–1301.
27. Sehl PD, Tai JT, Hillan KJ, Brown LA, Goddard A, Yang R, Jin H, Lowe DG. Application of cDNA microarrays in determining molecular phenotype in cardiac growth, development, and response to injury. *Circulation*. 2000;101:1990–1999.
28. Camerer E, Gjernes E, Wiiger M, Pringle S, Prydz H. Binding of factor VIIa to tissue factor on keratinocytes induces gene expression. *J Biol Chem*. 2000;275:6580–6585.
29. Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, Kern SG, Wang-Rodriguez J, Moskaluk CA, Frierson HF Jr, Hampton GM. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res*. 2001;61:5974–5978.
30. Yu Z, Ford BN, Glickman BW. Identification of genes responsive to BPDE treatment in HeLa cells using cDNA expression assays. *Environ Mol Mutagen*. 2000;36:201–205.
31. Brands MW, Hall JE, Van Vliet BN, Alonso-Galicia M, Herrera GA, Zappe D. Obesity and hypertension: roles of hyperinsulinemia, sympathetic nervous system and intrarenal mechanisms. *J Nutr*. 1995;125: 1725S-1731S.
32. Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:1517–1523.
33. Yang J, Moravec CS, Sussman MA, DiPaola NR, Fu D, Hawthorn L, Mitchell CA, Young JB, Francis GS, McCarthy PM, Bond M. Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation*. 2000;102:3046–3052.
34. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res*. 2001;89:201–210.
35. Hwang DM, Dempsey AA, Lee CY, Liew CC. Identification of differentially expressed genes in cardiac hypertrophy by analysis of expressed sequence tags. *Genomics*. 2000;66:1–14.
36. Seccia TM, Atlante A, Vulpis V, Marra E, Passarella S, Pirrelli A. Mitochondrial energy metabolism in the left ventricular tissue of spontaneously hypertensive rats: abnormalities in both adeninenucleotide and phosphate translocators and enzyme adenylate-kinase and creatine-phosphokinase activities. *Clin Exp Hypertens (New York)*. 1998;20: 345–358.
37. Atlante A, Seccia TM, Pierro P, Vulpis V, Marra E, Pirrelli A, Passarella S. ATP synthesis and export in heart left ventricle mitochondria from spontaneously hypertensive rat. *Int J Mol Med*. 1998;1:709–716.
38. Opie LH. *The Heart, Physiology From Cell to Regulation*. 3rd ed. Baltimore, Md: Lippincott Williams & Wilkins; 1998:377–378.
39. Roti E, Minelli R, Salvi M. Thyroid hormone metabolism in obesity. *Int J Obes Rel Metab Disord*. 2000;24(suppl 2):S113–S115.
40. Nagai R, Zarain-Herzberg A, Brandl CJ, Fujii J, Tada M, MacLennan DH, Alpert NR, Periasamy M. Regulation of myocardial Ca2+-ATPase

and phospholamban mRNA expression in response to pressure overload and thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U A*. 1989;86:2966–2970.
41. Tabak LA. In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:547–564.
42. Sawada T, Ho JJ, Chung YS, Sowa M, Kim YS. E-selectin binding by pancreatic tumor cells is inhibited by cancer sera. *Int J Cancer*. 1994;57: 901–907.
43. Hayflick JS. A family of heptahelical receptors with adhesion-like domains: a marriage between two super families. *J Recept Signal Transduct Res*. 2000;20:119–131.
44. Mercadier JJ, Lompre AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K. Altered sarcoplasmic reticulum Ca2(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest*. 1990;85:305–309.
45. Anversa P, Capasso JM, Olivetti G, Sonnenblick EH. Cellular basis of ventricular remodeling in hypertensive cardiomyopathy. *Am J Hypertens*. 1992;5:758–770.
46. Yung BY, Bor AM, Yang YH. Immunolocalization of phosphoprotein B23 in proliferating and non- proliferating HeLa cells. *Int J Cancer*. 1990;46:272–275.
47. Skaar TC, Prasad SC, Sharareh S, Lippman ME, Brunner N, Clarke R. Two-dimensional gel electrophoresis analyses identify nucleophosmin as an estrogen regulated protein associated with acquired estrogen- independence in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1998;67:391–402.
48. Dingwall C, Laskey RA. Nucleoplasmin: the archetypal molecular chaperone. *Semin Cell Biol*. 1990;1:11–17.
49. Szebeni A, Olson MO. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci*. 1999;8:905–912.
50. Laskey RA, Mills AD, Philpott A, Leno GH, Dilworth SM, Dingwall C. The role of nucleoplasmin in chromatin assembly and disassembly. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1993;339:263–269.
51. Cheng M, Zhen E, Robinson MJ, Ebert D, Goldsmith E, Cobb MH. Characterization of a protein kinase that phosphorylates serine 189 of the mitogen-activated protein kinase homolog ERK3. *J Biol Chem*. 1996; 271:12057–12062.
52. Sauma S, Friedman E. Increased expression of protein kinase C beta activates ERK3. *J Biol Chem*. 1996;271:11422–11426.
53. Janulis M, Trakul N, Greene G, Schaefer EM, Lee JD, Rosner MR. A novel mitogen-activated protein kinase is responsive to Raf and mediates growth factor specificity. *Mol Cell Biol*. 2001;21:2235–2247.
54. Zimmermann J, Lamerant N, Grossenbacher R, Furst P. Proteasome- and p38-dependent regulation of ERK3 expression. *J Biol Chem*. 2001;276: 10759–10766.

EARLY ATRIAL GENE REGULATIONS IN OBESITY-RELATED ARTERIAL HYPERTENSION

PHILIP-COUDERC P, SMIH F, PELAT M, VERWAERDE P, PATHAK A, BUYS S, MONTASTRUC JL, SENARD JM, ROUET P

Archives des maladies du coeur & des vaisseaux 2002, tome 95 n°7/8 : 695-699

Modifications précoces du transcriptome auriculaire dans l'hypertension artérielle associée à l'obésité chez le chien

P. Philip-Couderc, F. Smih, M. Pelat, P. Verwaerde, A. Pathak, S. Buys, J.-L. Montastruc, J.-M. Senard et P. Rouet*

Summary

Early Atrial Gene Regulations In Obesity-Related Arterial Hypertension

High fat diet (HFD) induces both arterial hypertension and tachycardia in dogs. Changes in heart rate occur early and are in part due to a decrease in the parasympathetic drive to the heart secondary to down-regulation of atrial muscarinic M2 receptors (*Pelat et al. Hypertension 1999; 340: 1066-72*). These data suggest that HFD is able to modify genic expression at atrial level. Thus, the aim of this work was to perform a systematic study of the genic expression profile in dogs made obese and hypertensive by 9 weeks of HFD.

Blood pressure and heart rate were measured by telemetry implanted 15 days before starting regimen in 6 HFD and in 6 control dogs. HFD was the normal canine diet administered to controls but mixed with 300g of beef fat. At the end of the experience, animals were sacrified and right atria were collected. Gene regulation was assessed in pooled tissue samples from both groups using suppressive substractive hybridization and microarray analysis. Genes with induction or repression rates of at least 20% when compared to controls were sequenced.

As previously reported HFD induced a significant increase in body weight, blood pressure and heart rate when compared to controls. The results of SSH experiments led to the identification of 32 genes which are differentially regulated in atria from HFD dogs. Most are genes encoding proteins which have been previously shown to be regulated during various cardiopathies (MMP9, Na/K-ATPase 3...). These changes indicate the existence of early remodeling processes of atrial myocardium secondary to HFD. Other group of genes encodes proteins with no role identified in heart up today (lec-3, ERK-3, TRIP1, nucleophosmin...) or which function remains totally unknown.

This work confirms that HFD is associated with early changes in gene expression in atrium. These changes are unlikely to be related to ventricular hypertrophy which is observed only during long-term HFD. Further studies are necessary to demonstrate the role of these modifications in the pathophysiological mechanisms leading to the increase in heart rate in this model of obesity-related arterial hypertension. Arch Mal Cœur 2002 ; 95 : 695-9.

(*) INSERM U317, laboratoire de pharmacologie médicale et clinique, faculté de médecine, 37, allée Jules Guesde, 31073 Toulouse Cedex.

e-mail : senard@cict.fr

(*Tirés à part* : Pr J.-M. Senard).

Dans certains modèles expérimentaux d'obésité comme chez l'homme, le développement de la masse adipeuse nutritionnelle s'accompagne d'une HTA, d'une insulinorésistance et de modifications de l'activité du système nerveux végétatif (SNV). Les modifications de celui-ci pourraient participer à l'installation de l'HTA, mais aussi rendre compte de l'augmentation précoce de la fréquence cardiaque (FC). Chez le chien rendu obèse et hypertendu par une alimentation hypercalorique et hyperlipidique (HFD), la tachycardie s'explique par une diminution de la variabilité sinusale et de l'activité parasympathique à destinée cardiaque [1] secondaire à la mise en place de régulations transcriptionnelles et à la diminution des récepteurs muscariniques M_2, de l'oreillette droite (OD) [2]. Si l'importance pronostique de la diminution de la variabilité sinusale

est démontrée chez l'homme [3], les mécanismes rendant compte des anomalies du SNV cardiaque chez l'obèse restent mal compris, mais impliquent probablement des facteurs endocrino-métaboliques, tels que les acides gras alimentaires, l'hyperinsulinémie, ou diverses sécrétions adipocytaires. Dans ce contexte, on peut donc supposer que la *down-regulation* des récepteurs M_2, que nous avons observée dans des travaux précédents [2], ne représente qu'une partie des modifications cardiaques imputables à l'alimentation HFD.

Le but de ce travail est l'identification systématique des modifications des taux d'ARNm précoces au niveau de l'oreillette droite afin de mieux comprendre les liens existant entre l'HTA associée à l'obésité et les modifications de la fréquence cardiaque. Pour ce faire, nous avons, chez le chien soumis à un régime HFD, utilisé la méthode des banques soustraites afin d'identifier les caractéristiques de l'expression génique propres au phénotype obésité, HTA et insulinorésistance.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Procédure générale

L'étude a été réalisée sur 12 chiens mâles Beagle-Harrier, âgés de 22 ± 3 mois au début de l'expérience. La pression sanguine artérielle et la fréquence cardiaque ont été mesurées par un capteur télémétrique (Data Science, St Paul, USA) implanté chirurgicalement dans l'artère fémorale 15 jours avant le début du régime. Les animaux ont été répartis en 2 groupes : un groupe témoin (n = 6) recevant une alimentation normale (19 g/kg, Royal Canin M25) et un groupe HFD (n = 6) recevant *ad libitum* le même aliment additionné de 300 g de gras de bœuf cru sans adjonction de sel. Après 9 semaines de régime, les animaux ont été sacrifiés et après élimination du péricarde, l'oreillette droite a été prélevée puis plongée dans l'azote liquide et conservée à - 80 °C.

Extraction des ARN totaux et SMART

Les tissus ont été broyés dans une solution de Trizol. Les ARN totaux ont été précipités et lavés à l'éthanol à 75 %. La technique SMART (*Switch Mechanism At the 5' end of RNA Templates*) a permis de générer suffisamment de matériel pour les études de génomique. Cette technique consiste d'abord à préparer, par transcription inverse, des ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN messagers (ARNm) des ARN totaux (ARNt) puis à ajouter une amorce (CDS *primer*) oligonucléotidique polydT capable de s'hybrider avec les ARNm. Après élongation de l'amorce par la transcriptase inverse en présence de dNTP, on obtient un complexe ADNc/ARNm. L'ADNc néoformé est alors hybridé avec une amorce munie d'un polyG en position 3' et amplifié par PCR avec une amorce 5' adaptée. La PCR a été contrôlée de façon à respecter les proportions originelles des transcrits ARNm.

La méthode utilisée a été la SSH (*Suppressive substractive hybridization*) [4]. L'ADN test de l'oreillette droite d'animaux HFD a été divisé en 2 populations munies d'adapteurs différents. Chaque population a été ensuite mélangée avec un excès d'ADN conducteur de l'oreillette droite contrôlé puis dénaturé et renaturé lentement de manière à piéger les ADNc présents en quantités équivalentes dans le test et le conducteur. Une deuxième hybridation a permis d'isoler puis d'amplifier sélectivement par PCR les molécules hybrides comportant les 2 adaptateurs et correspondant aux ADNc spécifiquement induits au niveau de l'OD des chiens obèses hypertendus. L'expérience inverse réalisée avec comme test les ADNc d'OD des chiens témoins et comme conducteur les ADNc d'animaux HFD a permis d'isoler les ADNc spécifiquement réprimés chez le chien obèse hypertendu.

Amplification des ADNc soustraits, banques ordonnées et séquençage

Les ADNc ont été liés par la ligase du bactériophage T4 dans des vecteurs plasmidiques pGEM-T contenant un gène de résistance à l'ampicilline et un promoteur flanqué de la région du gène LacZ codant pour le peptide α de la β-galactosidase. Cette construction a été intégrée par électroporation dans des bactéries DH5α. La culture des bactéries sur un milieu contenant du X-gal a permis d'identifier les colonies contenant un plasmide ayant intégré un insert. Ces colonies ont ensuite été repiquées dans un milieu contenant de l'ampicilline. L'ADNc plasmidique de chaque colonie a été amplifié par PCR et déposé sur membranes nylon par un robot (Biorobotix). Les ADNc déposés sur les membranes ont été hybridés avec une sonde complexe représentative des ARNm de l'oreillette droite des animaux témoins ou HFD. Ces sondes complexes issues du SMART ont été marquées en présence de dATPα32 à l'aide d'amorces aléatoires et de polymérase (protocole PCR Select differential screening kit, Clonetech). L'intensité des signaux d'hybridation a été mesurée par un Phosphorimager (Storm 860, Molecular Dynamics, résolution : 50 µm/pixel) puis l'analyse informatique des niveaux d'expression a été réalisée en utilisant le logiciel x-Dot Reader (Cose). Une vérification par *Northern-blot* a été réalisée afin de confirmer les résultats des expériences de microarrays. Les ADNc induits ou réprimés dans l'oreillette droite des chiens obèses hypertendus ont été purifiés par incubation (30 min à 37 °C) en présence d'exonucléase I et de phosphatase thermosensible de crevette. Les ADNc purifiés ont été séquencés à l'aide d'un séquenceur automatique (Applied Biosystem 373) puis les séquences obtenues comparées à celles connues dans les banques informatiques.

Analyses statistiques

Les valeurs de poids, de pression sanguine artérielle et de FC dans chaque groupe avant et après 9 semaines de régime ont été analysées par ANOVA suivie d'un test de Dunett. Pour la SSH, l'étude statistique *a priori*

a montré qu'au moins 8 hybridations étaient nécessaires pour identifier avec un risque d'erreur moins de 5% les clones dont l'expression dans le groupe HFD varie d'au moins 20 % par rapport au contrôle (rapport expression HFD/expression contrôle < 0,80 ou > 1,20. Les résultats dans les deux groupes ont été comparés à l'aide d'un test t de Student pour séries non appariées. Seuls les gènes pour lesquels l'ampleur de la variation d'expression atteint au moins 20 % à la fois en *microarrays* et en *Northern-blot* ont été pris en compte et considérés d'intérêt. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

RÉSULTATS

Caractéristiques phénotypiques des animaux

Les valeurs de poids corporel, de pression sanguine artérielle et de FC sont identiques dans les deux groupes de chiens avant le début du régime. Après 9 semaines de régime on observe une augmentation significative du poids corporel, de la pression sanguine artérielle et de la FC dans le groupe obèse hypertendu (tableau I).

TABLEAU I – VALEURS (MOYENNES ± ESM) DE LA PRESSION SANGUINE ARTÉRIELLE (PSA), DE LA FRÉQUENCE CARDIAQUE (FC) MESURÉES PAR TÉLÉMÉTRIE ET DU POIDS CORPOREL DANS LES GROUPES TÉMOINS SOUMIS À UNE ALIMENTATION NORMALE ET HFD SOUMIS À UNE ALIMENTATION HYPERLIPIDIQUE HYPERCALORIQUE (VOIR MATÉRIEL ET MÉTHODES) AVANT ET 9 SEMAINES APRÈS LE DÉBUT DU RÉGIME

	Témoins		HFD	
	Avant	9 sem	Avant	9 sem
PSA systolique (mmHg)	143 ± 4	148 ± 4	145 ± 5	161 ± 5*
PSA diastolique (mmHg)	79 ± 5	80 ± 5	79 ± 2	92 ± 3*
FC (batt/min)	78 ± 6	82 ± 4	81 ± 3	96 ± 4*
Poids corporel (kg)	11,5 ± 0,5	12,0 ± 0,5	12,0 ± 0,7	14,9 ± 0,5*

* : $p < 0,05$.

TABLEAU II – GÈNES CONNUS ET IDENTIFIÉS LORS DE L'ANALYSE EN *MICROARRAYS* DONT LA VARIATION D'EXPRESSION EST D'AU MOINS 20 % PAR RAPPORT AU CONTRÔLE AU NIVEAU DE L'OREILLETTE DROITE DES CHIENS SOUMIS PENDANT 9 SEMAINES À UNE ALIMENTATION HFD

	Taux d'induction ou de répression	
	Microarrays	Northern-blot
Gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire		
Métalloprotéinase 9	2,60 ± 0,01*	1,96
N-acétyl galactosamine transférase 2	0,77 ± 0,05*	0,11
Lectomédine 3	1,24 ± 0,03	1,43
Gènes impliqués dans la structure du cytosquelette et du sarcolemme		
Tensine	0,79 ± 0,03	0,86
β-actine	0,63 ± 0,02	0,88
Myoferline	1,43 ± 0,05*	1,10
Gènes impliqués dans le métabolisme énergétique mitochondrial		
Cytochrome C oxydase (sous-unité I)	1,54 ± 0,05*	2,75
Cytochrome C oxydase (sous-unité VIIb)	1,49 ± 0,04*	
NADH déshydrogénase	1,25 ± 0,05*	2,75
ATP synthase F0	1,51 ± 0,05*	1,90
Voltage dependent activating channel	1,20 ± 0,03	4,46
Gènes impliqués dans les flux ioniques		
Phospholamban	1,36 ± 0,05*	2,79
SERCA2	0,75 ± 0,02	2,49
Na/K-ATPase (isoforme 3)	0,71 ± 0,05*	0,44
Gènes ribosomaux ou impliqués dans la traduction		
ARN ribosomal 12S	1,71 ± 0,04*	ND
ARN ribosomal 16S	1,60 ± 0,05*	ND
Protéine ribosomale L41	1,42 ± 0,05*	ND
NF-E2 related factor	1,40 ± 0,04*	ND
Facteur d'élongation 1	1,51 ± 0,03*	ND
Autres		
Peptide atrial natriurétique	2,60 ± 0,02*	ND
ALS2	0,68 ± 0,02*	
HSP70	1,45 ± 0,04*	4,60

Les valeurs représentent la valeur moyenne ± ESM du rapport entre le niveau d'expression mesurée dans le groupe HFD et le groupe contrôle de 10 hybridations indépendantes. Lorsque les 2 méthodes ont été utilisées, l'analyse statistique n'a été réalisée que pour les gènes dont les variations en microarrays et en Northern-blot sont concordantes.
* : $p < 0,05$.

TABLEAU III – GÈNES DONT LA FONCTION AU NIVEAU CARDIAQUE N'EST PAS DÉTERMINÉE ET IDENTIFIÉS COMME INDUITS OU RÉPRIMÉS PAR L'ANALYSE EN *MICROARRAYS* D'AU MOINS 20 % PAR RAPPORT AU CONTRÔLE AU NIVEAU DE L'OREILLETTE DROITE DES CHIENS SOUMIS PENDANT 9 SEMAINES À UNE ALIMENTATION HFD

	Taux d'induction ou de répression	
	Microarrays	*Northern-blot*
Gènes de fonction non connue au niveau cardiaque		
Nucléophosmine	1,47 ± 0,04*	1,99
ERK-3	1,45 ± 0,05*	4,60
Caséine kinase 2α1	0,73 ± 0,04*	ND
TRIP1	0,48 ± 0,02*	0,08
Protéine TRABID	0,80 ± 0,03*	ND
Proteasom regulatory ATPase	1,52 ± 0,05*	ND
Coatomer protein complex subunit β	0,78 ± 0,05*	ND
Hémoglobine β	0,69 ± 0,02*	1,22
Gènes de fonction inconnue		
Homo sapiens α gene sequence	2,65 ± 0,04*	ND
Homo sapiens chromosome 7 clone RP11-305M3	1,86 ± 0,02*	ND
Homo sapiens brain My025	1,45 ± 0,05*	1,62

Les valeurs présentées représentent la valeur moyenne de 10 hybridations indépendantes. Lorsque les 2 méthodes ont été utilisées, l'analyse statistique n'a été réalisée que pour les gènes dont les variations en microarrays et en Northern-blot sont concordantes.
* : $p < 0,05$.

Profil d'expression génique

Sur les 2 400 clones isolés à partir des banques soustraites, 200 correspondent à des clones dont l'expression dans le groupe obèse hypertendu varie d'au moins 20 % par rapport au niveau d'expression retrouvé dans le groupe témoin. Le séquençage de ces clones a permis d'identifier 32 gènes distincts différentiellement régulés, pour lesquels la variation d'expression mise en évidence par *microarrays* a pu être vérifiée par *Northern-blot* dans 80 % des cas.

Parmi les gènes identifiés, une majorité correspond à des gènes connus déjà impliqués ou décrits dans différentes cardiopathies (tableau II). Parmi les variations les plus significatives on retrouve l'induction des gènes participant au métabolisme énergétique, des gènes régulant les flux ioniques, et en particulier du calcium (phospholamban), ou intervenant dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP_9). Un second groupe (tableau III) est constitué de gènes dont les fonctions, bien que connues, n'ont pas été à ce jour impliquées en physiopathologie cardiaque tels que TRIP1 ou Erk-3. Un dernier ensemble de gènes (tableau III) comprend des gènes dont la fonction reste encore inconnue à ce jour.

DISCUSSION

Ce travail complète nos travaux sur le modèle d'HTA associée à l'obésité chez le chien soumis à un régime hyperlipidique et hypercalorique [1]. Il met en évidence qu'au-delà des modifications d'expression des récepteurs muscariniques M_2 [2], l'oreillette droite est le siège de profondes modifications du profil d'expression génique éventuellement impliquées dans les altérations de la FC et de la variabilité sinusale observées dans ce modèle comme chez l'homme obèse.

Nous avons utilisé la méthode des banques soustraites pour construire des banques ordonnées, permettant d'identifier les ARNm dont l'expression varie de façon significative dans l'oreillette droite des chiens obèses [4]. Cette méthode, largement utilisée, a récemment permis l'identification de la résistine, une hormone sécrétée par l'adipocyte intervenant dans les processus d'insulinorésistance [5]. Dans nos conditions expérimentales, la fiabilité de la SSH apparaît satisfaisante puisque le sens des variations observées en *microarrays* a pu être confirmé dans 80 % des cas par *Northern-blot*. Par contre, la SSH n'est pas une méthode exhaustive ; elle ne s'intéresse qu'à des banques potentiellement enrichies en ADNc correspondant à des ARNm dont l'expression est induite ou réprimée. De plus, nous n'avons retenu que les ARNm dont l'expression différait d'au moins 20 % de celle des animaux témoins. Ce choix permet de n'identifier que les variations d'expression génique pertinentes et reproductibles. Comme toutes les approches génomiques, la SSH pose cependant le problème de la signification physiopathologique des modifications observées puisqu'elle ne permet pas de présager des régulations post-transcriptionnelles ou fonctionnelles des protéines matures.

La majorité des gènes identifiés comme exprimés différemment chez les obèses hypertendus correspond à des gènes dont la fonction est connue au niveau cardiaque et pour lesquels l'existence de régulations a été montrée au cours de l'HVG ou de l'insuffisance cardiaque [6]. Ainsi, l'induction de l'expression des ARNm codant pour HSP70, les protéines ribosomales impliquées dans la traduction ou encore le métabolisme mitochondrial, témoigne de l'ampleur des processus d'adaptation cellulaire au niveau de l'oreillette droite accompagnant l'HTA volumétrique chez les animaux obèses hypertendus [1]. L'induction du gène codant la métalloprotéase 9 de la matrice extracellulaire suggère la possibilité d'altérations précoces de la fonction contractile auriculaire non imputables à l'HVG qui n'apparaît que tardivement dans ce modèle [7]. L'ensemble de ces données, ainsi que l'induction de gènes fœtaux (isoforme 3 de la Na/K-ATP_{ase}) ou impliqués dans la prolifération (nucléophosmine, ERK-3) indiquent l'existence de phénomènes de remodelage précoces de l'oreillette droite. Par ailleurs, nous avons également retrouvé l'induction d'un gène codant une protéine régulant les flux calciques au niveau du réticulum sarcoplasmique (phospholamban). L'expression du phospholamban est en général considérée comme réduite au cours du remodelage ventriculaire. Son augmentation pourrait être une particularité de l'oreillette droite, mais aussi être le reflet de régulations précoces. L'induction du phospholamban pourrait, le cas échéant, refléter des anomalies plus complexes du réticulum sarcoplasmique relatives à la tachycardie observée dans ce modèle.

Dans le contexte de l'obésité, d'autres modifications paraissent intéressantes, comme la répression du gène TRIP1 [7]. La protéine TRIP1 inhibe les effets intracellulaires du TGFβ dont le rôle dans la synthèse de la matrice extracellulaire et la survenue de la fibrose s'avère bien établi [8]. La confirmation du rôle de TRIP1 au niveau cardiaque pourrait déboucher sur de nouvelles molécules capables d'influer sur le développement de la fibrose. Par ailleurs, notre groupe a rapporté une diminution de l'expression et de la fonction des récepteurs M_2 auriculaires droits dans ce modèle de chiens obèses et hypertendus [2], or le TGFβ apparaît susceptible de *down*-réguler la synthèse des récepteurs M_2 [9].

Il en est peut-être de même pour les nouveaux gènes identifiés pour lesquels l'analyse informatique des séquences suggère des fonctions biologiques permettant de les impliquer dans des processus physiopathologiques, mais qui restent cependant à vérifier expérimentalement.

CONCLUSION

Ce travail démontre l'existence de multiples régulations géniques au niveau de l'oreillette droite et témoigne de la rapidité d'installation de ces phénomènes adaptatifs associés à la survenue d'une obésité et d'une HTA. Nos résultats constituent cependant une première approche de l'étude des adaptations cardiaques à l'obésité. Des travaux ultérieurs s'avèrent nécessaires pour vérifier et comprendre la pertinence physiopathologique de ces modifications, notamment chez l'homme.

MOTS CLÉS : HTA, obésité, transcriptome, oreillette droite.

Références

1. **Verwaerde P, Senard JM, Galinier M et al.** Short term variability of blood pressure and heart rate changes during the development of obesity induced hypertension in dogs. J Hypertens 1999 ; 17 : 1135-43.
2. **Pelat M, Verwaerde P, Merial C et al.** Impaired atrial M2-cholinoceptor function in obesity-related hypertension. Hypertension 1999 ; 34 : 1066-72.
3. **Kikuya M, Hozawa A, Ohokubo T et al.** Pronostic significance of blood pressure and heart variabilities: the Ohasama study. Hypertension 2000 ; 36 : 901-6.
4. **Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP et al.** Suppression substractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissu-specific cDNA probes and libraries. Proc Natl Acad Sci USA 1996 ; 93 : 6025-30.
5. **Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ et al.** The hormone resistin links obesity to diabetes. Nature 2001 ; 409 : 307-12.
6. **Swynghedauw B.** Molecular basis of myocardial remodeling. Physiol Rev 1999 ; 79 : 215-62.
7. **Massabuau P, Verwaerde P, Galinier M et al.** Retentissement ventriculaire gauche d'une hypertension artérielle induite par surcharge pondérale chez le chien. Arch Mal Cœur 1997 ; 90 : 1033-5.
8. **Choy L, Derynck R.** The type II transforming growth factor (TGF)-β receptor-interacting protein TRIP1 acts as a modulator of the TGF-β response. J Biol Chem 1998 ; 273 : 31455-62.
9. **Haddad EB, Roussel J.** Regulation of the expression and function of the M2 muscarinic receptor. Trends Pharmacol Sci 1998 ; 19 : 322-7.

II. 2. Evolution du transcriptome cardiaque et cinétique d'engraissement chez le chien obèse hypertendu

L'ancienneté de l'obésité est reconnue comme jouant un rôle prépondérant dans l'aggravation de l'HVG et sa transition vers l'insuffisance cardiaque ainsi que dans les troubles du SNA [74,75]. Pour ces raisons, nous avons envisagé de réaliser la cinétique du profil d'expression cardiaque dans le modèle de chien obèse hypertendu. Les modifications morphologiques évidentes du VG au cours de l'engraissement nous ont conduit à étudier le transcriptome du VG avant et après l'apparition de l'hypertrophie. L'HVG étant détectable par échocardiographie dès la 20ième semaine dans ce modèle, nous avons poussé cette étude sur des VG de chien obèses engraissé jusqu'à 24 semaines. L'étude précédente nous avait permis d'établir une banque constituée de 2 400 ADNc de chien contenant au moins 85 ADNc différents séquencés et localisés. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire du Pr. Hall, Université de Jackson USA, qui a gracieusement fourni la totalité des VG de chiens Beagle engraissés jusqu'à la 24ième semaine.

Nous avons établi le profil de l'expression génique cardiaque à 9, 10, 15 et 24 semaines d'engraissement. D'un point de vue général, il apparaît un profil particulier à chaque période prouvant que le profil transcriptionnel varie souvent et se réadapte régulièrement en fonction des signaux perçus. Cette étude permet d'identifier qu'il existe des régulations biphasiques ou des régulations qui s'accentuent avec la durée de l'obésité. Il est évident que le profil de l'expression génique arbore des régulations très précoces, impliquant souvent des voies à priori bénéfiques pour compenser la pathologie naissante (HSP 70, cytochrome oxydase C,…). Ces régulations sont différentes, voir opposées, aux régulations tardives qui paraissent plutôt accentuer des boucles de régulations qui paraissent alors non adaptés. La voie TGF β paraît à ce stade jouer un rôle central. Cette approche met en exergue soit des éléments de la

voie de transduction du signal TGF β (Récepteur TGF β II, TRIP-1, Smad-6, myostatine) soit des cibles de cette voie au niveau du cardiomyocyte (SERCA-2, M_2, NpRA, RyR2).

Mais on ne sait toujours pas distinguer clairement l'origine de ces régulations et faire la part de l'influence de l'obésité ou l'hypertension artérielle.

KINETIC ANALYSIS OF CARDIAC TRANSCRIPTOME REGULATIONS DURING HIGH FAT DIET IN DOG

PHILIP-COUDERC P, SMIH F, HALL JE, PATHAK A, GALINIER M, SENARD JM, RONCALLI J, MASSABUAU P, ROUET P

Soumis à *Physiological Genomics*

Kinetic analysis of cardiac transcriptome regulations during high fat diet in dog

Pierre Philip-Couderc[1], Fatima Smih[1], John E. Hall[2], Atul Pathak[1], Michel Galinier[1], Jean-Michel Senard[1], Jérome Roncalli[1], Pierre Massabuau[1] and Philippe Rouet[1]

[1]Unité de recherches sur les obésités, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm U586), Institut Louis Bugnard, IFR31, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France
[2]Department of Physiology and Biophysics, University of Mississippi Medical Center, 2500 North State Street, Jackson, MS 39216-4505, USA.

Author for correspondence: Philippe Rouet INSERM U586, Faculté de Médecine, Laboratoire de Pharmacologie Médicale et Clinique, 37 Allées Jules Guesde. 31073 Toulouse cedex. France.

E-mail : Philippe.rouet@toulouse.inserm.fr

Phone : 33-5-61-14-59-98

Fax : 33-5-61-25-51-16

Short title: Obesity-related heart gene regulation during high fat diet

Subject codes : hypertension, obesity, functional genomics.

ABSTRACT

In a previous work we investigated, at the transcriptome level, cardiac adaptative processes related to short-term high fat diet using custom dog cDNA microarrays. We further used such arrays with RNA from heart ventricular samples from dogs under high fat diet for a period of 9, 10, 15 and 24 weeks. Hybridizations of these microarrays with complex probes representing mRNAs expressed in left ventricles from obese hypertense and control dogs were performed. 63 differentially expressed genes were identified and expression of 17 out of 20 randomly chosen genes was confirmed by Realtime PCR. Transcripts were categorized into groups involved in metabolism, signaling, tissue remodeling, ionic regulation, cell proliferation and protein synthesis. Hierarchical clustering showed clearly groups of co-regulated genes at each stage of high fat diet duration. This study clearly pointed out that high fat diet is associated with continuous cardiac adaptive phenomena at the transcriptome level and that gene expression alteration are linked to the duration of the high fat diet rate and to a lesser point to the obesity status of the animals. GenMAPP analysis of the data pointed out the crucial importance of the TGF–β pathway in heart during high fat diet. Moreover, these adaptations are suggestive of molecular remodeling at the ventricular level. These molecular adaptive processes are to be linked with observed cardiac and hemodynamic abnormalities that arise under prolonged high fat diet. These results will contribute to our understanding of novel aspects of the regulatory machinery for cardiac adaptation and is pointing out candidates genes involved in cardiac hypertrophy.

Key words: high-fat diet, hypertension, microarrays, heart

INTRODUCTION

Obesity is prevalent in developed countries and is affecting more than 250 millions people over the world [1]. Therefore obesity is thought to be a major concern for health in the future years [2 3 4 5]. Obesity itself is known as an independent factor increasing the rate of multiple pathologies. Also, duration of obesity has been shown a determinant factor for the alteration of cardiac functions [6 7]. In addition to its high prevalence, the onset of obesity arise now early in childhood which indicates that patients will be submitted to obesity during an extended period of time rising the appearance of obesity-related pathologies [8 9 10]. Obesity is a result of excessive increase of size and number of adipocytes that are a source of secreted factors [11] that will act on target organs such as kidney, brain and heart [12]. As a consequence of obesity, arterial hypertension is very common in obese population [13] and strongly contributes to morbidity of the patients [14].

We have developed an animal model of obesity-related hypertension [15 16 17].This model is closer to human obesity than mouse or rat genetic models with defect in leptin or leptin signaling. Our model of nutritional induced obesity tends to mimic the western countries diet where excess fat is the most environmental factor in obesity [18]. We previously observed that this hyperlipidic, hypercaloric, and *ad libitum* diet (HFD) induced abdominal obesity, hyper-insulinemia and arterial hypertension within a few weeks, and in particular, left ventricular hypertrophy (LVH) developed only after 20 weeks of HFD in dogs [19 17]. Early onset of cardiac molecular adaptations in diet related obesity [20] or late left ventricular hypertrophy has been studied at the transcriptome level [21] and proteome level [22] but provided a static view of adaptive phenomena that did not fully depicted the molecular undergoing

mechanisms. Besides, a time course of heart transcriptome analysis during high fat diet induced obesity has never been performed so far. In addition, transcriptome modulations at the launch of obesity-related hypertension induced left ventricular hypertrophy have not yet been studied. We previously observed left ventricular hypertrophy after a 22 weeks high fat diet in this model [19]. Therefore, we investigated the molecular processes induced by a 9 to 24 weeks of hyperlipidic and hypercaloric diet in this dog model of nutritional obesity.

MATERIALS AND METHODS

Blood pressure (BP) and heart rate (HR) measurement :

A receiver (RL 200, Data Science International) was used to monitor and amplify signal from implantable transmitter and to convert it into a series of digital pulses to be decoded and evaluated by computer. Systolic and diastolic blood pressure (BP) and heart rate (HR) were obtained from the femoral artery pressure waveform. BP and HR signal were digitalized at 500 Hz. Systolic and diastolic BP were computed for each cycle and extracted at 2 Hz, then stored in a compatible IBM-PC for analysis. BP and HR measurements were performed twice a week between 9 and 10 AM, on quiet, unrestained animals in their individual cages

Tissue sources

All animal procedure were performed according to the United States law. Myocardial tissue samples were obtained from 5 control and 5, 3, 5, 4 dogs submitted to 9, 10, 15, and 24 weeks of HFD. After 9, 10, 15, and 24 weeks of normal or HFD diet,

animals were anesthetized and surgery was quickly performed. Right atrium and left ventricle tissue samples were frozen in liquid nitrogen and maintained at - 80°C until RNA preparation.

RNA extraction, DNA array hybridization and expression analysis.

RNA were extracted by disrupting cells in Trizol reagent (Invitrogen) and prepared according to recommended procedures. We used 1 μg of total RNA to produce cDNA 32P labeled probes. Labeling with α-dATP (NEN) of mRNA from obese hypertensive or control dogs, hybridization to the membranes and washes were performed as described in the PCR select differential screening kit manual (Clontech). Labelled probes were hybridized to our microarrays containing 2400 heart dog cDNA clones spotted in duplicates [20]. Membranes were exposed for approximately 1-3 hours in a cassette and revealed with a Storm 860 PhosphorImager (Molecular Dynamics). Signal intensity was analyzed with X-dot reader software (COSE) and normalized to the mean intensity from all the measured values. Results are shown as ratio of obese/control of normalized data.

Realtime PCR analysis of gene expression

A set of 20 genes was randomly chosen for real-time PCR validation of the differential expression [23]. Oligos were synthesized by Proligos company and designed with Primer Express software (**Table 2**). Real time PCR was performed with the Sybergreen master mix reagent (AppliedBiosystems) in a GeneAmp 5700 apparatus. Standard curve method was used for relative quantification of the PCR

products and gene expressions were normalized to 18S RNA quantification. Real-time PCR was statistically analyzed with *SigmaStat* software

Western blot analysis of TRIP-1

Dog's heart ventricle were disrupted in mammalian MCL-1 cell lysis kit solution (Sigma) in the presence of a mix of protease inhibitors and procedures were performed according to the manufacturer's protocol. Sixty micrograms of protein were loaded on a 10 % polyacrylamide-SDS gel that was blotted on 0.45 μm nitrocellulose membrane BA85 (Schleicher et Schuell). MultiMark Multi-Colored standard (Invitrogen) was used to determine size of the proteins. Nitrocellulose membranes were blocked for 2 hours in TBS (7 mM Tris pH 7.5 ; NaCl 150 mM) with 0.1 % Twen 20 and 3 % non fat dry milk. Hybridization of the anti-TRIP-1 serum was performed in TBS-Tween 0.1 % during two hours. After 3 washes in TBS -Tween 0.1 %, Horseradish peroxydase conjugate (10^{-4} dilution) was incubated for two hours with the membrane in TBS-Tween 0.1 %, 3 % non fat dry milk. Blots were washed 3 times in Tween -TBS and one time in TBS then hybridizations were revealed with Supersignal West Pico chemioluminescent substrate according to the manufacturer's protocol (Pierce). Each blot comprised a set of dilutions of sera to ensure semi-quantitative quantification. Quantification of the detected TRIP-1 protein was performed by scanning densitometry and the use of the ImageQuant software (Molecular Dynamix).

Statistical analysis and identification of differentially expressed genes in ventricle

All results are depicted as mean ± SEM. Multiple comparisons were analyzed using ANOVA followed when required by Dunett's post hoc test using Statview 4.5 software (Abacus concept, USA). Single comparisons were performed using unpaired Student's *t* test with a value of $P \leq 0.05$ considered as significant.

Differentially expressed genes were identified using SAM software SAM software [24]. SAM is a permutation-based technique that permits the estimation of the false discovery rate (FDR) for set of genes. The FDR is similar to *P* value in standard statistical test, but can accommodate the effects of non normal distribution in the data and multiple testing. SAM gives a lambda value for each gene on an array, which describes how likely it is that the gene is expressed differently between the two sample populations. A large value of lambda means that the gene is almost certainly expressed differentially, while a small value (close to 0) indicates that there is no evidence for differential expression. SAM was set up with a FDR <0.05.

Hierarchical clustering

Hierarchical clustering was performed on normalized X-dot reader dataset with Cluster Software and drawed with TreeView software [24]. The clustering was performed on the average linkage clustering method for the genes and the arrays.

RESULTS

Body weight, blood pressure and heart rate

Body weight, blood pressure and heart rate were similar in the four groups before starting diet. After 9 weeks of HFD, a significant increase in blood pressure, cardiac output, heart rate and body weight was observed and remained significantly increased up to 24 weeks in the HFD group (**Table 1)**. After ten weeks HFD plasma glucose was slightly lowered and was not significantly modified at 24 weeks. Plasma Na+ increased after 10 and 24 weeks HFD. Plasma K+, nor renin activity, nor peripheral resistances were not significantly modified during HFD.

Differential gene expression in obese heart

We used our tissue-specific cDNA microarray to analyse transcriptome modulations during a 9 to 24 weeks HFD. SAM analysis revealed 63 significantly differentially expressed genes in HFD fed dogs. Differentially expressed genes were grouped by hierarchical clustering organization (**Figure 1**) that showed groups of co-regulated genes that are specific of the number of weeks considered or grouped by functional classes (**Table 3**) that encompass TGF-β and TNFα signaling, metabolism, structure, remodeling, proliferation, transcription and translation, ionic currents, stress, signal transduction and set of 14 new genes of unknown function. Out of these genes 20 were randomly chosen for differential expression verification by RT real-time PCR quantification of the mRNA. Expression of 17 (85 %) could be confirmed by RT real-time PCR, despite the induction or repression was often stronger by real-time qPCR.

Hierarchical clustering displayed a global view of gene expression and proposed set of co-regulated genes within clusters. we observed in the near the beginning obese dogs (9 weeks HFD), down regulation of TRIP-1 a recently discovered regulator of the TGF-β pathway [25] and was still down regulated in obese dogs after 24 weeks of HFD. In addition Myostatin, a TGF-β family member, known as a negative modulator of muscle mass [26] was strongly down regulated after 15 weeks (Microarrays) or 24 weeks (real-time PCR) HFD. Besides, the TGF-β receptor 2 was found to be down regulated and found in the same cluster as TRIP-1. Moreover, SERCA2 and Phospholamban, two TGF-β regulated target genes were down regulated. Semi-quantitative western blot analysis **(Figure 2**) showed a significant down regulation of TRIP-1 after 10, 15 and 24 weeks of HFD.

Since the TGF-β pathway seemed to be involved in the transcriptome adaptations in obese heart we used GenMapp, a new bioinformatics tool for viewing and analyzing microarray data on biological pathways [27]. This tool allowed us to organize of gene expression in the TGF-β pathway **(Figure 3**). GenMapp showed globally significant up regulation of the TGF-β1 gene, down regulation of TGF-β2 receptor, Smad 2, Smad 4 and TRIP-1 and up regulation of Smad 6. Smad 7 expression was not significantly altered. In parallel, GenMapp displayed regulations of a set of 10 target genes for the TGF-β pathways. Positively regulated genes are the atrial natriuretic peptide receptor that is strongly induced, the β1, 2, 3 adrenergic receptor, the ryanodine receptor, and collagen 1. Collagen 1 gene was up regulated only at 9 weeks HFD. Negatively regulated genes are SERCA2 and Phospholamban. Surprisingly, plasminogen Inhibitor activator 1 gene expression was not significantly regulated. M2 muscarinic receptor was up regulated after 10 and 15 weeks and down regulated at 24 weeks. Moreover, we could observe a positive correlation between

expression of SERCA2 and TRIP-1 (R=0.70, p= 0.006 with Spearman's test) and also between TGFB R2 and SERCA2 (R = 0,63 ; p= 0.008) (**Figure 4**).

DISCUSSION

Dogs fed a HFD have been largely studied as a relevant model for human obesity and hypertension [28], but only one report using a functional genomics approach has been realized in this animal [20] by contrast to the large amount of data available concerning gene regulation in other experimental models of ventricular overload or of cardiac failure in rodents. The aim of this work was to study the molecular adaptive processes in dog heart during 9 to 24 weeks of a hyperlipidic and hypercaloric diet. This was done in order to determine, from a qualitative point of view, the nature and the specificity of the alterations which may initiate obesity-related cardiovascular phenomena resulting from prolonged heart exposure to overweight and hypertension. Hierarchical clustering organization gave us both a global view of the regulations that provide an overview of the transcriptome adaptations and also grouped genes that are regulated in a similar way. Clearly, duration of obesity related hypertension has a profound impact on transcriptome regulations. Thus our observations point out a dynamic model of molecular adaptations. Our microarray analysis revealed 63 genes that were up- or down-regulated in ventricle from dogs made obese and hypertensive by HFD. Confirmation was obtained in 85 % of them by realtime PCR (17 confirmed out of 20 tested genes) thus indicating, as previously reported, that microarrays can be reliable indicators of altered gene expression. Despite this measure of reliability,

microarrays can generate some artifacts, which we have shown in our comparison of expression profiles between microarrays and Realtime PCR for MMP9 at 15 weeks. Even taking into account limitations, our data globally show that in a nutritional model of obesity using a *ad libitum* high fat diet a continuous gene regulated reprogramming occurs in ventricle. 9 weeks HFD are not, in our model, associated with any ventricular macroscopic alteration. This finding suggests that changes in the extra-cellular matrix may occur very early and participate in tissue remodeling that is seen after 20 weeks on an HFD [19]. At 9 weeks of HFD, we observed some differences when comparing data of gene expression in left ventricle from our previously published works [20]. At this stage of HFD we did not find in the present work a significant induction of MMP9 but we observed a significant down regulation of SERCA2 and Phospholamban that was not previously observed in left ventricle. This could be explained by the pedigree of the animals that are different in this present work and may be a source of difference in the kinetic of gene expression. In addition, the diet used in this present work was different. Combination of these parameters probably led to earlier transcriptome modification of gene expression. We also found up-regulation of mRNA levels encoding proteins of the mitochondrial respiratory chain such as cytochrome C oxydase subunit I and ATP synthase subunit 6. These changes probably reflect increased energy and ATP consumption secondary to the development of cardiac overload and arterial hypertension. Similar positive regulations of ATP synthesis have also been described in left ventricular mitochondria from spontaneous hypertensive rats [29], [30].

After 24 weeks HFD, we observed down regulation of Myostatin, a negative factor controlling muscle growth [26]. Deficiency of this negative factor led to hypertrophic muscle [31]. This molecular observation is in perfect accordance with previously

observed echographic data that showed hypertrophic heart in dog after 22 weeks HFD [19].

We also observed a significant reduction of N-acetyl galactosaminyl transferase mRNA only after 15 weeks HFD. This enzyme which mediates acquisition of carbohydrate side-chains in *O*-glycosidic linkage to either Thr or Ser modifies the structure of polypeptide backbone and heavily *O*-glycosylated proteins involved in cell interactions such as mucin glycoproteins [32]. In addition, *O*-glycans function as ligands for receptors mediating tumor cell adhesion [33]. mRNA levels encoding lectomedin-3 were also found to be down-regulated by qPCR. This protein harbors a galactose binding domain and is a G protein-coupled receptor that also regulates cell adhesion via an inside-out effector signaling pathway. Decreased expression of this protein can lower adhesion to ligands present in the extra-cellular matrix or on opposing cells resulting in chemotaxis and extravasation [34].

Reorganization of tissue structure is generally concomitant with cell proliferation [35]. We observed the expression of a set of genes involved in cell proliferation that have not yet been studied in heart. First of all, Nucleophosmin (NPM), which is known to accumulate in nuclei of exponential growing HeLa cells [36] and is strongly up-regulated during estrogen-induced cell proliferation in MCF-7 breast cancer cells [37], was continuously up-regulated after 10 weeks HFD. NPM has several potentially important roles in regulating cell function and signaling. Specifically, NPM is a chaperone for nuclear import of proteins [38] [39].This feature lends itself to chromatin dynamics [40] and clearly demonstrates an important role in the regulation of cellular mitogenesis. In this same group, we found down-regulation of mRNA levels for ERK-3, a mitogen activated protein kinase present in the nucleus [41]. ERK3, also called p97 or MAPK6, is responsive to different growth factors, in

response to activation of the p38 pathway [42]. Down regulation of ERK3 may be a negative control of cellular proliferation in attempt to slow down the processes involved ventricular hypertrophy.

One striking observation is the apparent key role of the TGF-β pathway that is pointed out by this study. We observed up regulation of the transcript for TGF-β in ventricle TGF-β has been proposed as autocrine and paracrine factor responsible for myocardial growth and function . Several experimental models of pathologic myocardial growth such as pressure and volume overload showed such regulation of the TGF-β gene . TGF-β function blocking by injection of neutralizing antibodies, prevented myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats [43]. Moreover, TGF-β has been associated with body mass index and hypertension in human and it has been proposed that adipose tissue may be an important determinant of TGF-β levels possibly by a leptin-dependent pathway [44,45]. TGF-β has been shown as a potent inducer of plasminogen activator 1 (PAI-1) [46] but also did not modify expression of PAI-1 in cardiac fibroblasts [47] or TGF-β1 administered in mice increased PAI-1 activity in plasma and PAI-1 mRNA expression in adipose and heart tissue [46] (Lundgren CH, Brown SL, circulation 1996) or human cardiac myocytes in vitro at the mRNA level [48]. In our study in dog heart PAI-1 expression was not regulated significantly by increased levels of TGFβ1 that arise in obese hypertensive animals and collagen 1 a well know target gene of TGF-β [49] was up regulated only at 9 weeks HFD. This is in accordance with the level of the transcript for TGFb1 that reached its maximum induction (29 folds) at 9 weeks and the observation that high levels of TGF-b are required for induction of collagen in cardiac tissues [50]. These mRNA level controls may occur through a particular regulation mechanism for PAI-1 and collagen in obese-hypertense heart. This regulation is probably a consequence

of the level of TGF-β or of the pattern of expression of the genes involved in the TGF-β1 pathway. As Smad 6, β1, β2, β3, and RYR receptor reached maximal induction at 9 weeks and since they are known TGFβ target genes we can propose that these gene are up regulated by high levels of TGF-β whereas NpRA receptor is strongly upregulated by lower levels of TGF-β (*i.e.* at 10 weeks HFD). Since we found the negative regulator of the TGFβ pathway, Smad 6 up regulated, we propose that this protein could block the expression of a set of defined genes. Smad 6 has been recently shown as predominantly expressed in heart and vessels and involved in the control of gene expression during heart development [51] and proposed as co-repressor of transcription by recruiting histone deacetylase [52]. Interestingly mRNA from genes involved in cardiac excitation-contraction coupling such as Phospholamban (PLB) and SERCA-2 were down regulated. SERCA2 was proposed as regulated by the TGFβ pathway [53]. This regulation could be at least in part responsible for the heart rate increase we observed and a consequence of decrease in spontaneous baroreflex efficiency [54]. In parallel, down regulation of TRIP-1, a negative regulator of the TGF-β pathway [55] was observed in heart ventricle for the first time here. This down regulation of a negative factor may be responsible for the activation of a set of specific genes such as NpRA, β1 and β2 AR and RyR2. Positive correlation was found between expression of SERCA2 and TRIP-1 ($R=0.70$, $p= 0.0006$) and also between TGFB R2 and SERCA2 ($R=0.63$, $p=0.0008$) according to Spearman's test, underline the links between the regulations of these genes. Since increased expression of TRIP-1 is associated with increased expression of SERCA2, it is likely that TRIP-1 acts as a positive factor on SERCA2 or that TRIP-1 and SERCA2 share common regulatory sequences. Comparison of 10 kb of 5' regulatory sequence of TRIP-1 and SERCA2 displayed a segment of about 300 bp of 82 % of

homology (data not shown). Within this DNA segment we could identify DNA binding sites for SREBP a transcription factor involved in lipids homeostasis [56]. Binding of this transcription factors on its cognate DNA binding site will be investigated in a future work.

In conclusion, long term HFD led to increased weight and cardiovascular adaptations but also caused profound modifications of the cardiac transcriptome. Because we analyzed modifications continuously during HFD, the observed changes offered a dynamic picture of obesity-related pathological adaptations in the myocardium. The pathophysiological determinants of altered gene expression, with regards to HFD, ascertained here would probably include fatty acids, insulinemia, volumetric overload and adipocyte secretions.

Acknowledgments :

V. Leberre and C. Tonon, S. Sokol (Toulouse Genomic Core Facilities) and J-J. Maoret (INSERM IFR 31) respectively for their excellent technical assistance in microarray spotting, data analysis and DNA sequencing. Lisa Choy is also warmly acknowledged for the kind gift of anti-TRIP-1 rabbit polyclonal antibodies.

REFERENCES

1. Seidell JC. Obesity, insulin resistance and diabetes--a worldwide epidemic. *Br J Nutr*. 2000;83 Suppl 1:S5-8.
2. Laurier D, Guiguet M, Chau NP, Wells JA, Valleron AJ. Prevalence of obesity: a comparative survey in France, the United Kingdom and the United States. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders*. 1992;16:565-72.
3. Seidell JC, Flegal KM. Assessing obesity: classification and epidemiology. *Br Med Bull*. 1997;53:238-52.
4. James WP, Ralph A. New understanding in obesity research. *Proc Nutr Soc*. 1999;58:385-93.
5. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *Jama*. 2003;289:76-9.
6. Nakajima T, Fujioka S, Tokunaga K, Hirobe K, Matsuzawa Y, Tarui S. Noninvasive study of left ventricular performance in obese patients: influence of duration of obesity. *Circulation*. 1985;71:481-6.

7. Alpert MA, Lambert CR, Panayiotou H, Terry BE, Cohen MV, Massey CV, Hashimi MW, Mukerji V. Relation of duration of morbid obesity to left ventricular mass, systolic function, and diastolic filling, and effect of weight loss. *Am J Cardiol*. 1995;76:1194-7.
8. Sakurai Y. Duration of obesity and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. 2000;54:80-4.
9. Mijailovic V, Micic D, Mijailovi M. Effects of childhood and adolescent obesity on morbidity in adult life. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2001;14 Suppl 5:1339-44; discussion 1365.
10. Freedman DS, Khan LK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. Relationship of childhood obesity to coronary heart disease risk factors in adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics*. 2001;108:712-8.
11. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc*. 2001;60:329-39.
12. Hall JE, Jones DW, Kuo JJ, Da Silva A, Tallam LS, Liu J. Impact of the obesity epidemic on hypertension and renal disease. *Curr Hypertens Rep*. 2003;5:386-92.
13. Stamler R, Stamler J, Riedlinger WF, Algera G, Roberts RH. Weight and blood pressure. Findings in hypertension screening of 1 million Americans. *Jama*. 1978;240:1607-10.
14. Melanson KJ, McInnis KJ, Rippe JM, Blackburn G, Wilson PF. Obesity and cardiovascular disease risk: research update. *Cardiol Rev*. 2001;9:202-7.
15. Rocchini AP, Moorehead C, Wentz E, Deremer S. Obesity-induced hypertension in the dog. *Hypertension*. 1987;9:III64-8.
16. Hall JE, Brands MW, Dixon WN, Smith MJ, Jr. Obesity-induced hypertension. Renal function and systemic hemodynamics. *Hypertension*. 1993;22:292-9.
17. Verwaerde P, Senard JM, Galinier M, Rouge P, Massabuau P, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M, Montastruc JL. Changes in short-term variability of blood pressure and heart rate during the development of obesity-associated hypertension in high-fat fed dogs. *J Hypertens*. 1999;17:1135-43.
18. Ravussin E, Bouchard C. Human genomics and obesity: finding appropriate drug targets. *Eur J Pharmacol*. 2000;410:131-145.
19. Massabuau P, Verwaerde P, Galinier M, Fourcade J, Rouge P, Galitzky J, Senard JM, Berlan M, Bounhoure JP, Montastruc JL. [Left ventricular repercussion of obesity-induced arterial hypertension in the dog]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1997;90:1033-5.
20. Philip-Couderc P, Smih F, Pelat M, Vidal C, Verwaerde P, Pathak A, Buys S, Galinier M, Senard JM, Rouet P. Cardiac transcriptome analysis in obesity-related hypertension. *Hypertension*. 2003;41:414-21.
21. Hwang DM, Dempsey AA, Lee CY, Liew CC. Identification of differentially expressed genes in cardiac hypertrophy by analysis of expressed sequence tags. *Genomics*. 2000;66:1-14.
22. Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE. Cardiovascular proteomics: evolution and potential. *Circulation Research*. 2001;88:763-73.
23. Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods*. 2001;25:443-51.
24. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14863-8.
25. Chen RH, Miettinen PJ, Maruoka EM, Choy L, Derynck R. A WD-domain protein that is associated with and phosphorylated by the type II TGF-beta receptor. *Nature*. 1995;377:548-52.
26. Lee SJ, McPherron AC. Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Curr Opin Genet Dev*. 1999;9:604-7.
27. Dahlquist KD, Salomonis N, Vranizan K, Lawlor SC, Conklin BR. GenMAPP, a new tool for viewing and analyzing microarray data on biological pathways. *Nat Genet*. 2002;31:19-20.
28. Hall JE, Brands MW, Hildebrandt DA, Kuo J, Fitzgerald S. Role of sympathetic nervous system and neuropeptides in obesity hypertension. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33:605-18.
29. Seccia TM, Atlante A, Vulpis V, Marra E, Passarella S, Pirrelli A. Mitochondrial energy metabolism in the left ventricular tissue of spontaneously hypertensive rats: abnormalities in both adeninenucleotide and phosphate translocators and enzyme adenylate-kinase and creatine-phosphokinase activities. *Clinical & Experimental Hypertension (New York)*. 1998;20:345-58.
30. Atlante A, Seccia TM, Pierro P, Vulpis V, Marra E, Pirrelli A, Passarella S. ATP synthesis and export in heart left ventricle mitochondria from spontaneously hypertensive rat. *International Journal of Molecular Medicine*. 1998;1:709-16.
31. Zhu X, Hadhazy M, Wehling M, Tidball JG, McNally EM. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. *FEBS Lett*. 2000;474:71-5.
32. Tabak LA. In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:547-64.

33. Sawada T, Ho JJ, Chung YS, Sowa M, Kim YS. E-selectin binding by pancreatic tumor cells is inhibited by cancer sera. *Int J Cancer*. 1994;57:901-7.
34. Hayflick JS. A family of heptahelical receptors with adhesion-like domains: a marriage between two super families. *J Recept Signal Transduct Res*. 2000;20:119-31.
35. Anversa P, Olivetti G, Capasso JM. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1991;68:7D-16D.
36. Yung BY, Bor AM, Yang YH. Immunolocalization of phosphoprotein B23 in proliferating and non-proliferating HeLa cells. *Int J Cancer*. 1990;46:272-5.
37. Skaar TC, Prasad SC, Sharareh S, Lippman ME, Brunner N, Clarke R. Two-dimensional gel electrophoresis analyses identify nucleophosmin as an estrogen regulated protein associated with acquired estrogen- independence in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1998;67:391-402.
38. Dingwall C, Laskey RA. Nucleoplasmin: the archetypal molecular chaperone. *Seminars in Cell Biology*. 1990;1:11-7.
39. Szebeni A, Olson MO. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci*. 1999;8:905-12.
40. Laskey RA, Mills AD, Philpott A, Leno GH, Dilworth SM, Dingwall C. The role of nucleoplasmin in chromatin assembly and disassembly. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1993;339:263-9; discussion 268-9.
41. Cheng M, Zhen E, Robinson MJ, Ebert D, Goldsmith E, Cobb MH. Characterization of a protein kinase that phosphorylates serine 189 of the mitogen-activated protein kinase homolog ERK3. *J Biol Chem*. 1996;271:12057-62.
42. Zimmermann J, Lamerant N, Grossenbacher R, Furst P. Proteasome- and p38-dependent regulation of ERK3 expression. *J Biol Chem*. 2001;276:10759-66.
43. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation*. 2002;106:130-5.
44. Alessi MC, Bastelica D, Morange P, Berthet B, Leduc I, Verdier M, Geel O, Juhan-Vague I. Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes*. 2000;49:1374-80.
45. Porreca E, Di Febbo C, Vitacolonna E, Baccante G, Di Castelnuovo A, Angelini A, Febo F, Di Nisio M, Cuccurullo F. Transforming growth factor-beta1 levels in hypertensive patients: association with body mass index and leptin. *Am J Hypertens*. 2002;15:759-65.
46. Sawdey MS, Loskutoff DJ. Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in vivo. Tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta. *J Clin Invest*. 1991;88:1346-53.
47. Akiyama-Uchida Y, Ashizawa N, Ohtsuru A, Seto S, Tsukazaki T, Kikuchi H, Yamashita S, Yano K. Norepinephrine enhances fibrosis mediated by TGF-beta in cardiac fibroblasts. *Hypertension*. 2002;40:148-54.
48. Macfelda K, Weiss TW, Kaun C, Breuss JM, Zorn G, Oberndorfer U, Voegele-Kadletz M, Huber-Beckmann R, Ullrich R, Binder BR, Losert UM, Maurer G, Pacher R, Huber K, Wojta J. Plasminogen activator inhibitor 1 expression is regulated by the inflammatory mediators interleukin-1alpha, tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta and oncostatin M in human cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:1681-91.
49. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab*. 2000;71:418-35.
50. Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension*. 2002;39:258-63.
51. Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA, Meyer RI, Paul RJ, Lorenz JN, Fairchild-Huntress V, Dixon KL, Dunmore JH, Gimbrone MA, Jr., Falb D, Huszar D. A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat Genet*. 2000;24:171-4.
52. Bai S, Cao X. A nuclear antagonistic mechanism of inhibitory Smads in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*. 2002;277:4176-82.
53. MacLellan WR, Brand T, Schneider MD. Transforming growth factor-beta in cardiac ontogeny and adaptation. *Circ Res*. 1993;73:783-91.
54. Verwaerde P, Galinier M, Fourcade J, Massabuau P, Galitzky J, Senard JM, Tran MA, Berlan M, Montastruc JL. [Autonomic nervous system abnormalities in the initial phase of insulin resistance syndrome. Value of the study of variability of cardiac rate and blood pressure on a model of nutritional obesity]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1997;90:1151-4.

55. Choy L, Derynck R. The type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor-interacting protein TRIP-1 acts as a modulator of the TGF-beta response. *J Biol Chem*. 1998;273:31455-62.
56. Rawson RB. The SREBP pathway--insights from Insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:631-40.

Figure and Table legends :

Table 1: Changes in blood pressure, heart rate and body weight induced by a 0 to 24 weeks of High Fat Diet (HFD). Values statistically different are indicated by * for $p < 0.05$. Cardiac output and total peripheric resistance was monitored only once for a 10 weeks HFD animal.

Table 2: PCR primer sequence used for RT realtime qPCR quantification.

Table 3: Identity of differentially expressed genes and differential expression ratio. ➔ no change ; ↑ : Induction (if > 1.2) and ↓: repression (if < 0.8). Ratios are represented as value obtained by dividing signal obtained with obese probe by signal obtained with control probe. Mean values are indicated. For n=1 measurement was repeated 5 times to assess experimental variation. Statistically relevant ratios are indicated as follow * : $p < 0.05$.

Figure 1: Cluster analysis of differential expression. Measurements values are shown in duplicates.

Figure 2: GenMapp (http://www.genmapp.org) analysis of differentially expressed genes: Involvement of the TGF-β pathway

Figure 3: (A) Realtime qPCR ; (B) Western blot analysis of Trip-1 in dog's heart. * : $p<0.05$.

Figure 4: Correlation of expression of TRIP-1 and SERCA2. Expression of TRIP-1 (x axis) and SERCA2 (y axis) are plotted. R^2=0.52

	Weeks of high fat diet				
	n = 5	**n = 3**	**n = 5**	**n = 3**	**n = 4**
	Control	**9**	**10**	**15**	**24**
Body weigth (kg)	23.56 ± 1.71	39.07 ± 1.68*	34.30 ± 1.27*	36.70 ± 3.30*	35.92 ± 0.43*
Mean arterial pressure (mm Hg)	91.60 ± 2.50	112 ± 0.47*	104.4 ± 2.27*	na	104.5 ± 4.73*
Heart rate (bpm)	76.6 ± 6.42	103.3 ±3.03*	114.4 ±1.43*	na	123.5 ±1.49*
Cardiac output ($L.min^{-1}$)	3.53 ± 0.26	6.0 ± 0.11*	4.39	na	4.75 ±0.70*
Total peripheric resistance	27.57 ± 1.46	19 ±0.33	22.8	na	24.22 ± 3.94
Plasma glucose ($mg.ml^{-1}$)	111.3 ± 4.14	na	96.66 ± 3.26*	na	104 ± 2.48
Plasma renin activity (ng AngI/ml/h)	0.42 ± 0.16	0.8 ± 0.37	na	na	1.05 ± 0.41
Plasma Na^+ ($meq.L^{-1}$)	147 ± 0.31	147.3 ± 0.98	150.2 ± 08*	na	149.2 ± 1.11*
Plasma K^+ ($meq.L^{-1}$)	4.26 ± 0.12	4.3 ± 0.25	4.1 ± 0.10	na	4.15 ± 0.09

*ANOVA & Dunnett

Name	Forward	Reverse
18 S	TCGTATTGCGCCGCTAGAG	TGAAAACATTCTTGGCAAATGC
ALS 2	TTCCACAAAAACAAAGGGTGAA	TCTACACTCTATTGACCTCAGCACAA
Collagen 1	CGTCTCTTGGCTCAGAAATCCT	TGGGCAGTTGCACTCTAAAGG
Cytochrome C oxydase	AGGAATAGATGTAGACACACGAGCAT	CTCCCGTTGGAATAGCGATAAT
EGF Receptor	TAGAATTGGCTGGACTTCCTAGGT	AGTGGGTGGCCTTTGGAGTT
hsp70	TGGCACACTGGACCCTGTAG	CCCACCAAGACAATATCATGGA
Integral mb 1	TGCCATGATTGCTGTAGTTCCT	CAAAAGATGGCAATCCCTTCA
Karyopherine α 4	TATTGCCCATTTTAGTCCATTGTCT	TGTTTGTCAAAGCCCATGCA
Lectomedine 3	ATTGCCAGCGGCGAATAC	GGGCGGTCTCGTTATGGTTA
M2 muscarinic receptor	GGCCTGGAGCACAACAAAAT	TTTCTCCTCTCCCTGGACACA
Melanophilin	GGAAACCGCTGCTTCAGAGA	TCTGTTCAAAGGCATGGATGTG
Mitochondrial P carrier protein	CCAAAAGTACAAGGGCATATTTAACG	GAGCCCATCCTTTAGCCAAAC
MMP 9	CCCTTGAACACGCATGACAT	AAGCGGTCCTGGCAGAAGTA
Myostatin (GDF 8)	TCCTGAGACTCATCAAACCTATGAAA	TGCCTGGGTTCATGTCAAGTT
NpRA	TGGAACCGAAGCTTTCAAGGT	CCATATCCCAGAGGGAGAAGTCT
PAI-1	TGGAGGGCACAACACTTTCA	CAATGGCAGGCGATGCA
PG D2 Synthase	CGTCGCTAACTGGATAAAACGA	CCCCCGAGAAAAACAAACTTG
Phosphodiesterase Beta 4	AATGCAAACTGAAGCAGCAAAA	GCTGTCTTGCATGAAATCTGTGT
Phospholamban	CATTTGGCCGCCAGCTT	ACTTTATCCATGACCCCAGGAA
RyR 2	AAAATTCACAAGCTCGCATGAG	CCCATAACACCCTGCCCATA
SERCA	TCGAACCTTCCCACAAGTCAA	TCACACCATCCCCAGTCATG
Smad 2	CAGGCTCTCCGGCTGAACT	CCGAGTAAGTAACTGGCTGCAA
Smad 3	TCCGCTGAAGGTCAGCGTAT	CCCTTGCTGCTTCCTGTGAA
Smad 4	AGCACTACCACCTGGACTGGAA	GTGCTGAAGATGGCCGTTTT
Smad 6	ACCCTGCTACTCGCGACAGT	TGAGTAGGATCTCCAGCCAACA
Smad 7	TCTCCATCAAGGCTTTTGACTATG	TCCATGGTTGCTGCATGAAC
ß actin	GACCCAGATCATGTTCGAGACTT	AGCCTGGATGGCCACGTA
ß1 AR	GCATCATCATGGGTGTGTTCA	CCAGGTCGCGGTGGAA
ß2 AR	GGGAACGGCTACTCTAGCAA	TTCTCCTGCCCCAGCTGAT
ß3 AR	CCGCTCAACAGTTCCCTTCTT	AGGGAAGTCCATTGCTGTCTATG
tensine	GGTATCTGCCGTCAGGTCATC	CAGCTTGGCCTGGCATTT
TGF ß 1	GCCCCGAGTGCTACTTTGAG	AGGCGGTCACCATCTTGTGT
TGF ß Receptor 2	CTGCGTCTGGACCCTACTCTGT	TTCTGGAGCCATGTATCTTGCA
Thioredoxin interacting protein	TACTCGTGTCAAAGCCGTTAGG	CACATGCTCACTGCACATTGTT
TRIP 1	ATGTTCTCCACAGACAAGCAGATG	GCTGTCGATCTGGCTTGGAT
VDAC 2	ATTTGGTTTTGGGTTGGTGAAA	TTAGATGAACCGGACGTTGAAA

Table 2

TABLE 3

Gene Name	Accession n°	Fold change (vs control)							
		DNA-microarray Weeks of high-fat diet				Real time PCR Weeks of high-fat diet			
		n = 5	n = 3	n = 5	n = 4	n = 5	n = 3	n = 5	n = 4
		9	10	15	24	9	10	15	24
TGF β & TNF α signalling									
TGF β Receptor 2	NM_003242	0.52*↓	0.68 ↓	0.54*↓	0.51*↓	0.30*↓	0.87 →	0.64 ↓	0.17*↓
TRIP 1	U36764	0.72 ↓	0.63*↓	0.68*↓	0.74 ↓	0.53*↓	0.41*↓	0.27*↓	0.19*↓
Myostatin 2 (GDF 8)	AJ344158	0.70 ↓	0.78 ↓	0.58*↓	0.78 ↓	1.20 ↑	0.93 →	1.10 →	0.04*↓
TRABID	AJ252060	0.80 ↓	1.75*↑	0.71 ↓	0.65*↓				
Metabolism									
Mitochondrial phosphate carrier protein precursor	X05340	2.30*↑	1.32 ↑	2.28*↑	1.98*↑	2.84*↑	1.37 ↑	2.38*↑	0.41*↓
Cytochrome oxydase I	AF028189	1.26 ↑	1.37*↑	1.51*↑	1.31 ↑	3.62*↑	27.5*↑	24.5*↑	13.1*↑
Proteasome regulatory ATPase subunit 6	AF227504	1.04 →	1.44*↑	1.24 ↑	1.02 →				
Structure									
karyopherin α 4 (importin alpha 3)	BC034493	0.60*↓	0.67*↓	0.63*↓	0.59*↓	0.44*↓	0.29*↓	0.45*↓	0.38*↓
β Actin	BC002409	0.90 →	0.57*↓	0.49*↓	0.83 ↓	0.91 →	0.43*↓	0.55*↓	0.91 →
Tensin	AF225896	1.68*↑	1.49*↑	0.76 ↓	0.71 ↓	1.47 ↑	0.48*↓	0.73*↓	0.84 ↓
Cadherin 19	NM_021153	0.48*↓	0.68 ↓	0.62*↓	0.56*↓				
Myoferlin	XM_011919	0.69 ↓	0.73 ↓	0.63*↓	0.69 ↓				
Melanophilin	NM_024101	0.68 ↓	1.58*↑	0.83 ↓	0.58*↓				
γ-non muscle actin	X60733	0.84 →	0.66*↓	0.61*↓	0.78 ↓				
Remodeling									
Matrix metalloproteinase-9	AF169244	1,20 ↑	1,46 ↑	1,57*↑	1,32 ↑	2.15 ↑	4.24*↑	0.11*↓	0.05*↓
Lectomedin 3	AF307080	1.07 →	1.32*↑	1.04 →	1.08 →	0.77 ↓	0.59*↓	0.20*↓	0.08*↓
β 1,4-galactosyltransferase	AL035683	0.56*↓	0.89 →	0.89 →	0.88 →				
N-acetylgalactosaminyltransferase 2	AL078646	0.77 ↓	0.82 →	0.67*↓	0.72 ↓				
E-selectin	AF287257	0.87 →	0.79 ↓	0.90 →	0.64*↓				
Proliferation									
Nucleophosmin	BC003670	1.34 ↑	1.50 ↑	1.60*↑	1.52 ↑	3.57 ↑	4.29*↑	5.19*↑	6.05*↑
ERK3	L77964	0,58*↓	0,71 ↓	0,65 ↓	0,58*↓	0.15*↓	0.61 ↓	0.43 ↓	0.08*↓
EGF Receptor	AF275365	0.74 ↓	2.04*↑	1.58*↑	0.48*↓				
Transcription-translation									
D8a mitochondrial control region I, D-loop	AF008153	1.37↑	1.64*↑	1.63*↑	1.26 ↑				
12S ribosomal	AY012152	1.27 ↑	1.48*↑	1.44*↑	1.44*↑				
16S ribosomal	AY011186	1.50*↑	1.70*↑	1.45*↑	1.01 →				
Ionic current									
SERCA2a	U94345	0.51*↓	0.72*↓	0.86 →	1.00 →	0.19*↓	0.45*↓	0.01*↓	0.09*↓
Phospholamban	U94345	0.66*↓	0.72*↓	0.78 ↓	0.86 →	0.27*↓	0.32*↓	0.03*↓	0.34*↓
Na+/K+ ATPase alpha subunit isoform 3	AF286374	1.24 ↑	1.15 →	1.32 ↑	1.25 ↑				
VDAC 2	AF268462	1.14 →	1.68*↑	1.54 ↑	1.01 →	1.48 ↑	4.03*↑	2.62*↑	2.28 ↑
Stress									
HSP 70	U73744	1.08 →	0.96 →	1.70*↑	1.08 →	1.88 ↑	4.46*↑	8.25*↑	2.60*↑
ANP	BF514976	0.74 ↓	0.80 ↓	0.74*↓	0.80 ↓				
Prostaglandin D2 synthase	NM_014485	0.71 ↓	0.86 →	0.62*↓	0.46*↓	0.40*↓	0.13*↓	0.13*↓	0.05*↓
Amyotrophic lateral sclerosis 2 (SOD)	NM_015049	1.27 ↑	1.16 →	1.48*↑	1.92*↑	3.14*↑	1.79 ↑	5.35 ↑	6.62*↑
P21 Rho-binding domain protein kinase PAK 5	AL031682	0.69 ↓	0.66 ↓	0.60*↓	0.48*↓				
Thioredoxin interacting protein	XM_059210	1.12 →	1.50*↑	1.12 ↑	0.71*↓				
Signal transduction									
1-Phosphatidylinositol -4,5-Bisphosphate Phosphodiesterase Beta 4	AL031652	0.58*↓	0.63*↓	0.68 ↓	0.48*↓	0.63 ↓	1.33 ↑	1.05 →	1.12 →
guanylate cyclase activator 2B (uroguanylin)	NM_007102	0.62*↓	0.70 ↓	0.55*↓	0.54*↓				

Calcium-binding EF-hand	NM_066739	0.71 ↓	0.78 ↓	0.63*↓	0.57*↓				
Polyadenylate binding protein-interacting protein 2	AF317675	1.40 ↑	1.29 ↑	1.54*↑	1.25 ↑				
Serum amyloid A protein (SAA3)	AF160867	0.82 →	0.87 →	0.72*↓	0.55*↓				
Zinc finger protein 106	NM_022473	0.87 →	0.83 →	0.84 →	0.71*↓				
New genes									
ITM1	XM_006242	0.41*↓	0.47*↓	0.38*↓	0.40*↓	0.87 ↓	0.42*↓	0.02*↓	0.15*↓
RP11-366K1	AL356096	0.65*↓	0.76 ↓	0.59*↓	0.52*↓				
RP11-232P16	AC044799	0.65*↓	0.67 ↓	0.64*↓	0.55*↓				
RP11-305M3	AC009244	0.61*↓	0.83 →	0.67 ↓	0.64*↓				
RP11-232P16	AC044799	0.65*↓	0.67*↓	0.64*↓	0.55*↓				
RP11-366K1	AL356096	0.65*↓	0.76 ↓	0.59*↓	0.52*↓				
RP11-392A22	AC106708	0.71 ↓	0.80 ↓	0.67 ↓	0.54*↓				
FLJ13188	XM_011941	0.87 →	0.89 →	0.62*↓	0.68 ↓				
host cell factor	BC002335	1.63*↑	1.15 →	1.08 →	1.20 ↑				
DC48 mRNA	AF271776	1.64*↑	1.38*↑	1.21 ↑	1.28 ↑				
α gene	AF203815	0.70 ↓	0.83 ↓	0.72 ↓	0.56*↓				
1E2	No Homology	1.44*↑	1.43*↑	1.12 →	1.30 ↑				
3O10	No Homology	0.67*↓	1.21 ↑	1.00 →	0.97 →				
3O22	No Homology	0.78 ↓	0.90 →	0.68*↓	0.63*↓				

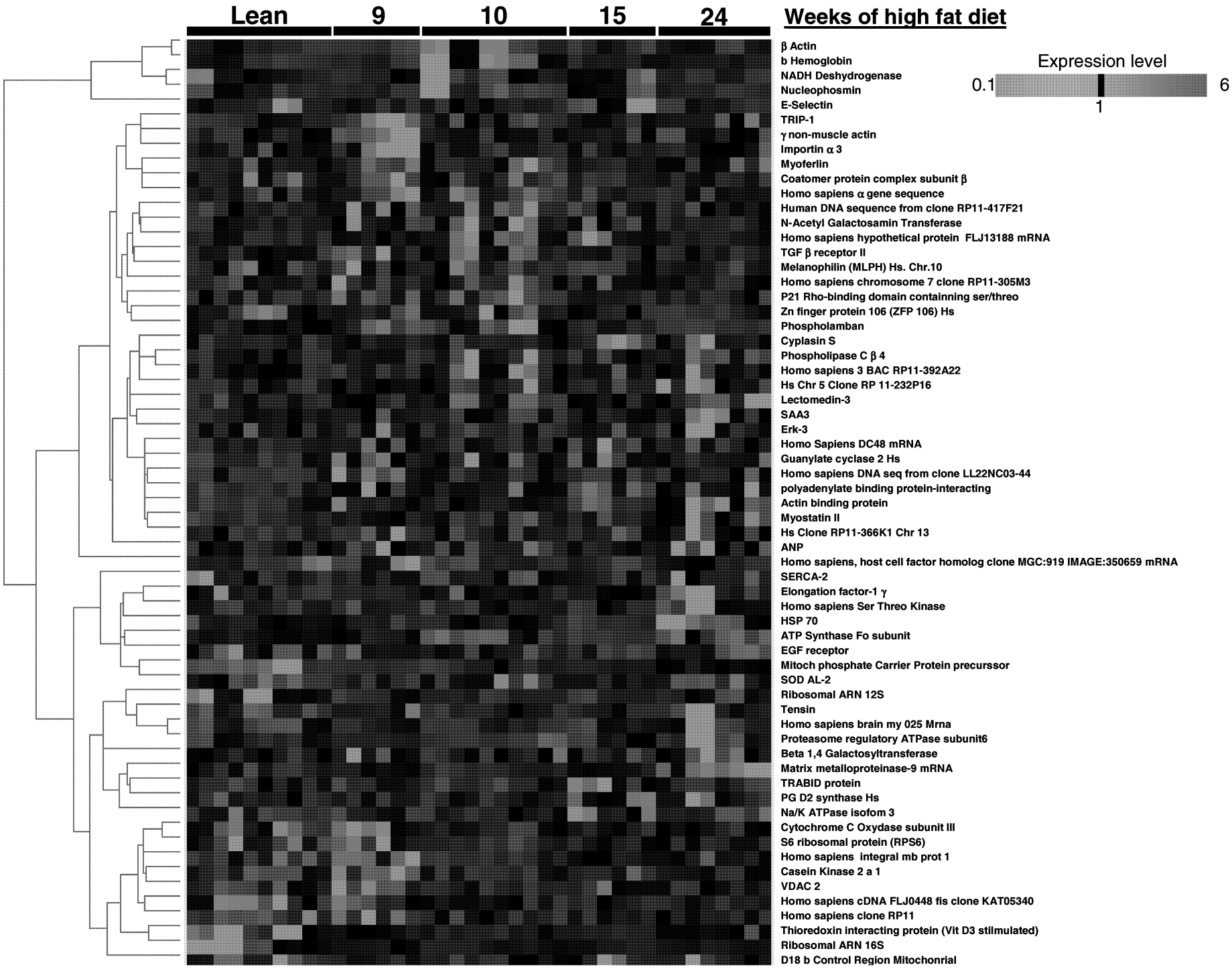
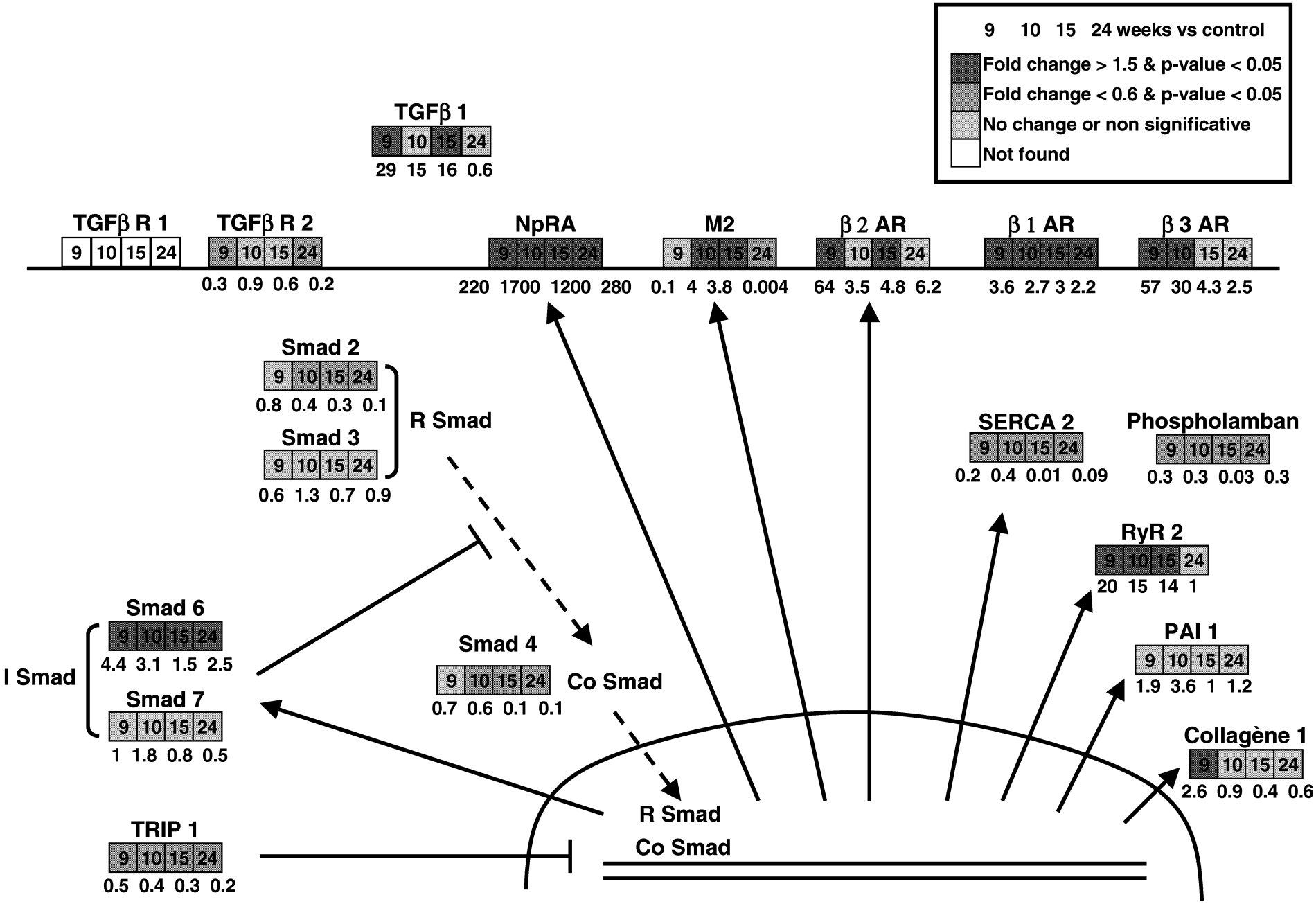

Lean
9
10
15
24
Weeks of high fat diet
Expression level
0.1
1
6
β Actin
b Hemoglobin
NADH Deshydrogenase
Nucleophosmin
E-Selectin
TRIP-1
γ non-muscle actin
Importin α 3
Myoferlin
Coatomer protein complex subunit β
Homo sapiens α gene sequence
Human DNA sequence from clone RP11-417F21
N-Acetyl Galactosamin Transferase
Homo sapiens hypothetical protein FLJ13188 mRNA
TGF β receptor II
Melanophilin (MLPH) Hs. Chr.10
Homo sapiens chromosome 7 clone RP11-305M3
P21 Rho-binding domain containning ser/threo
Zn finger protein 106 (ZFP 106) Hs
Phospholamban
Cyplasin S
Phospholipase C β 4
Homo sapiens 3 BAC RP11-392A22
Hs Chr 5 Clone RP 11-232P16
Lectomedin-3
SAA3
Erk-3
Homo Sapiens DC48 mRNA
Guanylate cyclase 2 Hs
Homo sapiens DNA seq from clone LL22NC03-44
polyadenylate binding protein-interacting
Actin binding protein
Myostatin II
Hs Clone RP11-366K1 Chr 13
ANP
Homo sapiens, host cell factor homolog clone MGC:919 IMAGE:350659 mRNA
SERCA-2
Elongation factor-1 γ
Homo sapiens Ser Threo Kinase
HSP 70
ATP Synthase Fo subunit
EGF receptor
Mitoch phosphate Carrier Protein precurssor
SOD AL-2
Ribosomal ARN 12S
Tensin
Homo sapiens brain my 025 Mrna
Proteasome regulatory ATPase subunit6
Beta 1,4 Galactosyltransferase
Matrix metalloproteinase-9 mRNA
TRABID protein
PG D2 synthase Hs
Na/K ATPase isofom 3
Cytochrome C Oxydase subunit III
S6 ribosomal protein (RPS6)
Homo sapiens integral mb prot 1
Casein Kinase 2 a 1
VDAC 2
Homo sapiens cDNA FLJ0448 fis clone KAT05340
Homo sapiens clone RP11
Thioredoxin interacting protein (Vit D3 stilmulated)
Ribosomal ARN 16S
D18 b Control Region Mitochonrial

FIG 2

TGF β pathway in obese hypertensive heart



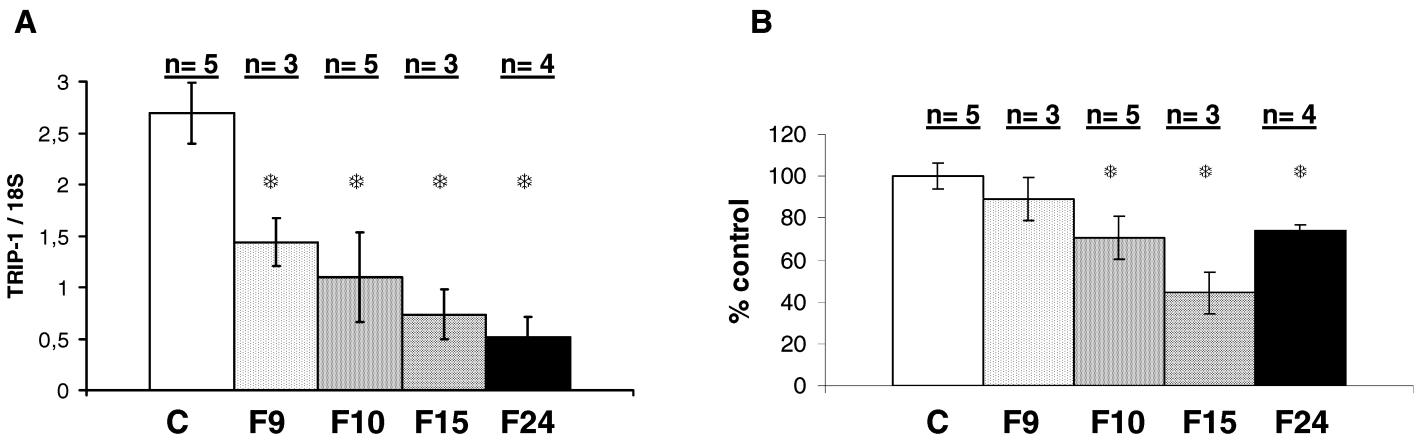

A
n= 5
n= 3
n= 5
n= 3
n= 4
TRIP-1 / 18S
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
C
F9
F10
F15
F24
B
n= 5
n= 3
n= 5
n= 3
n= 4
% control
120
100
80
60
40
20
0
C
F9
F10
F15
F24

Figure 3

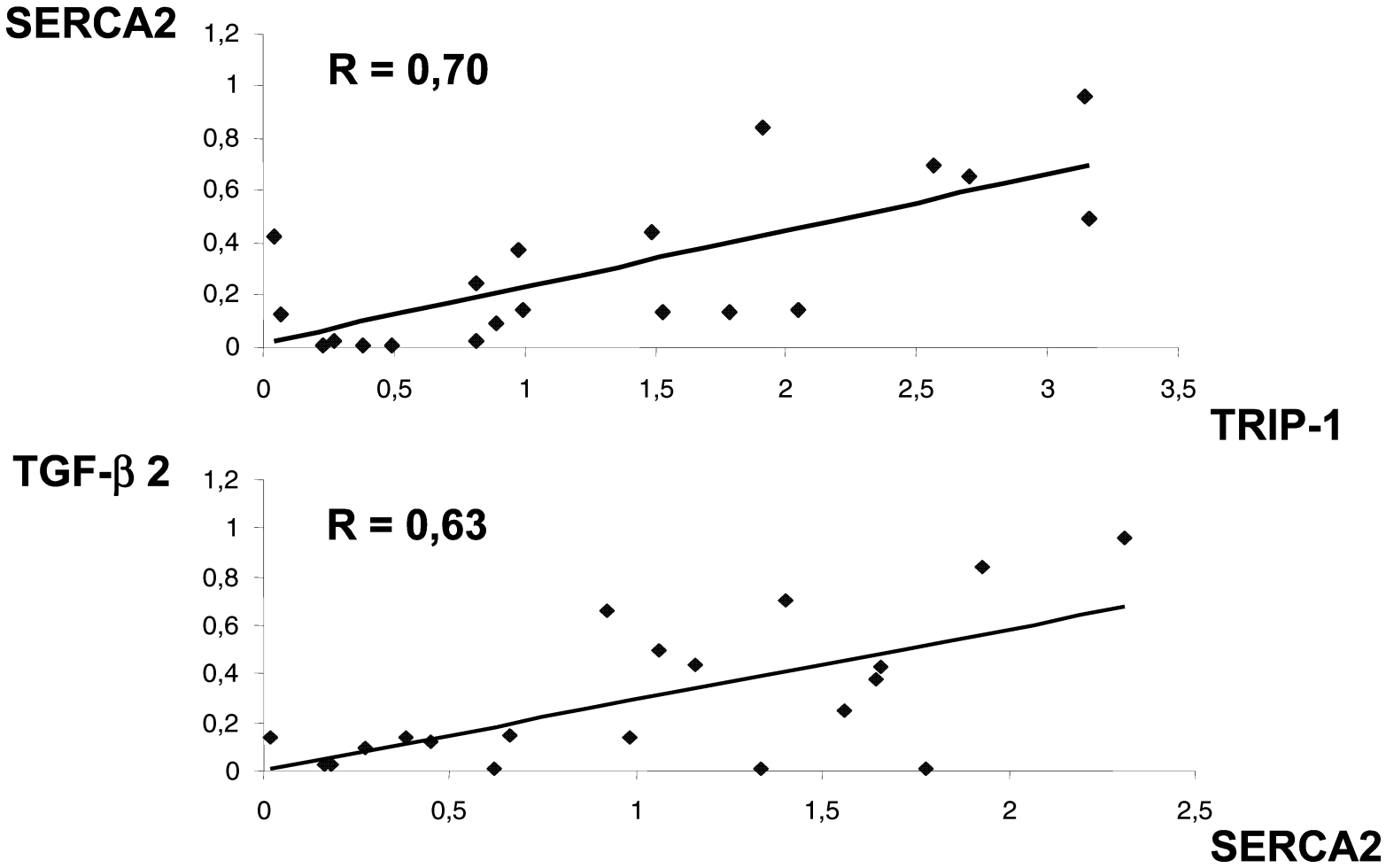

SERCA2
R = 0,70
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
TRIP-1
TGF-β 2
R = 0,63
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
0,5
1
1,5
2
2,5
SERCA2

Figure 4

III. 3. Profil de l'expression génique cardiaque chez l'Homme obèse

Nous avons vu qu'il existait une reprogrammation très précoce du transcriptome cardiaque (9 semaines de régime HFD) dans le modèle de chien obèse hypertendu. Néanmoins, à ce jour aucune donnée n'a permis d'identifier la part de l'influence de l'obésité ou de l'HTA sur le cœur. Nous savons déjà que le remodelage cardiaque est différent chez les individus obèses ou obèses hypertendus. L'analyse du transcriptome est une méthode globale qui peut permettre d'identifier les voies de régulations moléculaires mises en jeu dans le cœur de patients atteints d'HTA ou d'obésité ou de l'association des deux. Ainsi, nous avons entrepris d'établir le profil d'expression génique du cœur de l'Homme obèse en comparaison à celui du patient obèse hypertendu. Les tissus humains utilisés sont des déchets opératoires de la région auriculaire récupérés au décours du retrait de la circulation extracorporelle (CEC). Après la création d'une banque tissulaire cardiaque de près de 200 échantillons, 5 tissus dans chaque groupe ont été sélectionnés. Afin de distinguer l'influence de l'obésité seule *vs* l'HTA, tous les patients présentant des pathologies associées ont été exclus (diabète, insuffisance cardiaque, insuffisance valvulaire, insuffisance rénale, cancers…). Cette étude visait d'une part, à définir s'il existe un profil transcriptionnel propre à l'obèse et, d'autre part, à distinguer les spécificités de ces 2 types d'affections afin de déterminer les modifications liées à l'obésité ou à l'HTA.

La poursuite des travaux concernant les protéines nouvelles identifiées chez le chien obèse hypertendu a initié cette étude chez l'Homme. Nous avons commencé par confirmer chez l'Homme la surexpression de PPR2 (facteur de transcription potentiel) dans le cœur de patients obèses et hypertendus ou obèses asymptomatiques. Ce profil suggère que la surexpression de PPR2 serait liée à l'obésité (Fig. 19).

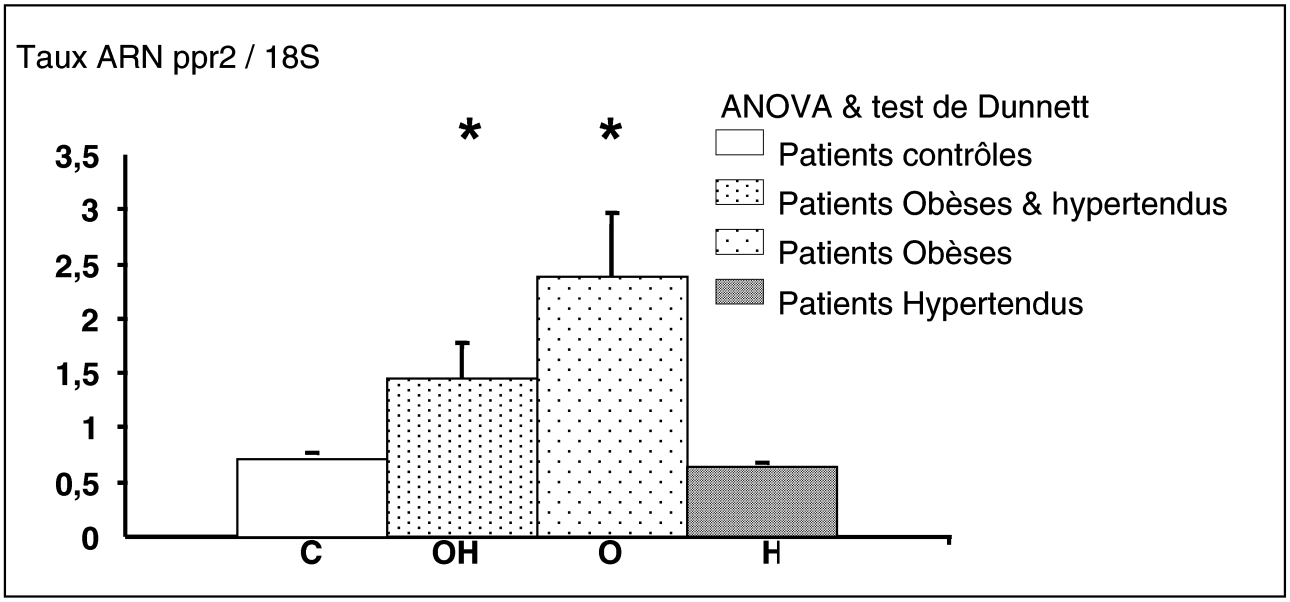


Fig. 19 : Taux d'ARNm PPR2 dans le cœur humain.

Une autre protéine connue, TRIP-1 (*TGF β Receptor Interacting Protein 1*), impliquée dans la transduction du signal *TGF β* (*Transforming Growth Factor β*), est surexprimée sans distinction dans le cœur des patients en surcharge de pression (HTA) ou de volume (obésité) (Fig. 20).

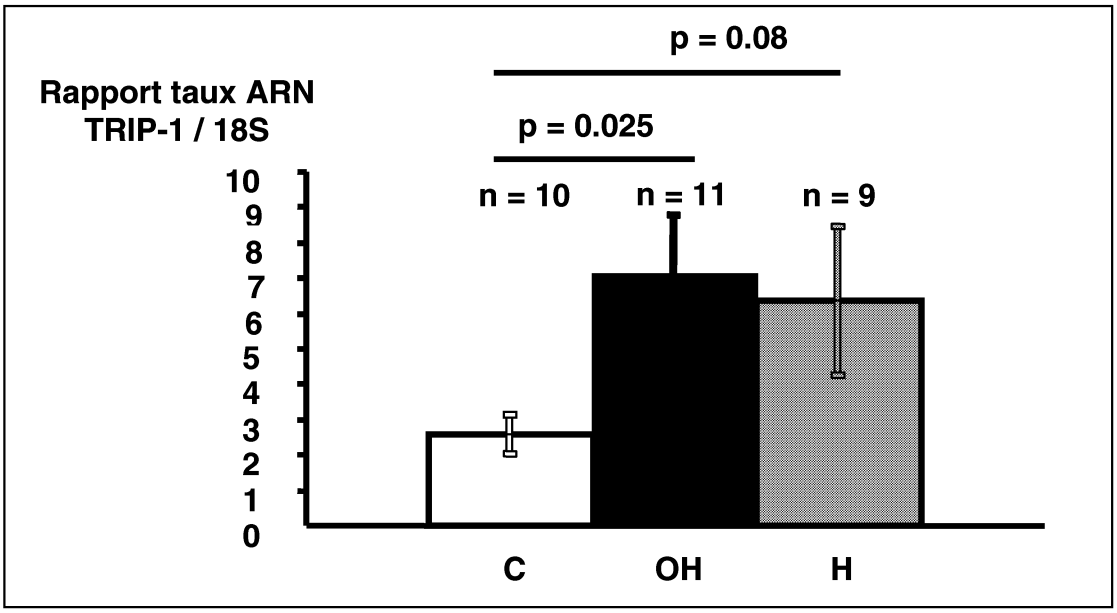


Fig. 20 : Taux d'ARNm TRIP-1 dans le cœur humain.

Nous avons pu montrer que les profils transcriptionnels cardiaques étaient propres à chacun des groupes de patients. Les recoupements entre les groupes d'obèses hypertendus et d'obèses ont permis d'identifier des gènes spécifiquement régulés par l'obésité, tandis que les recoupements entre les groupes d'obèses hypertendus et d'hypertendus essentiels ont permis d'identifier des gènes spécifiquement régulés par l'HTA. Globalement, le cœur de l'obèse implique environ 20 % en moins de gènes du développement et du cycle cellulaire par rapport au cœur des obèses hypertendus ou des hypertendus essentiels. Dans le cœur de l'obèse asymptomatique, on assiste à une implication 2 fois plus importante de gènes impliqués dans l'apoptose, les sécrétions et la matrice extracellulaire. La voie de signalisation *Wnt* apparaît régulée de manière diamétralement opposée entre le cœur de l'obèse et celui de l'hypertendu essentiel. Cette régulation est opposée à tous les niveaux de la voie : au niveau des effecteurs de la transduction du signal et au niveau des gènes cibles de cette voie.

GENE EXPRESSION PROFILING IN HEART FROM HUMAN OBESE PATIENTS WITH OR WITHOUT ARTERIAL HYPERTENSION

PHILIP-COUDERC P, PATHAK A, SMIH F, DAMBRIN C, HARMANCEY R, BUYS S, GALINIER M, SENARD JM, MASSABUAU P, RONCALLI J, ROUET P

Soumis à *FASEB*

Gene expression profiling in heart from human obese patients with or without arterial hypertension

Pierre PHILIP-COUDERC [1], Atul PATHAK [1], Fatima SMIH [1], Camille DAMBRIN [2], Romain HARMANCEY [1], Sophie BUYS [1], Michel GALINIER [1,3], Jean-Michel SENARD [1], Pierre MASSABUAU [1,3], Jerome RONCALLI [1,3] and Philippe ROUET [1]

[1] Unité de recherches sur les obésités, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm U586), Institut Louis Bugnard, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

[2] Department of Cardiovascular Surgery, Toulouse University Hospital, 1 avenue Jean Poulhes, 31059 Toulouse cedex 9, France

[3] Department of Cardiology, Toulouse University Hospital, 1 avenue Jean Poulhes, 31059 Toulouse cedex 9, France

Author for correspondence: Philippe Rouet, INSERM U586, Faculté de Médecine, Laboratoire de Pharmacologie Médicale et Clinique, 37 Allées Jules Guesde. 31073 Toulouse cedex. France.

E-mail : Philippe.rouet@toulouse.inserm.fr

Phone : 33-5-61-14-59-98

Fax : 33-5-61-25-51-16

Short title: Obesity and gene regulation in heart

Subject codes : obesity, heart, arterial hypertension, functional genomics.

ABSTRACT

A dramatic increase in obesity prevalence and cardiovascular morbidity is expected for the coming years. However, with relevance to the heart, little is known about the specific contribution of obesity on associated morbidity. Consequently, global analysis of gene regulations in human heart was undertaken to monitor molecular regulations related to obesity or to obesity-related hypertension. Transcriptome analysis using cDNA array was carried out in right appendage biopsies from obese patients (n=5), from patients with arterial hypertension with (n=5) or without obesity (n=5), and from 5 controls undergoing cardiac surgery and coronary by-pass. Statistical analysis of the data revealed 2716 differentially expressed genes out of 11,500 when compared to control tissues. Differential expression was verified by Real-time PCR in 84 % of 50 randomly chosen genes. Among genes encountered, 397 were specifically regulated in obese, 1299 in non obese hypertensive, and 355 in obese hypertensive patients respectively, whereas an additional set of 153 genes was found to be differentially expressed in all these situations. Ontology analysis, hierarchical clustering and molecular pathway analysis indicated that the heart molecular picture of obesity differs from that observed for obesity-related hypertension or hypertension and allowed the identification of complex co-regulations and gene networks involved in cardiac adaptations to obesity.

INTRODUCTION

Obesity is increasing to alarming levels around the World with at least 61 % of the adults in United States considered to be overweight [1]. Based on prospective studies, about 400,000 deaths could be attributed to obesity each year in USA [2] mainly as consequences of heart diseases including ischaemic cardiopathies and heart failure [3]. The mechanisms accounting for obesity-related morbidity include its tight association with arterial hypertension [4] and endocrine and metabolic disturbances such as diabetes mellitus [5] or dyslipidemia [6].

The possibility that part of the cardiac complications is due to specifically obesity or increased fat mass and independent from arterial hypertension or metabolic disturbances has not been extensively investigated. This is despite that adipose tissue has been shown to secrete multiple adipocytokines of which some have been shown to participate in cardiovascular disorders such as leptine [7], angiotensinogene [8], adiponectine [9], TNFα [10] or TGFβ [11]. Moreover, even if they are not specific for obesity, functional changes in the heart have been shown in healthy obese patients such as, for instance, a decrease in heart rate variability [12], a change associated with increased risk of death in cardiac diseases [13], [14] which is also seen in the general population [15].

We have recently reported data on early transcriptional regulation at the cardiac level obtained in dogs submitted for 9 weeks to a high fat diet [16] and also shown that in this model, changes in heart rate are related to a down-regulation of muscarinic receptors [17]. However, this experimental model does not allow us to distinguish between adaptations due to arterial hypertension and those specific to the development of fat mass. Moreover, these data only concern short-term adaptations whereas in humans, obesity often lasts several decades before cardiac problems occur.

Therefore, we decided to investigate the heart transcriptome remodeling focusing on changes specifically related to obesity. DNA microarray transcriptome profiling has been proposed as a powerful tool to study cardiac molecular phenotypes allowing a simultaneous analysis of expression of thousands of genes [18, 19]. It has been recently used to study human heart failure [20, 21] and congenital heart defects [22] as well as left ventricular hypertrophy [23] in animals. In the present study, microarray analysis was performed on right auricle samples from non complicated obese patients. Comparison of the results with those obtained in patients with obesity-related hypertension or in non obese hypertension patients was also carried out in order to discriminate between changes specifically linked to obesity or to arterial hypertension.

MATERIAL AND METHODS

Patients and heart sampling

All patients included in the study gave their informed consent for sample collection and molecular analysis prior to their inclusion. Patients were carefully selected by the physicians from the Obesity Clinic of the Department of Cardiology, Toulouse University hospital prior to cardiac surgery for coronary by-pass due to coronary disease. Criteria for inclusion and group allocation were body mass index (BMI), blood pressure (BP). Patients were excluded with an ejection fraction < 45% when measured by echography or with diabetes mellitus. Out of more than 150 patients, three groups of patients paired for age, sex and drug regime were selected (**Table 1**). The group of obese patients (Group O) comprised 5 patients (BMI > 30 kg/m^2) with normal blood pressure (BP < 140/90 mm Hg) and no history of arterial hypertension or of antihypertensive drug prescription. Two groups of hypertensive patients (BP > 140/90 mm Hg) at examination or taking antihypertensive medication were

also formed : a group of obese hypertensive patients (group OH : BMI > 30 kg/m^2, n=5) and a group of non obese hypertensive patients (group H: BMI : BMI <25 kg/m^2, n=5). The results in patients were compared to those of a control group composed by 5 non obese normotensive patients without heart failure or diabetes mellitus undergoing cardiac surgery because of coronary disease. The reason for rejection included inadequate age, unclear medical history, concomitant to diseases susceptible to introduce biases (congestive heart failure, valvular disease, renal failure, infection, cancer…).

Samples from right auricle appendages were collected from the department of cardiovascular surgery of Toulouse University Hospital at the beginning of cardiac surgery and were of extra corporeal circulation. Samples were immediately washed in cold buffer, snap frozen in liquid nitrogen and maintained at –80°C until analysis. Non used heart samples were destroyed.

RNA Extractions and cDNA labeling

Total RNA was isolated from the myocardium by using TRIzol reagent (Invitrogen, France) as described by the manufacturer. RNA integrity was checked with an Agilent Bioanalyser apparatus. cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using Strip-EZ RT mRNA labelling kit (Ambion) and α-[^{33}P]-dATP (Amersham).

DNA array hybridization and expression analysis

Hybridization to the Research Genetics membranes GF200 and GF201 were performed in UltraArray Hyb buffer (Ambion). Washes and chemical stripping were performed as recommended by Ambion. Membranes were hybridized up to five time and a diagram was generated to ensure that each membrane was used equally for each group of patients. We did not observe signal losses after four chemical strippings. This observation is

in accordance with Ambion's manual which shows that up to ten strippings are possible with this protocol. Membranes were exposed for approximately 24 hours in a cassette and revealed with a Storm 860 PhosphorImager (Molecular Dynamics). Signal intensity was analyzed with X-dot reader software (COSE) and normalized to the mean intensity from all the measured values. Results are shown as ratio of obese/control of normalized data.

Real-Time PCR control of differential expression

A set of 50 genes was randomly chosen for real-time PCR validation of the differential expression [24]. Oligos were synthetised by Proligos company and designed with Primer Express software (**Table 2**). Real time PCR was performed with the Sybergreen master mix reagent (AppliedBiosystems) in a GeneAmp 5700 apparatus. Standard curve method was used for relative quantification of the PCR products and gene expressions were normalized to 18S RNA quantification. Real-time PCR was statistically analyzed with *SigmaStat* software

Ontology clustering

Ontology clustering was performed with 2051 differentially expressed and known genes using Onto-Express Software [25].

Hierarchical clustering

Hierarchical clustering was performed on normalized X-dot reader dataset with Cluster Software and drawed with TreeView software [26]. The clustering was performed on the average linkage clustering method for the genes and the arrays.

Statistical analysis

All molecular studies were performed by investigators blind to the clinical status of the patients until the end of clustering. cDNA Array data were analyzed for statistical relevance with the use of SAM software [27]. SAM is a permutation-based technique that permits the estimation of the false discovery rate (FDR) for set of genes. The FDR is similar to *P* value in standard statistical test, but can accommodate the effects of non normal distribution in the data and multiple testing. SAM gives a lambda value for each gene on an array, which describes how likely it is that the gene is expressed differently between the two sample populations. A large value of lambda means that the gene is almost certainly expressed differentially, while a small value (close to 0) indicates that there is no evidence for differential expression. SAM was set up with a FDR <0.05.

RESULTS

Global analysis of differential expression

A differential expression of at least 3 times over the background of 2716 genes out of 11,500 was observed when compared to controls in the three patient groups. The results are depicted in **Figure 1**. DNA microarrays also revealed a set of 153 genes with non specific differential regulation and similar changes in each of the three patients groups. Up to 153 which were found to be differentially regulated in group O displayed identical regulation in group OH. 291 genes where submitted to identical regulation in groups O and OH. A limited number of 38 genes shared similar regulation within groups O and H. Finally, a set of 397 genes was identified to have a differential regulation of expression and were specific to group O. In the same way, 355 genes were found to be specifically regulated in group OH and 1299 in group H.

In order to validate the results of statistical analysis with SAM software, real-time PCR was performed on 50 randomly chosen genes identified with microarrays as displaying a differential regulation in the range of 0.07 to 7.09 (i.e. 14 fold repression or 7 fold induction) (**Table 3**). Out of the 50 oligos tested, 6 failed to amplify the cDNA in Sybergreen assays or generated several PCR products. Therefore, expression was checked for the remaining 44. A similar differential expression versus controls for 41 genes out of these 44 tested with microarrays was observed using real-time PCR (range: 0.05 to 78 (i.e. 20 fold repression or 78 fold induction) but the significance level was not reached for 7 genes. In overall, a differential expression was validated using the two methods for 84 % of the genes tested. Absence of PCR validation for 7 genes can be explained by false positive or PCR artifacts. A larger dispersion in values due to a more dynamic sensitivity of real-time PCR may also be involved in small groups.

Ontology analysis

Ontology analysis was performed on each gene cluster from the clustering analysis followed by a global ontology analysis focusing on 8 gene categories for each patient group. The results, which are depicted in **Figure 2**, show that from a qualitative point of view the profile of gene adaptation in hearts of patients from group O is quite different from that observed in patients from OH and H groups. A larger percentage of genes involved in cell cycle and developmental processes as well as in cell structure characterized by changes in the hearts from OH and H groups. Whereas, the changes in genes encoding secreted proteins, for inflammation, apoptosis or the extra-cellular matrix were more represented in the hearts from group O.

Hierarchical clustering analysis

The results of this analysis were performed on whole heart genes transcribed in hearts from patients and controls are depicted in Fig 3. Twelve clusters, numbered from 1 to 12, were identified. They are formed by groups of heart genes found to be co-regulated in each patient within each group. As indicated in the Methods section, clustering was performed by an experimented investigator blind to the clinical status of the patients.

From a global point of view, this analysis indicates that there are dramatic changes in the pattern of expression in heart between controls and each patient groups. In patients from group O, specific up-regulation of clusters 2, 10 and 12 is observed whereas genes of cluster 6 were found to be specifically down-regulated. A number of clusters displayed similar regulation in both O and OH groups (overexpressed: cluster 11; repressed: clusters 1 and 5). The pattern of regulation in O and OH groups was clearly different from that observed in patients from group H even if some clusters shared the same regulation in both OH and H groups (clusters 3, 4 and 9). Clustering analysis also shows that the pattern of heart gene expression in OH patients is not the result of additive effects of arterial hypertension and obesity. For instance, in group OH, a strong overexpression of genes from clusters 6 and 8 is observed and contrasts with the repression of this set of genes in both O and H groups. A selection of genes of interest with differential regulation ascribed to obesity or obesity-dependent hypertension is depicted in **Tables 4A and 4B** respectively. An exhaustive list of differentially expressed genes in each patient group and bibliographic references for table 4 can be found at the following web address: http://ifr31.toulouse.inserm.fr.

DISCUSSION

This study was designed to investigate the transcriptome regulations specifically related to obesity or to obesity-related hypertension in human hearts using DNA microarrays and functional genomics analysis. The main finding is that even in non-complicated obese subjects with no arterial hypertension or endocrine and metabolic disorders, strong adaptations occur in the heart at the molecular level. Moreover, this study also shows that expression profile related to obesity dramatically differs from that observed in obesity-related hypertension but also from that observed essentially in arterial hypertension.

The first question rising from our results is the quality of the population studied. Because of evident reasons, analysis of heart samples was performed on patients undergoing coronary by-pass surgery and extra-corporeal circulation and this explains why we have no true control group. However, since the reason for cardiac surgery was identical in controls and in patients groups, it can be considered that even if coronary disease may *per se* produce changes in the heart transcription profile, this factor probably would not influence the final results of the study. Apart from this point, we paid a lot of attention to selecting homogeneous groups of patients on a clinical basis and thus excluding patients with a decreased ejection fraction or diabetes mellitus. The quality of patient selection and the validity of genomic analysis appears thus to be correct. In fact, the individual variability in gene expression level within each group of subjects was quite low as indicated by the hierarchical analysis (see Fig 3.). This analysis grouped correctly the patients and the controls without the intervention of the investigator who was blind to the clinical status of the subject. As expected, the group with most heterogeneity is the group of obese and hypertensive patients. This can be explained by several factors among which the interactions between effects of obesity and of arterial hypertension surely play an important role. Moreover, some part of the variability may also be due to possible differences in fat mass deposit repartition in visceral and abdominal

territories. Once again, this variability appears acceptable since clustering software considered the patients from this group as sharing enough similarities in expression pattern to put them in the correct clinical group.

Another point is the relevance of the results obtained with a reduced number of patients and in samples from the right appendages of the heart to molecular adaptations linked to obesity. Concerning the limited number of patients, it has been shown that using similar strategies, relevant changes in gene expression in human hearts have been published [21]. Moreover, the clustering analysis has been designed to investigate transcription profile in limited surveys [26]. As discussed above, the most important factor in such an approach is the quality of patient characterization in order to build homogeneous groups and not the numbers of patients included. The choice of right appendage biopsies was made because it is the only heart tissue easily available in humans. However, this choice may have some consequences on our results. In fact, it is well established that morphological and functional changes at the cardiac level during obesity differ from that observed in isolated arterial hypertension. For instance, increased heart rate and decreased heart rate variability are frequently found in obesity in the absence of left ventricular hypertrophy in humans and in experimental models [28]. A volumetric overload which is considered as explaining obesity-related hypertension has not always the same consequences on the heart transcription profile of the right auricle and left ventricular levels in dogs made obese and hypertensive by a high fat diet [17], [16]. Thus, our data do not allow a conclusion on the putative transcriptome regulations in other myocardial chambers and specifically in the left ventricle. However, this limitation does not interfere with our main findings showing that in normotensive obese patients without diabetes mellitus or heart failure, obesity per se is associated with profound modifications of heart gene transcription and that the profile is different from that observed in obesity-related hypertension or in arterial hypertensive.

A similar conclusion comes from clustering analysis which clearly indicates that the expression profile in obese patients largely differs from that observed in controls and in hypertensive obese or non obese patients. This finding strongly suggests that in obese patients with no evidence for obesity-related cardiac complication, there is a relation between heart gene expression and adipose mass. This relation probably involves multiple adipose tissue secretions with a known effect on the heart but may also be due to the volumetric overload characteristic of obesity. Whatever, the case, this observation also suggests that changes observed in obesity could represent a patho-physiological basis for the understanding of the mechanisms driving the development of obesity-related diseases. In fact, beyond the descriptive aspect and the identification of a specific profile of transcription in the heart from obese patients we could also identify global gene adaptations in terms of physiology or biochemistry. One very interesting example was the quite opposite change (**Figure 4A and B**) in genes encoding proteins involved in the Wnt pathway in the heart from obese and hypertensive patients. The Wnt signaling pathway plays a major role in cardiac myogenesis [29], myocardial hypertrophy and heart failure [30] through various mechanisms among which the inhibition of GSK-3β activity [31] and the subsequent stabilization of the β-catenin complex [32] are examples. This leads to β-catenin translocation to the nucleus where it participates in the transcription processes through interaction with a nuclear transcription factor member of the TCF family [33]. As shown in Fig 4A, obesity is characterized by an over-expression of SRP4, an endogenous antagonist of the Wnt proteins, and not only a repressor of Wnt receptors (FDZ6 and FDZ4) but also of Dsh3, a direct inhibitor of GSK-3β activity. These changes will favor β-catenin ubiquitination and degradation in proteasomes [34] and direct repression of several transcription factors which play a pivotal role in cardiac hypertrophy such as c-myc, GATA4 and MEF2B (for review see [35]). Finally, the regulation of the Wnt/β-catenin pathway observed in the obese heart will potentially prevent the development of cardiac hypertrophy.

The mechanisms driving this regulation remain to be elucidated but they could be, at least in part, linked to the volume overload observed in obesity-related hypertension. In fact, it was recently shown that in rabbits, volume overloading induced by arteriovenous shunt provoked a decrease in expression of β-catenin and connexin 43 [36]. By contrast, to what is observed in obese hearts, the changes identified in hearts from hypertensive patients (**Figure 4B**) are consistent with decreased GSK-3β activity, nuclear accumulation of β-catenin and finally myocardial hypertrophy.

This work has several limitations apart from those discussed above. First, it does not give any information on the changes in specific cell types and thus further studies on separated cardiomyocytes or fibroblasts are required to define what kind of cardiac cells are most sensitive to the influence of obesity. Second, even if changes in gene expression were screened in order to eliminate non significant variations, we did not verify if they were associated with changes in protein expression or activity. Hence, the putative physiological significance of the regulation of the Wnt pathway in terms of proliferation remains to be confirmed by other specific studies.

In conclusion, these data demonstrate that in humans, obesity is marked by a profound and specific molecular remodeling in the right auricle which is not related to changes in blood pressure load or metabolic disturbances. Together with functional and morphological evidence, the specificity of molecular remodeling which is very different from that observed in obesity-related hypertension, strongly suggests that specific mechanisms probably having their origin in adipose tissue itself are involved. Moreover, this approach opens a wide set of opportunities to investigate putative new targets to prevent or correct cardiac morbidity related to obesity.

Acknowledgments :

S. Sokol (Toulouse Genomic Core Facilities) is acknowledged for image analysis. We are indebted to Neil Ledger (INRA, Toulouse) for critical reading of the manuscript.

References

1. O'Brien PE, Dixon JB. The extent of the problem of obesity. *Am J Surg*. 2002;184:4S-8S.
2. Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB. Annual deaths attributable to obesity in the United States. *Jama*. 1999;282:1530-8.
3. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med*. 2002;347:305-13.
4. Lukas A, Kumbein F, Temml C, Mayer B, Oberbauer R. Body mass index is the main risk factor for arterial hypertension in young subjects without major comorbidity. *Eur J Clin Invest*. 2003;33:223-30.
5. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *Jama*. 2003;289:76-9.
6. Shen BJ, Todaro JF, Niaura R, McCaffery JM, Zhang J, Spiro A, 3rd, Ward KD. Are metabolic risk factors one unified syndrome? Modeling the structure of the metabolic syndrome X. *Am J Epidemiol*. 2003;157:701-11.
7. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 1995;269:546-9.
8. Saye JA, Cassis LA, Sturgill TW, Lynch KR, Peach MJ. Angiotensinogen gene expression in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol*. 1989;256:C448-51.
9. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;221:286-9.
10. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259:87-91.
11. Burt DW, Boswell JM, Paton IR, Butterwith SC. Multiple growth factor mRNAs are expressed in chicken adipocyte precursor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187:1298-305.
12. Karason K, Molgaard H, Wikstrand J, Sjostrom L. Heart rate variability in obesity and the effect of weight loss. *Am J Cardiol*. 1999;83:1242-7.
13. La Rovere MT, Bigger JT, Jr., Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet*. 1998;351:478-84.
14. Galinier M, Pathak A, Fourcade J, Androdias C, Curnier D, Varnous S, Boveda S, Massabuau P, Fauvel M, Senard JM, Bounhoure JP. Depressed low frequency power of heart rate variability as an independent predictor of sudden death in chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2000;21:475-82.
15. Kikuya M, Hozawa A, Ohokubo T, Tsuji I, Michimata M, Matsubara M, Ota M, Nagai K, Araki T, Satoh H, Ito S, Hisamichi S, Imai Y. Prognostic significance of blood pressure and heart rate variabilities: the Ohasama study. *Hypertension*. 2000;36:901-6.
16. Philip-Couderc P, Smih F, Pelat M, Vidal C, Verwaerde P, Pathak A, Buys S, Galinier M, Senard JM, Rouet P. Cardiac transcriptome analysis in obesity-related hypertension. *Hypertension*. 2003;41:414-21.
17. Pelat M, Verwaerde P, Merial C, Galitzky J, Berlan M, Montastruc JL, Senard JM. Impaired atrial M(2)-cholinoceptor function in obesity-related hypertension. *Hypertension*. 1999;34:1066-72.
18. Paoni NF, Lowe DG. Expression profiling techniques for cardiac molecular phenotyping. *Trends Cardiovasc Med*. 2001;11:218-21.
19. Henriksen PA, Kotelevtsev Y. Application of gene expression profiling to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2002;54:16-24.
20. Barrans JD, Stamatiou D, Liew C. Construction of a human cardiovascular cDNA microarray: portrait of the failing heart. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280:964-9.
21. Tan FL, Moravec CS, Li J, Apperson-Hansen C, McCarthy PM, Young JB, Bond M. The gene expression fingerprint of human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:11387-92.
22. Kaynak B, von Heydebreck A, Mebus S, Seelow D, Hennig S, Vogel J, Sperling HP, Pregla R, Alexi-Meskishvili V, Hetzer R, Lange PE, Vingron M, Lehrach H, Sperling S. Genome-wide array analysis of normal and malformed human hearts. *Circulation*. 2003;107:2467-74.
23. Friddle CJ, Koga T, Rubin EM, Bristow J. Expression profiling reveals distinct sets of genes altered during induction and regression of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:6745-50.
24. Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods*. 2001;25:443-51.

25. Draghici S, Khatri P, Bhavsar P, Shah A, Krawetz SA, Tainsky MA. Onto-Tools, the toolkit of the modern biologist: Onto-Express, Onto-Compare, Onto-Design and Onto-Translate. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:3775-81.
26. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14863-8.
27. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5116-21.
28. Verwaerde P, Senard JM, Galinier M, Rouge P, Massabuau P, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M, Montastruc JL. Changes in short-term variability of blood pressure and heart rate during the development of obesity-associated hypertension in high-fat fed dogs. *J Hypertens*. 1999;17:1135-43.
29. Nakamura T, Sano M, Songyang Z, Schneider MD. A Wnt- and beta -catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5834-9.
30. Wang X, Gerdes AM. Chronic pressure overload cardiac hypertrophy and failure in guinea pigs: III. Intercalated disc remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:333-43.
31. Salic A, Lee E, Mayer L, Kirschner MW. Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in Xenopus egg extracts. *Mol Cell*. 2000;5:523-32.
32. Miller JR, Moon RT. Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev*. 1996;10:2527-39.
33. Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca2+ pathways. *Oncogene*. 1999;18:7860-72.
34. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J*. 1997;16:3797-804.
35. Hardt SE, Sadoshima J. Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res*. 2002;90:1055-63.
36. Itoh M, Takeishi Y, Nakada S, Miyamoto T, Tsunoda Y, Takahashi H, Kubota I, Tomoike H. Long-term treatment with angiotensin II type 1 receptor antagonist, CV-11974, restores beta-catenin mRNA expression in volume-overloaded rabbit hearts. *Heart Vessels*. 2002;17:36-41.

Legends of Figures and Tables

Figure 1: Wenn's diagram of global results of differential expression analysis in obese patients and in patients with arterial hypertension with or without obesity. The genes used for this representation are those for which a differential regulation of expression measured in controls was found when using DNA microarrays.

Figure 2: Percentage of gene categories among obese (white bars), hypertensive and obese (grey bars) and non obese hypertensive patients (black bars). This figure was built using the genes specifically differentially expressed in each of the three groups vs controls (see Figure 1).

Figure 3: Hierarchical clustering of heart expressed genes in obeses (O), obese and hypertensive (OH), non obese hypertensive (H) patients and control subjects (C). Each column represents a single patient and each row a single clone. Normalized expression levels of clones is color-coded. A selected list of genes in each cluster of interest with obesity specific or dependent regulation is depicted in Tables 4A and 4B.

Figure 4: Schematic representation of Wnt pathway changes in hearts from obese (4A) and hypertensive patients (4B).

Table 1: Characteristics of patients. Group O: normotensive obeses, group OH: obese and hypertensive patients, group H: hypertensive non obese patients. BMI:

body mass index, BP: blood pressure, EF: ejection fraction. Values are presented as mean±sem. * : $p < 0.05$.

Table 2: Details of oligos used for real-time PCR analysis. Genes were randomly selected from those which were found to be regultated with DNA microarrays.

Table 3: Comparison of DNA array analysis and real-time PCR. Genes were randomly chosen among the full set of 2796 genes found to be statistically differentially regulated by SAM analysis. Genes are organized according to their correspondant cluster defined by hierarchical analysis. ↓ Down regulation ; → No change ; ↑ Up regulation.

Table 4 : **(A)** Selection of genes with regulation specifically related to obesity. Genes were organized according to their main function. For each one, accession number is given as well as a reference on its biological role. **(B)** Selection of differentially expressed genes from obese hearts. Hierarchical analysis considered this set as obesity dependent. As in Table 4A, accession number is depicted as well as the main biological function.

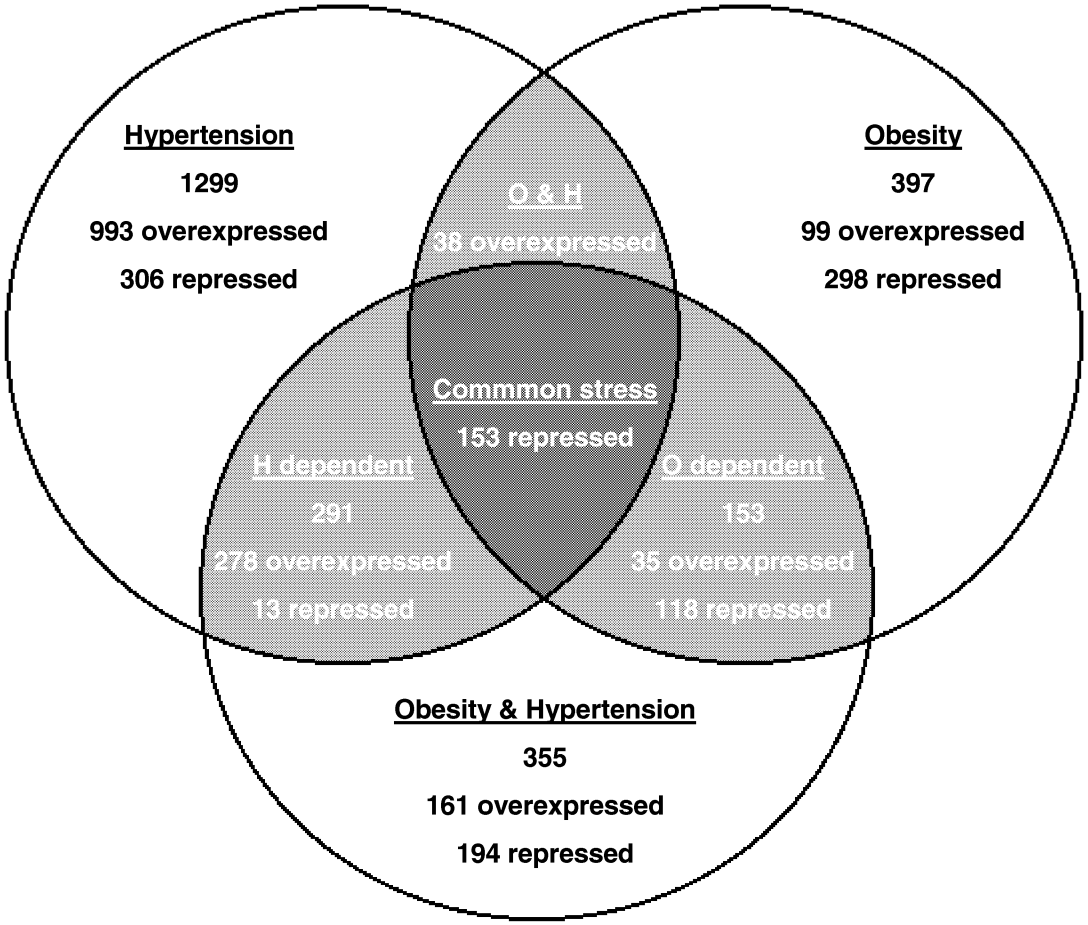

Hypertension
1299
993 overexpressed
306 repressed
Obesity
397
99 overexpressed
298 repressed
O & H
38 overexpressed
Commmon stress
153 repressed
H dependent
291
278 overexpressed
13 repressed
O dependent
153
35 overexpressed
118 repressed
Obesity & Hypertension
355
161 overexpressed
194 repressed

Figure 1

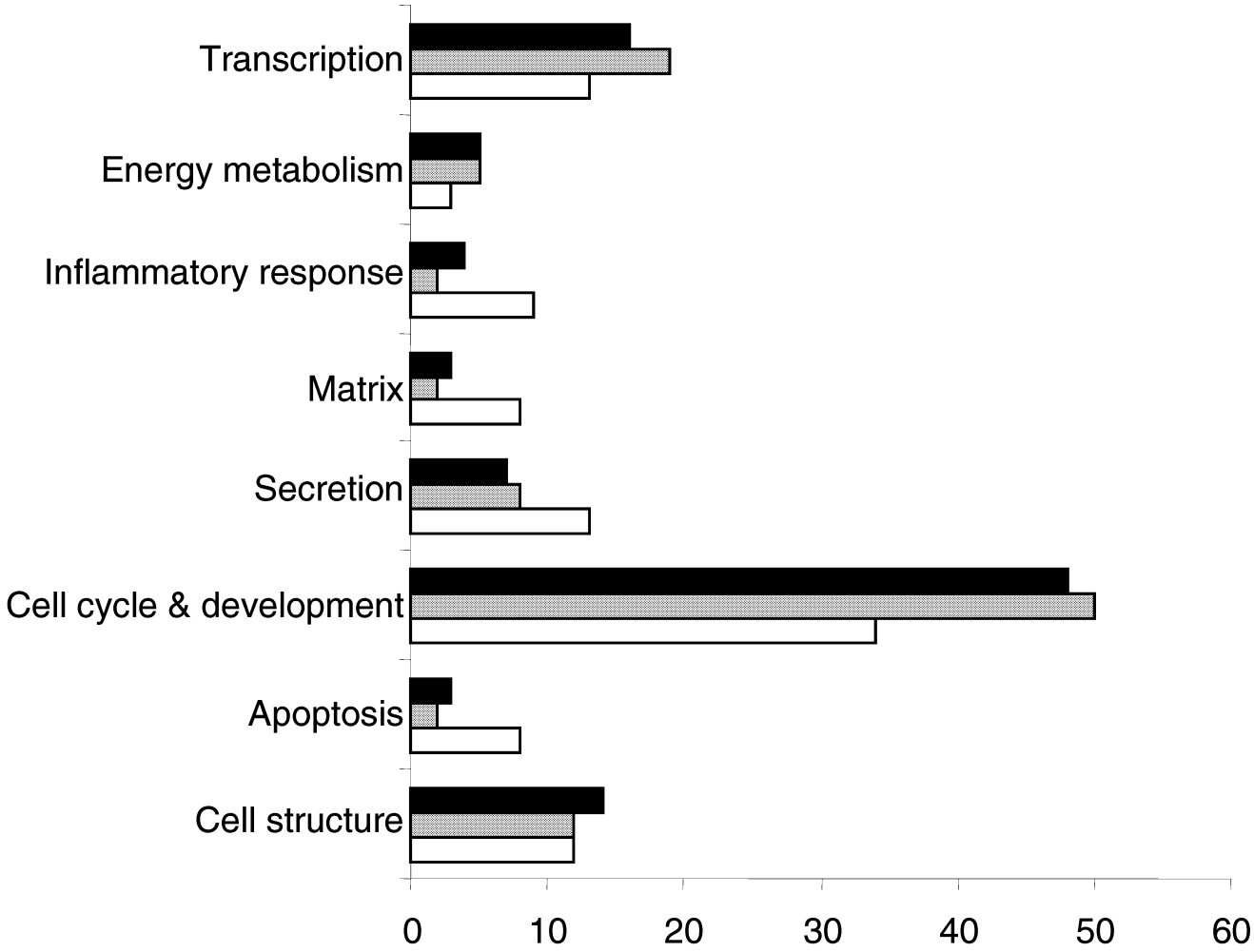

Transcription
Energy metabolism
Inflammatory response
Matrix
Secretion
Cell cycle & development
Apoptosis
Cell structure
0
10
20
30
40
50
60

Figure 2

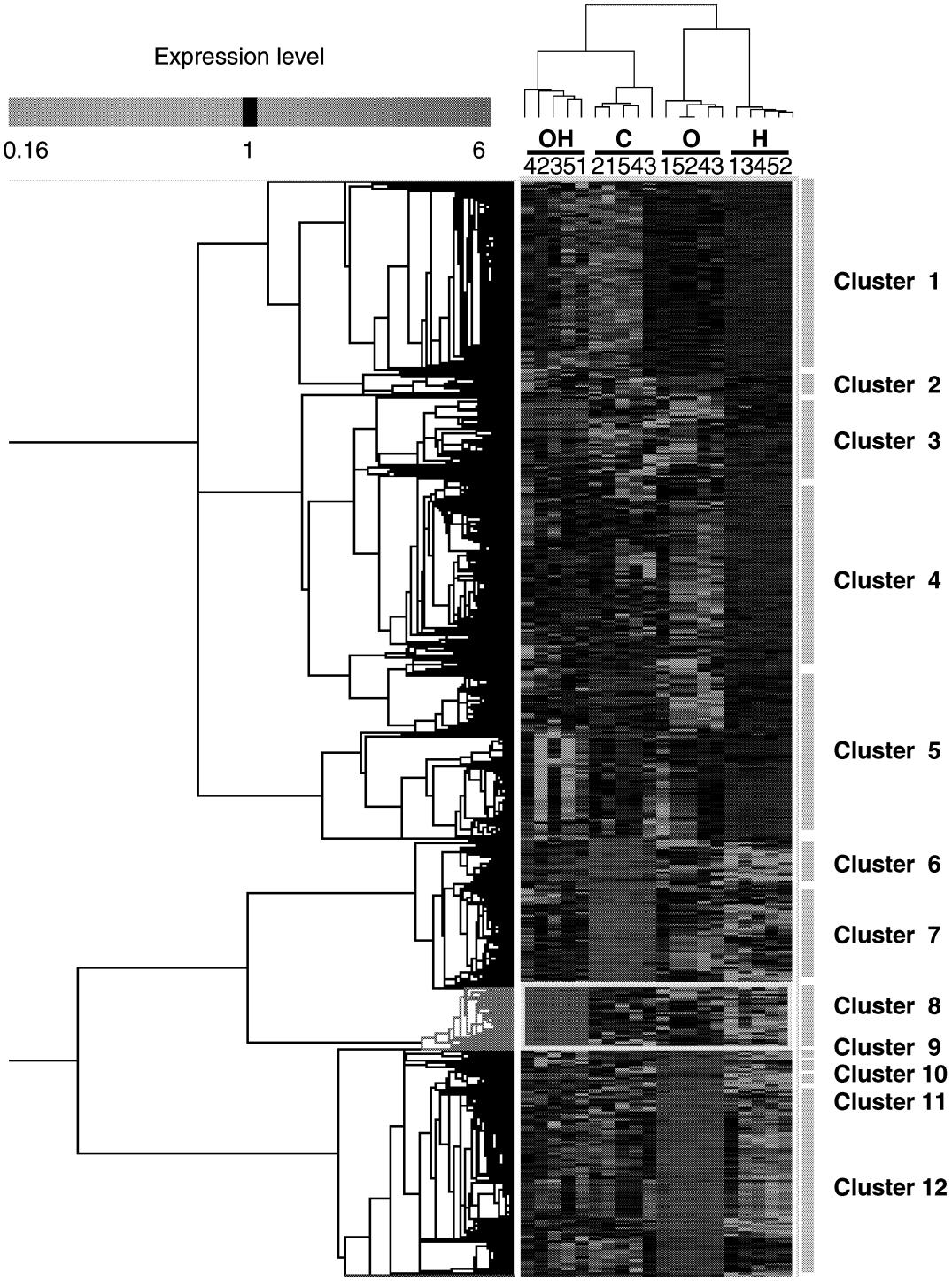
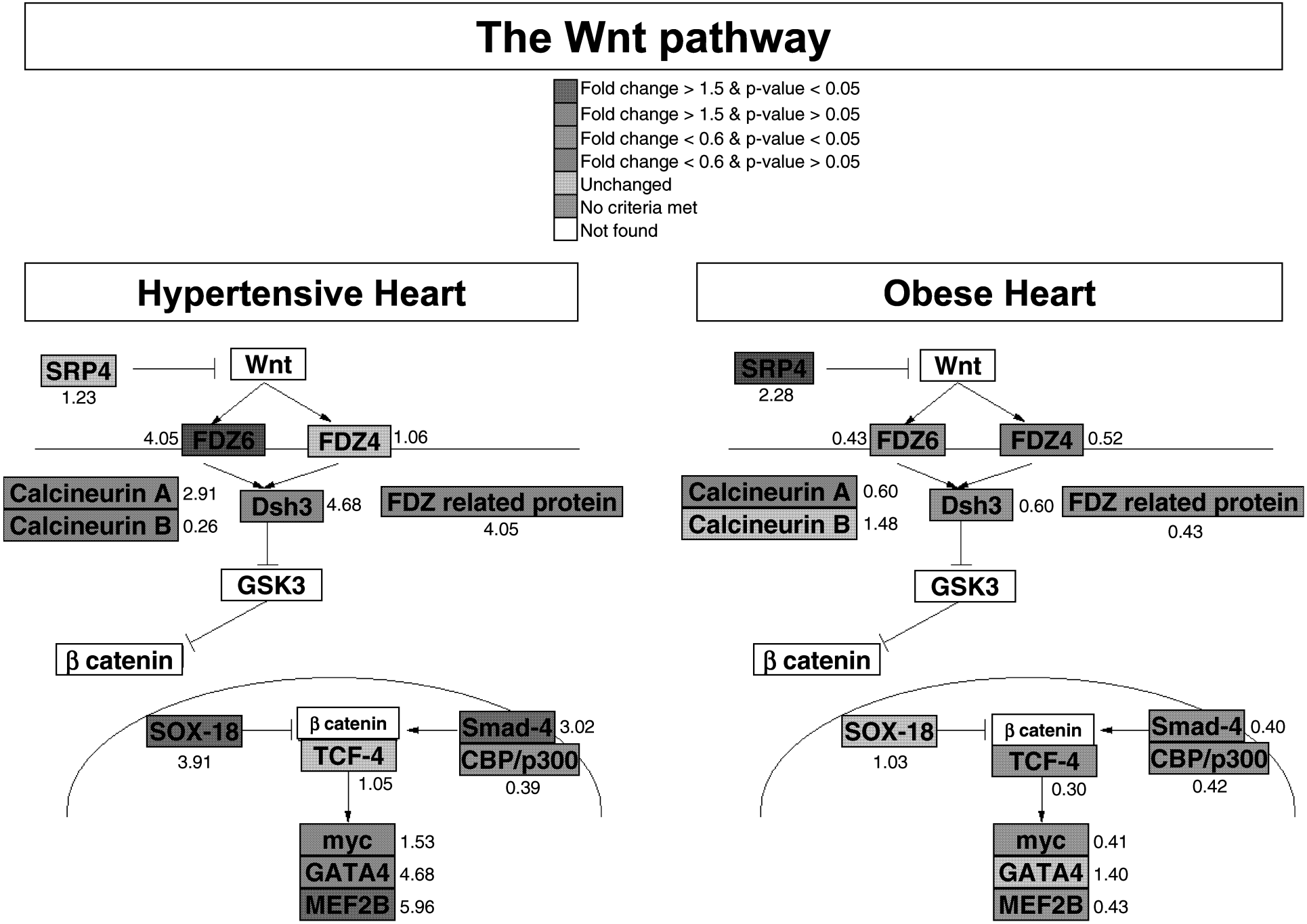

Expression level
0.16
1
6
OH
C
O
H
42351 21543 15243 13452
Cluster 1
Cluster 2
Cluster 3
Cluster 4
Cluster 5
Cluster 6
Cluster 7
Cluster 8
Cluster 9
Cluster 10
Cluster 11
Cluster 12

Figure 3

The Wnt pathway



	Sex (M/F)	Age (years)	BMI (kg/m^2)	BP (mmHg)	HR (bpm)	EF (%)	Glycemia (g/l)
Controls	4/1	59±9	23.5±0.7	119±8/66±4	74±4	62±2	1.0±0.1
Group O	5/0	66±9	30.4±0.2*	123±2/73±3	68±4	61±1	1.0±0.1
Group OH	5/0	67±3	31.3±0.6*	146±3/70±3*	67±2	59±2	1.0±0.1
Group H	3/2	69±4	23.4±1.1	142±3/79±8*	66±11	67±6	1.0±0.1

Table 1:

Table 2:

Accession n°	Gene	Forward	Reverse
W63749	BCL2	CAAATTCTACCTTGGAGGGAAAAAC	CATGCACCTAAACCTTTTGGAAA
AA131406	CXCL9	TTCAGGGAAGTTACATGAAGGAACT	GAGTGCTGTCCGGTGGAGAT
AA025819	GAS1	TGTTCTAAATATAGCACACTTCACAATGG	CCCCCCTGAAATGTATAGAATCC
W86199	IDE	CAAGGCTGGTGCTTGTGACA	GCCAGGGAAATGGATTCTTGT
T62491	CXCR4	AAATGATCCCCCAGGCTGTT	TAAGGAACCGGGAAAAAAACG
AA700054	ADFP	TGCGGCTCTAGCTTCTGGAT	GATGGCAGAGAACCGTTTGAA
H29256	CACNA1D	AATTTTAACCCCAGAGGATTTTCG	ATTTTTACTCGGGCTATCCAGAAG
AA004447	PRPSAP1	CTGTGTGTGGCATGGGACAT	TGTCACATCGTGGCCTTTTG
AA018372	GLUD1	TTGTTCCTCCCCAGCACCTA	GCCTCCTTTATCTTGGCTTGTG
AA040617	TGFB3	CAACTGTATTGGGCCTTTTGG	GGACCCAGAGGGCAGACA
AA135289	GPX2	GGCTTCCCTTGCAACCAATT	GCTTGGAGGGACATCTCGAA
AA136283	BACE	GAGGCAATCTTTGCACCAATG	AGGAGAGGATGCACAGTTTGCT
AA156030	ZNF131	GAAATATACTTCTCAAAACTCCCCTTCA	ATTGATTCCCCTCCCCCTACT
AA256123	FHIT	GCAGCAGAGAAGGAAGTTTAATCAT	AACGGCTCAGACAGGCAGAT
AA284275	EST	AGGCCCCCAAAAGATGAACT	GTGCCGTTGCCTTTGCA
AA427490	KCNH2	TGCTAGAATGAACCACATGCAGTA	ACAAATACACACCCCCACAAAAC
AA427740	PASK	TCTAAAATAATACAGCATCACTGTCTTCTG	CATCCCCAATTCACCTTCTAAAA
AA427940	PLN	TGCGGACCCACGAATTGT	GAACTTGTTGGCCCATCTATTACA
AA430545	KIAA0056	GGAACGAGGCACGTTTGG	CCGGCCTTCAATTTTCTCTTT
AA431631	GATA4	TCCCGCTCTGAGCGATTC	TGGCTAAACTACCCAGCTCTTGT
AA434130	TXNRD2	AGTGATGACATCTTCTGGCTGAAG	GCACACTACCAGGGCCACAT
AA448190	AVPR1A	TGCTCGCACCCTGTGTCA	TCACGATCACAAAAGTCATCTTCA
AA453231	CCNC	AAAACCACCTCCAAACAGTGAAG	GGAATGTTTTAAGATTGGCTGTAGCT
AA464791	HYAL1	TCCAGATCTTCTATGACACGACAAA	CCCTGGGCCGCACTCT
AA486313	LRPAP1	GGACTGGGTACACGTGAAAACA	CCCCAATGCCTTCAGAGTTC
AA489729	Fragile X mental retardation	GCCAGTGACTGTGGCTGACTATA	CTGAGGGTTTAGTGCGTTCCA
AA504461	FXR2	CACAAATGCCAAATGTACACAGTGT	ACCCCTACCCACTTCCATTCC
H07880	CCT6A	TGAAGCTTGGGACAAAAATTCC	CTCCTGTATCCTGAATCCTTGAAGA
H09590	EIF4A1	TCCACCTCGGACCGATTCT	AGCAGGTTTCTTTAGTCATCAACTATGA
H11003	EDN1	CACTGATGGGAAGCCAGTGA	CAGCGTCCCTCGTTCAAAAC
H15842	APOD	CAACAAGTTTATTTTGCAGCTAGCA	CAACCACGACAAAGGAAGTTGA
H21045	ADORA1	AGGGCACACCCAATTTCCA	CGAGTTGACCTTCTGAACATGAGT
N54596	IGF2	CTGTCCTCCCCTCCTTTGGT	GGCTCCTCACTCCCTTTTCC
N92901	FABP4	TGTAGAGTTCAATGCGAACTTCAGT	GGCGTCACTTCCACGAGAGT
R07295	SOAT1	GGAATGGGCTTTTCAACTTCAT	AGAGAAGTCCCACATCCAGAACA
R12802	UQCRC2	CTCTCTCCTGTAATGTGTGCATCA	TCAATGGCAGCAAGTGGAAA
R38539	FGF2	TCCCTCCCAATGTTTCATTCA	GGGAACCCGGATGGAAAA
R44290	DCT4	CTGGTCTCAAGTCAGTGTACAGGTAAG	CCAACTTGAGATGTATGAAGGCTTT
T67005	EDN3	ATGTGCCCCAGAGCATGAC	GGCTTTCCAACTTGCCAAAA
T71782	ACOX2	GCAGGGTTCTCCTGAGTATTGG	TGGCTGTTATGATGGAAACGTCTA
T89084	KCNV1	ATGAATGTCAAAATGCCTGCAA	ACAAAAAAATACTATGGACAGCTTTCTG
T99236	Jun B	CCCGCGGGCTTGAGTAC	CCTGCTGGAAACAGACTCGAT
W00992	MYO9A	CCCCTTCCTCCTGGATACTCA	GCTATGCAGCAGGAGGAGAGA
W23757	KRT13	AGTTGAGAAACCAAAGCGTATCC	CTGATGGTGGGCCCTCTGT

		DNA-microarrays		*Quantitative real time PCR*	
GenBank accession N°	**Name**	**P value**	**Fold change C vs O**	**P value**	**Fold change C vs O**
AA256123	fragile histidine triad gene	0.00111	0.24 ↓	0.005	0.05 ↓
AA489729	fragile X mental retardation. autosomal homolog 2	0.0431	0.40 ↓	0.058	0.12 ↓
W63749	B-cell CLL/lymphoma 2	0.03473	0.46 ↓	0.034	2.13 ↑
AA131406	monokine induced by gamma interferon	0.00478	0.48 ↓	0.041	0.37 ↓
H09590	eukaryotic translation initiation factor 4A. isoform 1	0.02326	0.48 ↓	0.023	0.05 ↓
AA025819	growth arrest-specific 1	0.00752	0.52 ↓	0.048	0.53 ↓
N92901	fatty acid binding protein 4	0.00792	0.65 ↓	0.028	0.51 ↓
AA427940	phospholamban	0.006	0.65 ↓	0.0098	0.35 ↓
W86199	insulin-degrading enzyme	0.03375	1.53 ↑	0.052	1.74 ↑
AA504461	low density lipoprotein receptor	0.01319	1.68 ↑	0.018	3.90 ↑
H21045	adenosine A1 receptor	0.0352	1.84 ↑	0.003	6.46 ↑
H11003	endothelin 1	0.0092	1.87 ↑	0.057	78.5 ↑
AA486313	low density lipoprotein-related protein-associated protein 1	0.00759	2.04 ↑	0.046	16.6 ↑
AA700054	adipose differentiation-related protein	0.03459	2.18 ↑	0.025	3.46 ↑
N54596	insulin-like growth factor 2	0.00601	2.65 ↑	0.036	6.58 ↑
H29256	calcium channel. voltage-dependent. L type. alpha 1D	0.02382	3.34 ↑	0.003	2.08 ↑

		DNA-microarrays		*Quantitative real time PCR*	
GenBank accession N°	**Name**	**P value**	**Fold change C vs OH**	**P value**	**Fold change C vs OH**
R07295	sterol O-acyltransferase 1	0.03275	0.17 ↓	0.045	0.71 ↓
T71782	acyl-Coenzyme A oxidase 2. branched chain	0.04276	0.23 ↓	0.040	0.38 ↓
AA489729	fragile X mental retardation. autosomal homolog 2	0.00962	0.30 ↓	0.054	0.50 ↓
AA256123	fragile histidine triad gene	0.00074	0.31 ↓	0.027	0.38 ↓
H09590	eukaryotic translation initiation factor 4A. isoform 1	0.01975	0.38 ↓	0.007	0.21 ↓
AA018372	glutamate dehydrogenase 1	0.00045	0.55 ↓	0.032	0.31 ↓
N54596	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	0.00405	2.14 ↑	0.006	31.8 ↑
AA453231	cyclin C	0.01002	2.32 ↑	0.009	2.46 ↑
T99236	jun B proto-oncogene	0.00739	2.58 ↑	0.007	3.47 ↑
AA431631	GATA-4	0.03053	2.99 ↑	0.033	2.97 ↑
H21045	adenosine A1 receptor	0.00074	2.26 ↑	0.012	10.5 ↑
H15842	apolipoprotein D	0.00059	2.77 ↑	0.028	2.80 ↑
AA040617	transforming growth factor. beta 3	0.0098	2.78 ↑	0.043	1.87 ↑
H07880	chaperonin containing TCP1 subunit 6A (zeta 1)	0.0045	7.09 ↑	0.030	1.83 ↑

		DNA-microarrays		*Quantitative real time PCR*	
GenBank accession N°	**Name**	**P value**	**Fold change C vs H**	**P Value**	**Fold change C vs H**
R38539	fibroblast growth factor 2 (basic)	0.00598	0.07 ↓	0.046	0.50 ↓
H09590	eukaryotic translation initiation factor 4A. isoform 1	0.0063	0.26 ↓	0.033	0.47 ↓
AA256123	fragile histidine triad gene	0.00117	0.34 ↓	0.010	0.13 ↓
AA489729	fragile X mental retardation. autosomal homolog 2	0.02499	0.40 ↓	0.031	0.64 ↓
AA448190	arginine vasopressin receptor 1A	0.0052	0.46 ↓	0.063	0.82 ↓
W00992	myosin IXA	0.00647	0.50 ↓	0.039	0.50 ↓
AA427490	potassium voltage-gated channel. subfamily H (eag-related). member 2	0.00936	0.51 ↓	0.041	0.62 ↓
H15842	apolipoprotein D	0.04014	0.55 ↓	0.047	0.15 ↓
AA018372	glutamate dehydrogenase 1	0.00017	0.56 ↓	0.019	0.23 ↓
AA427940	phospholamban	0.00736	0.66 ↓	0.035	0.30 ↓
AA504461	low density lipoprotein receptor	0.01021	1.54 ↑	0.040	2.19 ↑
AA486313	low density lipoprotein-related protein-associated protein 1	0.01348	1.62 ↑	0.054	0.58 ↓
H11003	endothelin 1	0.00323	1.73 ↑	0.078	0.98 →
AA004447	ESTs	0.00001	2.92 ↑	0.069	12.7 ↑

Overexpression (Cluster 2, 10 & 12)	**Genes**	**Accession #**	**Associated function**
Metabolism	-Low density Lipoprotein Receptor -Insulin-degrading enzyme -Sterol Oacyltransferase (ACAT) -LDLR associeted protein 1	AA504461 W86199 R07295 AA486313	Cholesterol metabolism. Insulin signaling. Expressed during heart development. Cholesterol metabolism. Cholesterol metabolism.
Signal transduction	-GRB2-associeted binding protein 1	N68193	Heart development.LVH. Fibrosis.
Circulation	-Endothelin 1 -Fibrinogen gamma	H11003 T52652	Vasoconstriction. Na^+/K^+ and Ca^{2+} transport. Vasoconstriction. Syndrome X metabolic.
Regulation of cell proliferation	-WEE 1 -PTEN -Fanconi Anemia, Complementation group G -Von Hippel-Lindau Syndrome -Secretd Frizzled-Related Protein 4	AA039640 W37864 AA430675 R54177 AA486838	CDC2/cyclin B inhibition. Expressed in heart. Tumor suppressor. Tumor suppressor. Tumor suppressor. Wnt pathway. Barometric overload.
Transcription factors	-Thyroid hormone receptor interactor 13 -Hairy/enhancer-of-split related -Exision repair cross-complementing rodent repair deficiency -ELL-related RNA polymerase II -Interferon regulatory factor 7 - prostaglandin F2 receptor negative regulator -Nuclear receptor coactivator 3 -TEA domain family member 3 -BTAF1 RNA polymerase II -TATA box binding protein	T74142 R27319 H20908 AA284232 AA443090 N63283 AA156793 AA150053 AA120777 N50549	Increase heart rate. Increase mRNA If (pace-maker current) Presumed to be involve in heart development Helicase activity. DNA dammage repair. Elongation factor super-activated interferon-regulatory factors PK c activation Heart development Development Low expression in normal heart
Channels	-Ca2+ channel, voltage-dependent, L-type, alpha 1D suunit -Inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor 2	H29256 AA479093	Voltage dependent but G protein independent activation Atria arrythmia.
Inflammation	-Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5 -Tumor necrosis factor, alpha-indiced protein 1 -Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 -Chemokine ligand 13	H98636 AA456314 W93163 AA041396	Dilated cardiomyopathy. Heart failure. Obesity. Induced PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor) and HSP (Heat Schock Protein) expression..
Repression			
Signal transduction	-Chemokine ligand 9 -Amine oxydase, copper containing 3 (protein 1) -Phopholipase C, beta 4 -Thyroid hormone receptor interactor 10 -Spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin) -Striatin, calmodulin binding protein 4 -Keratin 19 -Filamin A, alpha (actin binding protein280)	AA970872 AA036974 W49563 R49671 T60235 AA922379 AA464250 AA598978	 Vascular adhesion. Presumed to be involve in TGF β pathway and heart development

TABLE 4A

Overexpression **(Cluster 11)**	**Genes**	Accession #	**Associated function**
Receptors	-Adenosine A1 receptor -Arginine Vasopressin Receptor 1A	H21045 AA448190	Preconditionning. Coronary Vasodilatation Blood volume and arterial pressure regulation. Increase inotropy and cell proliferation
K+ transport	-K+ Voltage-Gated Channel, subfamily H, member 2	AA427490	Repolarisation. QT long syndrome
Cell-cell signaling	-Fibroblast growth factor 2 (basic) -Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	R38539 N54596	LVH. Heart development
Cell motility	-Formyl peptide receptor-like -ACTB: actin, beta	R80041 AA838335	Protection against ischemia.
Repression **(Clusters 1 & 5)**			
Neurogenesis	-Fatty acid binding protein 7 -Seven in absentia homolog 1 (Drosophila) -NGFI-A binding protein 2 -Dihydropyrimidase-like 5	N46862 T71889 AA434487 R20639	Expressed in heart TGF β pathway modulator via Smad-7 LVH
Receptors	-Putative G protein coupled receptor -Cannabinoid receptor 1 (brain) -Colony stimulating factor 1 receptor -Interleukin 6 receptor -Protein tyrosine phosphatase, receptor type O -Glutamate receptor, ionotropic, kainate 2 -Colony stimulating factor 3 receptor -Fibroblast Growth Factor Receptor 1 -Integrin, beta 4 -G protein-coupled receptor 19	N95435 R20626 AA284954 T52330 R42433 H15417 AA443000 AA281189 AA485668 H07878	Unknwon receptor Diminution of Norepinephrine secretion Overexpressed in LVH with macrophage infiltration from SHR rat. Proinflamatory response. Heart Failure marker AT2 signalling on Ca2+ T channel and proliferation. Negative regulator of insulin signal. Vagal nerve projecting to heart activity modulation Proliferation Heart development Heart development Heart development. Highly expressed in adult heart
Heart development	-Lamin A/C -Smad-4 -Transcription Factor 12 -T-Cell Transcription Factor 4 -Retinoic acid receptor, gamma -Frizzled homolog 6 -MYCN: v-myc -Dishevelled 3	AA489582 AA496022 AA488497 AA417665 AA496438 T68333 R66447 W84790	Dilated cardiomyopathy implication. Atioventricular arrythmia. Heart development & LVH Regulation of myogenic factors MYF. Myogenesis Heart development. Wnt pathway. LVH Heart development Heart development. Wnt pathway. LVH Heart development. Wnt pathway. LVH Heart development. Wnt pathway. LVH
Chloride channel	-Chloride channel 3 -Chloride Channel Nucleotide Sensitive 1A)	AA461332 T52435	Repolarisation. Cardiomyocyte volume regulation

TABLE 4B

SYNTHESE

Suite à l'identification de la diminution de l'expression du récepteur M_2 dans l'OD de chiens obèses hypertendus [365], ce travail de thèse poursuivait l'étude au niveau moléculaire de la contribution du système nerveux parasympathique dans le cœur de l'obèse hypertendu. Des investigations plus poussées dans la transduction du signal intracellulaire du récepteur M_2, notamment dans la voie M_2 / eNOS, nous ont permis d'observer une augmentation des taux d'ARNm de la eNOS dont la stimulation entraîne la synthèse de NO et l'activation de la guanylyl cyclase cytosoluble (**Publication n°1**). Ce phénomène compensatoire de surexpression de la eNOS a été préalablement décrit au niveau vasculaire et cardiaque dans un modèle d'hypertension artérielle génétique (rat SHR). Chez le chien obèse hypertendu, cette surexpression paraît tissu spécifique et va à l'encontre de la diminution des récepteurs M_2. Ce qui suggère encore une fois que les phénomènes compensatoires sont complexes et qu'aucun des acteurs moléculaires de la cellule ne peut être négligé pour élucider les mécanismes physiopathologiques.

Les études sur l'effet de l'adrénomeduline sur le récepteur M_2 ont permis de montrer que l'adrénomeduline constituait un des rares signaux plasmatiques contribuant à une *up-régulation* du récepteur M_2. Dès lors, cette découverte montrait à nouveau que des phénomènes compensatoires visant à rééquilibrer la balance sympatho-vagale au niveau des cardiomyocytes atriaux existaient (**Publication n°2**)[399]. Cette étude *in vitro* demande à être vérifiée *in vivo* en étudiant l'effet de l'AM sur la variabilité sinusale.

Comme les régulations de l'expression génique s'avéraient de plus en plus vastes, avec des phénomènes compensatoires surenchérissant à la complexité de la signalisation, nous avons entrepris de définir une représentation globale des variations d'expression géniques afin

d'être en mesure d'apprécier toutes les voies potentiellement impliquées. L'émergence des banques d'ADNc ordonnées (*DNA-microarrays*) allait permettre d'obtenir ce profil de l'expression génique cardiaque du cœur obèse hypertendu.

Tout d'abord, les recherches au niveau de l'OD chez des chiens obèses et hypertendus depuis 9 semaines ont permis d'identifier que les voies de signalisation affectées convergeaient vers l'augmentation du métabolisme énergétique mitochondrial, le remodelage de la matrice extracellulaire, les flux ioniques calcique et sodiques, la voie TGFβ (TRIP-1) et TNF α (TRABID), des marqueurs de prolifération et de nombreux gènes inconnus. Ces observations seulement visibles au niveau des ARNm suggéraient la mise en place précoce de systèmes compensatoires destinés initialement à maintenir la physiologie cardiaque. Alors que MMP-9 était déjà impliquée dans le remodelage cardiaque, des mécanismes compensateurs de la surexpression des MMP-9 ont été montrés, pour la première fois, au travers de la surexpression de LEC-3 et de la répression des N-acétylgalactosamines transférases. Le remodelage matriciel (suggéré par la surexpression de MMP-9) et la prolifération (suggérée par la surexpression de la nucléphosmine) préfigurent l'hypertrophie compensatoire future dans ce modèle (HVG et dilatations de toutes les cavités cardiaques à 20 semaines d'engraissement) [358]. La diminution de l'expression concomitante de SERCA-2 et des phospholambans, conjuguée à la diminution de l'expression des pompes Na^+/K^+ ATPase, font penser qu'elles pourraient favoriser une surcharge calcique et sodique allant dans le sens de la tachycardie et des dysfonctions diastoliques observées chez ces chiens **(Publication n°3-4)**[400,401]. Cette étude a été en mesure d'impliquer 11 gènes dont la fonction est inconnue à ce jour (dont 4 ont été séquencés pour la 1ière fois). Ceci constitue un premier pas dans leur fonction potentielle et dans la constitution nouvelles cibles thérapeutiques. L'analyse bioinformatique des séquences protéiques, extrapolées à partir des séquences ADNc, a permis d'approfondir ces recherches sur 2 candidats PPR1 & PPR2. La méthode du *southwestern-*

blot a permis d'identifier *in vitro* que PPR2 avait une affinité spécifique pour l'ADN et d'identifier une 30aine de séquences ADN potentielles de liaison. L'analyse de ces séquences avec le logiciel *MEME* a permis de dégager un motif redondant (fig. 21).

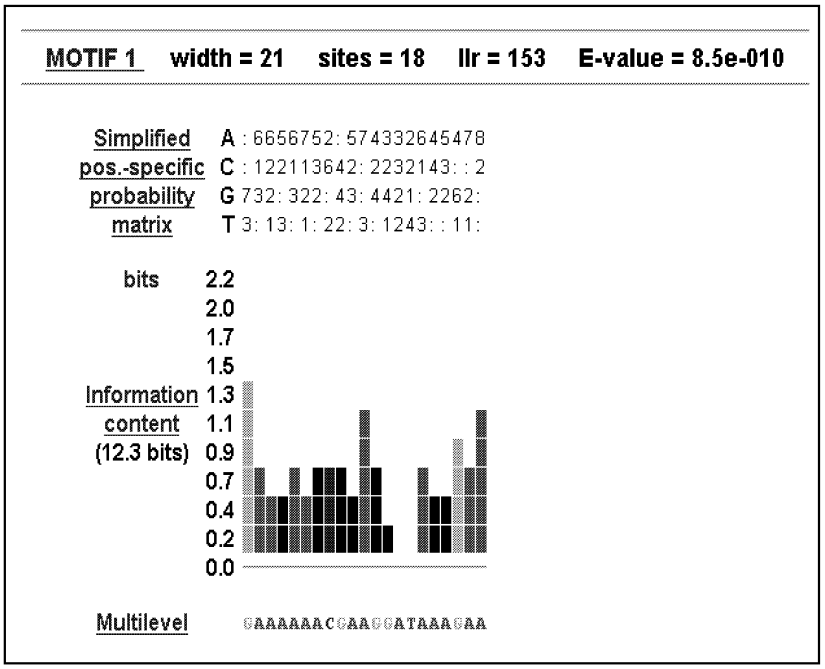


Fig. 21 : Analyse des séquences affines pour PPR2 par le logiciel *MEME*.

Le motif réduit à 8 bases (GAAAAAAC) a été retrouvé dans les zones 5'régulatrices des gènes suivants : le récepteur β3-adrénergique, le récepteur à la ryanodine, le collagène 10, la *serum amyloïd protein*, les *D-loop mitochondrial region*, les endopeptidases 16.22, erb-2, PPARγ et l'apolipoprotéine B.

L'élaboration d'un anticorps, chez le lapin, dirigé contre 2 peptides synthétiques extrapolés à partir de la séquence ADNc de PPR1, a permis de localiser cette protéine dans la fraction HDL3 des lipoprotéines (Fig. 22).

Ceci constitue la première confirmation de l'implication de PPR1 dans les apolipoprotéines.

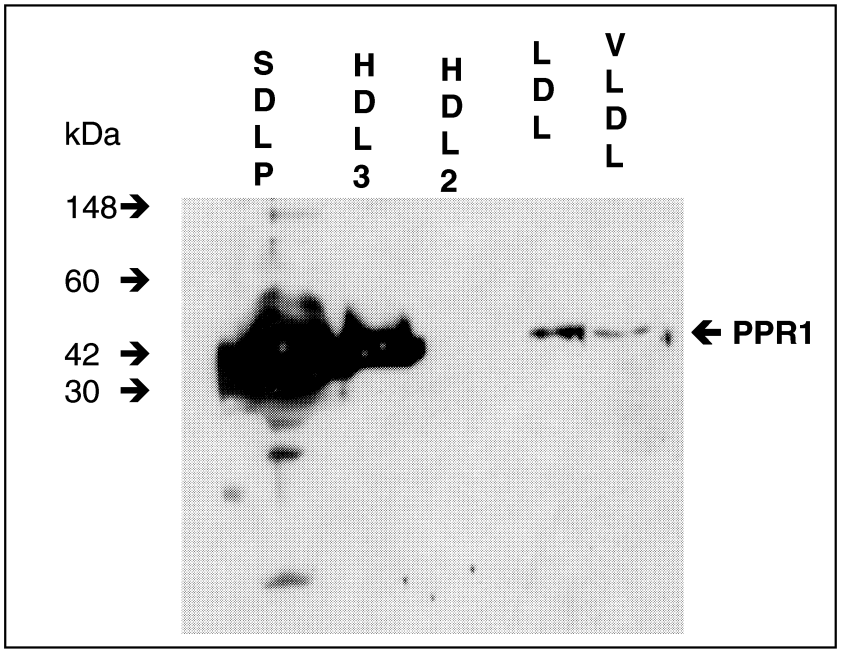


Fig. 22 : Analyse par western-blot de PPR1 dans les lipoprotéines.

Puis nous avons entrepris d'identifier l'évolution cinétique globale du transcriptome ventriculaire chez des chiens obèses hypertendus depuis 9, 10, 15 ou 24 semaines. Cette étude a fait ressortir que le profil transcriptionnel cardiaque évolue profondément sur de courtes périodes puisque d'une semaine à l'autre les gènes impliqués s'avèrent différents. Cette étude a impliqué la prostglandine synthase D2 et la myostatine (famille du TGF β) au niveau cardiaque. La PGD2 synthase aurait par ailleurs un effet inotrope positif et un effet inhibiteur sur la iNOS [402,403]. Enfin, l'étude de la cinétique des variations d'expression a fait ressortir une voie en particulier : la voie TGF β ainsi que ses cibles précédemment décrites au niveau cardiaque (le récepteur muscarinique M_2, le récepteur β2 adrénergique, SERCA 2, le récepteur à la ryanodine RyR 2 et le récepteur à l'ANP NpRA). De plus, cette étude a permis de confirmer aussi l'implication d'un effecteur mal connu de la voie TGF β, TRIP 1 (*TGF β Receptor Interacting Protein 1*). TRIP 1 avait déjà été identifié au niveau auriculaire chez le chien obèse hypertendu depuis 9 semaines pour la répression importante de son expression (**Publication n°5**).

Enfin, l'étude comparative du profil transcriptionnel cardiaque de l'Homme obèse *vs* obèse hypertendu *vs* hypertendu essentiel a permis de montrer d'une part que les gènes impliqués étaient différents et d'autre part que l'obèse avait aussi un profil transcriptionnel propre. Une voie apparaissait plus fortement régulée : la voie Wnt. L'obésité et l'hypertension paraissent avoir des effets opposés au niveau cardiaque sur cette voie. L'obésité semble diminuer l'expression de la plupart des effecteurs de cette voie tandis que l'hypertension paraît induire l'expression de ces gènes (**Publication n°6**). Les gènes cibles étant principalement impliqués dans le développement cardiaque, cette différence pourrait être une des origines de réponses différentes aux charges volumique (imposées par l'obésité) par rapport aux charges de pression (HTA).

Ce travail a permis de suggérer de revisiter des voies métaboliques déjà impliquées dans la physiopatholoqie du cœur de l'obèse, mais avec des acteurs qui n'avaient pas été considérés auparavant. Cet aspect montre souvent que les voies de signalisation sont régulées à plusieurs étages et parfois de manière opposées. Par exemple, le récepteur muscarinique M_2 et les eNOS, les MMP-9 et les lectomedines 3, TRIP-1 dans la voie TGF β, la voie Wnt dans le cœur du patient obèse par rapport au cœur du patient hypertendu essentiel. Au niveau moléculaire comme au niveau morphologique, il existe des compensations, pouvant retarder ou accélérer l'apparition de symptômes délétères. Il peut s'agir de cibles thérapeutiques potentielles. Parmi les protéines nouvelles, il y a des voies de régulation encore totalement inconnues dont le rôle reste à élucider. En fonction du rôle et de l'importance dans la physiopathologie du cœur de l'obèse, l'étude de ces protéines pourrait faire émerger des cibles nouvelles pour la pharmacologie.

PERSPECTIVES

Ces approches ont enrichi la compréhension des bases moléculaires responsables de la morphologie du cœur de l'obèse et de ses dysfonctions. Nous avons acquis la certitude que le cœur de l'obèse avait un profil d'expression génique spécifique. Ceci montre bien que le tissu adipeux a un impact ciblé au niveau cardiaque indépendamment de l'HTA ou du diabète. Vu la grande spécificité, il pourrait exister dans ce profil de l'expression génique cardiaque de l'obèse des cibles pharmacologiques totalement inédites. Des investigations au niveau du protéome constituent logiquement l'étape suivante. Les écueils techniques de ce type d'étude sont encore nombreux et principalement au niveau de la solubilité variée des protéines. Mais, les progrès techniques récents semblent améliorer les rendements de solubilisation, le pouvoir de séparation des gels de migration et l'association de la technique des gels 2D, de la spectrométrie de masse et de la bioinformatique. Le succès de la protéomique dépend maintenant majoritairement de la reproductibilité et du développement du haut débit, comme ce fut le cas pour le développement de la génomique. D'ailleurs, l'intérêt et les investissements des industries pharmaceutiques dans ce domaine ne cessent de croître.

L'implication de gènes inconnus nécessite des recherches plus longues afin de déterminer leur fonction et leur rôle dans cette pathologie. Deux de ces nouvelles protéines ont commencé à faire l'objet d'investigations plus poussées. La première protéine nommée provisoirement *PPR1* arborait un peptide signal et des *domaines apo AI* et a été retrouvée au niveau des *HDL3* ce qui la place potentiellement dans le cycle du cholestérol (DEA de Cyril Vidal 2001-2002). Les recherches devraient se poursuivre au niveau du foie notamment en collaboration avec le laboratoire d'étude des apolipoprotéines du Dr. Collet (Thèse de Matthieu Lamant).

En ce qui concerne la seconde protéine, nommée pour le moment *PPR2*, elle présente des sites de localisation nucléaire (*NLS*) et un homéodomaine (site de liaison à l'ADN) typique des facteurs de transcription du type homéoprotéines. Ces facteurs de transcription sont notamment impliqués dans les processus développementaux. Par exemple, pour le cœur *Nkx 2.5* constitue une homéoprotéine capitale pour le développement cardiaque. Les dernières recherches ont montré que les taux d'ARNm codant pour *PPR2* augmentent significativement dans le cœur de patients obèses hypertendus comme il a été observé chez le chien obèse hypertendu. Enfin, parmi les séquences consensus identifiées par *Southwestern-blot* une 20^{aine} de gènes présentant ce consensus au niveau de leur promoteur ont pu être sélectionnés. Un modèle cellulaire de cardiomyocytes *H9C2* surexprimant *PPR2* a permis de suggérer que *PPR2* diminuerait l'expression de l'Apo B (DEA de Peggy Regulus 2002-2003) .

Enfin, des investigations ont été menées sur le rôle potentiel de TRIP 1 (*TGF β Receptor Interacting Protein 1*). Pour la première fois, TRIP 1 a été montré comme étant régulé au niveau ARNm et protéique. La collaboration avec le laboratoire qui l'a découvert nous a permis son étude au niveau protéique (Choy L San Fransisco). Cette équipe a aussi montré l'importance de TRIP 1 dans la transduction du signal TGF β vers PAI-1 *(Plasminogen Activator Inhibitor 1)*[404], gène par ailleurs impliqué dans la fibrose cardiaque. Dans le cœur de chien obèse hypertendu, l'expression de TRIP 1 s'avère diminuée au niveau auriculaire et ventriculaire avec un décalage de 2 à 5 semaines. Puis l'expression de ce gène revient à son expression initiale vers la 24ième semaine. Il est possible que cette régulation biphasique se poursuive jusqu'à la surexpression de TRIP-1 (comme observé sur le seul VG à 35 semaines). Or, chez l'Homme nous avons identifié de manière significative une surexpression dans différentes situations de stress cardiaque (obésité, hypertension secondaire à l'obésité, hypertension essentielle). Il est possible que TRIP 1 suive une variation biphasique de son expression et que cette régulation soit identique chez l'Homme et chez le

chien obèse hypertendu à des stades plus tardifs. Seules des études sur des chiens obèses depuis plusieurs années permettraient d'identifier si cette variation suit ensuite la même que chez l'Homme. Rappelons que TRIP 1 est un des modulateurs de la voie TGF β et que le rôle pathologique de cette voie au niveau cardiaque en général et en particulier envers les variations d'expression du récepteur muscarinique M_2 s'avèrent déjà démontrées. Récemment, la surexpression de TRIP 1 a été impliquée dans le développement du cancer du sein [405]. Cette protéine a été d'ores et déjà citée par ce groupe comme une des futures cibles thérapeutiques des cancers impliquant le TGF β.Visiblement TRIP 1 serait bien une des nombreuses clefs de la voie TGF β dans le contrôle du cycle cellulaire, ce qui pourrait être aussi le cas dans le développement de l'HVG.

BIBLIOGRAPHIE

1. Simopoulos AP. Characteristics of obesity: an overview. *Ann N Y Acad Sci* 1987;**499:**4-13.
2. Bjorntorp P. Obesity. *Lancet* 1997;**350**(9075)**:**423-6.
3. Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. *Jama* 1999;**282**(16)**:**1523-9.
4. Saydah SH, Loria CM, Eberhardt MS, Brancati FL. Subclinical states of glucose intolerance and risk of death in the U.S. *Diabetes Care* 2001;**24**(3)**:**447-53.
5. Ge K, Zhai F, Wang Q. Effect of nationality on dietary pattern and meal behavior in China. *Am J Clin Nutr* 1997;**65**(4 Suppl)**:**1290S-1294S.
6. VanItallie TB. Treatment of obesity: can it become a science? *Obes Res* 1999;**7**(6)**:**605-6.
7. Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB. Annual deaths attributable to obesity in the United States. *Jama* 1999;**282**(16)**:**1530-8.
8. McGinnis JM, Foege WH. Actual causes of death in the United States. *Jama* 1993;**270**(18)**:**2207-12.
9. Katsilambros N. New developments in obesity. *Eur J Intern Med* 2000;**11**(2)**:**65-74.
10. Colditz GA. Economic costs of obesity and inactivity. *Med Sci Sports Exerc* 1999;**31**(11 Suppl)**:**S663-7.
11. Prineas RJ, Folsom AR, Kaye SA. Central adiposity and increased risk of coronary artery disease mortality in older women. *Ann Epidemiol* 1993;**3**(1)**:**35-41.
12. Bengtsson C, Bjorkelund C, Lapidus L, Lissner L. Associations of serum lipid concentrations and obesity with mortality in women: 20 year follow up of participants in prospective population study in Gothenburg, Sweden. *Bmj* 1993;**307**(6916)**:**1385-8.
13. Menotti A, Descovich GC, Lanti M, Spagnolo A, Dormi A, Seccareccia F. Indexes of obesity and all-causes mortality in Italian epidemiological data. *Prev Med* 1993;**22**(3)**:**293-303.
14. Lean ME, Han TS, Morrison CE. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *Bmj* 1995;**311**(6998)**:**158-61.
15. Stern JS, Thomas PR. A commentary on weighing the options: criteria for evaluating weight-management programs. *Obes Res* 1995;**3**(6)**:**589-90.
16. Kannel WB, McGee D, Gordon T. A general cardiovascular risk profile: the Framingham Study. *Am J Cardiol* 1976;**38**(1)**:**46-51.
17. MacMahon S, Peto R, Cutler J, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 1990;**335**(8692)**:**765-74.
18. Levy D, Kannel WB. Cardiovascular risks: new insights from Framingham. *Am Heart J* 1988;**116**(1 Pt 2)**:**266-72.
19. Kannel WB, Brand N, Skinner JJ, Jr., Dawber TR, McNamara PM. The relation of adiposity to blood pressure and development of hypertension. The Framingham study. *Ann Intern Med* 1967;**67**(1)**:**48-59.
20. Stamler J, Stamler R, Riedlinger WF, Algera G, Roberts RH. Hypertension screening of 1 million Americans. Community Hypertension Evaluation Clinic (CHEC) program, 1973 through 1975. *Jama* 1976;**235**(21)**:**2299-306.
21. Epstein FH, Francis T, Jr., Hayner NS, et al. Prevalence of Chronic Diseases and Distribution of Selected Physiologic Variables in a Total Community, Tecumseh, Michigan. *Am J Epidemiol* 1965;**681:**307-22.

22. Hsu PH, Mathewson FA, Rabkin SW. Blood pressure and body mass index patterns-a longitudinal study. *J Chronic Dis* 1977;**30**(2)**:**93-113.
23. Rabkin SW, Mathewson FA, Tate RB. Prognosis after acute myocardial infarction: relation to blood pressure values before infarction in a prospective cardiovascular study. *Am J Cardiol* 1977;**40**(4)**:**604-10.
24. Chiang BN, Perlman LV, Epstein FH. Overweight and hypertension. A review. *Circulation* 1969;**39**(3)**:**403-21.
25. Colditz GA. Economic costs of obesity. *Am J Clin Nutr* 1992;**55**(2 Suppl)**:**503S-507S.
26. Alpert MA, Hashimi MW. Obesity and the heart. *Am J Med Sci* 1993;**306**(2)**:**117-23.
27. Himeno E, Nishino K, Nakashima Y, Kuroiwa A, Ikeda M. Weight reduction regresses left ventricular mass regardless of blood pressure level in obese subjects. *Am Heart J* 1996;**131**(2)**:**313-9.
28. Verhaaren HA, Schieken RM, Mosteller M, Hewitt JK, Eaves LJ, Nance WE. Bivariate genetic analysis of left ventricular mass and weight in pubertal twins (the Medical College of Virginia twin study). *Am J Cardiol* 1991;**68**(6)**:**661-8.
29. Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1994;**330**(23)**:**1634-8.
30. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;**86**(4)**:**1343-6.
31. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 1990;**322**(22)**:**1561-6.
32. Casale PN, Devereux RB, Kligfield P, et al. Electrocardiographic detection of left ventricular hypertrophy: development and prospective validation of improved criteria. *J Am Coll Cardiol* 1985;**6**(3)**:**572-80.
33. Kannel WB, Doyle JT, McNamara PM, Quickenton P, Gordon T. Precursors of sudden coronary death. Factors related to the incidence of sudden death. *Circulation* 1975;**51**(4)**:**606-13.
34. Cupples LA, Gagnon DR, Kannel WB. Long- and short-term risk of sudden coronary death. *Circulation* 1992;**85**(1 Suppl)**:**I11-8.
35. Casale PN, Devereux RB, Milner M, et al. Value of echocardiographic measurement of left ventricular mass in predicting cardiovascular morbid events in hypertensive men. *Ann Intern Med* 1986;**105**(2)**:**173-8.
36. Yurenev AP, Bogdanova MM. Diagnostic value of two-dimensional Doppler echography in structural and functional changes of the great arteries. *Cor Vasa* 1986;**28**(6)**:**442-50.
37. Dannenberg AL, Levy D, Garrison RJ. Impact of age on echocardiographic left ventricular mass in a healthy population (the Framingham Study). *Am J Cardiol* 1989;**64**(16)**:**1066-8.
38. Galderisi M, Anderson KM, Wilson PW, Levy D. Echocardiographic evidence for the existence of a distinct diabetic cardiomyopathy (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* 1991;**68**(1)**:**85-9.
39. Lip GY, Gammage MD, Beevers DG. Hypertension and the heart. *Br Med Bull* 1994;**50**(2)**:**299-321.
40. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983;**67**(5)**:**968-77.
41. Kannel WB, Gordon T, Castelli WP. Obesity, lipids, and glucose intolerance. The Framingham Study. *Am J Clin Nutr* 1979;**32**(6)**:**1238-45.

42. Lauer MS, Anderson KM, Kannel WB, Levy D. The impact of obesity on left ventricular mass and geometry. The Framingham Heart Study. *Jama* 1991;**266**(2)**:**231-6.
43. Blake J, Devereux RB, Borer JS, Szulc M, Pappas TW, Laragh JH. Relation of obesity, high sodium intake, and eccentric left ventricular hypertrophy to left ventricular exercise dysfunction in essential hypertension. *Am J Med* 1990;**88**(5)**:**477-85.
44. Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 1993;**88**(1)**:**107-15.
45. MacMahon SW, Wilcken DE, Macdonald GJ. The effect of weight reduction on left ventricular mass. A randomized controlled trial in young, overweight hypertensive patients. *N Engl J Med* 1986;**314**(6)**:**334-9.
46. Alpert MA, Lambert CR, Terry BE, et al. Effect of weight loss on left ventricular mass in nonhypertensive morbidly obese patients. *Am J Cardiol* 1994;**73**(12)**:**918-21.
47. Kuch B, Hense HW, Gneiting B, et al. Body composition and prevalence of left ventricular hypertrophy. *Circulation* 2000;**102**(4)**:**405-10.
48. Whalley GA, Gamble GD, Doughty RN, et al. Left ventricular mass correlates with fat-free mass but not fat mass in adults. *J Hypertens* 1999;**17**(4)**:**569-74.
49. Licata G, Scaglione R, Barbagallo M, et al. Effect of obesity on left ventricular function studied by radionuclide angiocardiography. *Int J Obes* 1991;**15**(4)**:**295-302.
50. Messerli FH. Clinical determinants and consequences of left ventricular hypertrophy. *Am J Med* 1983;**75**(3A)**:**51-6.
51. de Simone G, Palmieri V, Bella JN, et al. Association of left ventricular hypertrophy with metabolic risk factors: the HyperGEN study. *J Hypertens* 2002;**20**(2)**:**323-31.
52. Gottdiener JS, Reda DJ, Materson BJ, et al. Importance of obesity, race and age to the cardiac structural and functional effects of hypertension. The Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents. *J Am Coll Cardiol* 1994;**24**(6)**:**1492-8.
53. Alpert MA, Terry BE, Kelly DL. Effect of weight loss on cardiac chamber size, wall thickness and left ventricular function in morbid obesity. *Am J Cardiol* 1985;**55**(6)**:**783-6.
54. Alpert MA, Terry BE, Mulekar M, et al. Cardiac morphology and left ventricular function in normotensive morbidly obese patients with and without congestive heart failure, and effect of weight loss. *Am J Cardiol* 1997;**80**(6)**:**736-40.
55. Messerli FH. Cardiopathy of obesity--a not-so-Victorian disease. *N Engl J Med* 1986;**314**(6)**:**378-80.
56. Park JJ, Swan PD. Effect of obesity and regional adiposity on the QTc interval in women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;**21**(12)**:**1104-10.
57. Duflou J, Virmani R, Rabin I, Burke A, Farb A, Smialek J. Sudden death as a result of heart disease in morbid obesity. *Am Heart J* 1995;**130**(2)**:**306-13.
58. Smith HL WF. *Arch Int Med* 1933.
59. Alexander JK, Dennis EW, Smith WG, Amad KH, Duncan WC, Austin RC. Blood volume, cardiac output, and distribution of systemic blood flow in extreme obesity. *Cardiovasc Res Cent Bull* 1962;**1:**39-44.
60. Messerli FH, Christie B, DeCarvalho JG, et al. Obesity and essential hypertension. Hemodynamics, intravascular volume, sodium excretion, and plasma renin activity. *Arch Intern Med* 1981;**141**(1)**:**81-5.
61. Alexander JK, Peterson KL. Cardiovascular effects of weight reduction. *Circulation* 1972;**45**(2)**:**310-8.
62. de Divitiis O, Fazio S, Petitto M, Maddalena G, Contaldo F, Mancini M. Obesity and cardiac function. *Circulation* 1981;**64**(3)**:**477-82.

63. Backman L, Freyschuss U, Hallberg D, Melcher A. Reversibility of cardiovascular changes in extreme obesity. Effects of weight reduction through jejunoileostomy. *Acta Med Scand* 1979;**205**(5)**:**367-73.
64. Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* 1966;**153**(740)**:**1127-8.
65. Dubuc PU, Cahn PJ, Willis P. The effects of exercise and food restriction on obesity and diabetes in young ob/ob mice. *Int J Obes* 1984;**8**(3)**:**271-8.
66. Bray GA. The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc* 1977;**36**(2)**:**148-53.
67. Michaelis OEt, Ellwood KC, Judge JM, Schoene NW, Hansen CT. Effect of dietary sucrose on the SHR/N-corpulent rat: a new model for insulin-independent diabetes. *Am J Clin Nutr* 1984;**39**(4)**:**612-8.
68. Kasper EK, Hruban RH, Baughman KL. Cardiomyopathy of obesity: a clinicopathologic evaluation of 43 obese patients with heart failure. *Am J Cardiol* 1992;**70**(9)**:**921-4.
69. Alexander JK. Obesity and Cardiac Performance. *Am J Cardiol* 1964;**14:**860-5.
70. Grossman E, Oren S, Messerli FH. Left ventricular filling in the systemic hypertension of obesity. *Am J Cardiol* 1991;**68**(1)**:**57-60.
71. Zarich SW, Kowalchuk GJ, McGuire MP, Benotti PN, Mascioli EA, Nesto RW. Left ventricular filling abnormalities in asymptomatic morbid obesity. *Am J Cardiol* 1991;**68**(4)**:**377-81.
72. Cueto-Garcia L, Maisterrena J, Arriaga J. Absence of left ventricular hypertrophy in thyrotoxic patients without congestive heart failure. An echocardiographic study. *Rev Invest Clin* 1984;**36**(3)**:**237-41.
73. Messerli FH, Sundgaard-Riise K, Reisin ED, et al. Dimorphic cardiac adaptation to obesity and arterial hypertension. *Ann Intern Med* 1983;**99**(6)**:**757-61.
74. Nakajima T, Fujioka S, Tokunaga K, Hirobe K, Matsuzawa Y, Tarui S. Noninvasive study of left ventricular performance in obese patients: influence of duration of obesity. *Circulation* 1985;**71**(3)**:**481-6.
75. Alpert MA, Lambert CR, Panayiotou H, et al. Relation of duration of morbid obesity to left ventricular mass, systolic function, and diastolic filling, and effect of weight loss. *Am J Cardiol* 1995;**76**(16)**:**1194-7.
76. Sasson Z, Rasooly Y, Bhesania T, Rasooly I. Insulin resistance is an important determinant of left ventricular mass in the obese. *Circulation* 1993;**88**(4 Pt 1)**:**1431-6.
77. Neely JR, Rovetto MJ, Oram JF. Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. *Prog Cardiovasc Dis* 1972;**15**(3)**:**289-329.
78. Opie LH. Metabolism of the heart in health and disease. I. *Am Heart J* 1968;**76**(5)**:**685-98.
79. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA, Denton RM, Pogson CI. Interactions of metabolism and the physiological role of insulin. *Recent Prog Horm Res* 1966;**22:**1-48.
80. Lopaschuk GD, Stanley WC. Glucose metabolism in the ischemic heart. *Circulation* 1997;**95**(2)**:**313-5.
81. Young LH, Renfu Y, Russell R, et al. Low-flow ischemia leads to translocation of canine heart GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporters to the sarcolemma in vivo. *Circulation* 1997;**95**(2)**:**415-22.
82. Sakaue H, Hara K, Noguchi T, et al. Ras-independent and wortmannin-sensitive activation of glycogen synthase by insulin in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1995;**270**(19)**:**11304-9.
83. Hara K, Yonezawa K, Sakaue H, et al. 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;**91**(16)**:**7415-9.
84. Valverde AM, Lorenzo M, Pons S, White MF, Benito M. Insulin receptor substrate (IRS) proteins IRS-1 and IRS-2 differential signaling in the insulin/insulin-like growth factor-I pathways in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol* 1998;**12**(5)**:**688-97.

85. Franke TF, Yang SI, Chan TO, et al. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 1995;**81**(5)**:**727-36.
86. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 1997;**275**(5300)**:**665-8.
87. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995;**378**(6559)**:**785-9.
88. Pearson RB, Thomas G. Regulation of p70s6k/p85s6k and its role in the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* 1995;**1:**21-32.
89. Grove JR, Banerjee P, Balasubramanyam A, et al. Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini. *Mol Cell Biol* 1991;**11**(11)**:**5541-50.
90. Romanelli A, Martin KA, Toker A, Blenis J. p70 S6 kinase is regulated by protein kinase Czeta and participates in a phosphoinositide 3-kinase-regulated signalling complex. *Mol Cell Biol* 1999;**19**(4)**:**2921-8.
91. Depre C, Rider MH, Veitch K, Hue L. Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of heart glycolysis. *J Biol Chem* 1993;**268**(18)**:**13274-9.
92. Weiss JN, Lamp ST. Glycolysis preferentially inhibits ATP-sensitive K+ channels in isolated guinea pig cardiac myocytes. *Science* 1987;**238**(4823)**:**67-9.
93. Coetzee WA. Regulation of ATP sensitive potassium channel of isolated guinea pig ventricular myocytes by sarcolemmal monocarboxylate transport. *Cardiovasc Res* 1992;**26**(11)**:**1077-86.
94. McCormack JG, Edgell NJ, Denton RM. Studies on the interactions of Ca2+ and pyruvate in the regulation of rat heart pyruvate dehydrogenase activity. Effects of starvation and diabetes. *Biochem J* 1982;**202**(2)**:**419-27.
95. Weiss JN, Lamp ST. Cardiac ATP-sensitive K+ channels. Evidence for preferential regulation by glycolysis. *J Gen Physiol* 1989;**94**(5)**:**911-35.
96. Gertz EW, Wisneski JA, Neese R, Houser A, Korte R, Bristow JD. Myocardial lactate extraction: multi-determined metabolic function. *Circulation* 1980;**61**(2)**:**256-61.
97. Witteveen SA, Hemker HC, Hollaar L, Hermens WT. Quantitation of infarct size in man by means of plasma enzyme levels. *Br Heart J* 1975;**37**(8)**:**795-803.
98. Vyska K, Meyer W, Stremmel W, et al. Fatty acid uptake in normal human myocardium. *Circ Res* 1991;**69**(3)**:**857-70.
99. Schaffer JE, Lodish HF. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 1994;**79**(3)**:**427-36.
100. Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* 1993;**268**(24)**:**17665-8.
101. Binas B, Danneberg H, McWhir J, Mullins L, Clark AJ. Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *Faseb J* 1999;**13**(8)**:**805-12.
102. Brandt JM, Djouadi F, Kelly DP. Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 1998;**273**(37)**:**23786-92.
103. Brown NF, Weis BC, Husti JE, Foster DW, McGarry JD. Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I isoform switching in the developing rat heart. *J Biol Chem* 1995;**270**(15)**:**8952-7.
104. Mascaro C, Acosta E, Ortiz JA, Marrero PF, Hegardt FG, Haro D. Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 1998;**273**(15)**:**8560-3.

105. Yu GS, Lu YC, Gulick T. Co-regulation of tissue-specific alternative human carnitine palmitoyltransferase Ibeta gene promoters by fatty acid enzyme substrate. *J Biol Chem* 1998;**273**(49)**:**32901-9.
106. McGarry JD, Woeltje KF, Kuwajima M, Foster DW. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes Metab Rev* 1989;**5**(3)**:**271-84.
107. Kelly DP, Strauss AW. Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med* 1994;**330**(13)**:**913-9.
108. Barger PM, Kelly DP. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 2000;**10**(6)**:**238-45.
109. Reinauer H, Adrian M, Rosen P, Schmitz FJ. Influence of carnitine acyltransferase inhibitors on the performance and metabolism of rat cardiac muscle. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990;**28**(5)**:**335-9.
110. Rosen P, Herberg L, Reinauer H. Different types of postinsulin receptor defects contribute to insulin resistance in hearts of obese Zucker rats. *Endocrinology* 1986;**119**(3)**:**1285-91.
111. Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF. The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. *Hypertension* 1992;**19**(1 Suppl)**:**I110-5.
112. Hales CN, Randle PJ. Effects of low-carbohydrate diet and diabetes mellitus on plasma concentrations of glucose, non-esterified fatty acid, and insulin during oral glucose-tolerance tests. *Lancet* 1963;**1:**790-4.
113. Patten GS, Rattigan S, Filsell OH, Clark MG. Insensitivity of cardiac phosphofructokinase to adrenergic activation in Zucker rats. A post-receptor defect. *Biochem J* 1984;**218**(2)**:**483-8.
114. Meirhaeghe A, Crowley V, Lenaghan C, et al. Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem J* 2003;**373**(Pt 1)**:**155-65.
115. Chen YE, Fu M, Zhang J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and the cardiovascular system. *Vitam Horm* 2003;**66:**157-88.
116. Landsberg L, Krieger DR. Obesity, metabolism, and the sympathetic nervous system. *Am J Hypertens* 1989;**2**(3 Pt 2)**:**125S-132S.
117. Valensi P, Huard JP, Giroux C, Attali JR. Factors involved in cardiac autonomic neuropathy in diabetic patients. *J Diabetes Complications* 1997;**11**(3)**:**180-7.
118. Brodde OE. Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 1991;**43**(2)**:**203-42.
119. del Monte F, Kaumann AJ, Poole-Wilson PA, Wynne DG, Pepper J, Harding SE. Coexistence of functioning beta 1- and beta 2-adrenoceptors in single myocytes from human ventricle. *Circulation* 1993;**88**(3)**:**854-63.
120. Xiang Y, Kobilka BK. Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science* 2003;**300**(5625)**:**1530-2.
121. Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Le Marec H. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 1996;**98**(2)**:**556-62.
122. Dobson JG, Jr. Catecholamine-induced phosphorylation of cardiac muscle proteins. *Biochim Biophys Acta* 1981;**675**(1)**:**123-31.
123. Varadi G, Mori Y, Mikala G, Schwartz A. Molecular determinants of Ca2+ channel function and drug action. *Trends Pharmacol Sci* 1995;**16**(2)**:**43-9.
124. Marban E, Rink TJ, Tsien RW, Tsien RY. Free calcium in heart muscle at rest and during contraction measured with Ca2+ -sensitive microelectrodes. *Nature* 1980;**286**(5776)**:**845-50.
125. Solaro RJ. Myosin and why hearts fail. *Circulation* 1992;**85**(5)**:**1945-7.
126. Santana LF, Cheng H, Gomez AM, Cannell MB, Lederer WJ. Relation between the sarcolemmal Ca2+ current and Ca2+ sparks and local control theories for cardiac excitation-contraction coupling. *Circ Res* 1996;**78**(1)**:**166-71.
127. Bootman MD, Berridge MJ. The elemental principles of calcium signaling. *Cell* 1995;**83**(5)**:**675-8.

128. Kentish JC, Barsotti RJ, Lea TJ, Mulligan IP, Patel JR, Ferenczi MA. Calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum induced by photorelease of calcium or Ins(1,4,5)P3. *Am J Physiol* 1990;**258**(2 Pt 2)**:**H610-5.
129. Babu YS, Cox JA, Cook WJ. Crystallization and preliminary x-ray investigation of sarcoplasmic calcium-binding protein from Nereis diversicolor. *J Biol Chem* 1987;**262**(24)**:**11884-5.
130. Kuhn HJ, Bletz C, Ruegg JC. Stretch-induced increase in the Ca2+ sensitivity of myofibrillar ATPase activity in skinned fibres from pig ventricles. *Pflugers Arch* 1990;**415**(6)**:**741-6.
131. Strang KT, Sweitzer NK, Greaser ML, Moss RL. Beta-adrenergic receptor stimulation increases unloaded shortening velocity of skinned single ventricular myocytes from rats. *Circ Res* 1994;**74**(3)**:**542-9.
132. Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 1999;**51**(4)**:**651-90.
133. Caulfield MP. Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 1993;**58**(3)**:**319-79.
134. Yamada K, Yanagida H, Ito Y, Inoue R. Postsynaptic enhancement by motilin of muscarinic receptor cation currents in duodenal smooth muscle. *Am J Physiol* 1998;**274**(3 Pt 1)**:**G487-92.
135. Lindemann JP, Watanabe AM. Muscarinic cholinergic inhibition of beta-adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca2+ transport in guinea pig ventricles. *J Biol Chem* 1985;**260**(24)**:**13122-9.
136. Ritz MC, George FR. Cocaine-induced seizures and lethality appear to be associated with distinct central nervous system binding sites. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;**264**(3)**:**1333-43.
137. Abi-Gerges N, Hove-Madsen L, Fischmeister R, Mery PF. A comparative study of the effects of three guanylyl cyclase inhibitors on the L-type Ca2+ and muscarinic K+ currents in frog cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* 1997;**121**(7)**:**1369-77.
138. Schmidt M, Rumenapp U, Keller J, Lohmann B, Jakobs KH. Regulation of phospholipase C and D activities by small molecular weight G proteins and muscarinic receptors. *Life Sci* 1997;**60**(13-14)**:**1093-100.
139. Tohse N, Sperelakis N. cGMP inhibits the activity of single calcium channels in embryonic chick heart cells. *Circ Res* 1991;**69**(2)**:**325-31.
140. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996;**79**(3)**:**363-80.
141. Jumrussirikul P, Dinerman J, Dawson TM, et al. Interaction between neuronal nitric oxide synthase and inhibitory G protein activity in heart rate regulation in conscious mice. *J Clin Invest* 1998;**102**(7)**:**1279-85.
142. Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, et al. Induction of NO synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1 beta and IFN-gamma. *Am J Physiol* 1995;**268**(3 Pt 2)**:**H1293-303.
143. Vandecasteele G, Eschenhagen T, Scholz H, Stein B, Verde I, Fischmeister R. Muscarinic and beta-adrenergic regulation of heart rate, force of contraction and calcium current is preserved in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 1999;**5**(3)**:**331-4.
144. Balligand JL. Regulation of cardiac beta-adrenergic response by nitric oxide. *Cardiovasc Res* 1999;**43**(3)**:**607-20.
145. Vejlstrup NG, Bouloumie A, Boesgaard S, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human heart: expression and localization in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1998;**30**(6)**:**1215-23.
146. Forstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol* 1995;**50**(9)**:**1321-32.

147. Rodriguez-Esparragon FJ, Rodriguez-Perez JC, Macias-Reyes A, Alamo-Santana F. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2-Pro12Ala and endothelial nitric oxide synthase-4a/bgene polymorphisms are associated with essential hypertension. *J Hypertens* 2003;**21**(9)**:**1649-55.
148. Neumann J, Boknik P, Herzig S, et al. Biochemical and electrophysiological mechanisms of the positive inotropic effect of calyculin A, a protein phosphatase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;**271**(1)**:**535-41.
149. Raymond JR, Hnatowich M, Lefkowitz RJ, Caron MG. Adrenergic receptors. Models for regulation of signal transduction processes. *Hypertension* 1990;**15**(2)**:**119-31.
150. Stadel JM, Nambi P, Shorr RG, Sawyer DF, Caron MG, Lefkowitz RJ. Phosphorylation of the beta-adrenergic receptor accompanies catecholamine-induced desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase. *Trans Assoc Am Physicians* 1983;**96:**137-45.
151. Francis SH, Corbin JD. Progress in understanding the mechanism and function of cyclic GMP-dependent protein kinase. *Adv Pharmacol* 1994;**26:**115-70.
152. van Biesen T, Hawes BE, Raymond JR, Luttrell LM, Koch WJ, Lefkowitz RJ. G(o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem* 1996;**271**(3)**:**1266-9.
153. Hausdorff WP, Aguilera G, Catt KJ. Inhibitory actions of somatostatin on cyclic AMP and aldosterone production in agonist-stimulated adrenal glomerulosa cells. *Cell Signal* 1989;**1**(4)**:**377-86.
154. Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, et al. Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 1988;**333**(6171)**:**370-3.
155. Muntz KH, Zhao M, Miller JC. Downregulation of myocardial beta-adrenergic receptors. Receptor subtype selectivity. *Circ Res* 1994;**74**(3)**:**369-75.
156. Maloteaux JM, Hermans E. Agonist-induced muscarinic cholinergic receptor internalization, recycling and degradation in cultured neuronal cells. Cellular mechanisms and role in desensitization. *Biochem Pharmacol* 1994;**47**(1)**:**77-88.
157. Haddad el B, Rousell J. Regulation of the expression and function of the M2 muscarinic receptor. *Trends Pharmacol Sci* 1998;**19**(8)**:**322-7.
158. Izzo JL, Jr., Taylor AA. The sympathetic nervous system and baroreflexes in hypertension and hypotension. *Curr Hypertens Rep* 1999;**1**(3)**:**254-63.
159. Palatini P. Sympathetic overactivity in hypertension: a risk factor for cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep* 2001;**3 Suppl 1:**S3-9.
160. Grassi G, Seravalle G, Cattaneo BM, et al. Sympathetic activation in obese normotensive subjects. *Hypertension* 1995;**25**(4 Pt 1)**:**560-3.
161. Rocchini AP, Mao HZ, Babu K, Marker P, Rocchini AJ. Clonidine prevents insulin resistance and hypertension in obese dogs. *Hypertension* 1999;**33**(1 Pt 2)**:**548-53.
162. Hall JE, Brands MW, Dixon WN, Smith MJ, Jr. Obesity-induced hypertension. Renal function and systemic hemodynamics. *Hypertension* 1993;**22**(3)**:**292-9.
163. Kassab S, Kato T, Wilkins FC, Chen R, Hall JE, Granger JP. Renal denervation attenuates the sodium retention and hypertension associated with obesity. *Hypertension* 1995;**25**(4 Pt 2)**:**893-7.
164. Alonso-Galicia M, Brands MW, Zappe DH, Hall JE. Hypertension in obese Zucker rats. Role of angiotensin II and adrenergic activity. *Hypertension* 1996;**28**(6)**:**1047-54.
165. Hall JE. Hyperinsulinemia: a link between obesity and hypertension? *Kidney Int* 1993;**43**(6)**:**1402-17.
166. Hildebrandt DA, Smith MJ, Jr., Hall JE. Cardiovascular regulation during insulin infusion into the carotid or vertebral artery in dogs. *J Hypertens* 1999;**17**(2)**:**251-60.

167. Stepniakowski KT, Goodfriend TL, Egan BM. Fatty acids enhance vascular alpha-adrenergic sensitivity. *Hypertension* 1995;**25**(4 Pt 2)**:**774-8.
168. Grekin RJ, Dumont CJ, Vollmer AP, Watts SW, Webb RC. Mechanisms in the pressor effects of hepatic portal venous fatty acid infusion. *Am J Physiol* 1997;**273**(1 Pt 2)**:**R324-30.
169. Tuck ML, Sowers J, Dornfeld L, Kledzik G, Maxwell M. The effect of weight reduction on blood pressure, plasma renin activity, and plasma aldosterone levels in obese patients. *N Engl J Med* 1981;**304**(16)**:**930-3.
170. Robles RG, Villa E, Santirso R, et al. Effects of captopril on sympathetic activity, lipid and carbohydrate metabolism in a model of obesity-induced hypertension in dogs. *Am J Hypertens* 1993;**6**(12)**:**1009-15.
171. Reisin E, Weir MR, Falkner B, Hutchinson HG, Anzalone DA, Tuck ML. Lisinopril versus hydrochlorothiazide in obese hypertensive patients: a multicenter placebo-controlled trial. Treatment in Obese Patients With Hypertension (TROPHY) Study Group. *Hypertension* 1997;**30**(1 Pt 1)**:**140-5.
172. Hall JE, Mizelle HL, Brands MW, Hildebrandt DA. Pressure natriuresis and angiotensin II in reduced kidney mass, salt-induced hypertension. *Am J Physiol* 1992;**262**(1 Pt 2)**:**R61-71.
173. Hall JE, Brands MW, Henegar JR. Mechanisms of hypertension and kidney disease in obesity. *Ann N Y Acad Sci* 1999;**892:**91-107.
174. Haynes WG, Sivitz WI, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL. Sympathetic and cardiorenal actions of leptin. *Hypertension* 1997;**30**(3 Pt 2)**:**619-23.
175. Eikelis N, Schlaich M, Aggarwal A, Kaye D, Esler M. Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system. *Hypertension* 2003;**41**(5)**:**1072-9.
176. Casto RM, VanNess JM, Overton JM. Effects of central leptin administration on blood pressure in normotensive rats. *Neurosci Lett* 1998;**246**(1)**:**29-32.
177. Lembo G, Morisco C, Lanni F, et al. Systemic hypertension and coronary artery disease: the link. *Am J Cardiol* 1998;**82**(3A)**:**2H-7H.
178. Flier JS, Maratos-Flier E. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* 1998;**92**(4)**:**437-40.
179. Pedrazzini T, Pralong F, Grouzmann E. Neuropeptide Y: the universal soldier. *Cell Mol Life Sci* 2003;**60**(2)**:**350-77.
180. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 1997;**88**(1)**:**131-41.
181. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 1997;**385**(6612)**:**165-8.
182. Shek EW, Brands MW, Hall JE. Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension* 1998;**31**(1 Pt 2)**:**409-14.
183. Ogawa Y, Nakao K. [Obesity and diseases. 6. Clinical significance of obesity gene product (leptin)]. *Nippon Naika Gakkai Zasshi* 1998;**87**(9)**:**1811-6.
184. Van Heek M, Compton DS, France CF, et al. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* 1997;**99**(3)**:**385-90.
185. Lu H, Duanmu Z, Houck C, Jen KL, Buison A, Dunbar JC. Obesity due to high fat diet decreases the sympathetic nervous and cardiovascular responses to intracerebroventricular leptin in rats. *Brain Res Bull* 1998;**47**(4)**:**331-5.
186. Hirose H, Saito I, Tsujioka M, Mori M, Kawabe H, Saruta T. The obese gene product, leptin: possible role in obesity-related hypertension in adolescents. *J Hypertens* 1998;**16**(12 Pt 2)**:**2007-12.
187. Suter PM, Locher R, Hasler E, Vetter W. Is there a role for the ob gene product leptin in essential hypertension? *Am J Hypertens* 1998;**11**(11 Pt 1)**:**1305-11.

188. Hiramatsu K, Yamada T, Ichikawa K, Izumiyama T, Nagata H. Changes in endocrine activities relative to obesity in patients with essential hypertension. *J Am Geriatr Soc* 1981;**29**(1)**:**25-30.
189. Dustan HP. Obesity and hypertension. *Diabetes Care* 1991;**14**(6)**:**488-504.
190. Rocchini AP, Key J, Bondie D, et al. The effect of weight loss on the sensitivity of blood pressure to sodium in obese adolescents. *N Engl J Med* 1989;**321**(9)**:**580-5.
191. Alpert MA, Terry BE, Cohen MV, Fan TM, Painter JA, Massey CV. The electrocardiogram in morbid obesity. *Am J Cardiol* 2000;**85**(7)**:**908-10, A10.
192. Schunkert H. Obesity and target organ damage: the heart. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;**26 Suppl 4:**S15-20.
193. Backman L, Freyschuss U, Hallberg D, Melcher A. Cardiovascular function in extreme obesity. *Acta Med Scand* 1973;**193**(5)**:**437-46.
194. Kaltman AJ, Goldring RM. Role of circulatory congestion in the cardiorespiratory failure of obesity. *Am J Med* 1976;**60**(5)**:**645-53.
195. Agarwal N, Shibutani K, SanFilippo JA, Del Guercio LR. Hemodynamic and respiratory changes in surgery of the morbidly obese. *Surgery* 1982;**92**(2)**:**226-34.
196. Alaud-din A, Meterissian S, Lisbona R, MacLean LD, Forse RA. Assessment of cardiac function in patients who were morbidly obese. *Surgery* 1990;**108**(4)**:**809-18; discussion 818-20.
197. Rosa EC, Moyses VA, Sesso RC, et al. Left ventricular hypertrophy evaluation in obese hypertensive patients: effect of left ventricular mass index criteria. *Arq Bras Cardiol* 2002;**78**(4)**:**341-51.
198. Reisin E, Messerli FH. Obesity-related hypertension: mechanisms, cardiovascular risks, and heredity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995;**4**(1)**:**67-71.
199. Chakko S, Mayor M, Allison MD, Kessler KM, Materson BJ, Myerburg RJ. Abnormal left ventricular diastolic filling in eccentric left ventricular hypertrophy of obesity. *Am J Cardiol* 1991;**68**(1)**:**95-8.
200. Amad KH, Brennan JC, Alexander JK. The cardiac pathology of chronic exogenous obesity. *Circulation* 1965;**32**(5)**:**740-5.
201. Mensah GA, Treiber FA, Kapuku GK, Davis H, Barnes VA, Strong WB. Patterns of body fat deposition in youth and their relation to left ventricular markers of adverse cardiovascular prognosis. *Am J Cardiol* 1999;**84**(5)**:**583-8.
202. Reisin E. Weight reduction in the management of hypertension: epidemiologic and mechanistic evidence. *Can J Physiol Pharmacol* 1986;**64**(6)**:**818-24.
203. Frohlich ED, Apstein C, Chobanian AV, et al. The heart in hypertension. *N Engl J Med* 1992;**327**(14)**:**998-1008.
204. Frohlich ED, Messerli FH, Reisin E, Dunn FG. The problem of obesity and hypertension. *Hypertension* 1983;**5**(5 Pt 2)**:**III71-8.
205. Thakur V, Richards R, Reisin E. Obesity, hypertension, and the heart. *Am J Med Sci* 2001;**321**(4)**:**242-8.
206. de la Maza MP, Estevez A, Bunout D, Klenner C, Oyonarte M, Hirsch S. Ventricular mass in hypertensive and normotensive obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1994;**18**(4)**:**193-7.
207. Bharati S, Lev M. Cardiac conduction system involvement in sudden death of obese young people. *Am Heart J* 1995;**129**(2)**:**273-81.
208. Contaldo F, Pasanisi F, Finelli C, de Simone G. Obesity, heart failure and sudden death. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2002;**12**(4)**:**190-7.
209. Wirth A, Kroger H. Improvement of left ventricular morphology and function in obese subjects following a diet and exercise program. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;**19**(1)**:**61-6.

210. Bedford E. The story of fatty heart. A disease of Victorian times. *Br Heart J* 1972;**34**(1)**:**23-8.
211. Balsaver AM, Morales AR, Whitehouse FW. Fat infiltration of myocardium as a cause of cardiac conduction defect. *Am J Cardiol* 1967;**19**(2)**:**261-5.
212. Dervan JP, Ilercil A, Kane PB, Anagnostopoulos C. Fatty infiltration: another restrictive cardiomyopathic pattern. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1991;**22**(3)**:**184-9.
213. Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 2003;**14**(3)**:**281-7.
214. Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard ML, et al. Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology* 2003;**144**(8)**:**3483-90.
215. Sweitzer NK, Moss RL. Determinants of loaded shortening velocity in single cardiac myocytes permeabilized with alpha-hemolysin. *Circ Res* 1993;**73**(6)**:**1150-62.
216. Campbell KB, Kirkpatrick RD, Tobias AH, Taheri H, Shroff SG. Series coupled non-contractile elements are functionally unimportant in the isolated heart. *Cardiovasc Res* 1994;**28**(2)**:**242-51.
217. Scaglione R, Dichiara MA, Indovina A, et al. Left ventricular diastolic and systolic function in normotensive obese subjects: influence of degree and duration of obesity. *Eur Heart J* 1992;**13**(6)**:**738-42.
218. Merlino G, Scaglione R, Paterna S, et al. Lymphocyte beta-adrenergic receptors in young subjects with peripheral or central obesity: relationship with central haemodynamics and left ventricular function. *Eur Heart J* 1994;**15**(6)**:**786-92.
219. Stoddard MF, Tseuda K, Thomas M, Dillon S, Kupersmith J. The influence of obesity on left ventricular filling and systolic function. *Am Heart J* 1992;**124**(3)**:**694-9.
220. Alpert MA, Terry BE, Lambert CR, et al. Factors influencing left ventricular systolic function in nonhypertensive morbidly obese patients, and effect of weight loss induced by gastroplasty. *Am J Cardiol* 1993;**71**(8)**:**733-7.
221. Zhang JJ, Yoshida H, Chao L, Chao J. Human adrenomedullin gene delivery protects against cardiac hypertrophy, fibrosis, and renal damage in hypertensive dahl salt-sensitive rats. *Hum Gene Ther* 2000;**11**(13)**:**1817-27.
222. Brutsaert DL, Sys SU. Relaxation and diastole of the heart. *Physiol Rev* 1989;**69**(4)**:**1228-315.
223. Gilbert JC, Glantz SA. Determinants of left ventricular filling and of the diastolic pressure-volume relation. *Circ Res* 1989;**64**(5)**:**827-52.
224. Cory CR, Grange RW, Houston ME. Role of sarcoplasmic reticulum in loss of load-sensitive relaxation in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol* 1994;**266**(1 Pt 2)**:**H68-78.
225. MacKinnon R, Morgan JP. Influence of the thyroid state on the calcium transient in ventricular muscle. *Pflugers Arch* 1986;**407**(2)**:**142-4.
226. Hoit BD, Shao Y, Gabel M, Walsh RA. In vivo assessment of left atrial contractile performance in normal and pathological conditions using a time-varying elastance model. *Circulation* 1994;**89**(4)**:**1829-38.
227. Holubarsch C, Hasenfuss G, Schmidt-Schweda S, et al. Angiotensin I and II exert inotropic effects in atrial but not in ventricular human myocardium. An in vitro study under physiological experimental conditions. *Circulation* 1993;**88**(3)**:**1228-37.
228. Koumi S, Arentzen CE, Backer CL, Wasserstrom JA. Alterations in muscarinic K+ channel response to acetylcholine and to G protein-mediated activation in atrial myocytes isolated from failing human hearts. *Circulation* 1994;**90**(5)**:**2213-24.
229. Leite-Moreira AF, Gillebert TC. Nonuniform course of left ventricular pressure fall and its regulation by load and contractile state. *Circulation* 1994;**90**(5)**:**2481-91.
230. Villari B, Vassalli G, Monrad ES, Chiariello M, Turina M, Hess OM. Normalization of diastolic dysfunction in aortic stenosis late after valve replacement. *Circulation* 1995;**91**(9)**:**2353-8.
231. Mehta S, Charbonneau F, Fitchett DH, Marpole DG, Patton R, Sniderman AD. The clinical consequences of a stiff left atrium. *Am Heart J* 1991;**122**(4 Pt 1)**:**1184-91.

232. Ohno M, Cheng CP, Little WC. Mechanism of altered patterns of left ventricular filling during the development of congestive heart failure. *Circulation* 1994;**89**(5)**:**2241-50.
233. Egan B, Fitzpatrick MA, Juni J, Buda AJ, Zweifler A. Importance of overweight in studies of left ventricular hypertrophy and diastolic function in mild systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1989;**64**(12)**:**752-5.
234. McKusick VA. Genomics: structural and functional studies of genomes. *Genomics* 1997;**45**(2)**:**244-9.
235. Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, et al. Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 1999;**23**(4)**:**387-8.
236. Pennisi E. Bioinformatics. Gene counters struggle to get the right answer. *Science* 2003;**301**(5636)**:**1040-1.
237. Cohen J. The genomics gamble. *Science* 1997;**275**(5301)**:**767-72.
238. Pennisi E. DNA chips give new view of classic test. *Science* 1999;**283**(5398)**:**17-8.
239. Ouellette BF, Boguski MS. Database divisions and homology search files: a guide for the perplexed. *Genome Res* 1997;**7**(10)**:**952-5.
240. Lewin B. The best of molecular biology. *Mol Cell* 1997;**1**(1)**:**1.
241. Zawel L, Reinberg D. Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1993;**44:**67-108.
242. Burley SK, Roeder RG. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem* 1996;**65:**769-99.
243. Goodrich JA, Tjian R. Transcription factors IIE and IIH and ATP hydrolysis direct promoter clearance by RNA polymerase II. *Cell* 1994;**77**(1)**:**145-56.
244. Pabo CO, Sauer RT. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 1992;**61:**1053-95.
245. Schwabe JW, Rhodes D. Beyond zinc fingers: steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition. *Trends Biochem Sci* 1991;**16**(8)**:**291-6.
246. Vinson CR, Sigler PB, McKnight SL. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 1989;**246**(4932)**:**911-6.
247. Davis RL, Cheng PF, Lassar AB, Weintraub H. The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 1990;**60**(5)**:**733-46.
248. Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 1993;**62:**453-81.
249. Montminy M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 1997;**66:**807-22.
250. Sassone-Corsi P. Transcription factors responsive to cAMP. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;**11:**355-77.
251. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992;**258**(5082)**:**607-14.
252. Tsuda T, Hamamori Y, Yamashita T, Fukumoto Y, Takai Y. Involvement of three intracellular messenger systems, protein kinase C, calcium ion and cyclic AMP, in the regulation of c-fos gene expression in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett* 1986;**208**(1)**:**39-42.
253. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997;**389**(6649)**:**349-52.
254. Kafri T, Gao X, Razin A. Mechanistic aspects of genome-wide demethylation in the preimplantation mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;**90**(22)**:**10558-62.
255. McKeown M. The role of small nuclear RNAs in RNA splicing. *Curr Opin Cell Biol* 1993;**5**(3)**:**448-54.
256. Erdmann VA, Barciszewska MZ, Hochberg A, de Groot N, Barciszewski J. Regulatory RNAs. *Cell Mol Life Sci* 2001;**58**(7)**:**960-77.

257. Nicoloso M, Qu LH, Michot B, Bachellerie JP. Intron-encoded, antisense small nucleolar RNAs: the characterization of nine novel species points to their direct role as guides for the 2'-O-ribose methylation of rRNAs. *J Mol Biol* 1996;**260**(2)**:**178-95.
258. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;**294**(5543)**:**853-8.
259. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. *Science* 2001;**294**(5543)**:**858-62.
260. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. *Science* 2001;**294**(5543)**:**862-4.
261. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 2002;**16**(6)**:**720-8.
262. Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 2002;**110**(4)**:**513-20.
263. Frasch M. Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early Drosophila embryo. *Nature* 1995;**374**(6521)**:**464-7.
264. Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev* 1997;**11**(4)**:**451-62.
265. Mohun T, Sparrow D. Early steps in vertebrate cardiogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1997;**7**(5)**:**628-33.
266. Lough J, Barron M, Brogley M, Sugi Y, Bolender DL, Zhu X. Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precardiac embryonic mesoderm. *Dev Biol* 1996;**178**(1)**:**198-202.
267. Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 1993;**119**(2)**:**419-31.
268. Lee KH, Xu Q, Breitbart RE. A new tinman-related gene, nkx2.7, anticipates the expression of nkx2.5 and nkx2.3 in zebrafish heart and pharyngeal endoderm. *Dev Biol* 1996;**180**(2)**:**722-31.
269. Lyons I, Parsons LM, Hartley L, et al. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev* 1995;**9**(13)**:**1654-66.
270. Cleaver OB, Patterson KD, Krieg PA. Overexpression of the tinman-related genes XNkx-2.5 and XNkx-2.3 in Xenopus embryos results in myocardial hyperplasia. *Development* 1996;**122**(11)**:**3549-56.
271. Gajewski K, Kim Y, Lee YM, Olson EN, Schulz RA. D-mef2 is a target for Tinman activation during Drosophila heart development. *Embo J* 1997;**16**(3)**:**515-22.
272. Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 1997;**276**(5317)**:**1404-7.
273. Grepin C, Dagnino L, Robitaille L, Haberstroh L, Antakly T, Nemer M. A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994;**14**(5)**:**3115-29.
274. Ip HS, Wilson DB, Heikinheimo M, et al. The GATA-4 transcription factor transactivates the cardiac muscle-specific troponin C promoter-enhancer in nonmuscle cells. *Mol Cell Biol* 1994;**14**(11)**:**7517-26.
275. Molkentin JD, Kalvakolanu DV, Markham BE. Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol Cell Biol* 1994;**14**(7)**:**4947-57.
276. Johnson JE, Wold BJ, Hauschka SD. Muscle creatine kinase sequence elements regulating skeletal and cardiac muscle expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1989;**9**(8)**:**3393-9.
277. Argentin S, Ardati A, Tremblay S, et al. Developmental stage-specific regulation of atrial natriuretic factor gene transcription in cardiac cells. *Mol Cell Biol* 1994;**14**(1)**:**777-90.

278. Srivastava D, Cserjesi P, Olson EN. A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science* 1995;**270**(5244)**:**1995-9.
279. Biben C, Harvey RP. Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. *Genes Dev* 1997;**11**(11)**:**1357-69.
280. Bao ZZ, Bruneau BG, Seidman JG, Seidman CE, Cepko CL. Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by Irx4. *Science* 1999;**283**(5405)**:**1161-4.
281. Bruneau BG, Bao ZZ, Tanaka M, et al. Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene Irx4 is modulated by Nkx2-5 and dHand. *Dev Biol* 2000;**217**(2)**:**266-77.
282. Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* 1994;**8**(9)**:**1007-18.
283. Mendelsohn C, Lohnes D, Decimo D, et al. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 1994;**120**(10)**:**2749-71.
284. Davis AC, Wims M, Spotts GD, Hann SR, Bradley A. A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* 1993;**7**(4)**:**671-82.
285. Stanton BR, Perkins AS, Tessarollo L, Sassoon DA, Parada LF. Loss of N-myc function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop. *Genes Dev* 1992;**6**(12A)**:**2235-47.
286. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;**359**(6397)**:**693-9.
287. Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev* 1994;**8**(16)**:**1888-96.
288. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, et al. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993;**74**(4)**:**679-91.
289. Brannan CI, Perkins AS, Vogel KS, et al. Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes Dev* 1994;**8**(9)**:**1019-29.
290. George KM, Leonard MW, Roth ME, et al. Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. *Development* 1994;**120**(9)**:**2673-86.
291. Pereira FA, Qiu Y, Zhou G, Tsai MJ, Tsai SY. The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes Dev* 1999;**13**(8)**:**1037-49.
292. Dyson E, Sucov HM, Kubalak SW, et al. Atrial-like phenotype is associated with embryonic ventricular failure in retinoid X receptor alpha -/- mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**(16)**:**7386-90.
293. Reecy JM, Yamada M, Cummings K, et al. Chicken Nkx-2.8: a novel homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and pharyngeal pouch-2 and -3 endoderm. *Dev Biol* 1997;**188**(2)**:**295-311.
294. Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 1995;**378**(6555)**:**394-8.
295. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996;**383**(6595)**:**73-5.
296. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;**87**(7)**:**1171-80.
297. Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, Barnett JV. Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* 1999;**283**(5410)**:**2080-2.
298. Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, et al. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 1998;**392**(6672)**:**186-90.

299. de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, et al. Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 1998;**392**(6672)**:**182-6.
300. Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA, et al. A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat Genet* 2000;**24**(2)**:**171-4.
301. Kurihara Y, Kurihara H, Oda H, et al. Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J Clin Invest* 1995;**96**(1)**:**293-300.
302. Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, et al. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* 1998;**125**(5)**:**813-24.
303. Thomas T, Kurihara H, Yamagishi H, et al. A signaling cascade involving endothelin-1, dHAND and msx1 regulates development of neural-crest-derived branchial arch mesenchyme. *Development* 1998;**125**(16)**:**3005-14.
304. Yamagishi H, Olson EN, Srivastava D. The basic helix-loop-helix transcription factor, dHAND, is required for vascular development. *J Clin Invest* 2000;**105**(3)**:**261-70.
305. Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 1999;**126**(21)**:**4895-902.
306. Winnier GE, Kume T, Deng K, et al. Roles for the winged helix transcription factors MF1 and MFH1 in cardiovascular development revealed by nonallelic noncomplementation of null alleles. *Dev Biol* 1999;**213**(2)**:**418-31.
307. Li J, Liu KC, Jin F, Lu MM, Epstein JA. Transgenic rescue of congenital heart disease and spina bifida in Splotch mice. *Development* 1999;**126**(11)**:**2495-503.
308. Gruber PJ, Kubalak SW, Pexieder T, Sucov HM, Evans RM, Chien KR. RXR alpha deficiency confers genetic susceptibility for aortic sac, conotruncal, atrioventricular cushion, and ventricular muscle defects in mice. *J Clin Invest* 1996;**98**(6)**:**1332-43.
309. Satoda M, Zhao F, Diaz GA, et al. Mutations in TFAP2B cause Char syndrome, a familial form of patent ductus arteriosus. *Nat Genet* 2000;**25**(1)**:**42-6.
310. Moalic JM, Charlemagne D, Mansier P, Chevalier B, Swynghedauw B. Cardiac hypertrophy and failure--a disease of adaptation. Modifications in membrane proteins provide a molecular basis for arrhythmogenicity. *Circulation* 1993;**87**(5 Suppl)**:**IV21-6.
311. Swynghedauw B, Delcayre C. Biology of cardiac overload. *Pathobiol Annu* 1982;**12:**137-83.
312. Astorri E, Bolognesi R, Colla B, Chizzola A, Visioli O. Left ventricular hypertrophy: a cytometric study on 42 human hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1977;**9**(9)**:**763-75.
313. Weber KT, Janicki JS, Pick R, et al. Collagen in the hypertrophied, pressure-overloaded myocardium. *Circulation* 1987;**75**(1 Pt 2)**:**I40-7.
314. Hatt PY, Ledoux C, Bonvalet JP. [Lysis and synthesis of myocardial proteins during experimental cardiac failure. (Study by the electron microscope)]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1965;**58**(12)**:**1703-21.
315. Moalic JM, Bercovici J, Swynghedauw B. Myosin heavy chain and actin fractional rates of synthesis in normal and overload rat heart ventricles. *J Mol Cell Cardiol* 1984;**16**(10)**:**875-84.
316. de la Bastie D, Levitsky D, Rappaport L, et al. Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca2(+)-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res* 1990;**66**(2)**:**554-64.
317. Lompre AM, Lambert F, Lakatta EG, Schwartz K. Expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and calsequestrin genes in rat heart during ontogenic development and aging. *Circ Res* 1991;**69**(5)**:**1380-8.
318. Sainte Beuve C, Allen PD, Dambrin G, et al. Cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in control and cardiomyopathic human hearts: mRNA and protein contents are differentially regulated. *J Mol Cell Cardiol* 1997;**29**(4)**:**1237-46.

319. Charlemagne D, Maixent JM, Preteseille M, Lelievre LG. Ouabain binding sites and (Na+,K+)-ATPase activity in rat cardiac hypertrophy. Expression of the neonatal forms. *J Biol Chem* 1986;**261**(1)**:**185-9.
320. Charlemagne D, Orlowski J, Oliviero P, et al. Alteration of Na,K-ATPase subunit mRNA and protein levels in hypertrophied rat heart. *J Biol Chem* 1994;**269**(2)**:**1541-7.
321. Hanf R, Drubaix I, Marotte F, Lelievre LG. Rat cardiac hypertrophy. Altered sodium-calcium exchange activity in sarcolemmal vesicles. *FEBS Lett* 1988;**236**(1)**:**145-9.
322. Studer R, Reinecke H, Bilger J, et al. Gene expression of the cardiac Na(+)-Ca2+ exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 1994;**75**(3)**:**443-53.
323. Assayag P, Carre F, Chevalier B, Delcayre C, Mansier P, Swynghedauw B. Compensated cardiac hypertrophy: arrhythmogenicity and the new myocardial phenotype. I. Fibrosis. *Cardiovasc Res* 1997;**34**(3)**:**439-44.
324. Coulombe A, Momtaz A, Richer P, Swynghedauw B, Coraboeuf E. Reduction of calcium-independent transient outward potassium current density in DOCA salt hypertrophied rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 1994;**427**(1-2)**:**47-55.
325. Gidh-Jain M, Huang B, Jain P, el-Sherif N. Differential expression of voltage-gated K+ channel genes in left ventricular remodeled myocardium after experimental myocardial infarction. *Circ Res* 1996;**79**(4)**:**669-75.
326. Moalic JM, Bourgeois F, Mansier P, et al. Beta 1 adrenergic receptor and G alpha s mRNAs in rat heart as a function of mechanical load and thyroxine intoxication. *Cardiovasc Res* 1993;**27**(2)**:**231-7.
327. Eschenhagen T, Mende U, Nose M, et al. Increased messenger RNA level of the inhibitory G protein alpha subunit Gi alpha-2 in human end-stage heart failure. *Circ Res* 1992;**70**(4)**:**688-96.
328. Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Inada M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest* 1995;**95**(1)**:**46-54.
329. Regitz-Zagrosek V, Friedel N, Heymann A, et al. Regulation, chamber localization, and subtype distribution of angiotensin II receptors in human hearts. *Circulation* 1995;**91**(5)**:**1461-71.
330. Asano K, Dutcher DL, Port JD, et al. Selective downregulation of the angiotensin II AT1-receptor subtype in failing human ventricular myocardium. *Circulation* 1997;**95**(5)**:**1193-200.
331. Mercadier JJ, Samuel JL, Michel JB, et al. Atrial natriuretic factor gene expression in rat ventricle during experimental hypertension. *Am J Physiol* 1989;**257**(3 Pt 2)**:**H979-87.
332. Touyz RM, Schiffrin EL. Role of endothelin in human hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;**81**(6)**:**533-41.
333. Sigel AV, Centrella M, Eghbali-Webb M. Regulation of proliferative response of cardiac fibroblasts by transforming growth factor-beta 1. *J Mol Cell Cardiol* 1996;**28**(9)**:**1921-9.
334. Lompre AM, Schwartz K, d'Albis A, Lacombe G, Van Thiem N, Swynghedauw B. Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. *Nature* 1979;**282**(5734)**:**105-7.
335. Schwartz K, Lecarpentier Y, Martin JL, Lompre AM, Mercadier JJ, Swynghedauw B. Myosin isoenzymic distribution correlates with speed of myocardial contraction. *J Mol Cell Cardiol* 1981;**13**(12)**:**1071-5.
336. Leclercq JF, Swynghedauw B, Bouveret P, Faucomprez C, Piguet V. Myofibrillar ATPase, DNA and hydroxyproline content of human hypertrophied heart. *Eur J Clin Invest* 1976;**6**(1)**:**27-33.
337. Mercadier JJ, de la Bastie D, Menasche P, et al. Alpha-myosin heavy chain isoform and atrial size in patients with various types of mitral valve dysfunction: a quantitative study. *J Am Coll Cardiol* 1987;**9**(5)**:**1024-30.

338. Hirzel HO, Tuchschmid CR, Schneider J, Krayenbuehl HP, Schaub MC. Relationship between myosin isoenzyme composition, hemodynamics, and myocardial structure in various forms of human cardiac hypertrophy. *Circ Res* 1985;**57**(5)**:**729-40.
339. Sutsch G, Brunner UT, von Schulthess C, et al. Hemodynamic performance and myosin light chain-1 expression of the hypertrophied left ventricle in aortic valve disease before and after valve replacement. *Circ Res* 1992;**70**(5)**:**1035-43.
340. Rappaport L, Contard F, Samuel JL, et al. Storage of phosphorylated desmin in a familial myopathy. *FEBS Lett* 1988;**231**(2)**:**421-5.
341. Tsutsui H, Ishihara K, Cooper Gt. Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Science* 1993;**260**(5108)**:**682-7.
342. Schaper J, Froede R, Hein S, et al. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1991;**83**(2)**:**504-14.
343. Swynghedauw B, Chevalier B, Medigue C, Maisonblanche P, Besse S. Molecular basis of the regression of cardiac hypertrophy. *J Card Fail* 1996;**2**(4 Suppl)**:**S21-7.
344. Field LJ. Transgenic mice in cardiovascular research. *Annu Rev Physiol* 1993;**55:**97-114.
345. Bauters C, Moalic JM, Bercovici J, et al. Coronary flow as a determinant of c-myc and c-fos proto-oncogene expression in an isolated adult rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1988;**20**(2)**:**97-101.
346. Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**(13)**:**7473-8.
347. Sack MN, Disch DL, Rockman HA, Kelly DP. A role for Sp and nuclear receptor transcription factors in a cardiac hypertrophic growth program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**(12)**:**6438-43.
348. Bortoluzzi S, d'Alessi F, Danieli GA. A computational reconstruction of the adult human heart transcriptional profile. *J Mol Cell Cardiol* 2000;**32**(11)**:**1931-8.
349. Sehl PD, Tai JT, Hillan KJ, et al. Application of cDNA microarrays in determining molecular phenotype in cardiac growth, development, and response to injury. *Circulation* 2000;**101**(16)**:**1990-9.
350. Lyn D, Liu X, Bennett NA, Emmett NL. Gene expression profile in mouse myocardium after ischemia. *Physiol Genomics* 2000;**2**(3)**:**93-100.
351. Stanton LW, Garrard LJ, Damm D, et al. Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction. *Circ Res* 2000;**86**(9)**:**939-45.
352. Schoenfeld JR, Vasser M, Jhurani P, et al. Distinct molecular phenotypes in murine cardiac muscle development, growth, and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1998;**30**(11)**:**2269-80.
353. Friddle CJ, Koga T, Rubin EM, Bristow J. Expression profiling reveals distinct sets of genes altered during induction and regression of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**(12)**:**6745-50.
354. Hwang DM, Dempsey AA, Lee CY, Liew CC. Identification of differentially expressed genes in cardiac hypertrophy by analysis of expressed sequence tags. *Genomics* 2000;**66**(1)**:**1-14.
355. Yang J, Moravec CS, Sussman MA, et al. Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation* 2000;**102**(25)**:**3046-52.
356. Tan FL, Moravec CS, Li J, et al. The gene expression fingerprint of human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**(17)**:**11387-92.
357. Hall JE, Brands MW, Hildebrandt DA, Mizelle HL. Obesity-associated hypertension. Hyperinsulinemia and renal mechanisms. *Hypertension* 1992;**19**(1 Suppl)**:**I45-55.
358. Verwaerde P, Senard JM, Galinier M, et al. Changes in short-term variability of blood pressure and heart rate during the development of obesity-associated hypertension in high-fat fed dogs. *J Hypertens* 1999;**17**(8)**:**1135-43.

359. Kaneko. Clinical biochemestry of domestic animals. New York: Kaneko JJ eds., 1980.
360. Lewis. Alimentation clinique des petits animaux: M. M. associates eds., 1987.
361. Anderson EA. Estimating body fat in mature Beagle bitchies. *Laboratory Animal Sciences* 1982;**32:**367-370.
362. Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**(12)**:**6025-30.
363. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**(9)**:**5116-21.
364. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**(25)**:**14863-8.
365. Pelat M, Verwaerde P, Merial C, et al. Impaired atrial M(2)-cholinoceptor function in obesity-related hypertension. *Hypertension* 1999;**34**(5)**:**1066-72.
366. Pelat M, Dessy C, Massion P, Desager JP, Feron O, Balligand JL. Rosuvastatin decreases caveolin-1 and improves nitric oxide-dependent heart rate and blood pressure variability in apolipoprotein E-/- mice in vivo. *Circulation* 2003;**107**(19)**:**2480-6.
367. Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T. Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;**194**(2)**:**720-5.
368. Kitamura K, Kangawa K, Ishiyama Y, et al. Identification and hypotensive activity of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP). *FEBS Lett* 1994;**351**(1)**:**35-7.
369. Ichiki Y, Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Matsuo H, Eto T. Distribution and characterization of immunoreactive adrenomedullin in human tissue and plasma. *FEBS Lett* 1994;**338**(1)**:**6-10.
370. Hay DL, Smith DM. Knockouts and transgenics confirm the importance of adrenomedullin in the vasculature. *Trends Pharmacol Sci* 2001;**22**(2)**:**57-9.
371. Hirayama N, Kitamura K, Imamura T, et al. Molecular forms of circulating adrenomedullin in patients with congestive heart failure. *J Endocrinol* 1999;**160**(2)**:**297-303.
372. Kobayashi K, Kitamura K, Hirayama N, et al. Increased plasma adrenomedullin in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1996;**131**(4)**:**676-80.
373. Hayashi M, Shimosawa T, Isaka M, Yamada S, Fujita R, Fujita T. Plasma adrenomedullin in diabetes. *Lancet* 1997;**350**(9089)**:**1449-50.
374. Kohno M, Hanehira T, Hirata K, et al. An accelerated increase of plasma adrenomedullin in acute asthma. *Metabolism* 1996;**45**(11)**:**1323-5.
375. Nagaya N, Satoh T, Nishikimi T, et al. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation* 2000;**101**(5)**:**498-503.
376. Romppanen H, Puhakka J, Foldes G, et al. Endothelin-1-Independent and Angiotensin II-Independent Induction of Adrenomedullin Gene Expression. *Hypertension* 2001;**37**(1)**:**84-90.
377. Hirano S, Imamura T, Onitsuka H, et al. Rapid increase in cardiac adrenomedullin gene expression caused by acute pressure overload: effect of the renin-angiotensin system on gene expression. *Circ J* 2002;**66**(4)**:**397-402.
378. Autelitano DJ, Ridings R, Tang F. Adrenomedullin is a regulated modulator of neonatal cardiomyocyte hypertrophy in vitro. *Cardiovasc Res* 2001;**51**(2)**:**255-64.
379. Yamaguchi T, Baba K, Doi Y, Yano K. Effect of adrenomedullin on aldosterone secretion by dispersed rat adrenal zona glomerulosa cells. *Life Sci* 1995;**56**(6)**:**379-87.
380. Yamakawa H, Imamura T, Matsuo T, et al. Diastolic wall stress and ANG II in cardiac hypertrophy and gene expression induced by volume overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;**279**(6)**:**H2939-46.

381. Tsuruda T, Kato J, Kitamura K, et al. Adrenomedullin: a possible autocrine or paracrine inhibitor of hypertrophy of cardiomyocytes. *Hypertension* 1998;**31**(1 Pt 2)**:**505-10.
382. Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K. Effects of adrenomedullin on cultured rat cardiac myocytes and fibroblasts. *Eur J Pharmacol* 1999;**382**(1)**:**1-9.
383. Kapas S, Catt KJ, Clark AJ. Cloning and expression of cDNA encoding a rat adrenomedullin receptor. *J Biol Chem* 1995;**270**(43)**:**25344-7.
384. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, et al. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998;**393**(6683)**:**333-9.
385. Kano H, Kohno M, Yasunari K, et al. Adrenomedullin as a novel antiproliferative factor of vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 1996;**14**(2)**:**209-13.
386. Kapas S, Brown DW, Farthing PM, Hagi-Pavli E. Adrenomedullin has mitogenic effects on human oral keratinocytes: involvement of cyclic AMP. *FEBS Lett* 1997;**418**(3)**:**287-90.
387. Shimekake Y, Nagata K, Ohta S, et al. Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca2+ mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 1995;**270**(9)**:**4412-7.
388. Terata K, Miura H, Liu Y, Loberiza F, Gutterman DD. Human coronary arteriolar dilation to adrenomedullin: role of nitric oxide and K(+) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;**279**(6)**:**H2620-6.
389. Withers DJ, Coppock HA, Seufferlein T, Smith DM, Bloom SR, Rozengurt E. Adrenomedullin stimulates DNA synthesis and cell proliferation via elevation of cAMP in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett* 1996;**378**(1)**:**83-7.
390. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;**286**(5439)**:**531-7.
391. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;**403**(6769)**:**503-11.
392. Manger ID, Relman DA. How the host 'sees' pathogens: global gene expression responses to infection. *Curr Opin Immunol* 2000;**12**(2)**:**215-8.
393. Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 1993;**259**(5097)**:**946-51.
394. Rebrikov DV, Britanova OV, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Tarabykin VS, Lukyanov SA. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res* 2000;**28**(20)**:**E90.
395. Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature* 1997;**387**(6633)**:**620-4.
396. Murphy M, Godson C, Cannon S, et al. Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells. *J Biol Chem* 1999;**274**(9)**:**5830-4.
397. Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 1999;**27**(6)**:**1517-23.
398. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;**409**(6818)**:**307-12.
399. Buys S, Smih F, Pathak A, et al. Adrenomedullin upregulates M2-muscarinic receptors in cardiomyocytes from P19 cell line. *Br J Pharmacol* 2003;**139**(6)**:**1219-27.
400. Philip-Couderc P, Smih F, Pelat M, et al. Cardiac transcriptome analysis in obesity-related hypertension. *Hypertension* 2003;**41**(3)**:**414-21.
401. Philip-Couderc P, Smih F, Pelat M, et al. [Early atrial gene regulation of obesity-related arterial hypertension]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2002;**95**(7-8)**:**695-9.

402. Hattori Y, Levi R. Effect of PGD2 on cardiac contractility: a negative inotropism secondary to coronary vasoconstriction conceals a primary positive inotropic action. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;**237**(3)**:**719-24.
403. Nagoshi H, Uehara Y, Kanai F, et al. Prostaglandin D2 inhibits inducible nitric oxide synthase expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998;**82**(2)**:**204-9.
404. Choy L, Derynck R. The type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor-interacting protein TRIP-1 acts as a modulator of the TGF-beta response. *J Biol Chem* 1998;**273**(47)**:**31455-62.
405. Matsuda S, Katsumata R, Okuda T, et al. Molecular cloning and characterization of human MAWD, a novel protein containing WD-40 repeats frequently overexpressed in breast cancer. *Cancer Res* 2000;**60**(1)**:**13-7.

ABREVIATIONS

β-ARK : *β-adrenergic receptor kinase.*
αMEM : *α minimum essential medium.*
2v & 2a MLC : *myosine light chain.*
A : Adrénaline.
AC : Adénylate cyclase.
ADNc : ADN (Acide déoxyribonucléique) complémentaire.
ADP : Adénosine diphosphate.
AGNE : Acide gras non-estérifié.
ALS : *Amyolateral sclerosis.*
AM : Adrénomedulline.
AMh : AM humaine.
AMm : AM de souris.
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique.
Amp^R : Gène de résistance à l'ampicilline.
AMr : AM de rat.
ANP : Atrial natriuretic peptide.
AP-1 : Activator protein complex 1.
ARNm : ARN (Acide ribonucléique) messager.
ARNnm : ARN non-messager.
ARNr : ARN ribosomal.
ATF-1 : *Activating transcription factor 1.*
ATP : Adénosine triphosphate.
AVC : Accident vasculaire cérébral.
BET : Bromure d'éthydium.
BMI : *Body mass index.*
BMP : *Bone morphogenetic protein.*
BNP : *Brain natriuretic pepetide.*
BP : *Blood pressure.*
C : Contrôle.
CGRP : *Calcitonin gene-related peptide.*
CPT : Carnithine palmitoyltransferase.
CRE : *cAMP response element.*
CREB : *cAMP response element binding protein.*
CRLR : *Calcitonin like receptor.*
DAG : Diacylglycerol.
dNTP : Deoxyribonucléosides triphosphates.
DTT : Dithioltréïtol.
E2F : *E2 promoter binding factor.*
EDTA : Acide éthylènediamine tétraacétique sel disodique.
EGF : *Epidermal Growth fatctor.*
eIF 4 A,E,G : *Elongation initiation factor.*
ERK : *Extracellular signal regulated kinase.*
EST : *Express sequence tag.*
ET-1 : Endotheline 1.

FABP : *Fatty acid binding protein.*
FAT : *Fatty acid translocase.*
FATP : *Fatty acid transporter protein.*
FC : Fréquence cardiaque.
FDR : *False discovery rate.*
FITC : Fluorescein isothiocyanate.
Fos : *Feline ostesarcoma.*
GC : Guanylate cyclase.
GDP : Guanosine diphosphate.
GLUT : *Glucose transpoter.*
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique.
GRK : *G-coupled receptor kinase.*
GSK 3β : *Glycogen synthase kinase 3β.*
GTP : Guanosine triphosphate.
H : Hypertendu.
HFD : *High fat diet.*
HR : *heart rate.*
HRV : *Heart rate variability.*
HSP : *Heat shock protein.*
HTA : Hypertension artérielle.
HVG : Hypertrophie ventriculaire gauche.
IκB : *Inhibitory factor κB.*
ICa L : Canal calcique de type L.
IEC : Inhibiteur de l'enzyme de conversion.
IGF : *Insulin-like growth factor.*
IL-6 : Interleukine 6.
IMC : Indice de masse corporel.
IP_3 : Inositol triphosphate.
IRS 1 : *Insulin receptor signal.*
KD : *Knock down.*
KI : *Knock in.*
KO : *Knock Out.*
LCAD : *Long chain acyl-CoA deshydrogenase*
LDH : Lactate deshydrogenase.
MAPK : *Mitogen activating protein kinase.*
MC4R : *Melanocortine 4 receptor.*
MCAD : *Middle chain acyl-CoA deshydrogenase.*
miRNA : *micro RNA.*
MMP-1, 2, 9 : *Matrix metalloproteinase.*
MOS : *Mirror orientation selection.*
mRNA : *messager RNA.*
NA : Noradrénaline.
NCBI : *Nationnal center for bioinformatic.*
NFκB : *Nuclear factor.*
NOS : *Nitric oxyde (NO) synthase.*
NPM : Nuclephosmine.
NpRA : Récepteur à l'ANP de type A.
NPY : Neuropeptide Y.
O : obèse
OD : Oreillette droite.

OG : Oreillette gauche.
OH : Obèse & hypertendu.
PA : Pression artérielle.
PAI-1 : *Plasminogen activator inhibitor 1.*
PCR : *Polymerase chain reaction.*
PDGF : *Platelet-derived growth factor.*
PDH : Pyruvate déshydrogénase.
PFK 1, 2 : Phosphofructokinase.
PGC 1 : *PPARγ coactivator 1).*
PI_3K : PIP_3 Kinase.
PIP_3 : Phosphoinositol triphosphate.
$PK_{A, B, C, G}$: Protein kinase.
PLB : Phospholamban.
PLc : Phospholipase C.
POMC : Proopiomelanocortine.
PPARα, β, γ : *Peroxysome proliferator activator receptor.*
PYY : Peptide YY.
Raf : *Rat fibrosarcoma* ou MAPKKK.
RAMP : *Receptor activity modifying protein.*
RAR : *Retinoïc acid receptor.*
RCPG : *Receptor coupled protein G.*
RDA : *Representationnal difference analysis.*
RDC-1 : *chemokine-like receptors.*
rRNA : *Ribosomal RNA.*
RS : Réticulum sarcoplasmique.
RT : Reverse transcription.
SAA : *Serum amyloïd protein A.*
SAM : *Significance analysis of microarrays.*
SCAD : *Short chain acyl-CoA deshydrogenase.*
SDS : Sodececyl sulfate.
SERCA : *Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase.*
Smad : *Small mothers against decapenplegic (dpp).*
SMART : *Switch mechanism at the 5' end of RNA templates.*
SNA : Système nerveux autonome.
snoRNA : *small nucleolar RNA.*
snRNA : *small nuclear RNA.*
SOD : Super oxyde dismutase.
SRAA : Système rénine angiotensine alodostérone.
SRF : *Serum response factor.*
SSH : *Suppressive substractive hybridization.*
SVD : Sérum de veau nouveau-né.
SVF : Sérum de veau fœtal.
TBP : TATA box binding protein.
TCF : Ternary complex factor.
TF : *Transcription factor.*
FT : Facteur de transcription.
TGF β : *Transforming growth factor β.*
TNF α : *Tumor necrosis factor α.*
TRIP-1 : *TGF β receptor interarcting protein 1.*
tRNA : *transfert RNA.*

VCAD : *Very long chain acyl-CoA deshydrogenase.*
VD : Ventricule droit.
VDAC : *Volt-dependant anion channel.*
VG : Ventricule gauche.
VLF : *Very low frequence.*

Auteur : PHILIP-COUDERC Pierre

Titre : ADAPTATIONS DU SYSTEME NERVEUX VEGETATIF ET DU TRANSCRIPTOME CARDIAQUE AU COURS DE L'OBESITE

Lieu et date de soutenance : **TOULOUSE, le 05/01/2004.**

RESUME (anglais)

Obesity follows a progression without precedent in the industrialised countries and dramatically increases the cardiovascular morbimortality. The excessive development of adipose tissue has a direct impact on heart through peptides and cytokines secreted by adipocytes and an indirect impact through the increase in the volemia. These changes induce modifications of the gene expression in both cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. For example, the expression of the receptor M_2 decreases in the RA of obese hypertensive dogs.

In this experimental model, we showed the existence of a M_2/eNOS pathway that there were compensatory regulations on the level of eNOS.expression which may participate to modulation of M_2 muscarinic receptor in cardiomyocytes derived from P19 cell line.

We undertook a systemic study of cardiac transcriptome both in obese hypertensive dogs and in various human patients. The results show that transcriptionnal adaptation occurs very early after obesity development and that pattern of modifications is specific from obesity. The most interesting data involve TGFβ and Wnt pathways, both implied in cardiogenesis and cardiac hypertrophy. Finally, this genomic approach also identified news genes specifically regulated by obesity and which role is currently under investigation (PPR1 & PPR2).

Titre (anglais) : CARDIAC VEGETATIVE NERVOUS SYSTEM AND TRANSCRIPTOME MODIFICATIONS IN OBESITY

Mots clés : Obese heart, muscarinic receptor M_2 pathway, functional genomic.

Discipline : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE & INTEGREE

Intitulé et adresse du laboratoire : Laboratoire de pharmacologie médicale & clinique
Faculté de médecine, INSERM U586 37 Allées Jules Guesde 31073 TOULOUSE.

Auteur : PHILIP-COUDERC Pierre

Titre : ADAPTATIONS DU SYSTEME NERVEUX VEGETATIF ET DU TRANSCRIPTOME CARDIAQUE AU COURS DE L'OBESITE

Lieu et date de soutenance : TOULOUSE, le 05/01/2004.

RESUME (français)

La prévalence de l'obésité suit une progression sans précédent dans les pays industrialisés et augmente dramatiquement la morbimortalité cardiovasculaire. Le développement excessif du tissu adipeux a un impact direct sur le tissu myocardique au travers des peptides et cytokines qu'il sécrète et un impact indirect au travers de l'augmentation de la volémie. Ces changements induisent des modifications de l'expression génique dans les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques. Par exemple, l'expression du récepteur M_2 diminue dans l'OD de chiens rendus obèses hypertendus.

Dans ce modèle canin, nous avons montré dans la voie M_2/eNOS qu'il existait des régulations compensatoires au niveau de la eNOS. Nous avons également montré que l'adrénomedulline, peptide impliqué dans l'homéostasie tensionnelle et sécrété par le tissu adipeux, détermine la surexpression compensatoire du récepteur M_2, dans le modèle de cardiomyocytes de la lignée P19.

Nous avons entrepris une étude globale au niveau du transcriptome dans le but d'identifier l'ensemble des modifications induites dans le cœur de l'obèse. Ces études, dans le modèle de chien obèse hypertendu, puis chez l'Homme ont montré que le cœur de l'obèse modifiait très précocement l'expression de ses gènes et qu'il avait un profil transcriptionnel unique. Ces régulations convergent notamment vers la voie TGF β et la voie Wnt, toutes deux normalement impliquées dans la cardiogénèse. Enfin, ces travaux ont initié l'étude de gènes nouveaux inconnus (PPR1 & PPR2).

Titre (anglais) : CARDIAC VEGETATIVE NERVOUS SYSTEM AND TRANSCRIPTOME MODIFICATIONS IN OBESITY

Mots clés : Cœur de l'obèse, voie de signalisation des récepteurs muscariniques M_2 cardiaques, génomique fonctionnelle.

Discipline : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE & INTEGREE

Intitulé et adresse du laboratoire : Laboratoire de pharmacologie médicale & clinique
Faculté de médecine, INSERM U586 37 Allées Jules Guesde 31073 TOULOUSE.