



**UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE**  
**ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**  
Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale (CRMBM)

Thèse présentée par  
Natacha Fourny

Pour obtenir le grade universitaire de Docteur  
Discipline : Pathologie Humaine  
Spécialité : Pathologie vasculaire et nutrition

---

**Du prédiabète au diabète de type 2 : Quels impacts sur la santé  
cardiovasculaire dans le sexe féminin ?**

-

*Approche thérapeutique par le Resvératrol contre les lésions  
myocardiques liées à l'ischémie-reperfusion dans le diabète de type 2.*

---

Soutenue publiquement le 19/04/2019 devant le jury composé de :

**Dr Renée VENTURA-CLAPIER**, Université Paris-sud XI

Rapportrice

**Pr François BOUCHER**, Université Grenoble Alpes

Rapporteur

**Dr Stéphane MANZO-SILBERMAN**, Université Paris VII

Examinatrice

**Pr Anne DUTOUR**, Université d'Aix-Marseille

Examinatrice

**Dr Monique BERNARD**, Université d'Aix-Marseille

Directrice de thèse

**Dr Martine DESROIS**, Université d'Aix-Marseille

Co-Directrice de thèse



## **REMERCIEMENTS**

Je tiens exprimer mes sincères remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail de thèse. Je remercie le Docteur Ventura-Clapier et le Professeur Boucher d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que le Docteur Manzo-Silberman et le Professeur Dutour d'avoir accepté d'être les examinatrices de ce travail. Je leur suis très reconnaissante du temps qu'ils ont bien voulu accorder à lecture de ce manuscrit.

Je remercie le Dr Monique Bernard de m'avoir permis d'intégrer le laboratoire il y a quelques années déjà ! Je vous remercie de votre accueil, de m'avoir donné l'opportunité de faire une thèse dans d'excellentes conditions, d'avoir pu présenter mes travaux dans de nombreux congrès, qui ont été pour moi des expériences très enrichissantes. Merci encore pour vos remarques pertinentes lors de l'écriture des articles et du manuscrit.

Je souhaite remercier chaleureusement ma co-directrice de thèse Martine ! J'espère qu'en tant que première thésarde j'ai été à la hauteur. Je n'ai pas vu le temps passer et c'est bien la preuve que de travailler et échanger avec toi a été un réel plaisir. J'espère que tu as pris autant de plaisir que moi à travailler ensemble au cours de ces trois années de thèse. Merci pour ton implication, tes conseils et tes encouragements tout au long de la thèse et pendant l'écriture du manuscrit. Tu m'as montré que la recherche est un monde passionnant et pour ça je te remercie !

A ma team cœur isolé, Martine et Carole, merci de m'avoir aussi bien accueillie !! Team cœur isolé forever ! J'ai adoré travailler avec vous deux. Nos semaines au Nicolet et nos voyages pour les congrès resteront de supers souvenirs ! J'ai appris à vous connaître pendant le master et la thèse et je ne regrette pas d'avoir fait le choix de travailler avec vous, ce fût un réel plaisir ! Vous allez devoir me supporter encore quelques mois et j'espère qu'on aura l'occasion de travailler à nouveau ensemble après ça !

Un grand merci à toi Carole pour ton aide tout au long de ma thèse, de m'avoir appris ce qu'il fallait savoir pour les expériences de cœur isolé dans la bonne humeur et parfois même en musique ! On s'en rappellera avec Calypso ^^ ! Merci aussi pour ton aide pour la biochimie et le traitement de données, particulièrement vers la fin.

Un immense merci à Frank, pour ton aide tout au long de ma thèse. Pendant mes manips au Biospec où je pensais que j'allais parfois m'arracher les cheveux ! Tu as toujours répondu présent pour que mes expériences puissent aboutir ! Merci également de ton aide dans l'écriture

du premier papier et de ta patience. J'ai toujours apprécié nos discussions qu'elles soient scientifiques ou sur la vie en général.

Merci à ma voisine de bureau Nathalie, pour ton accueil et ta bonne humeur, pour nos discussions matinales sur la vie, sur la cuisine... Merci également pour les soins que tu prodigues à nos animaux chaque jour.

Je souhaite également remercier Christophe, Yann et Emilie, pour votre aide pendant mes manip aux Biospec et en biochimie. Merci à Martyne pour tes conseils, nos discussions scientifiques ou non scientifiques d'ailleurs.

Merci à Alex et Charlotte, vous êtes au top ! Si j'ai passé trois super années c'est aussi en grande partie grâce à vous ! Les moments des repas du midi étaient cool ! Entre mots croisés, paris sur la coupe du monde de foot et dégustations culinaires on avait de quoi s'occuper !! Nos after-lab au Glam rock et nos parties de badminton m'ont aussi fait beaucoup de bien. Merci aussi pour vos conseils sur la thèse et votre soutien!

Merci aux jeunes (qui sont déjà partis, qui sont encore là ou qui viennent d'arriver) pour votre bonne humeur et tous ses bons moments passés ensemble au sein du labo ou en dehors !

Un grand merci à Magatte et Danielle, pour votre aide bien sûr mais aussi pour ces petits moments de discussion cinématographique ! Merci aussi à Djamila qui nous chouchoute au quotidien comme ses enfants et qui nous transmet une joie de vivre communicative!

J'aimerais également remercier l'ensemble du laboratoire pour leur accueil chaleureux. Ceux avec qui j'ai passé du temps au quotidien et qui ont rendu ces trois années très agréables, et ceux que je n'ai pas eu l'occasion de côtoyer au quotidien mais que j'avais toujours plaisir à rencontrer.

Merci à mes amis,

Ma Thérèse, on a chacune eu le temps de faire une thèse depuis que l'on se connaît ! 8 ans déjà et je me rends compte à quel point j'ai de la chance de t'avoir pour amie dans ma vie. Merci de m'avoir embarqué dans ton aventure Québécoise le temps de quelques vacances ! Merci de ton soutien. Je t'aime fort ma Thérèse !

Ma tata Aur et ma Gluglu d'amour. Mes plus belles rencontres de Marseille sans aucun doute !  
Moi qui ne voulais pas venir à Marseille au début, je ne regrette pas car cela m'a permis de rencontrer deux amies en or ! Je vous aime les girls <3

Bien sûr une mention particulière à Augustin, mon ami, mon partenaire de badminton et d'apéro Glam rock avec qui j'ai pu discuter de la thèse (la tienne et la mienne), de la vie, de tout... Pour moi tu resteras ma meilleure rencontre au laboratoire ! C'est sûr que ces trois années n'auraient pas été aussi fun sans toi 😊 !

Merci à mes amis, Guillaume, Annie, Pierre, Fabou, Flo, Delphine, Benjamin, Sophie, Sarah. On ne se voit pas souvent, mais c'est ça aussi l'amitié, se retrouver sans que rien n'ait changé. Vous rendez ma vie plus belle par vos attentions et vos rires.

Merci également à ma belle-famille, qui est ma deuxième famille et qui m'encourage depuis le début.

Merci à ma famille,

Elena, ma petite sœur chérie, ma morue, la femme de ma vie. 2019 est décidément une année importante pour toutes les deux ! Merci pour ton soutien au quotidien, merci de m'apporter tant d'amour, de me faire tant rire, de me faire danser quand il est tard au labo 😊. Je suis fière de toi, je t'aime.

Ma mamounette et mon papounet, si j'ai pu arriver jusqu'ici c'est bien grâce à vous ! Merci à vous de m'avoir toujours encouragé dans la vie et les études. C'est qu'au bout de 11 années il serait temps que je sois enfin diplômée d'ailleurs ! Vous êtes des modèles pour moi et je suis fière de notre famille et d'être votre fille. Je vous aime <3

David, l'homme de ma vie. Merci d'être à mes côtés depuis le début. Bientôt 8 ans déjà et j'ai une chance inouïe d'être tombé sur toi ! On le dit depuis toujours, #bestcoupleintheworld !! 😊  
Cette thèse c'est également grâce à toi alors merci ! (Et puis aussi un peu grâce à Meiko et Torvi haha). Je t'aime !!

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### Revues à comité de lecture

- **N. Fourny**, C. Lan, F. Kober, D. Boulghobra, J. Bresciani, C. Reboul, M. Bernard and M. Desrois. Cardiac remodeling and higher sensitivity to ischemia-reperfusion injury in female rats submitted to high-fat high-sucrose diet: an in vivo / ex vivo longitudinal follow-up. Publié dans *The Journal of Nutritional Biochemistry* (2019); <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.03.022>.
- **N. Fourny**, C. Lan, E. Séréé, M. Bernard and M. Desrois. Protective effect of Resveratrol against ischemia-reperfusion injury via improved mitochondrial energetic pathway and endothelial function in type 2 diabetic female rat heart. Publié dans *Nutrients* (2019); doi: 10.3390/nu11010105.
- I. Abdesselam, P. Pepino, T. Troalen, M. Macia, P. Ancel, B. Masi, **N. Fourny**, B. Gaborit, B. Giannesini, F. Kober, A. Dutour, M. Bernard. Time course of cardiometabolic alterations in a high fat high sucrose diet mice model and improvement after GLP-1 analog treatment using multimodal cardiovascular magnetic resonance. Publié dans *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* (2015); doi: 10.1186/s12968-015-0198-x.
- C. Mathieu, M. Desrois, F. Kober, N. Lalevée, C. Lan, **N. Fourny**, M. Iché-Torres, T.T. Tran, L.T. Lê, M. Singer, J.L. Mège, M. Bernard, M. Leone. Sex-Mediated Response to the Beta-Blocker Landiolol in Sepsis: An Experimental, Randomized Study. Publié dans *Critical Care Medicine* (2018); doi: 10.1097/CCM.0000000000003146.

### Actes de colloque à comité de lecture

#### 2018

- **N. Fourny**, C. Lan, M. Bernard and M. Desrois. Does sex influence the tolerance to ischemia-reperfusion injury in a metabolic syndrome model? *Diabetologia*. 2018 Oct;61(Suppl 1):577.
- **N. Fourny**, C. Lan, E. Séréé, L. Pechere, M. Bernard and M. Desrois. Protective effect of Resveratrol against cardiac dysfunction and impaired energy metabolism of type 2 diabetic female GK rat heart submitted to Ischemia-Reperfusion injury. *Proc. Intl. Mag. Reson. Med.* 26 (2018) 2956.

- **N. Fourny**, C. Lan, F. Kober, M. Bernard and M. Desrois. Tolerance to ischemia-reperfusion injury in a metabolic syndrome model: effect of gender? *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements Vol 10 (n°2), April 2018*.

## **2017**

- M. Desrois, **N. Fourny**, C. Lan, E. Séréé, L. Pechere and M. Bernard. Protective effect of Resveratrol against cardiac and endothelial dysfunctions of type 2 diabetic female GK rat heart submitted to Ischemia-Reperfusion injury. *Diabetologia. 2017 Sept;60(Suppl 1):266*.

- **N. Fourny**, C. Lan, F. Kober, M. Bernard and M. Desrois. Modification of cardiac morphology was associated with impaired myocardial sensitivity to ischemia-reperfusion injury in a diet-induced metabolic syndrome model. *Diabetologia. 2017 Sept;60(Suppl 1):583*.

- **N. Fourny**, C. Lan, F. Kober, M. Bernard and M. Desrois. Intolerance to glucose and abdominal obesity in a diet-induced metabolic syndrome model were associated with modification of cardiac morphology and impaired myocardial function. *Archives of Cardiovascular Diseases, Supplements, Vol 9, n°2, April 2017*.

## **2016**

- **N. Fourny**, C. Lan, J. Movassat, M. Bernard and M. Desrois. Impaired tolerance to ischemia-reperfusion of the female type 2 diabetic rat heart was associated with impaired energy metabolism, cardiac and endothelial function. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine, September 2016, Volume 29, Issue 1 Supplement: S235*.

- **N. Fourny**, C. Lan, J. Movassat, M. Bernard and M. Desrois. Impaired energy metabolism, cardiac and endothelial function in the female type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat heart following ischemia-reperfusion injury. *Diabetologia, August 2016, Volume 59, Supplement 1*.

## **Communications à des congrès, symposium**

### **2018**

- 54th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD); Berlin, Germany, 1 – 5 octobre **2018**. **N. Fourny**, C. Lan, M. Bernard and M. Desrois. Does sex

influence the tolerance to ischemia-reperfusion injury in a metabolic syndrome model? *Poster commenté.*

- International Society for Magnetic Resonance in Medicine - European Society for Magnetic Resonance in Medicine & Biology (ISMRM – ESMRMB); Paris, 16 – 21 juin **2018**. **N. Fourny**, C. Lan, E. Séréé, L. Pechere, M. Bernard and M. Desrois. Protective effect of Resveratrol against cardiac dysfunction and impaired energy metabolism of type 2 diabetic female GK rat heart submitted to Ischemia-Reperfusion injury. *Poster commenté.*

- Printemps de la Cardiologie ; Montpellier, 4 – 6 Avril **2018**. **N. Fourny**, C. Lan, F. Kober, M. Bernard and M. Desrois. Tolerance to ischemia-reperfusion injury in a metabolic syndrome model: effect of gender? *Poster commenté.*

## **2017**

- 53rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Lisbonne, 11 – 15 septembre **2017**. M Desrois, **N Fourny**, C Lan, E Séréé, L Pechere and M Bernard. Protective effect of Resveratrol against cardiac and endothelial dysfunctions of type 2 diabetic female GK rat heart submitted to Ischemia-Reperfusion injury. *Poster commenté.*

- 53rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Lisbonne, 11 – 15 septembre 2017. **N Fourny**, C Lan, F Kober, M Bernard and M Desrois. Modification of cardiac morphology was associated with impaired myocardial sensitivity to ischemia-reperfusion injury in a diet-induced metabolic syndrome model. *Poster commenté.*

- Printemps de la Cardiologie ; Nantes 6 – 7 avril **2017**. **N. Fourny**, C. Lan, F. Kober, M. Bernard and M. Desrois. Intolerance to glucose and abdominal obesity in a diet-induced metabolic syndrome model were associated with modification of cardiac morphology and impaired myocardial function.

- Société Française de Résonance Magnétique en Biologie et Médecine (SFRMBM); Bordeaux, 13 – 15 mars **2017**. **N Fourny**, C Lan, F Kober, M Bernard and M Desrois. Intolérance au glucose et obésité abdominale associées à une modification de la morphologie et une altération de la fonction cardiaque dans un modèle de syndrome métabolique induit par un régime. *Poster commenté.*



## **2016**

- 33rd Annual Scientific Meeting of the European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology (ESMRMB) Vienne; 29 septembre – 1 octobre **2016**. **N. Fourny**, C. Lan, J. Movassat, M. Bernard and M. Desrois. Impaired tolerance to ischemia-reperfusion of the female type 2 diabetic rat heart was associated with impaired energy metabolism, cardiac and endothelial function. *Oral et Poster commenté.*

- 52nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD); Munich, 12 – 16 septembre **2016**. **N. Fourny**, C. Lan, J. Movassat, M. Bernard and M. Desrois. Impaired energy metabolism, cardiac and endothelial function in the female type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat heart following ischemia-reperfusion injury. *Poster commenté.*

- Première rencontre scientifique du champ disciplinaire cardiovasculaire et nutrition. Marseille, 19 février **2016**. **N. Fourny** et M. Desrois. Effet du genre sur les altérations fonctionnelles, métaboliques et endothéliales dans le cœur diabétique de type 2. *Oral.*

## **Prix**

- Prix Poster Printemps de la Cardiologie ; Montpellier, 4 – 6 Avril **2018**.

## **Vulgarisation scientifique**

- Participation au concours Ma thèse en 180 secondes en **2017**.

- Projet d'Accompagnement en Sciences et Technologie à l'Ecole Primaire (ASTEP), réalisé à l'école Bugeaud (Marseille) en **2016-2017** : Apprentissage de la démarche scientifique et étude du mode de déplacement du lapin et de l'escargot dans une classe de maternelle.

## **ABBREVIATIONS**

8-iso PGF <sub>2α</sub> : 8-iso prostaglandine F <sub>2α</sub>	FID: Free induction decay
ADA: American Diabetes Association	FID: Fédération Internationale du Diabète
ADP: Adénosine di-phosphate	FOV: Field of view
AG: Acides gras	FPG: Fasting Plasma Glucose
AMP: Adénosine mono-phosphate	GCs: Guanylate cyclase
AMPK: AMP-activated protein kinase	GK: Goto-Kakizaki
ANOVA: Analyse of variance	GLP-1: Glucagon Like Peptide -1
ASL-FAIR: Arterial spin labeling - flow alternating inversion recovery	GPx: Glutathion peroxydase
ATP: Adénosine tri-phosphate	H <sup>+</sup> : Proton
BCA: Bi-cinchoninic acid assay	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène
BH <sub>4</sub> : Tétrahydrobioptérine	HbA1c: Hémoglobine glyquée
BSA: Bovine serum albumin	HDL: High-Density Lipoprotein
Ca <sup>2+</sup> : Calcium	HENS: HEPES, EDTA, Neocuproine, SDS
CaCl <sub>2</sub> : Chlorure de calcium	HFS: High-Fat-Sucrose
CAECs: Coronary arterial endothelial cells	HOMA: Homeostasis Model Accessment of insuline resistance
CF: Coronary flow	HPLC: High performance liquid chromatography
CI: Cardiac index	HR: Heart rate
CK: Creatine kinase	ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1
CO: Cardiac output	IDL: Interactive data language
CO <sub>2</sub> : Dioxyde de carbone	IL1β: Interleukine 1β
CRP: Protein C reactive	IL6: Interleukine 6
CS: Citrate synthase	iNOS: Inducible nitric oxide synthase
CTRL: Contrôle	IPGTT: Intraperitoneal glucose tolerance test
CV: Cardiovasculaire	IRM: Imagerie par Résonance Magnétique
DP: developed pressure	K <sup>+</sup> : Potassium
DPP-4: Dipeptidyl peptidase-4	KCl: Chlorure de potassium
EC: Energy charge	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : Phosphate de potassium monobasique
ECG: Electrocardiogramme	KO: Knock-out
EDTA: Acide éthylènediaminetétraacétique	LB: Laemml Buffer
EDV: End diastolic volume	LDH: Lactate Deshydrogénase
eNOS: Endothelial Nitric Oxide Synthase	LDL: Low-Density Lipoprotein
EROs: Espèces Réactives de l'Oxygène	LVEF: Left ventricular ejection fraction
ERRα: Estrogen-related receptor α	LVVdia: Left ventricular volume in diastole
ERα: Estrogen receptor α	LVVsys: Left ventricular volume in systole
ERβ: Estrogen receptor β	MBF: Myocardial blood flow
ESV: End systolic volume	MDA: Malondialdéhyde
FDA: US Food and Drug Administration	
FFAs: Free fatty acids	

MetS: Syndrome métabolique  
 MgSO<sub>4</sub>: Sulfate de magnésium  
 miRs: Micro-ARNs  
 MRI: Magnetic resonance imaging  
 MRS: Magnetic resonance spectroscopy  
 NA: Nombre d'accumulation  
 NaCl: Chlorure de sodium  
 NAD<sup>+</sup>/NADH: Nicotinamide adénine nucléotide  
 NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
 NaHCO<sub>3</sub>: Bicarbonate de sodium  
 NF-κB: Nuclear factor-kappa B  
 NO: Nitric Oxide  
 NOS: Nitric Oxide Synthase  
 NOX: NADPH oxydase  
 Nrf1: Nuclear respiratory factor 1  
 Nrf2: Nuclear respiratory factor 2  
 O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ion superoxide  
 O<sub>2</sub>: Oxygène  
 OGTT: Oral glucose tolerance test  
 OLETF: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty  
 OMS: Organisation Mondiale de la Santé  
 ONOO<sup>-</sup>: Peroxyde nitrite  
 Pa: Palmitate  
 PA: Pression artérielle  
 PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1  
 PCr: Phosphocréatine  
 PGC1α: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α  
 PGI<sub>2</sub>: Prostacycline  
 pHi: pH intracellulaire  
 Pi: Phosphate inorganique  
 PI3K: Phosphoinositide 3-kinase  
 PKCβ: Protein kinase C β  
 PME: Phosphate monoester  
 PPA: Acide phenylphosphonique  
 PPARα: Peroxisome proliferator-activated receptor α  
 PRESS: Point resolved spectroscopy  
 PVDF: Polyfluorure de vinylidène

RF: Radiofréquence  
 RIPA: Radioimmunoprecipitation assay buffer  
 RMN: Résonance magnétique nucléaire  
 RPG: Resting Plasma Glucose  
 RSV: Resvératrol  
 SB: Sample buffer  
 SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
 SERCA2a: Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase  
 SGLT-2: Sodium/glucose cotransporteur 2  
 SIRT 3: Sirtuine 3  
 SIRT1: Sirtuine 1  
 SOD: Superoxyde dismutase  
 SPECT: Tomographie par émission monophotonique  
 SRM: Spectroscopie par Résonance Magnétique  
 STZ: Streptozotocine  
 SV: Stroke volume  
 sWtn: Systolic wall thickening  
 TAN: Total adenine nucleotides  
 TASC: Tissu adipeux sous-cutané  
 TAV: Tissu adipeux viscéral  
 TBA: Acide thiobarbiturique  
 TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances  
 TBS: Tris-buffered saline  
 TBS-T: TBS-Tween  
 TE: Temps d'écho  
 TEP: Tomographie par émission de positons  
 Tfam: Mitochondrial transcription factor A  
 TG: Triglycérides  
 TNFα: Tumor Necrosis Factor α  
 TR: Temps de répétition  
 UCP3: Mitochondrial uncoupling protein 3  
 VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1  
 vWf: Von Willebrand factor  
 Wtdia: Wall thickness in diastole  
 Wtsys: Wall thickness in systole  
 ZDF: Zucker Diabetic Fatty

## **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

<b>Figure 1</b> Estimation de la prévalence du diabète au niveau mondial et par région en 2017 et en 2045. D'après l'Atlas du diabète de la FID, Huitième édition 2017. ....	20
<b>Figure 2</b> Evolution de la prévalence du diabète entre 1980 et 2014 dans le monde. D'après L'Organisation Mondiale de la Santé.....	22
<b>Figure 3</b> Diagnostic du prédiabète et du diabète en fonction de l'hémoglobine glyquée (HbA1c), de la glycémie à jeun (FPG), du test oral de tolérance au glucose (OGTT) et de la glycémie prise à n'importe quel moment de la journée (RPG). D'après The American Diabetes Association (ADA); Standards of medical care in diabetes; 2018. ....	24
<b>Figure 4</b> Prévalence du prédiabète en France en 2013. Adapté de S. Fosse-Edorh; Les rencontres de Santé Publique France, Paris, 29 mai 2018.....	25
<b>Figure 5</b> Du prédiabète au diabète de type 2. Evolution des paramètres d'insulinorésistance, d'insulinémie et de glycémie à jeun au cours du temps. D'après Rabasa-Lhoret.....	26
<b>Figure 6</b> Anomalies détectées dans le diabète de type 2. Adapté de Brunton.....	26
<b>Figure 7</b> Dimère ou monomère de la eNOS. D'après Lu et coll. ....	37
<b>Figure 8</b> Mortalité par maladie coronarienne par pays en fonction de la consommation de lipides par jour. Adapté de Renaud et de Lorgeril.....	53
<b>Figure 9</b> Effets du Resvératrol sur l'organisme. D'après Weiskirchen et coll.....	54
<b>Figure 10</b> Structure des deux isomères du Resvératrol.....	55
<b>Figure 11</b> Voie de synthèse du Resvératrol. D'après Latruffe.....	56
<b>Figure 12</b> Cibles et mécanismes d'action du Resvératrol. D'après Xia et coll.....	61
<b>Figure 13</b> Schéma d'un spin.....	66
<b>Figure 14</b> Orientation des spins en absence de champ magnétique externe. ....	67
<b>Figure 15</b> Orientation des spins en présence d'un champ magnétique externe.....	67
<b>Figure 16</b> Représentation schématique des spins avec la même origine.....	68
<b>Figure 17</b> Bascule de l'aimantation dans le plan transversal après application d'un champ magnétique $B_1$ . ....	68
<b>Figure 18</b> Relaxation longitudinale .....	69
<b>Figure 19</b> Relaxation transversale .....	69
<b>Figure 20</b> Création d'un signal de précession libre (FID) .....	70

<b>Figure 21</b> Techniques d'IRM cardiaque permettant une évaluation myocardique. Adapté de Shah et coll. ....	73
<b>Figure 22</b> Spectre de SRM du phosphore-31 .....	77
<b>Figure 23</b> Schéma représentant la façon dont la lignée GK a été créée. D'après Portha. ....	82
<b>Figure 24</b> Aimant Biospec 4,7T utilisé lors des examens cardiaques. ....	83
<b>Figure 25</b> Berceau accueillant le rat pour l'examen IRM/SRM. ....	84
<b>Figure 26</b> Acquisitions IRM permettant l'obtention d'images du cœur en coupe « petit axe » et « 4 chambres ».....	86
<b>Figure 27</b> Images utilisées pour les mesures des zones endocardiques (contours rouges) et épicaudiques (contour en bleu) lors de la diastole (A) et la systole (B) ; et la mesure des longueurs ventriculaires en diastole (C) et systole (D). ....	86
<b>Figure 28</b> Analyse des acquisitions de perfusion sur le logiciel IDL.....	87
<b>Figure 29</b> Exemple de spectre de résonance magnétique du proton analysé par AMARES... ..	88
<b>Figure 30</b> Exemple de coupe transversale permettant l'évaluation de la distribution des tissus adipeux (en violet) viscéral (A) et sous cutané (B). ....	89
<b>Figure 31</b> Préparation du cœur isolé perfusé. ....	91
<b>Figure 32</b> Système de perfusion du cœur isolé.....	92
<b>Figure 33</b> Protocole expérimental d'ischémie-reperfusion.. ....	93
<b>Figure 34</b> Exemple d'acquisition de la fonction cardiaque avec le logiciel ATS .....	94
<b>Figure 35</b> Exemple d'acquisition des spectres de SRM du phosphore-31 permettant l'évaluation du métabolisme énergétique cardiaque. ....	95
<b>Figure 36</b> Résultat préliminaire sur la fonction myocardique de rats diabétiques de type 2 GK mâles (MGK) et femelles (FGK) vs. rats Wistar contrôles mâles (MW) et femelles (FW)... ..	199
<b>Tableau 1</b> Les différentes classes thérapeutiques utilisées dans le traitement du diabète de type 2.....	52
<b>Tableau 2</b> Composition détaillée du régime U8978 v19 (SAFE).....	80
<b>Tableau 3</b> Concentrations et solutions d'incubation des anticorps primaires.....	101
<b>Tableau 4</b> Concentrations et solutions d'incubation des anticorps secondaires.....	102

## SOMMAIRE

Avant-propos.....	18
Introduction générale.....	21
<b>Partie 1 : Prédiabète, diabète de type 2 et complications cardiovasculaires.....</b>	<b>22</b>
<b>I- Du prédiabète au diabète de type 2.....</b>	<b>23</b>
<b>II- Les complications cardiovasculaires du diabète de type 2.....</b>	<b>27</b>
<b>A- Généralités.....</b>	<b>27</b>
<b>B- Les facteurs de risque associés aux complications cardiovasculaires.....</b>	<b>28</b>
1- L'obésité.....	28
2- L'inflammation.....	29
3- La dyslipidémie.....	30
4- L'hypertension.....	30
<b>C- Les complications micro- et macrovasculaires du diabète de type 2....</b>	<b>30</b>
1- Les atteintes microvasculaires.....	30
2- Les atteintes macrovasculaires.....	31
a- L'ischémie myocardique.....	31
b- La reperfusion.....	32
<b>D- La cardiomyopathie diabétique.....</b>	<b>32</b>
1- Généralités.....	32
2- Caractéristiques.....	33
3- Mécanismes moléculaires.....	34
<b>E- Rôle des dysfonctions endothéliale et mitochondriale dans les complications cardiovasculaires associées au diabète de type 2.....</b>	<b>35</b>
1- La dysfonction endothéliale.....	35
a- Généralités.....	35
b- Mesure de la dysfonction endothéliale.....	35
c- Mécanismes.....	36
d- Rôle du stress oxydant.....	37
2- La dysfonction mitochondriale.....	38
a- Généralités.....	38
b- Mécanismes.....	38
c- Rôle du stress oxydant.....	40
<b>III- Conclusion.....</b>	<b>40</b>
<b>Partie 2 La théorie du genre/sexe : une réalité en santé cardiovasculaire ?.....</b>	<b>41</b>
<b>I- Encore trop d'idées reçues sur le risque cardiovasculaire des femmes.....</b>	<b>41</b>
<b>II- Dimorphisme sexuel basal.....</b>	<b>43</b>

<b>III- Dimorphisme sexuel dans les facteurs de risque cardiovasculaires.....</b>	<b>43</b>
<b>A- Comportements et style de vie.....</b>	<b>43</b>
<b>B- Obésité.....</b>	<b>44</b>
<b>C- Hypertension.....</b>	<b>45</b>
<b>D- Hyperglycémie.....</b>	<b>45</b>
<b>IV- Dimorphisme sexuel dans les maladies cardiovasculaires associées au diabète de type 2.....</b>	<b>46</b>
<b>A- Effet du sexe dans les maladies des artères coronaires.....</b>	<b>47</b>
<b>B- Effet du sexe dans la cardiomyopathie diabétique.....</b>	<b>48</b>
1- Généralités.....	48
2- Fibrose/Hypertrophie.....	48
3- Métabolisme mitochondrial.....	49
<b>V- Conclusion.....</b>	<b>50</b>
<b>Partie 3 : Approche thérapeutique par le Resvératrol.....</b>	<b>51</b>
<b>I- Le traitement du diabète de type 2.....</b>	<b>51</b>
<b>II- Le « French Paradox ».....</b>	<b>53</b>
<b>III- Généralités sur le Resvératrol.....</b>	<b>55</b>
<b>A- Origine.....</b>	<b>55</b>
<b>B- Structure.....</b>	<b>55</b>
<b>C- Voie de synthèse.....</b>	<b>56</b>
<b>D- Absorption, métabolisme et biodisponibilité.....</b>	<b>57</b>
<b>IV- Les cibles du Resvératrol.....</b>	<b>57</b>
<b>A- Généralités.....</b>	<b>57</b>
<b>B- SIRT1 et SIRT3.....</b>	<b>57</b>
1- SIRT1.....	57
2- SIRT3.....	58
<b>V- Les doses de Resvératrol.....</b>	<b>59</b>
<b>VI- Effets du Resvératrol sur le diabète de type 2 et les complications cardiovasculaires.....</b>	<b>60</b>
<b>A- Effets du Resvératrol sur le diabète.....</b>	<b>60</b>
<b>B- Effets du Resvératrol sur le cœur.....</b>	<b>60</b>
<b>C- Mécanismes d'action du Resvératrol.....</b>	<b>61</b>
1- Effets du Resvératrol sur le stress oxydant.....	62
2- Effets du Resvératrol sur la fonction endothéliale.....	63
3- Effets du Resvératrol sur la mitochondrie.....	63

4- Effets du Resvératrol sur les œstrogènes.....	64
<b>VII- Conclusion.....</b>	<b>65</b>
<b>Partie 4 : Résonance Magnétique Nucléaire et Applications à l'étude des complications cardiovasculaires du diabète de type 2.....</b>	<b>66</b>
<b>I- Principe de la RMN.....</b>	<b>66</b>
<b>A- L'aimantation.....</b>	<b>67</b>
<b>B- La polarisation.....</b>	<b>67</b>
<b>C- La résonance.....</b>	<b>68</b>
<b>D- La relaxation.....</b>	<b>69</b>
<b>E- L'expérience de RMN.....</b>	<b>70</b>
<b>II- Les applications de l'IRM et la SRM à l'étude des complications cardiovasculaires du diabète de type 2.....</b>	<b>71</b>
<b>A- Imagerie et exploration des complications cardiovasculaires associées au diabète.....</b>	<b>71</b>
<b>B- Paramètres étudiés par IRM et SRM.....</b>	<b>72</b>
1- Les pathologies ischémiques.....	73
2- La cardiomyopathie diabétique.....	74
a- La morphologie et la fonction cardiaque.....	74
b- La fibrose myocardique.....	75
c- Les dépôts ectopiques de graisse.....	76
d- Le métabolisme énergétique.....	77
<b>III- Conclusion.....</b>	<b>78</b>
<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>79</b>
<b>I- Modèles animaux.....</b>	<b>80</b>
<b>A- Le rat soumis à un régime riche en graisse et en sucre (HFS).....</b>	<b>80</b>
<b>B- Le rat Goto-Kakizaki (GK).....</b>	<b>81</b>
<b>II- Expérimentations <i>in vivo</i>.....</b>	<b>82</b>
<b>A- Etude par Imagerie et Spectroscopie de Résonance Magnétique.....</b>	<b>82</b>
1- Préparation.....	82
2- Paramètres mesurés.....	84
a- Morphologie et fonction cardiaque.....	84
b- Perfusion myocardique.....	87
c- Contenu intra-cardiaque et intra-hépatique en triglycérides (TG).....	88
d- Volume de tissu adipeux sous-cutané et viscéral (SCAT et VAT).....	89
<b>B- Mesures physiologiques.....</b>	<b>89</b>
1- Test de tolérance au glucose.....	89
2- Mesure de la pression artérielle.....	90
<b>III- Expérimentations <i>ex vivo</i>.....</b>	<b>90</b>
<b>A- Préparation du cœur isolé perfusé.....</b>	<b>90</b>
<b>B- Appareillage et solutions de perfusion.....</b>	<b>91</b>



<b>C-</b>	<b>Protocole expérimental.....</b>	<b>92</b>
1-	Paramètres mesurés.....	93
a-	Fonction cardiaque.....	93
b-	Métabolisme énergétique.....	94
<b>IV-</b>	<b>Expérimentations <i>in vitro</i> / Analyses biochimiques.....</b>	<b>96</b>
<b>A-</b>	<b>Dissection et collecte d'échantillons.....</b>	<b>96</b>
<b>B-</b>	<b>Analyses dans le plasma.....</b>	<b>96</b>
<b>C-</b>	<b>Analyses dans les cœurs.....</b>	<b>96</b>
1-	Activité des enzymes Créatine Kinase (CK) et Lactate Déshydrogénase (LDH).....	96
a-	Dosage de la LDH.....	96
b-	Dosage de la CK.....	96
c-	Dosage des protéines.....	97
2-	Malondialdéhyde (MDA).....	97
3-	Créatine, phosphocréatine et nucléotides adénylés.....	97
4-	Activité de l'enzyme Citrate Synthase (CS).....	98
5-	Expression protéique par Western Blots.....	98
a-	Extraction des protéines.....	98
b-	Dosage des protéines.....	99
c-	Préparation des échantillons.....	99
d-	Electrophorèse.....	99
e-	Transfert des protéines.....	100
f-	Inhibition des interactions non-spécifiques.....	101
g-	Anticorps primaires.....	101
h-	Anticorps secondaires.....	102
i-	Détection du signal.....	102
<b>V-</b>	<b>Analyses statistiques.....</b>	<b>103</b>
<b>Résultats.....</b>		<b>104</b>
<b>ETUDE 1.....</b>		<b>106</b>
<b>ETUDE 2.....</b>		<b>145</b>
<b>ETUDE 3.....</b>		<b>177</b>
<b>Discussion générale et Perspectives.....</b>		<b>200</b>
<b>Conclusion générale.....</b>		<b>214</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>		<b>215</b>
<b>Annexes .....</b>		<b>234</b>
<b>Résumé / Abstract.....</b>		<b>4<sup>ème</sup> de couverture</b>

## Avant-propos

**E**n raison de son expansion, le diabète est considéré de nos jours comme l'épidémie du 21<sup>ème</sup> siècle. Un rapport alarmant de la Fédération Internationale du Diabète (FID) estime que 425 millions de personnes étaient atteintes de diabète en 2017 et que 629 millions en seront atteintes en 2045 (Figure 1). Le diabète est une pathologie plurifactorielle dont l'étiologie repose à la fois sur des facteurs environnementaux et sur une prédisposition génétique. Le mode de vie actuel caractérisé par une alimentation trop riche et une diminution de la pratique d'une activité physique a fortement contribué à l'expansion du diabète de type 2 dans le monde.

Le diabète de type 2 est un facteur de risque connu de complications cardiovasculaires (CV). Il est intéressant de noter que des différences existent entre les hommes et les femmes diabétiques en termes de risque CV. En absence de diabète de type 2 et avant la ménopause, on reconnaît largement une cardioprotection chez les femmes par rapport aux hommes. Les hypothèses émises pour expliquer ces différences portent essentiellement sur les hormones sexuelles féminines qui seraient protectrices. Cependant, cet avantage semble aboli chez une femme diabétique de type 2. En effet, les femmes diabétiques de type 2 deviendraient plus à risque de complications et de mortalité CV que les hommes diabétiques de type 2. Peu d'études s'intéressent au sexe féminin et la compréhension des mécanismes impliqués dans ces différences reste incomplète. L'implication des hormones féminines dans divers processus physiologiques et physiopathologiques a orienté la communauté scientifique à axer ses recherches sur le sexe masculin. Nous savons aujourd'hui que dans de multiples pathologies dont le diabète de type 2, les femmes ont une présentation clinique et une réponse médicamenteuse différentes des hommes, impliquant probablement des mécanismes moléculaires spécifiques. Mettre en lumière les altérations présentes dans le sexe féminin pourrait permettre une meilleure prise en charge des patientes et ainsi diminuer la morbidité et mortalité CV liées au diabète de type 2.

Ainsi, au cours de ma thèse, nous avons souhaité déterminer l'impact du prédiabète et du diabète de type 2 sur la santé cardiovasculaire dans le sexe féminin. Nous avons étudié plus

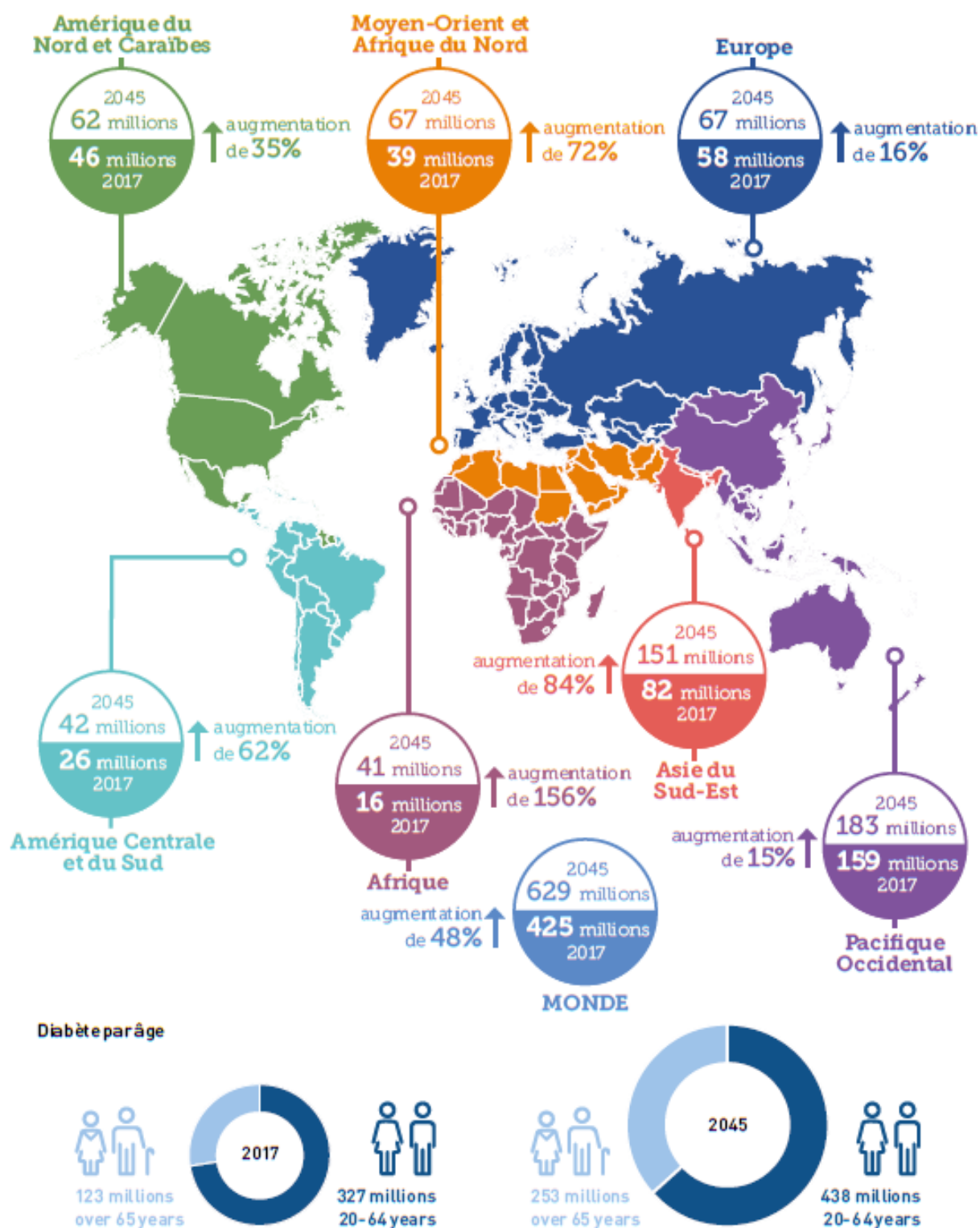
précisément les altérations morphologiques, fonctionnelles, métaboliques et endothéliales du cœur de rats femelles à l'aide de deux modèles animaux de prédiabète et de diabète de type 2.

Dans une première étude, nous avons évalué le prédiabète à l'aide du modèle de rat HFS (« High-Fat Sucrose »), induit par un régime riche en graisse et en sucre. Nous avons étudié les altérations cardiaques précoces présentes au cours du développement du prédiabète induit par le régime chez des femelles HFS. Pour cela, nous avons réalisé un suivi longitudinal *in vivo* du cœur mois par mois par imagerie par résonance magnétique (IRM), puis nous avons évalué *ex vivo* la tolérance myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion, mimant un infarctus du myocarde.

Dans une seconde étude, nous avons évalué la tolérance à un épisode d'ischémie-reperfusion du cœur de femelles Goto-Kakizaki (GK) ayant un diabète de type 2 avéré. L'une des problématiques actuelles dans le traitement des patients diabétiques de type 2 est de réduire la mortalité CV. Ainsi dans cette deuxième étude, nous avons également testé les effets potentiellement cardioprotecteurs d'un complément alimentaire sur la tolérance à un épisode d'ischémie-reperfusion du cœur de femelles GK. Nous avons choisi une approche thérapeutique par le Resvératrol, connu pour avoir des effets pléiotropes sur l'organisme via l'amélioration du métabolisme, du stress oxydant, de l'inflammation et de la fonction endothéliale.

Enfin, dans une troisième étude, nous avons déterminé si le régime HFS induit les mêmes modifications physiologiques chez des rats mâles et les femelles et s'il existe des différences liées au sexe dans la tolérance myocardique à l'ischémie-reperfusion.

Ce travail de thèse nous a donc permis d'étudier dans le sexe féminin, les complications CV liées au développement du prédiabète et du diabète de type 2. Déterminer les altérations présentes dans le cœur de femelles prédiabétiques et diabétiques de type 2 pourrait permettre de comprendre les mécanismes impliqués dans les complications cardiovasculaires chez les femmes diabétiques de type 2 et de développer des approches médicamenteuses spécifiques.



**Figure 1** Estimation de la prévalence du diabète au niveau mondial et par région en 2017 et en 2045. D'après l'Atlas du diabète de la FID, Huitième édition 2017 [1].

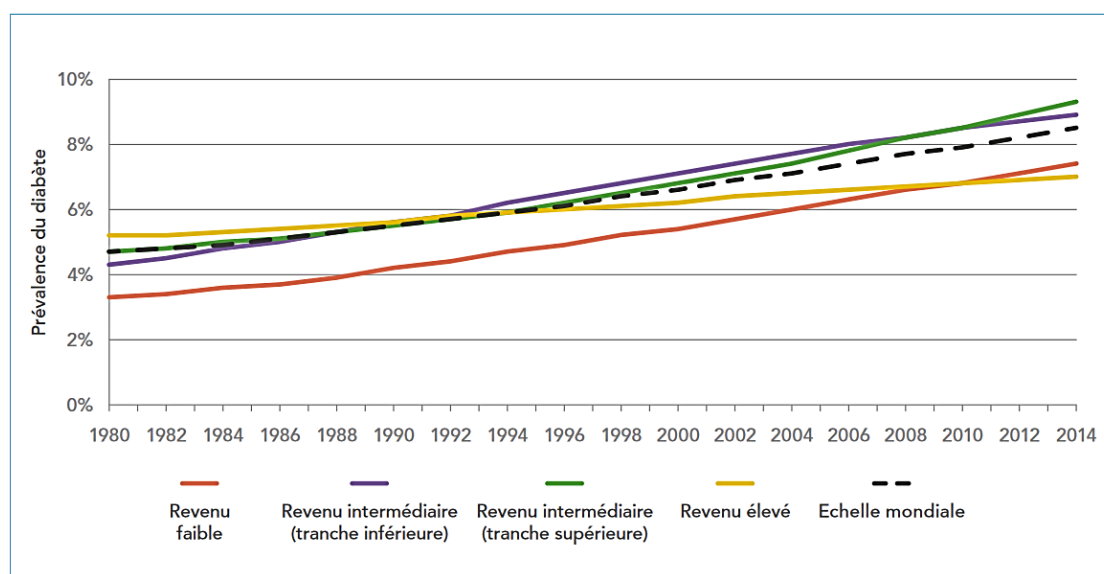
## **Introduction générale**

## Partie 1 : Prédiabète, diabète de type 2 et complications

### cardiovasculaires

« Toutes les huit secondes, une personne meurt du diabète dans le monde, soit plus que le SIDA, la tuberculose et la malaria » [1].

Ce constat affligeant de la FID nous fait prendre conscience de la gravité du diabète et de l'importance d'agir afin de mieux comprendre, prévenir et traiter cette pathologie. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la prévalence du diabète a presque doublé depuis 1980 (Figure 2), atteignant 8,5% de la population adulte [2]. En France, 5,4 % de la population française était atteinte de diabète en 2015, soit environ 3,3 millions de personnes [3].



**Figure 2** Evolution de la prévalence du diabète entre 1980 et 2014 dans le monde. D'après L'Organisation Mondiale de la Santé [2].

Le diabète est une maladie métabolique évolutive, caractérisée par une augmentation chronique du taux de glucose dans le sang. Il se développe lorsque l'organisme ne produit plus assez d'insuline (hormone hypoglycémiante) ou ne l'utilise pas correctement [4]. Ainsi, on

diagnostique la maladie lorsque la glycémie à jeun devient supérieure à 126 mg/dL ou lorsque la glycémie, prise à n'importe quel moment de la journée, atteint un taux supérieur à 200 mg/dL [5].

Il existe plusieurs types de diabète :

- Le diabète de type 1, « insulino-dépendant », représente 10% des cas. Il touche principalement des sujets jeunes. Il est caractérisé par une destruction partielle ou complète des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans par le système immunitaire, conduisant à une production insulinique incomplète ou nulle. Les patients diabétiques de type 1 nécessitent un traitement quotidien en insuline [6].

- Le diabète de type 2, « non -insulinodépendant », représente 90% des cas de diabète [7]. C'est une maladie se déclarant généralement chez l'adulte mais que l'on observe de plus en plus chez le sujet jeune [8]. L'hyperglycémie résulte à la fois d'une anomalie de l'insulinosécrétion et d'une incapacité des cellules des tissus périphériques à répondre au signal insulinique, appelé insulino-résistance [9].

- D'autres types de diabète existent mais ils sont plus rares : le diabète gestationnel, les diabètes monogéniques [10], les diabètes induits par une maladie du pancréas, les diabètes induits par des médicaments [11].

## **I- Du prédiabète au diabète de type 2**

Le prédiabète est un état décrivant un stade précoce où l'on peut déceler une hyperglycémie chronique, sans pour autant atteindre le taux de 126 mg/dL à jeun. Il est caractérisé par une hyperglycémie modérée à jeun comprise entre 100 et 126 mg/dL et/ou une intolérance au glucose c'est à dire une altération de la capacité à diminuer la glycémie en post-prandial [12-14] (Figure 3)[11].

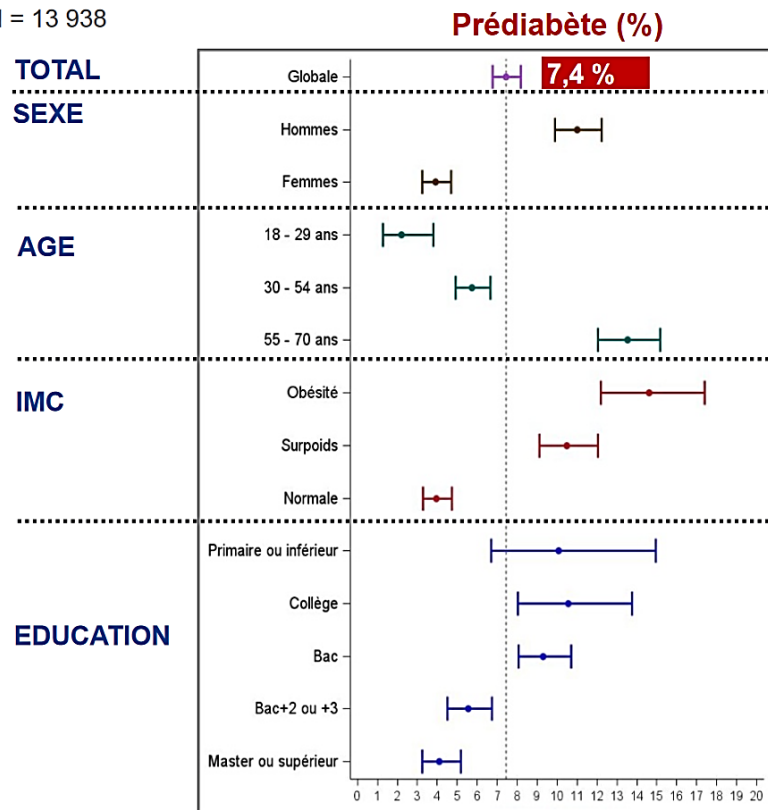
PREDIABETES AND DIABETES DIAGNOSIS		
	Prediabetes	Diabetes
A1C	5.7-6.4%* (39-47 mmol/mol)	≥6.5%† (48 mmol/mol)
FPG	100-125 mg/dL (5.6-6.9 mmol/L)*	≥126 mg/dL (7.0 mmol/L)†
OGTT	140-199 mg/dL (7.8-11.0 mmol/L)*	≥200 mg/dL (11.1 mmol/L)†
RPG		≥200 mg/dL (11.1 mmol/L)‡

**Figure 3** Diagnostic du prédiabète et du diabète en fonction de l'hémoglobine glyquée (HbA1c), de la glycémie à jeun (FPG), du test oral de tolérance au glucose (OGTT) et de la glycémie prise à n'importe quel moment de la journée (RPG). D'après "The American Diabetes Association (ADA); Standards of medical care in diabetes; 2018" [11].

Le prédiabète est un enjeu majeur de santé publique. En effet, 7,4 % de la population française était atteinte de prédiabète en 2013 (Figure 4) [15]. Aux Etats Unis ce chiffre explose avec une prévalence moyenne de 33,9 % en 2015 [16]. Les personnes présentant un prédiabète ont un risque élevé de diabète de type 2 mais toutes n'en développent pas [17]. L'hyperglycémie modérée à jeun et l'intolérance au glucose augmentent le risque de développer un diabète de type 2 jusqu'à 5 à 10 % par an, contre 0,7 % chez une personne normo-glycémique [12]. Cependant le risque de comorbidités n'est pas nul et la prévention, par une alimentation saine et une activité physique, reste l'un des meilleurs moyens de réduire l'incidence et la mortalité du diabète de type 2 [18]. Les individus à risque de développer un diabète doivent être détectés pour minimiser le développement et la progression des complications cardiovasculaires associées. Ainsi, des études sur le prédiabète pourraient permettre de mieux comprendre les altérations précoces conduisant aux complications CV dans le diabète de type 2.

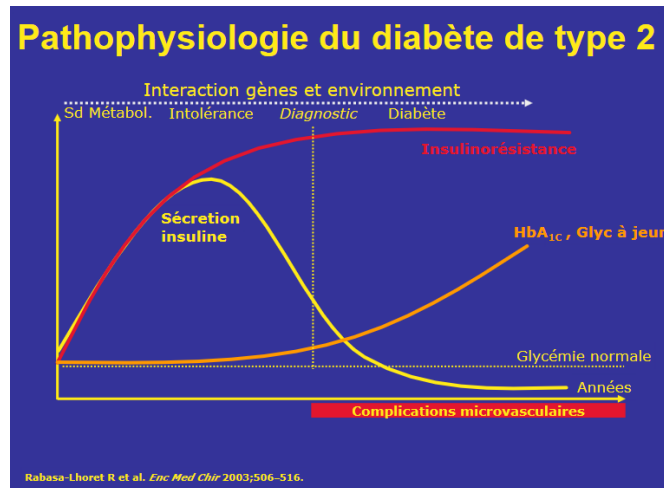


N = 13 938



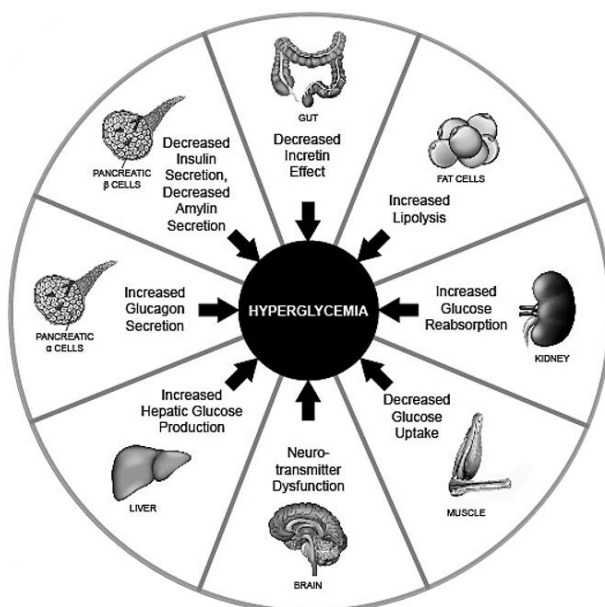
**Figure 4** Prévalence du prédiabète en France en 2013. Adapté de S. Fosse-Edorh; Les rencontres de Santé Publique France, Paris, 29 mai 2018 [15].

L'évolution naturelle du prédiabète (Figure 5) [19] conduit à une intolérance au glucose de plus en plus marquée se traduisant par une élévation progressive de la glycémie. Dans les premiers stades de la pathologie, une augmentation compensatoire de la production d'insuline par le pancréas est observée afin de diminuer la glycémie [20]. Cependant sans intervention hygiéno-diététique adéquate, l'organisme va tendre vers un état d'insulino-résistance et d'hyperglycémie continuellement plus important [21]. Petit à petit les cellules  $\beta$  pancréatiques s'épuisent, conduisant à une diminution de la production d'insuline (insulinopénie relative) et favorisant l'apparition d'un diabète de type 2. C'est lorsque la glycémie atteint le taux de 126 mg/dL que l'on parle alors de diabète de type 2 établi.



**Figure 5** Du prédiabète au diabète de type 2. Evolution des paramètres d'insulinorésistance, d'insulinémie et de glycémie à jeun au cours du temps. D'après Rabasa-Lhoret [19].

L'insulinorésistance périphérique (dans les muscles, le foie et le tissu adipeux) est l'anomalie métabolique fondamentale qui caractérise le diabète de type 2 [22]. Elle induit un déficit de captation du glucose dans les tissus et le développement de l'hyperglycémie. Cependant, d'autres anomalies ont également été décrites dans le diabète de type 2 telles qu'une augmentation de la sécrétion de glucagon, une hyperproduction hépatique de glucose, une augmentation de la lipolyse dans le tissu adipeux, une altération de l'effet des hormones incrétines comme le GLP-1 au niveau intestinal, une augmentation de la réabsorption rénale du glucose et une dysfonction des neurotransmetteurs au niveau du cerveau (Figure 6) [9].



**Figure 6** Anomalies détectées dans le diabète de type 2. Adapté de Brunton [9].

Le diabète de type 2 résulte de la conjonction d'un ou de plusieurs gènes de prédisposition génétique et de notre environnement. Il a été montré que l'expression de plusieurs gènes de susceptibilité pouvait dépendre de facteurs environnementaux [23]. Avec une prévalence de 90% dans la population diabétique, le surpoids et l'obésité représentent les principales causes du diabète de type 2 [24]. Ces deux pathologies étant fortement connectées, il a même été proposé le terme de « diabésité » [25]. En effet, un excès de masse grasse suite à une sédentarité et une alimentation trop riche en graisse et en sucre favorise l'insulino-résistance périphérique ainsi qu'une hyperglycémie [26].

L'hyperglycémie modérée à jeun et l'intolérance au glucose s'associent souvent à d'autres facteurs de risque de diabète de type 2 tels que les dyslipidémies, l'obésité, l'hypertension artérielle, que l'on regroupe sous le terme de syndrome métabolique [27]. Celui-ci est également un fort prédicteur de l'apparition du diabète de type 2 avec une augmentation du risque de 52% par rapport à une personne non malade [28]. Si l'intolérance au glucose est l'un des facteurs prédisposant le plus au diabète de type 2, l'obésité semble aussi jouer un rôle primordial dans son apparition. Plusieurs définitions du syndrome métabolique sont proposées par divers organismes de santé. En 2009, afin d'harmoniser ces critères, Alberti et coll. ont proposé la définition suivante : le syndrome métabolique est défini par la présence de trois des quatre facteurs de risque suivants : l'obésité abdominale, l'intolérance au glucose, la dyslipidémie et l'augmentation de la pression artérielle [29]. Combinés, tous ces facteurs multiplient par 12 le risque de développer un diabète de type 2 [30]. Le diabète de type 2, le prédiabète et le syndrome métabolique augmentent le risque de comorbidités et mortalité cardiovasculaire.

## **II- Les complications cardiovasculaires du diabète de type 2**

### **A- Généralités**

Actuellement, les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde. En 2030, selon l'OMS plus de 23 millions de personnes décèderont de maladies cardiovasculaires, principalement de pathologies cardiaques et d'accidents vasculaires cérébraux [31]. Certains facteurs de risque ne sont pas modifiables comme l'âge, le genre ou encore l'histoire familiale. Cependant, d'autres facteurs de risque, impactant fortement sur la

santé cardiovasculaire, sont modifiables comme par exemple l'hypertension, le tabagisme, l'inactivité physique, l'obésité et le diabète.

En 2012, un total de 3,7 millions de personnes sont décédées des causes de l'hyperglycémie chronique dont 1,5 millions directement causées par le diabète et 2,2 millions par les maladies cardiovasculaires résultant du diabète [2]. Les pathologies cardiovasculaires demeurent à ce jour la plus grande cause de morbidité et mortalité chez les personnes atteintes de diabète de type 2. L'étude de Framingham est à la base de la notion de facteurs de risque dans les maladies cardiovasculaires [32]. Cette étude a notamment permis de mettre en avant le rôle délétère du diabète. En effet, à long terme, l'hyperglycémie chronique entraîne des lésions micro- et macrovasculaires ainsi que le développement d'une cardiomyopathie diabétique [33, 34]. La cause principale de mortalité chez les patients diabétiques reste l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux. En effet, le diabète augmente les risques d'infarctus du myocarde de 2 à 5 fois [35].

Les complications cardiovasculaires apparaissent dès le début de la maladie, au stade de prédiabète [36]. Il est donc important de dépister les sujets à risque avant qu'un diabète avéré ne s'installe, avec une glycémie > 126 mg/dL. Le risque cardiovasculaire est également élevé dans le syndrome métabolique du fait de la conjonction de nombreux facteurs de risque. Ainsi il pourrait être responsable à lui seul d'une augmentation de 78% du risque CV, de 17% des événements CV et de 7% de la mortalité CV chez les patients avec un syndrome métabolique [37, 38]. Plus spécifiquement, le risque d'infarctus du myocarde est 2,5 fois plus élevé chez une personne avec un syndrome métabolique que chez une personne saine [39].

## **B- Les facteurs de risque associés aux complications cardiovasculaires**

Différents facteurs peuvent contribuer aux complications cardiovasculaires associées au diabète de type 2 parmi lesquels figurent l'obésité, l'inflammation, la dyslipidémie et l'hypertension.

### **1- L'obésité**

90 % des patients diabétiques sont en surpoids ou en obésité. L'excès de masse grasseuse est connu pour être un facteur de risque CV important dans le diabète de type 2 [40]. La distribution

anatomique de la graisse a un impact important sur le système cardiovasculaire [41]. En effet, l'obésité viscérale est largement reconnue pour ses effets cardiométaboliques désastreux [41], alors que la présence de tissu adipeux dans la région glutéo-fémorale est associée à un risque cardiométabolique plus faible [42]. Il a été montré que l'incapacité du tissu adipeux sous-cutané à s'expandre favorise l'apparition et le développement de tissu adipeux viscéral et de dépôts de graisse ectopique dans divers organes comme le cœur [43]. Ces dépôts ectopiques favorisent les complications CV et participent fortement à la dysfonction cardiaque via le phénomène de lipotoxicité, notamment par leur dérivés (céramides, diacylglycérol...) qui favorisent l'inflammation, le stress oxydant, l'athérosclérose et les dysfonctions endothéliale et mitochondriale [44-45]. Il existe deux types de dépôts ectopiques : la stéatose qui est définie comme l'accumulation de triglycérides intracellulaires, et la constitution d'un tissu adipeux autour des organes [46]. Notamment la graisse épicaudique représente des dépôts de graisse autour du cœur et est positivement associée aux maladies des artères coronaires [47]. Il a également été montré que la présence de triglycérides au sein des cellules cardiaques est un prédicteur indépendant de dysfonction diastolique chez des patients diabétiques [48]. Par ailleurs, la stéatose myocardique est plus importante chez des sujets obèses avec une intolérance au glucose ou un diabète de type 2 par rapport aux sujets uniquement obèses [49].

## **2- L'inflammation**

L'inflammation de bas grade est un des mécanismes reliant l'obésité, le diabète de type 2 et les complications cardiovasculaires. Le tissu adipeux présente un rôle endocrine en libérant de multiples hormones, adipokines et cytokines dans l'organisme. L'insulino-résistance et le diabète de type 2 sont associés à la surexpression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires par le tissu adipeux et plus particulièrement le tissu adipeux viscéral [46, 50]. La surexpression de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, de la leptine, ou encore de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) contribue aux complications CV en favorisant la dysfonction endothéliale via l'inflammation et le développement de plaques d'athérosclérose [51]. Il a aussi été montré que les patients diabétiques présentent une augmentation de la protéine C réactive (CRP) au niveau plasmatique, contribuant à la dysfonction endothéliale par altération de la production de NO dans les vaisseaux. Dans un modèle de souris diabétiques de type 2, il a également été montré qu'une interaction IL6-TNF $\alpha$  contribuait à la dysfonction endothéliale au niveau du cœur [52].

### **3- La dyslipidémie**

La dyslipidémie est une anomalie qualitative ou quantitative d'un ou de plusieurs lipide(s) plasmatique(s) : cholestérol total et ses fractions, HDL-cholestérol, LDL-cholestérol, triglycérides, augmentant le risque de complications CV via le développement de l'athérosclérose [53]. Le relargage d'acides gras libres dans la circulation par le tissu adipeux dysfonctionnel conduit à une augmentation de la production de triglycérides et de lipoprotéines. Notamment, le rétrécissement d'une artère par la formation d'une plaque d'athérosclérose contribue aux pathologies ischémiques décrites précédemment. La dysfonction endothéliale rencontrée dans le diabète de type 2 crée un environnement favorable à la formation de lésions athérosclérotiques [54]. Wang et coll. ont par ailleurs montré que l'oxydation des LDL pouvait conduire à une diminution de la biodisponibilité du NO et donc à une altération de la relaxation dépendante de l'endothélium [55]. Il s'agit donc là de la mise en place d'un cercle vicieux favorisant les complications cardiovasculaires chez les patients diabétiques de type 2.

### **4- L'hypertension**

L'hypertension est également très fréquente dans le diabète de type 2 puisqu'elle concerne environ 60% des patients. Elle est souvent liée au développement de la néphropathie diabétique. L'hypertension est un facteur favorisant les complications CV en stimulant l'hypertrophie et la dysfonction cardiaque. Van Bilsen et coll. montrent dans un modèle de souris diabétiques de type 2 db/db que l'hypertension est un facteur conditionnant le développement de l'hypertrophie cardiaque à un stade précoce [56].

## **C- Les complications micro- et macrovasculaires du diabète de type 2.**

### **1- Les atteintes microvasculaires**

Les atteintes microvasculaires sont à l'origine de diverses comorbidités, comprenant la rétinopathie, la néphropathie ainsi que la neuropathie. Ces complications sont le résultat d'une évolution chronique à long terme de lésions des vaisseaux sanguins [57], conduisant à des lésions de la rétine et des glomérules rénaux, et d'une perte progressive des fibres nerveuses

[58]. Les atteintes microvasculaires sont responsables de la perte progressive de la vue, de la défaillance rénale, des déficits sensitif et moteur et d'amputations [59]. De manière intéressante, les atteintes microvasculaires ont également été associées à une augmentation du risque d'évènements cardiovasculaires chez les patients diabétiques de type 2 [60-62]. Ho et coll. montrent notamment que chez les personnes atteintes de diabète, la rétinopathie augmente le risque de maladies CV [63]. Les patients atteints de néphropathie diabétique présentent également un risque cardiovasculaire élevé, comparable à celui des patients atteints de coronaropathie [64]. Enfin, la neuropathie diabétique est aussi associée à un fort risque d'évènements CV dans le diabète de type 2 [65].

## **2- Les atteintes macrovasculaires**

Les atteintes macrovasculaires comprennent les cardiopathies ischémiques, les accidents vasculaires cérébraux et l'insuffisance des artères des membres inférieurs [36]. Dans cette partie, nous décrirons plus spécifiquement les cardiopathies ischémiques.

### **a- L'ischémie myocardique**

L'ischémie myocardique est définie comme une réduction des apports en oxygène et en nutriments au sein du myocarde par rapport aux besoins de celui-ci. Au cours d'un infarctus du myocarde, la réduction des apports peut être due à différents facteurs : une diminution du diamètre des artères coronaires, la présence d'un thrombus ou d'une plaque d'athérome [66]. La sévérité des lésions lors de l'ischémie myocardique dépend essentiellement de la durée de l'ischémie ainsi que de la taille de la zone ischémiée. Ainsi, une ischémie de courte durée aura des conséquences réversibles, alors qu'une ischémie de longue durée supérieure à 15 minutes aura des conséquences irréversibles [67].

Au cours de l'ischémie, l'absence de renouvellement des substrats et de l'oxygène dans les tissus entraîne différents effets majeurs sur le métabolisme énergétique et l'homéostasie ionique conduisant à une diminution de l'activité contractile du cœur. Dès les premières minutes d'ischémie, un arrêt de la phosphorylation oxydative est observé induisant une chute rapide de la synthèse des composés riches en énergie représentés par l'ATP et la PCr. Afin de fournir rapidement l'énergie nécessaire au fonctionnement du cœur, la glycolyse anaérobie est stimulée

mais celle-ci ne permet pas de combler le déficit énergétique du cœur [68]. La phosphocréatine est rapidement dégradée en créatine, mettant à disposition son phosphate pour la transformation de l'ADP en ATP. La dégradation de l'ATP, au cours de l'ischémie, en ADP, AMP et en H<sup>+</sup> est la source principale de protons produits pendant la glycolyse anaérobie. L'accumulation des protons dans le cytosol entraîne une acidose intracellulaire [69].

### **b- La reperfusion**

Actuellement, le seul traitement contre l'ischémie reste la reperfusion coronaire du territoire ischémié [70]. Cependant, la reperfusion est elle-même à l'origine de lésions myocardiques par des mécanismes impliquant la formation massive d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) et la surcharge calcique cellulaire [71]. En effet, afin de compenser la diminution du pHi, divers mécanismes se mettent en place. L'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> intervient en facilitant l'entrée du sodium et la sortie des protons à la reperfusion. La baisse de l'ATP au cours de l'ischémie diminue le fonctionnement physiologique de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, utilisée pour réguler les concentrations en sodium et potassium. Ainsi, l'accumulation de sodium est évacuée par la pompe Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> au cours de la reperfusion. L'augmentation de Ca<sup>2+</sup> à l'intérieur de la cellule crée la surcharge calcique responsable de la dysfonction myocardique et des dommages cellulaires à la reperfusion. La surcharge calcique est connue pour avoir de nombreux effets sur la cellule. D'une part, elle active de nombreux systèmes Ca<sup>2+</sup> dépendants comme les protéases, les nucléases ou encore les protéines catalysant la transformation d'O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub><sup>-</sup>. D'autre part, l'augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol, empêche la cellule d'établir un gradient nécessaire pour la contraction des myofilaments. Quatre types de lésions sont observables à la reperfusion : la sidération myocardique, le phénomène de « no-reflow » (altération de la perfusion), les arythmies cardiaques et la mort cellulaire. Ces lésions sont regroupées sous le nom de « syndrome de reperfusion » [72].

## **D- La cardiomyopathie diabétique**

### **1- Généralités**

Il existe chez le patient diabétique de type 2 une altération du myocarde indépendante de l'hypertension, de la pathologie coronarienne ou de la dyslipidémie, amenant au concept de



cardiomyopathie diabétique. Celle-ci est favorisée par l'insulino-résistance, l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie. Premièrement décrite en 1972 par Rubler et coll. sur 4 patients [73], la cardiomyopathie diabétique a ensuite été décrite dans l'étude de Framingham en 1974. Kannel et coll., ont alors montré que le risque de défaillance cardiaque était multiplié par 2,4 chez les hommes diabétiques par rapport aux hommes non diabétiques, après ajustement pour les autres facteurs de risque (âge, obésité, hypertension, dyslipidémie et maladie des artères coronaires). Chez les femmes diabétiques, ce risque était même décrit comme multiplié par 5 par rapport aux femmes non diabétiques [35, 74]. Depuis, diverses études cliniques ont confirmé ce constat [75] avec une prévalence de la cardiomyopathie diabétique atteignant 60 % chez les patients diabétiques [76]. Une relation étroite existe entre la cardiomyopathie diabétique et l'hyperglycémie. En effet, une augmentation de 1 % de l'hémoglobine glyquée augmenterait de 8 % le risque de cardiomyopathie diabétique [77], et une réduction de 1 % de l'hémoglobine glyquée réduirait de 16 % le risque de défaillance cardiaque [78]. La cohorte de Framingham a également montré une corrélation entre l'hypertrophie ventriculaire et le contrôle glycémique [79]. Dans cette étude, la masse du ventricule gauche et l'épaisseur de la paroi, évalués par échographie, étaient corrélés avec l'intolérance au glucose.

## **2- Caractéristiques**

Cette pathologie est caractérisée par une modification de la structure et de la masse du ventricule gauche ainsi que de la fonction cardiaque en diastole et en systole. Ces altérations sont observées en absence de changements de pression artérielle et de maladie coronarienne [34]. Des changements pathophysiologiques ont lieu tels que le remodelage cardiaque par la fibrose et la rigidité cardiaque, conduisant à l'altération de la fonction diastolique. Des études réalisées par échographie ont en effet montré une dysfonction diastolique chez 40 à 75 % des patients diabétiques [80, 81]. Chez l'animal, dans un modèle murin de diabète de type 2 (ZDF), Radovits et coll. ont aussi montré un risque élevé de rigidité cardiaque et de dysfonction diastolique [82]. Une étude par IRM a également montré que la consommation d'un régime riche en graisse et en fructose conduit à une dysfonction diastolique chez des souris, via l'altération de la signalisation cellulaire insulinique, l'inflammation, le stress oxydant et la formation de fibrose [83].

A un stade avancé de la cardiomyopathie diabétique, il est possible d'observer une altération plus importante de la structure cardiaque. Comme décrite dans des revues de Wang et coll. et Mytas et coll., celle-ci se caractérise par l'hypertrophie et la nécrose des cardiomyocytes, la formation de fibrose interstitielle, la sclérose de vaisseaux coronaires et la formation de micro-anévrismes des capillaires [84, 85]. Par ailleurs, une altération de la fonction systolique est observée chez 24 % des patients diabétiques [86].

### **3- Mécanismes moléculaires**

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la cardiomyopathie diabétique sont multiples. L'environnement des cardiomyocytes dans le cadre du diabète est propice à des altérations importantes des voies de régulation moléculaire. Parmi celles-ci on peut citer la glucotoxicité [87], la fibrose [88], le stress oxydant [89, 90], l'inflammation [91, 92], la lipotoxicité [93] et l'augmentation de l'utilisation des acides gras [94-96]. Ces altérations peuvent conduire à la dysfonction et la mort des myocytes, ainsi qu'à une altération de la contractilité cardiaque, contribuant au développement de la cardiomyopathie diabétique.

Récemment, les micro-ARNs (miRs) ont été évoqués comme des régulateurs clés dans les maladies CV, dont la cardiomyopathie diabétique [97, 98]. Les miRs jouent un rôle dans la pathogénèse de la cardiomyopathie diabétique, en modulant notamment l'expression de gènes cardiaques impliqués dans le remodelage du cœur diabétique. Plusieurs miRs ont été identifiés comme par exemple miR-1 qui joue un rôle pro-apoptotique et pro-hypertrophique. Une sous-expression de miR-1 a été décrite dans le cœur de souris femelles STZ, conduisant à une apoptose des cardiomyocytes [99]. Un autre exemple concerne miRs-30c, qui est différemment exprimé dans le cœur au fur et à mesure de la défaillance fonctionnelle du cœur. Dans une revue, Ghosh et coll. expliquent qu'une diminution de l'expression de miR-30c a été décrite dans l'hypertrophie ventriculaire gauche, la fibrose et l'apoptose myocardique, ainsi que dans la défaillance cardiaque et l'infarctus du myocarde [97].

Dans la partie suivante, nous nous intéresserons plus particulièrement aux dysfonctions endothéliale et mitochondriale impliquées dans les complications CV du diabète de type 2. En effet, bien que la cardiomyopathie diabétique soit indépendante des maladies des artères coronaires, il y a une forte altération des vaisseaux dans le diabète de type 2 avec une

dysfonction de l'endothélium vasculaire, augmentant le risque de complications CV. La dysfonction mitochondriale semble également jouer un rôle important dans la cardiomyopathie diabétique [89], mais également dans les pathologies ischémiques où le métabolisme énergétique est altéré [100].

## **E- Rôle des dysfonctions endothéliale et mitochondriale dans les complications cardiovasculaires associées au diabète de type 2.**

### **1- La dysfonction endothéliale**

#### **a- Généralités**

La dysfonction endothéliale est décrite comme un déséquilibre entre facteurs vasorelaxants et facteurs vasoconstricteurs. La dysfonction endothéliale est notamment caractérisée par une perte ou une diminution des vasorelaxations dépendante et indépendante de l'endothélium, une diminution de la sécrétion d'oxyde nitrique (NO) synthétisé par la protéine NO synthase dans l'endothélium (eNOS) et une augmentation de substances vasoconstrictrices [101, 102]. En plus de permettre une vasodilatation des vaisseaux, le NO a la capacité d'inhiber la croissance et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires, l'agrégation plaquettaire, la thrombogénèse et l'inflammation dans les vaisseaux [103].

La dysfonction endothéliale contribue de manière importante à la pathogénèse des maladies vasculaires dans le diabète de type 2 [104]. Les études décrivent une dysfonction endothéliale chez les patients diabétiques de type 2 mais aussi chez les patients avec une insulino-résistance [105], un prédiabète [106] et un syndrome métabolique [107]. Par ailleurs, la dysfonction endothéliale est une altération précoce qui précède parfois le développement du diabète de type 2 [108, 109].

#### **b- Mesure de la dysfonction endothéliale**

La dysfonction endothéliale peut être étudiée chez l'Homme par la mesure de marqueurs circulants ou par la mesure de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. L'un des critères les plus importants pour l'étude de la dysfonction endothéliale chez l'Homme est la mesure de la dilatation médiée par le flux au niveau des artères [109]. Les études chez l'Homme montrent

une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium ainsi qu'une augmentation des taux circulants de facteurs favorisant la thrombose (Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1 ; Von Willebrand factor, vWF) et des molécules d'adhésion (Vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1 ; Intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1), associées à l'athérosclérose et aux maladies microvasculaires [108, 110].

Chez l'animal, une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium et de la voie du NO a été décrite dans différents modèles de diabète de type 2. Par exemple, sur le modèle du cœur isolé perfusé, une diminution de la réponse vasculaire dépendante et indépendante de l'endothélium à la 5-hydroxytryptamine et à la papavérine, associée à une diminution de la surrégulation de la voie du NO, a été observée chez des femelles GK diabétiques de type 2 [111]. Alameddine et coll. ont par ailleurs montré dans ce modèle, une altération de la capacité maximale de la vasodilatation d'anneaux aortiques en réponse à l'acétylcholine [112].

### **c- Mécanismes**

L'hyperglycémie est un des facteurs contribuant au développement de la dysfonction endothéliale dans le diabète de type 2 [108]. En effet, il a été montré que l'activité d'eNOS pouvait être modulée par l'insuline via la voie de la protéine Akt. La production du NO et la réponse vasculaire sont donc particulièrement impactées dans le cadre de la résistance à l'insuline dans le diabète de type 2 [113]. Cependant, la littérature concernant l'expression de la protéine eNOS dans le diabète de type 2 fait état de controverses. Zhang et coll. observent par exemple une sous-expression de la voie du NO chez des rats STZ [114], alors que Desrois et coll. montrent une surexpression de la protéine eNOS ainsi qu'une augmentation de la production de NO dans les cœurs de rats mâles GK diabétiques de type 2 [115]. Les auteurs suggèrent alors que l'augmentation du NO dans les cœurs diabétiques est associée à une diminution de la biodisponibilité du NO par un stress oxydatif exacerbé. L'activité d'eNOS est également régulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation [116]. Une diminution de l'activité de la eNOS et de sa phosphorylation sur la sérine 1177 a par ailleurs été observée dans le cœur diabétique de type 2 [117, 118].

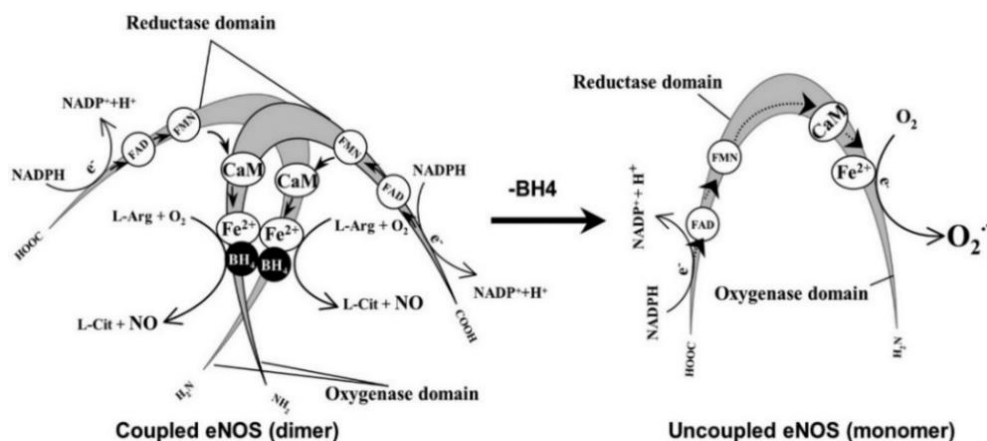
Très récemment, plusieurs études ont décrit le rôle de la protéine Pin1 dans la dysfonction endothéliale associées au diabète de type 2. Un taux élevé de glucose stimule la surexpression

de Pin1 dans les tissus cardiaque et vasculaire, diminuant l'expression d'eNOS, la production de NO et favorisant la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose. [119-121].

Enfin, l'inflammation a également un rôle important dans la dysfonction endothéliale. Des facteurs pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  et la CRP favorisent le profil pro-athérogénique. Notamment le TNF $\alpha$  est capable de diminuer l'expression d'eNOS dans des cellules endothéliales en culture et d'induire une dysfonction endothéliale chez des patients diabétiques [122, 123].

#### **d- Rôle du stress oxydant**

Le diabète de type 2 est associé à une production importante d'EROs, ayant un impact sur la fonction endothéliale. En effet, la forte production d'EROs au niveau de l'endothélium est associé à une augmentation de la perméabilité endothéliale et de l'adhésion des leucocytes [54]. La diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans le diabète de type 2 est associée soit à une altération de l'action du NO, soit à une inactivation de celui-ci par une augmentation du stress oxydant. En particulier, l'hyperglycémie conduit à la production d'EROs par la mitochondrie, l'activation de la NADPH oxydase, l'inactivation des enzymes antioxydantes et le découplage de la protéine eNOS. Le passage d'une forme dimérique (active) à une forme monomérique (découplée) de la protéine eNOS entraîne la production d'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  à la place du NO (Figure 7), pouvant former du peroxyneutre, aggravant le stress oxydant déjà présent dans le diabète de type 2 [124]. Un lien étroit existe donc entre dysfonction endothéliale et stress oxydant.



**Figure 7** Dimère ou monomère de la eNOS. D'après Lu et coll.[124].

## **2- La dysfonction mitochondriale**

### **a- Généralités**

La mitochondrie est l'organite régissant la production d'énergie sous forme d'ATP au sein de la cellule, à partir de différents substrats comme le glucose ou les acides gras. En conditions physiologiques, le cœur génère de l'ATP principalement à partir des acides gras (environ 60%) et dans une moindre mesure à partir du glucose, du lactate, du pyruvate et des acides aminés (environ 40%) [125]. Dans le cadre du diabète de type 2, le cœur utilise une plus forte proportion d'acides gras par rapport aux autres substrats afin de générer de l'ATP [126]. Des études suggèrent donc que des altérations du métabolisme cardiaque pourraient jouer un rôle fondamental dans la pathogenèse de la cardiomyopathie diabétique. En effet, des altérations de la fonction mitochondriale ont été décrites dans le cadre de l'insulino-résistance et du diabète de type 2 [127].

### **b- Mécanismes**

Comme introduit ci-dessus, le diabète est accompagné par une augmentation de l'utilisation des acides gras dans le cœur pour la production d'ATP [128]. Une augmentation de PGC1 $\alpha$ , qui est un coactivateur de PPAR $\alpha$  régulant l'utilisation des acides gras, a été rapporté dans le diabète de type 2 [126]. Cette situation a été corrélée à une diminution de l'efficacité du cœur diabétique de type 2 en raison de sa forte demande en oxygène. Peterson et coll. ont montré une augmentation de l'utilisation des acides gras par le cœur, associée à un accroissement de la consommation cardiaque en oxygène et une diminution de l'efficacité cardiaque, chez de jeunes patientes obèses et insulino-résistantes [95].

Chez l'animal, Buchanan et coll. montrent par ailleurs une augmentation de l'expression de PPAR $\alpha$  dans le cœur de souris db/db favorisant l'utilisation des acides gras par le myocarde [94]. D'autres études ont montré que ce « shift » vers une utilisation plus importante des acides gras était en lien avec la défaillance myocardique. Par exemple, dans un modèle de rat sous régime riche en gras, Cole et coll. ont montré une augmentation de l'oxydation des acides gras dans le cœur [129].

Les personnes diabétiques de type 2 présentent une altération du métabolisme énergétique dans le cœur de manière assez précoce, avant même une altération de la fonction contractile du cœur [130], conduisant à une diminution de la synthèse d'ATP. Anderson et coll. ont montré une altération de la capacité respiratoire mitochondriale sur des myofibres perméabilisées de patients diabétiques [89]. De manière intéressante ces altérations étaient observées à des stades précoces, même chez des sujets avec un taux d'hémoglobine glyquée faible [89]. L'utilisation de la spectroscopie par résonance magnétique du phosphore-31 a confirmé chez l'Homme, une altération du métabolisme énergétique, en lien avec des modifications du fonctionnement mitochondrial [131]. Une réduction des niveaux d'ATP dans le cœur est associée à une hypertrophie cardiaque et à une altération de la fonction myocardique chez les patients avec une cardiomyopathie diabétique [132]. Levelt et coll. ont aussi montré une diminution du ratio PCr/ATP chez des patients diabétiques de type 2 [133]. Les études chez l'Homme concernant la dysfonction mitochondriale associée au diabète de type 2 restent tout de même peu nombreuses. Ainsi, l'utilisation de modèles animaux a permis d'approfondir les mécanismes moléculaires impliqués.

Chez la souris db/db, Dabkowski et coll. décrivent une diminution de la respiration mitochondriale, de l'activité de la chaîne de transport des électrons, de l'activité de l'ATP synthase et du potentiel membranaire mitochondrial [134]. D'autres altérations mitochondriales ont été décrites et favorisent les complications CV dans le diabète de type 2. Itoh et coll. ont notamment montré une altération de la régulation du pore de transition de perméabilité mitochondriale dans le modèle de rat GK [135]. Une autre étude sur des souris exposée à une hypoxie et un régime riche en graisse, a montré une diminution de l'efficacité cardiaque due à une augmentation de UCP3 (Mitochondrial uncoupling protein 3), permettant l'entrée des protons dans la matrice mitochondriale [136].

La biogénèse mitochondriale peut également être altérée dans le diabète de type 2 [137]. Il s'agit d'un processus régulant le contenu en mitochondrie dans les cellules, notamment par des phénomènes de fusion et fission [138]. Le régulateur principal de la biogénèse mitochondriale est le facteur PGC1 $\alpha$ , qui agit sur diverses cibles telles que le récepteur nucléaire « estrogen related receptor » (ERR), les facteurs Nrf1 et Nrf2, et aussi PPAR $\alpha$  [139]. La biogénèse mitochondriale est associée à une altération de la respiration et de la synthèse en ATP, et a été décrite dans le cœur de souris db/db et ob/ob [90, 140]. Duncan et coll. ont également montré

que l'insulino-résistance cardiaque est capable de moduler la biogénèse mitochondriale par la voie PPAR $\alpha$ /PGC1 $\alpha$  [141].

### **c- Rôle du stress oxydant**

Les patients diabétiques de type 2 présentent une augmentation du stress oxydant ainsi qu'une diminution des défenses antioxydantes. La majorité des EROs produits au niveau du cœur proviennent du découplage des complexes I et III de la chaîne de transport mitochondriale [142]. L'hyperglycémie ainsi que l'augmentation des acides gras libres et de la leptine sont des facteurs contribuant à la production d'EROs [143]. L'hyperglycémie chronique favorise la production d'EROs au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale mais également au niveau endothélial (via la eNOS) [142]. Dans un modèle de souris nourries avec un régime riche en graisse et en sucre, Sverdlov et coll. ont notamment montré une augmentation de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau cardiaque avec une diminution de l'activité du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale conduisant à une diminution de la synthèse en ATP [144]. Chez la souris db/db, Boudina et coll. ont par ailleurs montré une augmentation de la production d'EROs et des produits issus de la peroxydation des lipides et des protéines. Dans leur étude, le stress oxydant était associé à une altération de la phosphorylation oxydative dans les cœurs ainsi qu'à un découplage mitochondrial [90]. La mitochondrie aurait donc un rôle important dans la production d'EROs et le stress oxydant aurait lui-même un rôle dans les altérations mitochondriales observées dans les complications CV associées au diabète de type 2.

## **III- Conclusion**

Comme décrit dans cette première partie, les personnes atteintes de diabète de type 2 présentent un fort risque CV. La littérature semble indiquer un rôle important des dysfonctions endothéliale et mitochondriale dans la cardiomyopathie diabétique et les événements ischémiques. De plus, des altérations cardiaques précoces ont été décrites avant l'apparition d'un diabète de type 2 franc. Ainsi, l'un des objectifs de ce travail de thèse était d'étudier plus particulièrement les altérations endothéliales et métaboliques du cœur prédiabétique et diabétique de type 2, à l'aide de deux modèles animaux. Les trois études présentées par la suite utiliseront un modèle de rat prédiabétique, nourri avec un régime riche en graisse et en sucre (HFS) ; et un modèle de diabète de type 2, le rat GK.



## **Partie 2 : La théorie du genre/sexe : une réalité en santé cardiovasculaire ?**

Une distinction doit être faite entre le « sexe » et le « genre ». En effet, le sexe fait référence aux caractéristiques biologiques et physiologiques définissant les hommes et les femmes (ou les mâles et les femelles). Le genre, quant à lui, se rapporte aux comportements, activités, rôles et attributs sociaux [145].

Tout au long du manuscrit, je parlerai donc d'effet du sexe pour les caractéristiques biologiques et d'effet du genre pour les comportements sociaux.

### **I- Encore trop d'idées reçues sur le risque cardiovasculaire des femmes**

Dans l'inconscient collectif, les femmes demeurent protégées au niveau cardiovasculaire par rapport aux hommes. Les femmes elles-mêmes ne pensent pas présenter un risque de morbidité et mortalité cardiovasculaire. Cependant, la première cause de mortalité chez les femmes reste les maladies cardiovasculaires [146].

Au cours des dernières décennies les femmes ont un mode de vie plus proche de celui des hommes avec des comportements à risque tels que la consommation d'alcool et de tabac. D'autres facteurs de risque tels que l'inactivité physique et une alimentation trop riche en graisse et sucre, le prédiabète et le diabète de type 2 exposent fortement les femmes aux maladies CV [147].

Dans la population générale, l'incidence d'infarctus du myocarde reste plus élevée chez les hommes par rapport aux femmes. Notamment les études de Framingham et INTERHEART ont montré que les maladies CV apparaissaient en moyenne dix ans plus tôt chez les hommes par rapport aux femmes [35, 148]. Des études animales montrent également que les maladies cardiovasculaires apparaissaient plus tôt et sont plus sévères chez les mâles [149]. Les raisons de cet « avantage » ne sont pas encore complètement élucidées [150] mais les femmes semblent perdre cette protection liée au sexe en présence d'un diabète de type 2. Ainsi, la différence

d'incidence devient beaucoup moins importante entre les hommes et les femmes. Lorsque l'on considère la mortalité associée aux maladies coronaires, les femmes diabétiques ont plus de risque que les hommes diabétiques et surtout une mortalité plus élevée de 50% [32]. Elles présentent également davantage de pathologies coronariennes et une plus grande mortalité face à l'infarctus du myocarde [151]. La nature des événements diffère avec une prédisposition aux maladies microvasculaires chez les femmes et plutôt macrovasculaires chez les hommes [152]. Levitsky et coll. et Koro et coll. ont par ailleurs montré un risque de maladie coronaire plus élevé à des taux plus bas de glucose chez les femmes [153, 154].

Ce désavantage global des femmes diabétiques pourrait premièrement provenir de différences dans le diagnostic et le traitement de l'infarctus du myocarde en lui-même. En 2016, la Fédération Française de Cardiologie a d'ailleurs lancé une campagne de sensibilisation du grand public afin d'alerter les femmes sur les symptômes pouvant révéler un infarctus du myocarde. En effet, le nombre d'infarctus a triplé chez les femmes de moins de 50 ans durant les 15 dernières années. Les symptômes ressentis par les femmes sont, dans 50 % des cas, différents des symptômes classiques reconnus chez les hommes avec une douleur dans la poitrine irradiant dans le bras gauche et la mâchoire [147]. D'autres signes cliniques peuvent en effet alerter sur un infarctus du myocarde : la sensation d'épuisement, les troubles digestifs comme la nausée et l'essoufflement à l'effort ou parfois au repos. Du fait de cette méconnaissance générale, la prise en charge des femmes est retardée par rapport aux hommes [155]. La réponse médicamenteuse pourrait également être différente selon le sexe et jouer un rôle [156, 157].

Le désavantage des femmes dans le cadre du diabète proviendrait également de différences physiologiques, via l'impact des hormones sexuelles et des différences dans les facteurs de risque. La prévalence de l'obésité est plus importante chez les femmes diabétiques de type 2 par rapport aux hommes diabétiques de type 2, particulièrement après la ménopause. Les femmes présentent également en moyenne un taux plus élevé de cholestérol HDL et une hypertension plus marquée [158]. Les femmes diabétiques présentent donc un profil cardiovasculaire défavorable, en lien avec ces différents facteurs de risque.

De nos jours, les études menées sur les complications CV liées au diabète de type 2 ont principalement été réalisées chez les hommes ou sur des animaux mâles. Par ailleurs, dans de multiples modèles animaux les mâles sont plus prompts à développer un diabète de type 2 que

les femelles [159]. Les études sur le sexe féminin restent donc peu nombreuses mais la « National Institutes of Health » (NIH) a récemment relevé l'importance du dimorphisme sexuel et de l'inclusion des deux sexes dans les essais cliniques et dans la recherche fondamentale [160].

## **II- Dimorphisme sexuel basal**

Il existe en conditions physiologiques des différences entre les hommes et les femmes. Les femmes présentent notamment une plus grande sensibilité centrale à la leptine (hormone de la satiété) et à l'insuline, une consommation alimentaire, une masse musculaire et une dépense énergétique moins élevées. Le pourcentage de masse grasse est plus élevé chez les femmes avec une distribution gynoïde de la graisse, alors que les hommes présentent une distribution plutôt androïde de la graisse [161]. La physiologie cardiaque est également différente entre les sexes en conditions physiologiques. En effet, la fonction cardiaque diffère en termes de rythme cardiaque, de débit systolique et de fraction d'éjection [162]. Une implication de la contractilité des myocytes et des canaux ioniques expliquerait le dimorphisme sexuel basal. Des études sur des rongeurs ont notamment montré que les myocytes cardiaques de rats mâles se contractent plus fortement et plus rapidement que les myocytes de rats femelles [162, 163].

## **III- Dimorphisme sexuel dans les facteurs de risque cardiovasculaires**

Le dimorphisme sexuel est également rencontré dans les facteurs de risque de diabète de type 2 et de complications cardiovasculaires.

### **A- Comportements et style de vie**

Le style de vie, les habitudes alimentaires ainsi que l'activité physique jouent un rôle prépondérant dans le risque de diabète de type 2 et des complications cardiovasculaires associées. Des différences importantes ont été décrites entre les hommes et les femmes. Les femmes ont tendance à être moins actives que les hommes mais consomment d'avantage de fruits et de légumes et moins de viande [164, 165]. La sédentarité est un meilleur facteur prédictif d'infarctus du myocarde chez les femmes par rapport aux hommes. En effet, Hare-

Bruun et coll. [166] montrent que les régimes à fort index glycémique augmentent le poids, la masse grasseuse particulièrement chez les femmes sédentaires, et que cette association n'est pas retrouvée chez les hommes. Cependant, malgré des efforts alimentaires, les femmes sédentaires consomment plus de sucres favorisant le développement de graisse viscérale [161, 166]. De manière intéressante, seules les femmes présentent une augmentation de risque de diabète de type 2 lors de la consommation journalière de boissons sucrées [167]. Le tabagisme est également corrélé à la survenue du diabète de type 2, mais sans effets du genre [168]. Cependant, de manière intéressante, pour un tabagisme équivalent, les femmes présentent un risque de maladie coronaire supérieur de 25% à celui des hommes [169].

## **B- Obésité**

De manière générale, les femmes présentent un pourcentage de masse grasseuse supérieur à celui des hommes, essentiel pour la gestation et la lactation. Elles diffèrent également en termes de distribution du tissu adipeux dans l'organisme. Les hommes présentent plus facilement de la graisse au niveau abdominal (phénotype androïde) alors que les femmes accumulent la graisse essentiellement au niveau sous-cutané (phénotype gynoïde) [170]. Les œstrogènes jouent un rôle protecteur vis-à-vis de la graisse viscérale. En effet, dans un modèle de souris nourries avec un régime gras, Stubbins et coll. ont montré que les femelles prenaient moins de poids que les rats mâles, et que cet avantage était perdu lorsque les femelles étaient ovariectomisées [171]. Les œstrogènes sont notamment capables de moduler la distribution des graisses grâce à l'expression de leurs récepteurs ER  $\alpha$  et  $\beta$ . Il a d'ailleurs été montré qu'un ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  plus élevé était corrélé à une adiposité moindre spécialement au niveau viscéral [172]. La prévalence du récepteur ER $\beta$  résulterait en un profil adipogénique et diabétogène [173]. L'augmentation de l'expression des récepteurs ER $\beta$  par rapport aux récepteurs ER $\alpha$  serait associé à une augmentation du stress oxydant, de l'inflammation et de la formation des plaques d'athérome [172], favorisant la survenue du diabète de type 2 et des complications CV.

Le rôle du tissu adipeux viscéral dans les complications cardiovasculaires n'est plus à démontrer. Celui-ci est la source de cytokines pro-inflammatoires contribuant à l'insulino-résistance et à l'athérosclérose, mais contribuant également au relargage d'acides gras libres dans la circulation sanguine, favorisant les dépôts ectopiques de graisse au niveau du cœur [43]. Ces dépôts ectopiques ont des conséquences désastreuses pour l'organe. Notamment,

l'augmentation des lipides intracardiaques est l'un des facteurs favorisant le développement de la cardiomyopathie diabétique [174] par le mécanisme de lipotoxicité. L'augmentation des lipides intracardiaques induit par exemple une augmentation de l'apoptose, de la production d'EROs et un remodelage lipidique membranaire [175]. Les femmes en bonne santé présentent un taux de lipides intracardiaques plus bas que les hommes. Par ailleurs, le sexe masculin est un facteur prédictif de la stéatose myocardique [35, 49]. Cependant cet avantage est aboli en présence d'un diabète de type 2, avec une augmentation plus prononcée du contenu lipidique intracardiaque chez les femmes par rapport aux hommes dans un contexte d'hyperglycémie [49].

### **C- Hypertension**

De manière générale, la pression artérielle diastolique et systolique est supérieure chez les hommes, à partir de l'adolescence [176]. L'hypertension est un facteur de risque CV bien connu qui touche les hommes et les femmes. Cependant l'incidence et la gravité de l'hypertension demeurent plus importantes chez les hommes [177]. Le système rénine-angiotensine, contrôlant la pression artérielle au niveau des reins, semble plus actif avec une activité de la rénine 27% supérieure chez les hommes par rapport aux femmes [176]. Dans le cadre du diabète de type 2, l'hypertension deviendrait plus marquée chez les femmes [148]. Anand et coll. ont par ailleurs montré que l'hypertension est un facteur prédictif d'infarctus du myocarde plus important chez les femmes par rapport aux hommes [148], au même titre que la sédentarité.

Le sexe semble également influencer l'adaptation morphologique du cœur à l'hypertension [178]. En effet, les femmes ont tendance à développer une hypertrophie concentrique par rapport aux hommes qui développent plutôt une hypertrophie excentrique [179].

### **D- Hyperglycémie**

Comme précédemment décrit, le prédiabète se caractérise par une élévation modérée de la glycémie à jeun et/ou par une intolérance au glucose [14]. Les femmes présentent plus souvent une intolérance au glucose, lorsque les hommes présentent plus fréquemment une élévation de la glycémie à jeun [180]. L'intolérance au glucose est fondamentalement reliée à une résistance des tissus périphériques à l'insuline et prédit donc plus fortement la progression du prédiabète vers un diabète de type 2. Des différences significatives entre hommes et femmes existent même

en absence de diabète dans la régulation systémique des niveaux de glucose [152]. L'insulinémie basale semble plus élevée chez les femmes, suggérant une insulinosensibilité plus faible [181] et une insulino-résistance plus forte dans le diabète. Lors de la progression d'une normoglycémie vers une altération de la glycémie à jeun, les femmes présentent une plus grande insulino-résistance couplé à une dysfonction endothéliale, ce qui pourrait expliquer le haut risque de complications CV dans le diabète de type 2 [79]. De manière intéressante, la prévalence de l'hyperglycémie modérée à jeun est plus importante chez les hommes que chez les femmes. Cependant, dans le prédiabète, une glycémie à jeun entre 100 et 125 mg/dL est prédicteur de maladies CV seulement chez les femmes [182]. Il existe également une différence entre les sexes concernant les hormones incrétones, régulant la sécrétion d'insuline. En général, les hommes présentent une concentration à jeun de GLP-1 plus élevée que les femmes [183]. Færch et coll. montrent que les femmes diabétiques de type 2 présentent une réduction de 25% de la sécrétion de GLP-1 par les cellules intestinales en réponse à un test de tolérance au glucose [183], alors que les hommes ne présentent une réduction que de 13%. Lors d'un prédiabète, les femmes présentent une réponse relative au GLP-1 diminuée de 18 à 25% par rapport aux femmes non diabétiques. Chez les hommes cette réponse relative ne diffère pas durant un OGTT [183]. Enfin, l'insulino-résistance est associée à l'augmentation de la masse du ventricule gauche uniquement chez les femmes et pas chez les hommes [79].

#### **IV- Dimorphisme sexuel dans les maladies cardiovasculaires associées au diabète de type 2**

De multiples études ont montré que les hormones féminines et notamment les œstrogènes présentent un effet bénéfique sur la santé cardiovasculaire [149]. Les œstrogènes ont notamment une action sur le métabolisme lipidique, la régulation de la balance énergétique, la distribution de la graisse, la sensibilité à l'insuline, le contrôle de la pression artérielle et les vaisseaux [184]. Les récepteurs aux œstrogènes sont par ailleurs exprimés dans les muscles lisses et l'endothélium vasculaire [185]. Les œstrogènes sont capables de diminuer la formation des athéromes, d'augmenter la biodisponibilité du NO par l'augmentation de la production de NO ou par une diminution de la concentration en  $O_2^-$  [185]. Les œstrogènes ont aussi une régulation positive sur des facteurs de relaxation vasculaire, comme la prostaglandine  $I_2$  (PGI<sub>2</sub>). Des études sur des animaux femelles ovariectomisées ont par ailleurs montré une plus forte

altération de la fonction ventriculaire gauche, une augmentation de l'apoptose et des cytokines pro-inflammatoires (IL1 $\beta$  et IL6) suite à un épisode d'ischémie-reperfusion [186], indiquant un rôle potentiel des hormones sexuelles féminines. Lagranha et coll. ont montré une récupération fonctionnelle plus faible à la reperfusion chez des femelle Sprague-Dawley ovariectomisées, avec une augmentation de la génération d'EROs [187]. Dans ces deux études, le traitement des animaux ovariectomisées par des œstrogènes permet une restauration de la fonction cardiaque.

### **A- Effet du sexe dans les maladies des artères coronaires**

Le diabète de type 2 atténue les effets protecteurs du sexe féminin même à un stade précoce de la maladie. La dysfonction endothéliale est un signe précoce des complications CV chez les patients diabétiques et en particulier chez les femmes [188]. Les femmes manifesteraient plus facilement des taux élevés de facteurs endothéliaux, des facteurs fibrinolytiques/thrombotiques pendant la transition d'une normoglycémie vers un diabète [189, 190]. Lors d'un diabète, elles présentent une altération de la vasodilatation endothélium-dépendante plus importante, une dyslipidémie athérogène plus grave ou encore un profil altéré de coagulation prothrombotique [188, 190]. Par ailleurs, les femmes diabétiques de type 2 sont plus sensibles à des changements de la coagulation (facteur VIII), de l'inflammation et de la fonction vasculaire que les hommes. L'hyperglycémie modifie également la balance des récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha$  et  $\beta$ ), augmente le stress oxydant et le niveau d'endothéline (vasoconstrictrice) [188, 190, 191].

Dans une étude explorant l'impact d'un régime riche en graisse sur la compliance artérielle de rats obèses et insulino-résistants JCR:LA-cp, Hunter et coll. ont montré un impact négatif du régime avec une perte de compliance plus importante chez les femelles par rapport aux mâles. Dans cette même étude, les auteurs ont également montré une altération de la réponse à l'acétylcholine des micro-vaisseaux mésentériques plus importante chez les femelles JCR:LA-cp sous régime gras par rapport aux mâles [192]. La régulation de la voie Akt pourrait être aussi un facteur contribuant à la dysfonction endothéliale vasculaire, participant à la sensibilité du myocarde à un épisode d'ischémie-reperfusion chez les femelles [193]. Reichelt et coll. ont montré que les œstrogènes et l'insuline sont engagés dans une voie de signalisation commune importante pour les cardiomyocytes, la voie PI3K/Akt [152]. Goel et coll. suggèrent que les œstrogènes causent une dysfonction endothéliale sexe-spécifique dans des conditions hyperglycémiques, par une augmentation de l'expression de PKC $\beta$  et une augmentation de la

production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> chez les femelles [194]. Desrois et coll. ont montré une altération plus importante du débit coronaire, associé à une surexpression plus faible de la protéine eNOS chez les femelles GK diabétiques de type 2 par rapport aux mâles GK [111]. Par conséquent, une interaction entre hormones sexuelles féminines et diabète de type 2, est un mécanisme plausible des différences hommes-femmes dans les maladies des artères coronaires [111].

## **B- Effet du sexe dans la cardiomyopathie diabétique**

### **1- Généralités**

Comme précédemment décrit, la cardiomyopathie diabétique est définie comme une altération de la fonction cardiaque chez les patients diabétiques, indépendamment des maladies des artères coronaires et de l'hypertension, conduisant à un risque élevé de mortalité CV [34, 195]. De manière intéressante, la prévalence de la cardiomyopathie diabétique est supérieure chez les femmes par rapport aux hommes [196]. Kiencke et coll. ont notamment montré que le sexe féminin était un facteur de risque indépendant de la cardiomyopathie diabétique [197]. La cardiomyopathie diabétique est caractérisée chez les femmes par des altérations structurelles et fonctionnelles plus importante que chez les hommes [196].

### **2- Fibrose / Hypertrophie**

En absence de cardiomyopathie diabétique des différences entre les sexes préexistent concernant la composition en collagène dans le cœur. Dworatzek et coll. ont montré un taux de collagène I et III plus élevé chez les hommes par rapport aux femmes jeunes. A contrario, avec l'âge les femmes présentent plus de collagène I et III que les hommes [198]. Une étude chez le rat a également montré une composition en collagène I plus élevée dans le sexe féminin [199].

Un remodelage myocardique se produit lors du développement de la cardiomyopathie diabétique, avec notamment une augmentation de la fibrose myocardique pouvant participer à l'hypertrophie et à la défaillance cardiaque. La cardiomyopathie diabétique promeut la fibrose et les dépôts de collagène I et III conduisant à une rigidité du myocarde [195]. Des études cliniques par IRM ont par ailleurs montré un remodelage et une fibrose myocardiques plus importants chez les femmes avec une défaillance cardiaque en comparaison des hommes [200].



Les femmes diabétiques de type 2 présentent une hypertrophie cardiaque plus importante, caractérisée par un épaississement de la paroi du myocarde et une augmentation de la masse du ventricule gauche. Le sexe féminin est par ailleurs un prédicteur indépendant de l'hypertrophie cardiaque [195]. Les femmes développent une cardiomyopathie hypertrophique lorsque les hommes développent plus une dilatation myocardique [161].

Par ailleurs, il a été montré que le récepteur  $\beta$  aux œstrogènes joue un rôle important dans la régulation du taux de collagène [201]. Schuster et coll. ont montré que les souris surexprimant le récepteur  $\beta$  aux estrogènes présentaient une diminution de la fibrose myocardique caractérisée par une diminution des dépôts de collagène I et III, en association avec une amélioration de la fonction cardiaque [201]. De plus, chez des souris femelles déficientes pour le récepteur aux œstrogènes  $\beta$ , Skavdahl et coll. montrent une hypertrophie cardiaque, confirmant le rôle important de ce récepteur dans l'hypertrophie cardiaque dans le sexe féminin [202]. Chez le rat GK diabétique de type 2, Apaijai et coll. montrent que la privation en œstrogène par ovariectomie augmente la sévérité de l'hypertrophie cardiaque [203]. Dans le même modèle, Desrois et coll. ont notamment montré une hypertrophie plus importante chez des femelles GK que chez les mâles GK diabétiques de type 2 [193]. Ces résultats pourraient expliquer les différences entre les sexes concernant l'hypertrophie et la fibrose myocardiques dans le cadre de la cardiomyopathie diabétique.

### **3- Métabolisme mitochondrial**

Il existe un dimorphisme sexuel au niveau de la mitochondrie. En l'absence de pathologies, les études sur les rongeurs ont montré que les cellules du cœur de femelles présentent moins de mitochondries, une efficacité et une différenciation mitochondriale plus importante et une production réduite d'EROs [138]. Le cœur des femmes utilise également les acides gras en plus grande proportion pour ses besoins énergétiques par rapport aux hommes [138, 204]. Les enzymes impliquées dans le transport et l'oxydation des acides gras sont sous le contrôle des facteurs de transcription PPARs, et plus particulièrement de PPAR $\alpha$  [205]. L'augmentation de l'oxydation des acides gras dans le cœur diabétique est associée avec une augmentation de PPAR $\alpha$  dans divers modèles animaux [206].

Des études suggèrent que le sexe pourrait jouer un rôle dans les altérations du métabolisme cardiaque observées dans la cardiomyopathie diabétique. Une implication des œstrogènes a été

rapportée dans la voie de signalisation du métabolisme lipidique et pourrait expliquer les différences de métabolisme mitochondrial observées entre les mâles et les femelles diabétiques. En effet, Djouadi et coll. ont montré chez des souris PPAR $\alpha$ <sup>-/-</sup>, que l'inhibition du flux d'acides gras cellulaires a provoqué une accumulation massive de lipides hépatiques et cardiaques, une hypoglycémie et la mort chez 100% des souris mâles, mais seulement 25% des souris femelles. Un traitement avec du  $\beta$ -estradiol a diminué la mortalité des souris mâles démontrant bien le rôle des hormones sexuelles féminines dans l'homéostasie lipidique médiée par PPAR $\alpha$  [204].

Peu d'études traitent des différences entre les sexes concernant les composés riches en énergie comme l'ATP et la PCr dans le cadre du diabète. La mitochondrie qui permet la production d'énergie au sein de la cellule, est sujette à des différences entre les sexes dans son fonctionnement basal. Les œstrogènes sont capables de moduler la fonction mitochondriale par exemple en augmentant des régulateurs clé du métabolisme énergétique et de la biogénèse mitochondriale, en augmentant la production d'ATP et en régulant l'homéostasie calcique [207]. Une localisation mitochondriale des récepteurs aux œstrogènes a été suggérée, induisant des effets directs des œstrogènes sur la mitochondrie. Notamment ER $\alpha$  promouvoir la respiration mitochondriale et les défenses antioxydantes. Les œstrogènes modulent également les régulateurs de la biogénèse mitochondriale, comme les facteurs Nrf1/2, TFAM, and PGC1 $\alpha$ .

Dans la cardiomyopathie diabétique des altérations du métabolisme mitochondriale existent, mais leur rôle dans le sexe féminin reste à déterminer dans des études futures.

## **V- Conclusion**

La littérature concernant les effets du genre et du sexe sur les complications CV dans le prédiabète et le diabète de type 2 reste encore peu documentée. Pourtant, les femmes diabétiques de type 2 présentent un risque CV plus important que les hommes diabétiques de type 2. Les raisons de cette différence ne sont pas encore entièrement élucidées mais les pistes concernant la fonction endothéliale et la fonction mitochondriale en lien avec les hormones sexuelles féminines semblent prometteuses. Au cours de ma thèse, nous nous sommes donc intéressés au sexe féminin en mettant en lumière les altérations cardiaques présentes chez des rates prédiabétiques et diabétiques de type 2.

## **Partie 3 : Approche thérapeutique par le Resvératrol**

### **I- Le traitement du diabète de type 2**

Depuis sa découverte en 1921 par Frederick Banting et Charles Best [208], l'insuline reste le traitement de première intention chez les diabétiques de type 1. Le traitement du diabète de type 2 semble plus complexe. Son caractère plurifactoriel en fait une maladie nécessitant parfois plusieurs approches médicamenteuses [209].

Du fait d'un fort lien entre diabète de type 2 et obésité [25, 210], le traitement de référence du diabète de type 2 est l'optimisation des habitudes de vie. Dans un premier temps, une perte de poids, une activité physique régulière et une alimentation équilibrée peuvent suffire à contrôler la glycémie. Dans le cadre d'un prédiabète, les mesures hygiéno-diététiques évitent même parfois l'apparition d'un diabète de type 2 [21, 211]. Cependant, lorsque ce type d'intervention ne suffit plus, des médicaments antidiabétiques oraux et/ou injectables sont utilisés pour contrôler la glycémie. De nos jours il existe plusieurs classes de médicaments antidiabétiques : les biguanides (metformine), les sulfonylurées, les glinides, les incrétines, les inhibiteurs du cotransporteur sodium/glucose 2 (SGLT-2) et l'insuline [209]. Ces classes thérapeutiques reposent sur des mécanismes d'action différents et sont administrées seules ou combinées entre elles (Tableau 1).

Malgré la diversité des traitements disponibles, les maladies cardiovasculaires restent la première cause de mortalité chez les patients diabétiques [35, 212], même lors d'un contrôle glycémique intense [103]. Ainsi, depuis 2008 la FDA (US Food and Drug Administration) exige des études d'innocuité cardiovasculaire pour tout nouveau traitement antidiabétique à paraître sur le marché [213]. Récemment, l'Empagliflozine, un inhibiteur du SGLT2 a montré une réduction de la mortalité cardiovasculaire de 38% [214], alors que la plupart des traitements montrent une neutralité ou parfois une augmentation du risque cardiovasculaire [215]. Ainsi, trouver de nouvelles approches thérapeutiques visant à améliorer les morbidités et la mortalité associés au diabète de type 2 reste un défi. Dans ce but, les compléments alimentaires semblent

être une piste intéressante, en combinaison avec des médicaments antidiabétiques, afin d’agir sur les facteurs de risque associés aux complications CV du diabète.

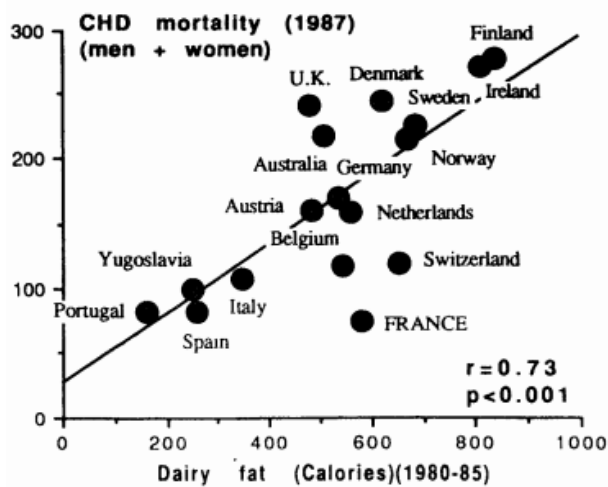
Depuis des millénaires, l’Homme utilise les plantes afin de soigner ses maux. Les études archéologiques montrent qu’il y a déjà 30 000 ans, l’Homme de Neandertal se soignait à l’aide des plantes. Actuellement, la médecine complémentaire et parallèle désigne divers types de pratiques et de produits médicaux autres que la médecine conventionnelle [216]. La consommation de plantes médicinales et de suppléments alimentaires est la plus répandue [216] et les femmes semblent avoir d’avantage recours à ce type de pratique [217]. En parallèle, un intérêt croissant se porte sur les régimes de type méditerranéen, caractérisés par une consommation élevée de fruits, légumes, légumineuses, noix et huile d’olive ; ainsi qu’une consommation modérée de vin et de produits laitiers [218]. Les polyphénols figurent parmi les constituants les plus abondants dans ce type de régime. Certains fruits (baies, raisin) peuvent en contenir jusqu’à 200-300 mg pour 100 g [219] et leur consommation a été associée à des bénéfices sur la santé cardiovasculaire ainsi que sur la prévention des maladies métaboliques chroniques [220, 221].

<b>Classe thérapeutique</b>	<b>Mécanisme d’action</b>
<b>Les Biguanides</b> (Metformine)	Réduisent la glycémie en dehors et après un repas Diminuent la production hépatique de glucose Diminuent l’insulino-résistance Retardent l’absorption intestinale du glucose
<b>Les Sulfamides hypoglycémiantes et les Glinides</b>	Stimulent la sécrétion d’insuline Améliorent la glycémie avant et après les repas
<b>Les inhibiteurs des <math>\alpha</math>-glucosidases</b>	Retardent l’absorption des glucides après un repas
<b>Les incrétines</b> GLP-1, analogues du GLP-1 ou inhibiteurs de la DDP-4	Stimulent la sécrétion d’insuline au début des repas Stimulent la sécrétion d’insuline lorsque la glycémie est élevée Réduisent la sécrétion de glucagon Diminuent l’appétit Ralentissent la vidange gastrique
<b>Les inhibiteurs du SGLT2</b>	Augmentent l’élimination du glucose dans les urines
<b>Insuline</b>	En cas d’insulinopénie

**Tableau 1** Les différentes classes thérapeutiques utilisées dans le traitement du diabète de type 2 [222].

## II- Le « French Paradox »

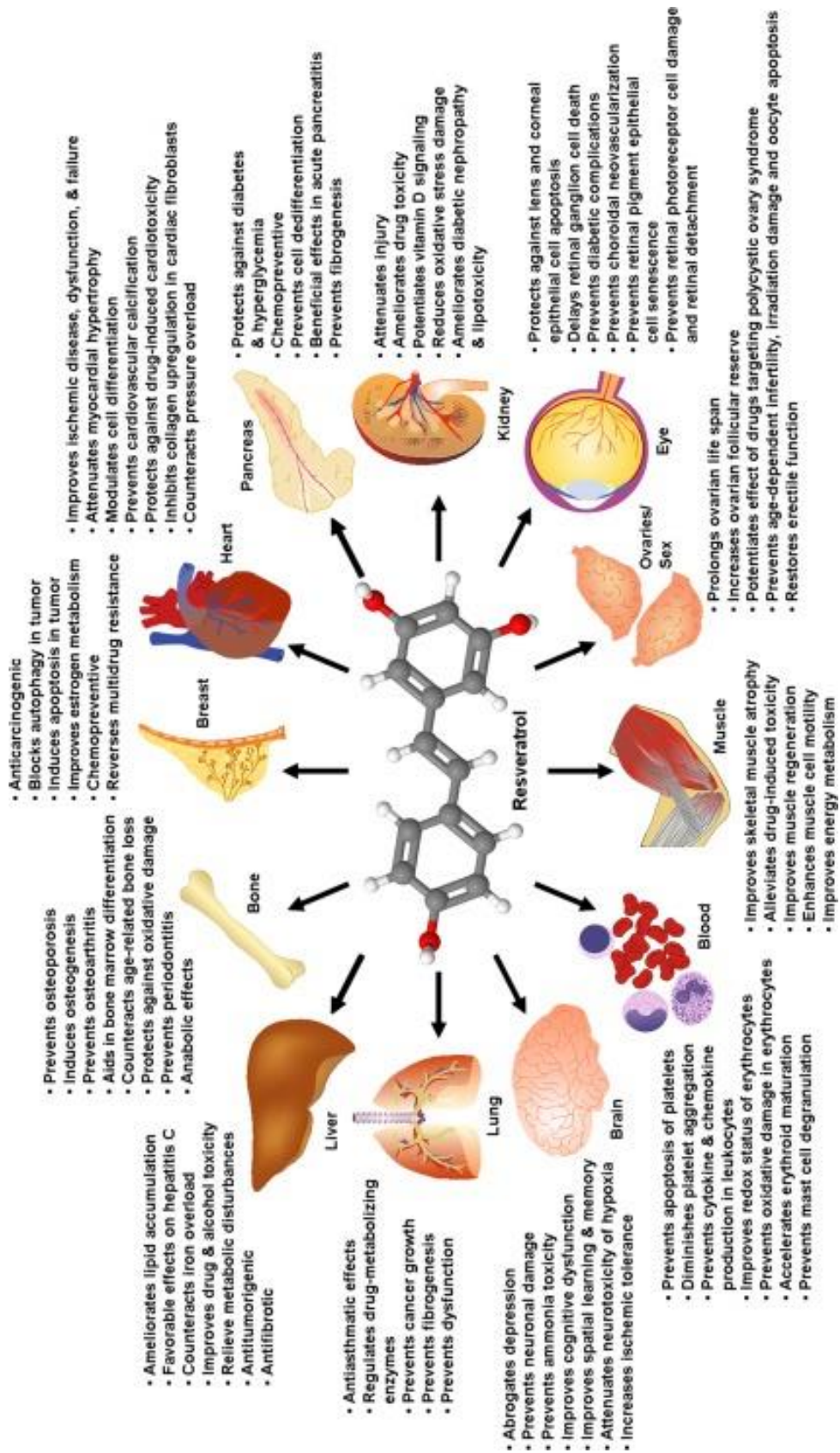
En dehors du contexte du diabète de type 2, les français présentent une mortalité cardiovasculaire moins importante que celle de leur voisins Européens (Figure 8). Ce phénomène est rapporté pour la première fois dans la littérature en 1986 comme le « French Paradox ». En effet, malgré une alimentation identique voire moins équilibrée, un taux de cholestérol équivalent et des facteurs de risque identiques, les français présentent un taux de mortalité par maladie coronarienne moins élevé [223].



**Figure 8** Mortalité par maladie coronarienne par pays en fonction de la consommation de lipide par jour.

Adapté de Renaud et de Lorgeril [223].

L'origine de ce phénomène a rapidement été attribuée à la consommation régulière de vin rouge [223]. Quelques années plus tôt, un polyphénol appelé Resvératrol (RSV) a été identifié dans le vin rouge [224] et il a été émis l'hypothèse que le RSV pouvait être à l'origine du French Paradox [225]. Le RSV est une molécule reconnue pour sa pléiotropie. De nombreuses études ont montré que le RSV présente un panel d'action large au sein de l'organisme (Figure 9). En effet, le RSV a montré des effets bénéfiques sur les maladies métaboliques chroniques comme le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, les maladies inflammatoires, le vieillissement précoce et également le cancer [226]. Dans l'organisme, les cibles du RSV sont multiples. Ses actions antioxydante, anti-inflammatoire, sur le métabolisme du glucose et des lipides ainsi que sur la fonction endothéliale laissent à penser que le RSV pourrait être un candidat prometteur dans le cadre des complications cardiovasculaires du diabète de type 2. Les effets du RSV dans le cadre du diabète de type 2 seront exposés plus loin dans cette partie.



**Figure 9** Effets du Resvératrol sur l'organisme, d'après Weiskirchen et coll. [226]

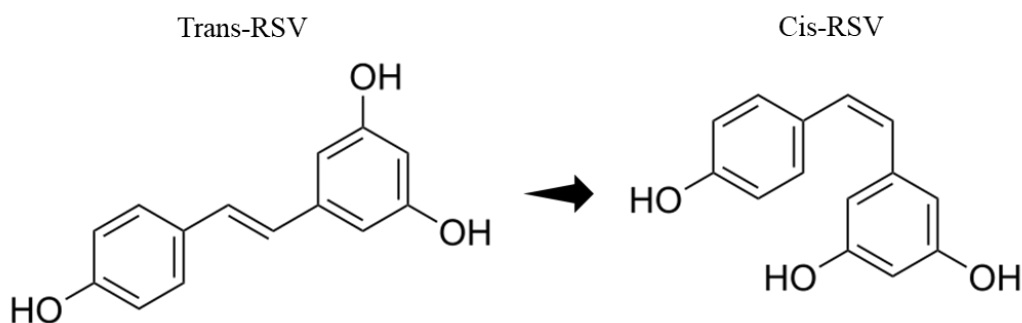
### III- Généralités sur le Resvératrol

#### A- Origine

En réponse à un stress extérieur physicochimique ou biologique, les plantes ont développé la capacité de produire des métabolites secondaires appartenant pour la plupart à la classe des polyphénols, divisée en 4 familles : les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques, les stilbènes et les flavonoïdes [227]. Parmi les stilbènes se trouve le RSV ou 3,5,4'-trihydroxystilbène. Le RSV a été recensé dans plus de 70 plantes dont la vigne [224, 228]. En réponse à un stress physico-chimique ou biologique telle qu'une agression par le champignon *Botrytis cinerea*, la vigne est capable de produire de grandes quantités de RSV dans les feuilles, la peau du raisin, les pellicules des grains et dans le bois [227]. Le RSV intervient alors comme un médiateur puissant, capable d'activer des systèmes de défense chez la plante. Les concentrations dans la peau du raisin peuvent se situer entre 50 et 100 mg/g [228], contribuant à une concentration relativement élevée de RSV dans le vin rouge (1 à 45 mg/L selon les cépages).

#### B- Structure

Le RSV possède une structure caractérisée par deux groupements phénoliques de part et d'autre d'une double liaison styrénique, ainsi que trois groupements -OH. Cette configuration permet l'existence de deux isomères du RSV, le cis-RSV et le trans-RSV (Figure 10). Le trans-RSV est la forme majoritaire et biologiquement la plus active. Le passage du trans-RSV vers la configuration cis est rendu possible par irradiation UV (photoisomérisation). Le RSV est donc photosensible et ce processus est irréversible dans les cellules.



**Figure 10** Structure des deux isomères du Resvératrol

## C- Voie de synthèse

Le RSV est synthétisé à partir de phénylalanine après une succession de quatre réactions enzymatiques (Figure 11). L'enzyme la plus importante dans la production du RSV est la stilbène synthase, qui catalyse la dernière réaction enzymatique. C'est cette enzyme clé qui est activée lors de stimuli extérieurs chez la plante. Ce processus appelé « élévation » va permettre ainsi à la plante de stimuler ses systèmes de défense [227].

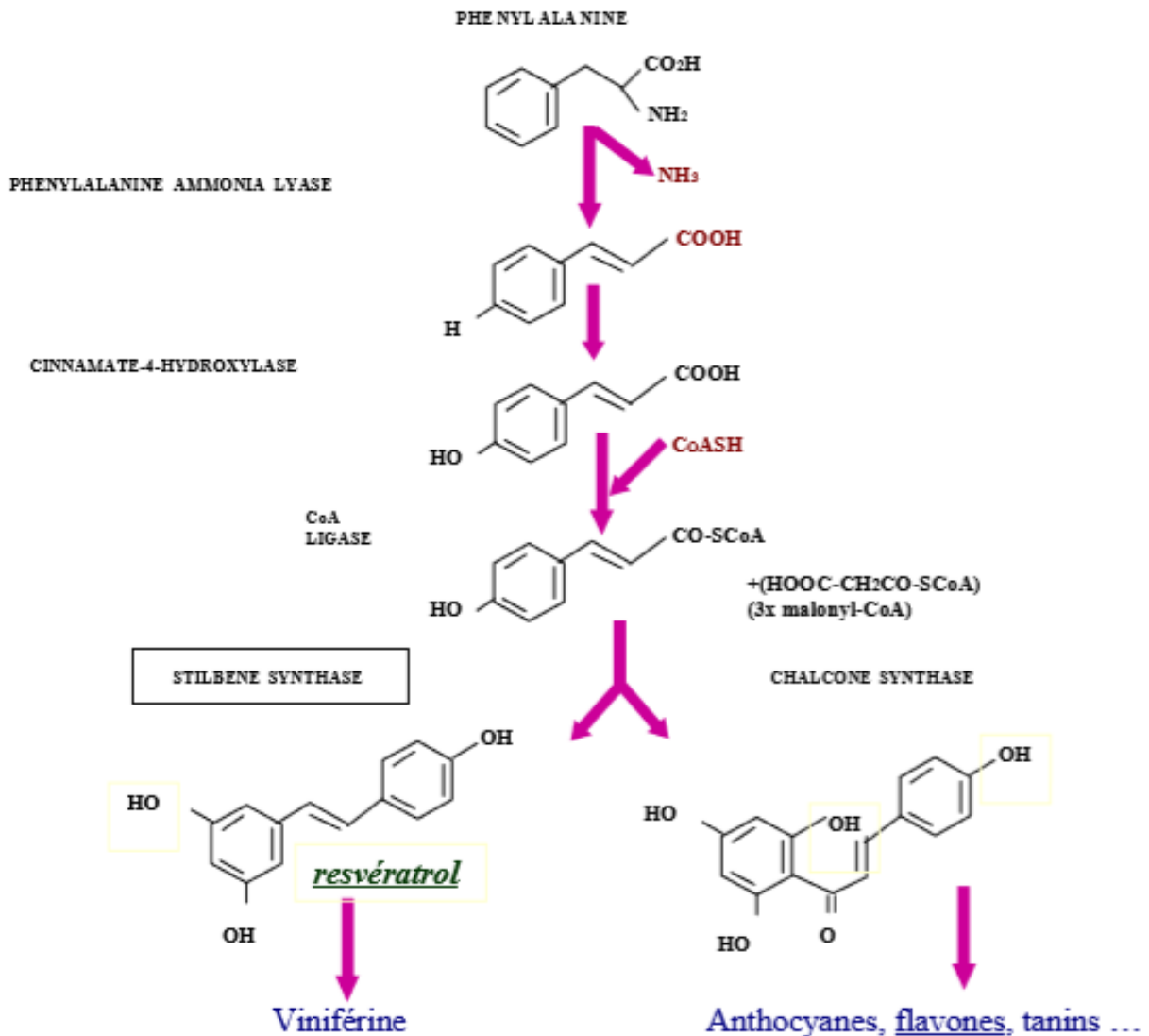


Figure 11 Voie de synthèse du Resvératrol, D'après Latruffe [227].



## **D- Absorption, métabolisme et biodisponibilité**

La voie naturelle d'absorption du RSV chez l'Homme reste l'absorption par voie orale, notamment via la consommation de vin rouge, de raisin, de mûres ou de cacahuètes. La biodisponibilité correspond à la fraction de RSV effectivement active dans l'organisme une fois que celui-ci a été absorbé et métabolisé. Malgré une absorption relativement bonne, la biodisponibilité du RSV reste faible, avec moins de 1% du RSV sous sa forme active trans initiale [229, 230]. La quantité de RSV dans le plasma reste très basse (1 à 5 ng/mL) et son niveau maximal est atteint trente à soixante minutes après absorption [228]. Son suivi est possible par administration de <sup>14</sup>C-RSV [231]. Actuellement de nouvelles stratégies se mettent en place afin de rendre plus biodisponible le RSV [232, 233], notamment en modifiant les voies d'administration afin que celui-ci arrive directement dans le sang [234].

## **IV- Les cibles du Resvératrol**

### **A- Généralités**

Plus de 20 molécules ont été identifiées comme se liant directement au RSV [235]. Le RSV est largement reconnu comme étant un activateur de la sirtuine 1 (SIRT1) mais également de la sirtuine 3 (SIRT3) au niveau mitochondrial [236]. Ainsi, dans ce travail de thèse nous avons donc choisi d'explorer SIRT1 et SIRT3.

### **B- SIRT1 et SIRT 3**

Les sirtuines constituent une classe d'enzyme phylogénétiquement conservée des bactéries à l'Homme. Ce sont des histones désacétylases de classe III NAD-dépendantes régulant l'expression de multiples gènes. Chez l'Homme, il existe 7 Sirtuines classifiées de SIRT1 à SIRT7.

#### **1- SIRT1**

Il s'agit de la sirtuine la mieux caractérisée. Elle se situe au niveau nucléaire, possède une activité désacétylase et interagit avec divers facteurs de transcription. SIRT1 intervient dans le métabolisme du glucose et des lipides, mais aussi dans les processus d'inflammation, de

restriction calorique, de biogenèse mitochondriale, de résistance au stress, de sénescence cellulaire, de fonction endothéliale, ou encore d'apoptose [236, 237].

SIRT1 est une cible intéressante dans le diabète de type 2 puisqu'elle pourrait participer au contrôle de l'homéostasie glucidique en régulant la sécrétion d'insuline, en diminuant l'insulino-résistance et en protégeant les cellules bêta pancréatiques [238-240].

SIRT1 joue également un rôle dans la physiologie et les pathologies cardiovasculaires. En effet, les souris déficientes en SIRT1, présentent un défaut de développement cardiaque conduisant à la mort embryonnaire [241]. SIRT1 est également un facteur agissant contre le développement de l'athérosclérose, en inhibant l'apoptose des cellules endothéliales, en modulant l'expression d'eNOS, en diminuant l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales [242]. SIRT1 a été décrite comme favorisant la vasodilatation dépendante de l'endothélium en activant eNOS et donc en augmentant la production de NO [243]. De manière intéressante, un rétrocontrôle positif existe entre SIRT1 et eNOS, puisque le NO est capable à son tour d'activer SIRT1 [237]. SIRT1 a également la capacité de réduire l'inflammation dans des modèles d'hypertrophie et de défaillance cardiaque [244, 245]. Par ailleurs, une défaillance en SIRT1 est associée à une augmentation de l'expression des protéines pro-inflammatoires IL1 $\beta$ , IL6 et TNF $\alpha$  [246]. Enfin, il a été montré que les lésions d'ischémie-reperfusion conduisent à une diminution de l'expression de SIRT1 [247]. A l'inverse dans un modèle de souris surexprimant SIRT1, Hsu et coll. ont montré une meilleure récupération fonctionnelle myocardique après un épisode d'ischémie-reperfusion [248].

## **2- SIRT3**

SIRT3 est une sirtuine mitochondriale possédant une forte activité désacétylase [249]. SIRT3 est hautement exprimée dans les tissus ayant un métabolisme élevé comme le cœur [250]. SIRT3 a pour cible des enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras, l'oxydation du glucose, la chaîne de transport des électrons, le stress oxydant et l'intégrité cellulaire [251]. SIRT3 a également un rôle dans la régulation de la fonction cardiaque et dans les pathologies cardiovasculaires [236, 251-253]. En effet, des études utilisant des souris SIRT3<sup>-/-</sup>, ont montré une altération de la fonction cardiaque avec une diminution de la fraction d'éjection et du volume d'éjection systolique, et une augmentation du volume du ventricule gauche [254, 255]. Dans ce modèle, d'autres études ont montré une hypertrophie cardiaque associée à une

augmentation de la fibrose myocardique [254] et à un niveau plus faible d'ATP [250]. SIRT3 participe également à la détoxification des EROs [256-258]. En effet, les souris SIRT3<sup>-/-</sup> présentent un stress oxydant exacerbé, reflété par une augmentation des TBARS dans le cœur [254]. Enfin, SIRT3 jouerait également un rôle dans les lésions myocardiques observées après un épisode d'ischémie-reperfusion, puisque qu'une délétion en SIRT3 conduirait à une augmentation de la taille d'infarctus et à une diminution de la récupération fonctionnelle à la reperfusion [259].

## **V- Les doses de Resvératrol**

Dans la littérature, les doses administrées de RSV varient énormément. En effet, les doses observées sont comprises entre 0,1 mg/kg/jour à plus de 500 mg/kg/jour pour les études chez le rat [260, 261]. Les modèles d'étude diffèrent également allant d'études cellulaires sur des cardiomyocytes isolé à des études chez l'animal (rat ou souris) et l'Homme *in vivo* [262-264].

La dose de RSV à administrer doit donc être soigneusement évaluée. En partant du principe que le RSV est la molécule à l'origine du « French paradox », la dose à utiliser doit donc se rapprocher un maximum de la dose de RSV ingérée via la consommation de vin rouge. En 2009, Rocha et coll. préconisent une dose d'environ 1 mg/kg/jour en se basant sur la consommation réelle des occidentaux, sur les paramètres de cinétique et de biodisponibilité du RSV [265]. Cette dose prend en compte les effets cliniques du RSV en fonction de son taux plasmatique après une administration orale. Lin et coll. ont aussi montré qu'une dose de 0,1 mg/kg/jour ne suffisait pas à induire d'effets bénéfiques sur le cœur, lorsqu'une dose de 1 mg/kg/j permettait d'améliorer la fonction cardiaque [260]. A contrario des doses trop élevées de RSV semblent délétères. Dans un modèle d'ischémie-reperfusion, Dudley et coll. montrent qu'une dose supérieure à 25 mg/kg/jour peut augmenter la taille d'infarctus [266]. Ainsi, au cours de ma thèse nous avons choisi d'utiliser une dose de 1 mg/kg/jour pendant 8 semaines, administrée par voie orale dans l'eau de boisson.

## **VI- Effets du Resvératrol sur le diabète de type 2 et les complications cardiovasculaires**

### **A- Effets du Resvératrol sur le diabète**

Le RSV a de multiples effets sur le diabète de type 2, en diminuant notamment la glycémie à jeun et la glycémie post-prandiale [267] ainsi que l'hémoglobine glyquée [268] chez des patients diabétiques de type 2. L'insulino-résistance est également un facteur critique dans le développement du diabète de type 2. Dans une autre étude [269], les auteurs montrent une amélioration de l'insulino-résistance et du stress oxydant par le RSV chez des patients diabétiques de type 2.

L'effet anti-diabétique du RSV a également été montré dans des modèles de rat STZ de diabète de type 1 et de type 2, via une augmentation de la capture du glucose par les tissus périphériques [270]. Dans un modèle de souris obèse et insulino-résistance, Frombaum et coll. ont montré une amélioration de la réponse à l'insuline au niveau des tissus périphériques, par augmentation de la phosphorylation des protéines Akt et AMPK dans le tissu adipeux, le foie et le muscle [271]. Le RSV est capable d'améliorer l'insulino-résistance induite par un régime HF par des mécanismes impliquant SIRT1 et AMPK [272, 273]. Le RSV agit également sur la sécrétion du GLP-1 au niveau intestinal, améliorant le contrôle glycémique chez des souris diabétiques soumises à un régime riche en graisse [274]. Au niveau hépatique, le RSV permet une augmentation de la production de glycogène et une diminution de la production hépatique de glucose, conduisant à une baisse de la glycémie [275]. Enfin au niveau pancréatique, la tolérance au glucose est améliorée par une protection des cellules  $\beta$  contre le stress oxydant [276].

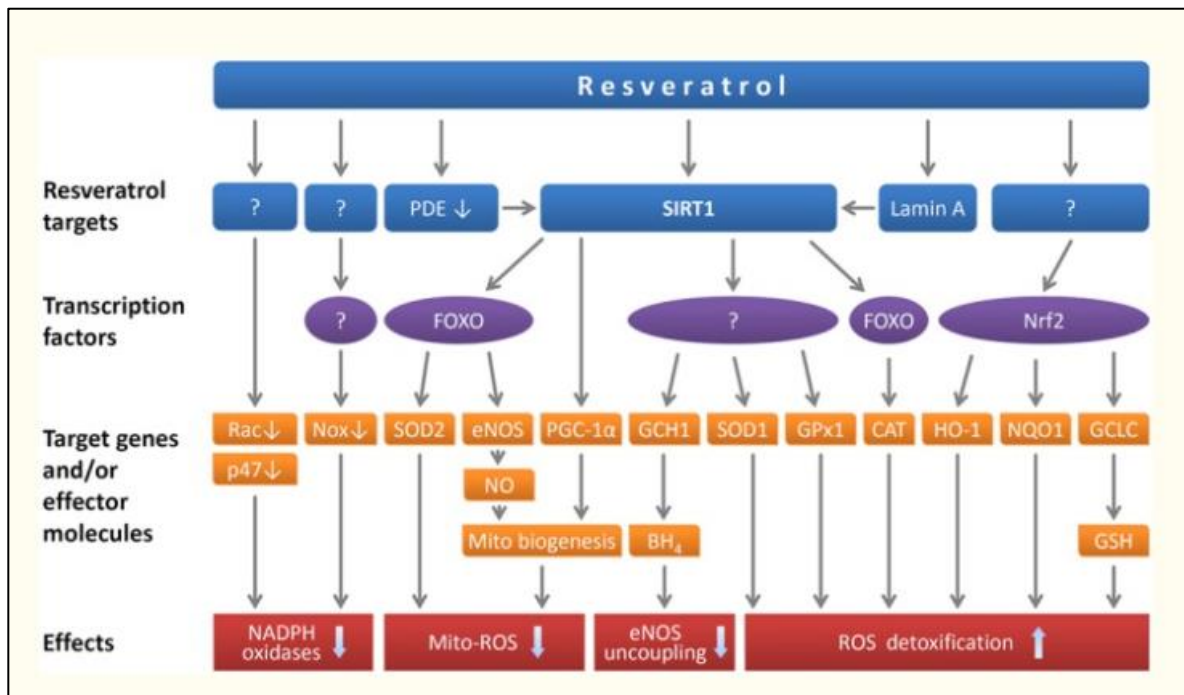
### **B- Effets du Resvératrol sur le cœur**

La littérature montre que le RSV possède des propriétés cardioprotectrices notamment contre l'ischémie-reperfusion. Les études animales montrent que le RSV peut réduire la taille d'infarctus et améliorer la fonction ventriculaire gauche. Les mécanismes impliqués font notamment intervenir une diminution des processus d'apoptose et d'inflammation [277]. En absence de blessure ischémique, le RSV est également capable d'améliorer la fonction

myocardique de rats diabétiques STZ [278]. En effet le RSV a montré des effets bénéfiques sur la cardiomyopathie diabétique. Mohammadshahi et coll. montrent notamment que le RSV peut atténuer la cardiomyopathie diabétique en diminuant le stress oxydant dans ce même modèle [279]. Le RSV, qui est un activateur connu de SIRT1 est également capable d'augmenter l'expression de la pompe SERCA2a et ainsi d'améliorer la fonction cardiaque [280]. De plus à travers l'activation de SIRT1, le RSV améliore la fonction cardiaque dans des modèles de cardiomyopathie diabétique, via une modulation des protéines mitochondriales PGC1 $\alpha$ , NRF1, ERR $\alpha$  et TFAM [281-283].

### C- Mécanismes d'action du Resvératrol

Les cibles du RSV sont multiples et font intervenir diverses voies de signalisations décrites dans la Figure 12 [284]. Par la modulation de ces différentes voies, le RSV présente notamment des propriétés antioxydantes et présente des effets bénéfiques sur les fonctions endothéliale et mitochondriale. Le RSV peut également agir sur les voies de signalisation des œstrogènes. Nous allons donc détailler dans la partie suivante les effets du RSV sur le stress oxydant, les fonctions endothéliale et mitochondriale et les œstrogènes.



**Figure 12** Cibles et mécanismes d'action du Resvératrol. D'après Xia et coll. [284].

## **1- Effets du Resvératrol sur le stress oxydant**

Le RSV est capable d'intervenir dans la régulation du stress oxydant au sein de l'organisme. En effet, des études *in vitro* ont montré que le RSV est capable d'éliminer directement les EROs telles que le radical hydroxyle,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , et le peroxy-nitrite [285]. *In vivo*, il semble que le RSV ait plutôt un mode d'action indirect, par l'activation des systèmes antioxydants endogènes [284, 286]. En effet, Cao et coll. et Li et coll. ont montré que le RSV peut augmenter l'activité et l'expression des enzymes superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et catalase [287, 288]. Le RSV a montré une augmentation des défenses antioxydantes dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez la souris [289]. Kong et coll. ont également montré que le RSV pouvait protéger le cœur contre le stress oxydant et augmenter les défenses antioxydantes de rats nourris avec un régime riche en graisse [290]. De façon similaire, Rocha et coll. ont montré une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase chez des rats nourris avec un régime riche en graisse, avec une diminution de l'oxydation du LDL et du stress oxydatif hépatique [265]. Dans un autre modèle de diabète (STZ), Ma et coll. ont montré que le RSV était capable de diminuer le MDA dans le cœur, participant ainsi à améliorer de la fonction cardiaque [281]. Chez des souris âgées, le RSV est également capable de diminuer le taux de 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, qui est un marqueur du stress oxydant [291].

Les enzymes NAPDH oxydases (NOX) représentent une source d'EROs dans le système cardiovasculaire [292]. Le RSV est capable de réduire l'expression des NOX, comme par exemple NOX2 et NOX4 dans le cœur de souris présentant une hypercholestérolémie [293].

Au niveau de l'endothélium, le découplage de la protéine eNOS est un également un signe de stress oxydant exacerbé. En effet, le stress oxydant peut aboutir au découplage de la protéine eNOS, produisant elle-même l'ion superoxyde à la place du NO [294]. Xia et coll. ont montré que le RSV est capable de réduire le découplage de la protéine eNOS dans le tissu cardiaque. Dans cette étude le traitement par le RSV conduisait à une diminution de la production de superoxyde dans le cœur de souris ApoE<sup>-/-</sup>, par diminution de la forme découplée d'eNOS [293].

## **2- Effets du Resvératrol sur la fonction endothéliale**

Le RSV est capable d'améliorer la vasodilatation dépendante de l'endothélium, indicateur « clé » de la fonction endothéliale [295-297]. Une amélioration de la relaxation vasculaire par le RSV a également été montré chez des rats rendus diabétiques par de la streptozotocine [298].

Diverses études ont montré la capacité du RSV à améliorer la fonction endothéliale, notamment en augmentant la bio-activité du NO au sein de l'endothélium. Une étude *in vitro* a par ailleurs montré que les mécanismes impliqueraient une stimulation de la transcription du gène codant pour eNOS, une meilleure stabilisation des ARNm de eNOS, une surexpression de la protéine eNOS via un mécanisme en partie SIRT1-dépendant [299]. Une autre étude *in vitro* sur des cellules endothéliales soumises à une hyperglycémie, montre que le RSV est capable d'augmenter la phosphorylation des protéines Akt et eNOS, induisant une meilleure vasorelaxation des cellules en réponse à l'acétylcholine [270]. Le RSV peut aussi augmenter la phosphorylation de eNOS sur le résidu Sérine 1177 et désacétyler eNOS sur les lysines 496 et 506, conduisant à une amélioration de la production de NO [284]. Chez des souris nourries avec un régime riche en graisse, le RSV augmente la phosphorylation d'Akt et l'expression d'eNOS dans l'aorte thoracique, contribuant à une meilleure fonction endothéliale [300]. Le RSV prévient également le découplage de la eNOS [301] notamment via une augmentation du cofacteur BH4 [286].

Par ailleurs, le RSV est un activateur connu de SIRT1. En effet, il a été montré que l'expression de SIRT1 était augmentée par le RSV dans des cœurs de rats diabétiques (STZ) et dans des cœurs soumis à une ischémie-reperfusion [302]. Dans un modèle de souris obèses et diabétiques, le RSV a également montré une amélioration de la fonction endothéliale par des mécanismes impliquant SIRT1 et PPAR $\delta$  [303].

## **3- Effets du Resvératrol sur la mitochondrie**

Le RSV est capable d'agir aussi sur la mitochondrie et le métabolisme énergétique des cellules. Dans la cardiomyopathie diabétique, des travaux ont montré une altération du métabolisme énergétique chez des patients diabétiques de type 2 avec une diminution du ratio PCr/ATP [130]. Le RSV a montré des effets positifs sur la fonction mitochondriale en augmentant le contenu en ATP, l'ADN mitochondrial, la biogenèse mitochondriale via une surexpression de

PGC1 $\alpha$  [304] et en diminuant l'ouverture du pore de transition mitochondrial [305]. De plus le RSV est capable de restaurer l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale et de diminuer le taux de MDA dans des cardiomyocytes isolés [304]. Comme mentionné précédemment, le RSV peut aussi moduler la balance redox en augmentant les défenses antioxydantes et en diminuant la production mitochondriale d'EROs. Desquirit-Dumas et coll. ont également montré que le RSV pouvait moduler le ratio NAD<sup>+</sup>/NADH conduisant à une augmentation de l'activité du complexe I mitochondrial dans un modèle de cellules hépatiques. Une augmentation de NAD<sup>+</sup> a été rapportée dans cette étude comme activatrice de la sirtuine mitochondriale SIRT3 [306]. De manière intéressante, le RSV favoriserait la fonction vasculaire en augmentant la biogénèse mitochondriale des cellules endothéliales des artères coronaires (CAECs) [262]. Dans une étude *in vitro* sur des cellules endothéliales eNOS<sup>-/-</sup>, le RSV n'est plus capable d'augmenter l'ADN mitochondrial et PGC1 $\alpha$ , démontrant le rôle important de la production du NO dans l'expression de ces protéines et dans la biogénèse mitochondriale [307].

#### 4- Effet du Resvératrol sur les œstrogènes

Très peu d'études explorent les effets du RSV dans le sexe féminin. Pourtant, les récepteurs aux œstrogènes constituent une autre cible importante du RSV. Il a notamment été montré que le RSV pouvait avoir un effet identique aux œstrogènes en activant leurs récepteurs spécifiques [308]. Récemment, une étude a montré une amélioration des paramètres physiologiques par le RSV chez des femelles ovariectomisées [309]. Dans le cadre du diabète de type 2, une supplémentation en RSV comme acteur direct sur les récepteurs aux œstrogènes semble intéressante à étudier. En effet, les œstrogènes jouent un rôle dans la fonction endothéliale, notamment en améliorant la vasorelaxation des vaisseaux [310]. Dans un modèle de rats hypertendus, Mizutani et coll. montrent que le RSV améliore la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium en réponse à l'acétylcholine chez des femelles ovariectomisées [311]. Des études sur des modèles murins montrent par ailleurs que l'ovariectomie de femelles peut conduire à une dégradation du statut métabolique et de la fonction cardiovasculaire [312]. Ainsi, le RSV semble être une approche thérapeutique intéressante dans le cadre des complications CV du diabète de type 2 dans le sexe féminin. En 2016, Meng et coll. montrent que le RSV est capable d'améliorer la fonction contractile cardiaque chez des souris femelles ovariectomisées et ayant subi une ligature permanente d'une artère coronaire [261]. Le RSV a



ainsi diminué les lésions infligées aux cardiomyocytes en diminuant la taille d'infarctus et les taux plasmatiques de CK et LDH [261].

## **VII- Conclusion**

Le RSV semble une approche thérapeutique intéressante dans le cadre des complications cardiovasculaires du diabète de type 2 et particulièrement dans le sexe féminin. Son action sur les fonctions endothéliale et mitochondriale dans l'organisme et notamment dans le cœur pourrait permettre une cardioprotection contre une séquence d'ischémie-reperfusion chez des femelles diabétiques de type 2. Cette problématique a fait l'objet de la deuxième étude de ma thèse. Nous avons évalué les effets d'une faible dose de RSV (1 mg/kg/jour) sur la sensibilité myocardique aux lésions d'ischémie-reperfusion chez des femelles Goto-Kakizaki diabétiques de type 2, avec pour hypothèse que le RSV pourrait induire une cardioprotection par l'amélioration du métabolisme énergétique et de la fonction endothéliale.

## **Partie 4 : Résonance Magnétique Nucléaire et Applications à l'étude des complications cardiovasculaires du diabète de type 2**

Au cours ma thèse nous avons utilisé la résonance magnétique nucléaire (RMN), qui est un outil permettant d'étudier de manière non invasive l'ensemble de l'organisme dont le cœur. La RMN a été découverte en 1946 par deux équipes américaines, l'une à Stanford [313] et l'autre à Harvard [314]. Le caractère multimodal de la RMN permet une évaluation relativement complète du cœur. Ainsi dans mon travail de thèse, nous avons déterminé *in vivo* la morphologie, la fonction, la perfusion et le contenu en TG du myocarde, ainsi que le contenu en TG dans le foie et la quantité de tissu adipeux sous-cutané et viscéral, grâce à l'imagerie et la spectroscopie de résonance magnétique du proton. Nous avons également étudié le métabolisme énergétique du cœur lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion, grâce à la spectroscopie de résonance magnétique du phosphore-31 *ex vivo*.

Nous allons maintenant aborder les principes de la technique de RMN puis les applications des techniques d'imagerie et de spectroscopie de résonance magnétique à l'étude des complications cardiovasculaires du diabète de type 2.

### **I- Principe de la RMN**

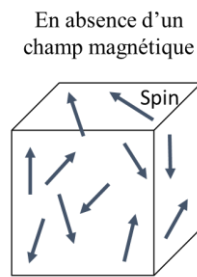
La résonance magnétique nucléaire, ou RMN, est basée sur les propriétés magnétiques de la matière et permet de détecter les noyaux des atomes de moment cinétique non nul. Le noyau d'un atome est chargé positivement et est animé d'un mouvement de rotation sur lui-même. Le mouvement circulaire de ces charges induit alors un petit champ magnétique appelé « spin » ou « moment magnétique nucléaire  $\mu$  » (Figure 13).



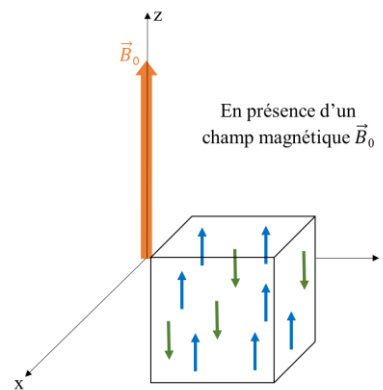
**Figure 13** Schéma d'un spin

## **A- L'aimantation**

En absence d'un champ magnétique externe, l'ensemble des moments magnétiques d'un échantillon sont orientés de manière totalement aléatoire. À un instant  $t$ , pour tout moment magnétique, on peut trouver un autre moment magnétique ayant la même orientation mais un sens opposé. Ainsi, la résultante magnétique globale  $\vec{M}_0$  pour l'ensemble de l'échantillon est nulle (Figure 14). En présence d'un champ magnétique externe appelé  $\vec{B}_0$ , les moments magnétiques vont s'orienter dans l'axe du champ (Figure 15). Pour un proton (le noyau de l'atome d'hydrogène) ou pour un atome de phosphore, le moment magnétique ne peut prendre que deux orientations possibles : soit dans le même sens que le champ magnétique, c'est-à-dire parallèle (en bleu) ; soit dans le sens contraire, c'est-à-dire antiparallèle (en vert).



**Figure 14** Orientation des spins en absence de champ magnétique externe.

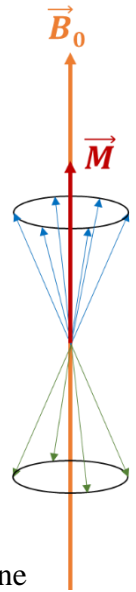


**Figure 15** Orientation des spins en présence d'un champ magnétique externe. Le référentiel utilisé est constitué de 3 axes  $x$ ,  $y$  et  $z$ , orthogonaux et fixes. Par convention l'axe  $z$  est parallèle à  $\vec{B}_0$ .

## **B- La polarisation**

L'équilibre qui résulte de l'application du champ  $\vec{B}_0$  conduit à un nombre de protons parallèles supérieur au nombre de protons antiparallèles. C'est cette différence de population entre les deux niveaux qui rend possible l'expérience de RMN. Ce sont les protons parallèles en excès

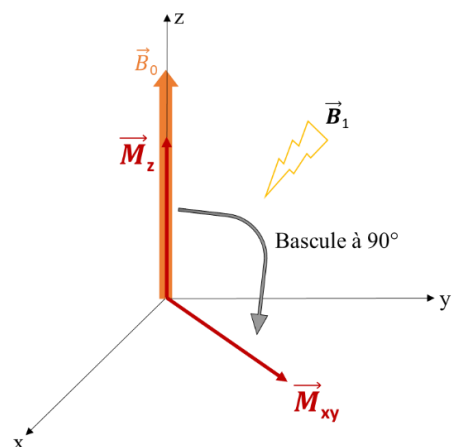
qui donnent le signal de RMN et plus le champ magnétique est élevé plus ce nombre est élevé. Le nombre de noyaux parallèles étant légèrement supérieur à celui des noyaux antiparallèles, la somme vectorielle de tous les moments magnétiques nucléaires est alors non nulle et dirigée dans la direction du champ  $\vec{B}_0$ . Cette somme est appelée aimantation nucléaire,  $\vec{M}$  (Figure 16). C'est cette aimantation qui est mesurée en RMN car elle est directement proportionnelle au nombre de noyaux présents dans l'échantillon. Cependant, dans cet état il est impossible de différencier l'aimantation  $\vec{M}$  du champ  $\vec{B}_0$  puisqu'ils ont la même direction et le même sens. L'idée est donc de perturber l'aimantation et d'observer son retour à l'équilibre.



**Figure 16** Représentation schématique des spins avec la même origine

### C- La résonance

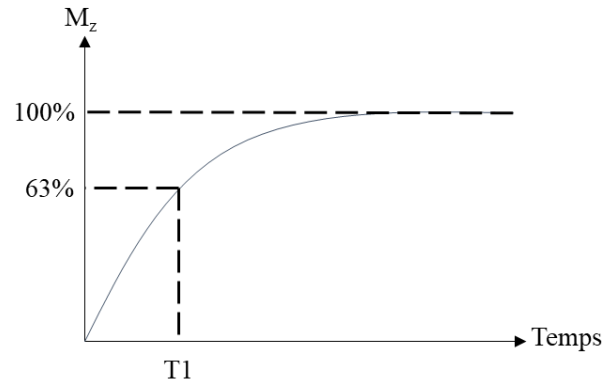
Lorsqu'un moment magnétique est plongé dans un champ magnétique intense tel que  $B_0$ , il est animé d'un mouvement de précession autour du champ  $\vec{B}_0$  à la manière d'une toupie. Cependant,  $\vec{M}$  n'est pas mesurable lorsqu'elle est parallèle à  $\vec{B}_0$ , il faut donc la basculer à  $90^\circ$  dans le plan transversal (xOy). Pour cela, un second champ magnétique  $\vec{B}_1$  dirigé à  $90^\circ$  de  $\vec{B}_0$ , est appliqué transitoirement. La phase de résonance se traduit par l'apparition d'une aimantation transversale et la diminution de l'aimantation longitudinale (Figure 17). Dès que la rotation de  $90^\circ$  est obtenue, le champ  $\vec{B}_1$  est coupé et les moments magnétiques reprennent une polarisation et une précession uniquement gouvernée par  $\vec{B}_0$ .



**Figure 17** Bascule de l'aimantation dans le plan transversal après application d'un champ magnétique  $\vec{B}_1$ .

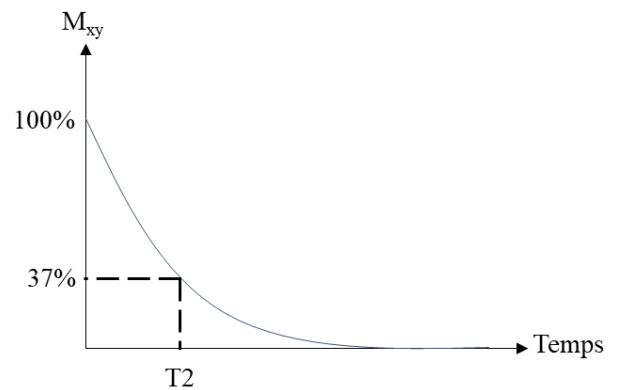
## **D- La relaxation**

Après avoir été basculé dans le plan transversal (x, y), l'aimantation ( $\vec{M}_{xy}$ ) va progressivement retourner à sa position d'équilibre, parallèle à  $\vec{B}_0$ , conduisant au phénomène de relaxation. On observera alors une décroissance de l'aimantation transversale et une repousse longitudinale. Le retour de l'aimantation longitudinale  $\vec{M}_z$  vers sa valeur d'équilibre  $\vec{M}_0$  se produit selon un processus exponentiel (Figure 18). Le temps caractéristique de la croissance de l'aimantation longitudinale est appelé temps de relaxation longitudinal T1. Il correspond au temps au bout duquel on a récupéré 63% de l'aimantation maximale. C'est la relaxation longitudinale qui induit un échange d'énergie, que l'on capte lors de l'expérience de RMN. On l'appelle la relaxation spin-réseau.



**Figure 18** Relaxation longitudinale

De son côté, l'aimantation transversale décroît de façon exponentielle (Figure 19). Le temps caractéristique de la décroissance de l'aimantation transversale est appelé temps de relaxation transversal T2. Il correspond au temps nécessaire pour qu'il reste 37% de l'aimantation transversale maximale. Dans ce cas il n'y a pas d'échange d'énergie, c'est une relaxation spin-spin.



L'environnement (c'est-à-dire les champs magnétiques locaux) fait que les spins tournent à des vitesses très légèrement différentes. Ainsi on observe un déphasage progressif des spins, dont les moments magnétiques s'annulent entre eux, entraînant la perte de la composante transversale.

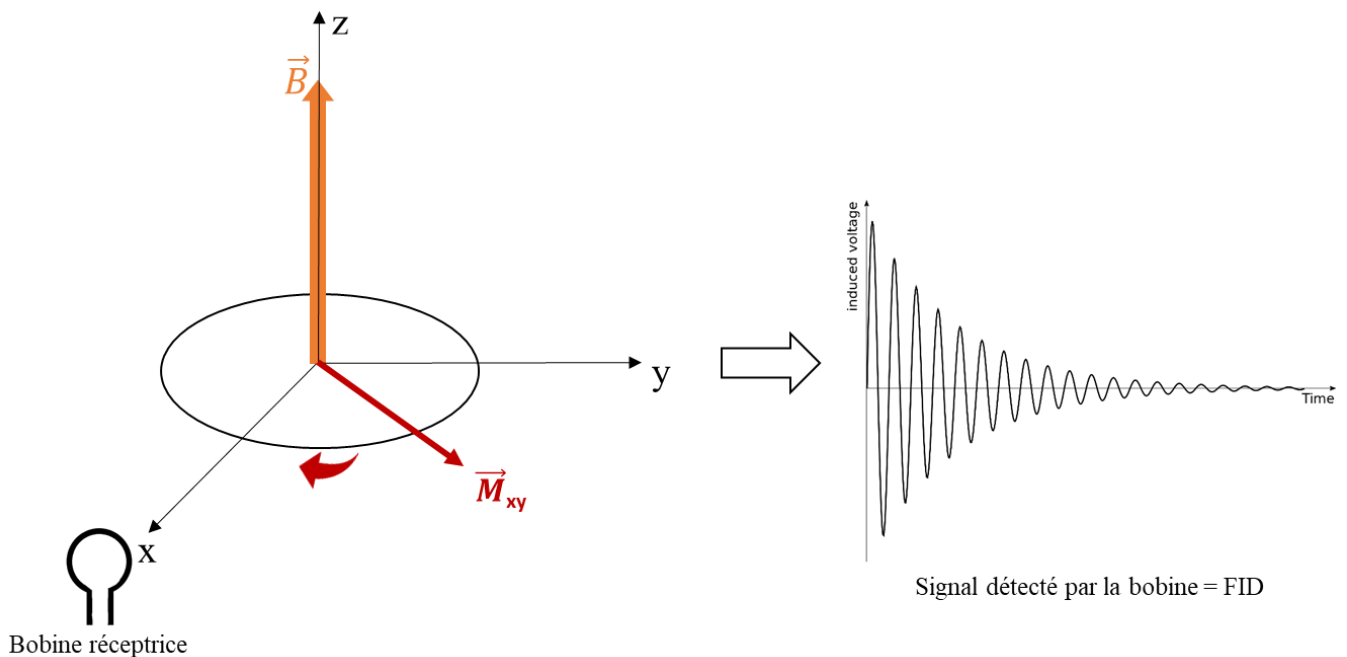
**Figure 19** Relaxation transversale

## E- L'expérience de RMN

L'expérience de RMN peut être décomposée ainsi :

- D'une part, une période d'excitation, constituée d'une impulsion RF dont l'amplitude et la durée sont calibrées de manière à produire une bascule de l'aimantation dans le plan transverse.
- D'autre part, une période de détection du signal. Après avoir été basculée à  $90^\circ$  de  $\vec{B}_0$ , l'aimantation tourne autour de celui-ci (car  $\vec{B}_0$  est toujours présent) et son amplitude décroît progressivement du fait de la relaxation transversale.

En considérant la composante suivant l'axe x de l'aimantation transversale, cette composante varie sinusoidalement en raison de la rotation de  $\vec{M}$ , et son amplitude diminue exponentiellement en raison de la relaxation. Afin de mesurer la valeur de  $\vec{M}$  il suffit de placer perpendiculairement à l'axe x une bobine conductrice (Figure 20). Cette bobine va capter une sinusoïde amortie. La rotation de  $\vec{M}$  fait donc naître dans la bobine un signal électrique de fréquence  $\nu_0$  et dont l'amplitude initiale est proportionnelle à l'aimantation et donc au nombre de noyaux. On appelle ce signal, le signal de précession libre ou FID pour « free induction decay ».



**Figure 20** Création d'un signal de précession libre (FID)

## **II- Les applications de l'IRM et la SRM à l'étude des complications cardiovasculaires du diabète de type 2**

### **A-Imagerie et exploration des complications cardiovasculaires associées au diabète**

Comme précédemment décrit dans la partie 1, le diabète de type 2 augmente fortement le risque de complications cardiovasculaires. Les maladies métaboliques s'accompagnent d'une cardiomyopathie en l'absence de maladie des artères coronaires à laquelle s'ajoute l'augmentation du risque de maladie obstructive des artères coronaires. La détection précoce de la cardiomyopathie diabétique est un enjeu important pour l'imagerie. Par ailleurs, le risque d'ischémie myocardique reste l'un des objectifs les plus critiques en médecine cardiovasculaire. Identifier la présence, la sévérité et les conséquences d'une ischémie restent une priorité pour la prévention et le suivi chez les patients diabétiques de type 2, dont le risque d'infarctus du myocarde est deux à trois fois plus élevé chez les hommes et cinq fois plus élevé chez les femmes [32]. Dans le diabète de type 2, il est donc nécessaire de pouvoir réaliser un suivi cardiaque non invasif. Plusieurs techniques sont disponibles en pratique clinique avec pour objectif la compréhension de l'histoire naturelle de la maladie, la détection précoce de marqueurs pronostiques et la stratification du risque CV.

L'échographie est la technique de première intention utilisée afin d'évaluer les patients présentant des signes de complications CV. Cependant la résolution de l'échographie n'est pas toujours suffisante, notamment dans la population diabétique où la prévalence du surpoids et de l'obésité peut atteindre 90%. Ainsi, l'échographie peut omettre de petits infarctus qui ne causent pas d'anomalies significatives du mouvement des parois [315]. L'échographie a montré son intérêt dans la détection d'atteintes précoces de la fonction régionale dans le diabète de type 2 [316]. La tomographie par émission de positons (TEP) est fréquemment utilisée pour évaluer l'ischémie myocardique, mais sa résolution spatiale ne permet pas toujours de révéler une diminution significative de la perfusion. Notamment la TEP et la tomographie par émission monophotonique (SPECT) ne permettent pas de détecter des ischémies sous-endocardiques [317]. Les infarctus du myocarde non reconnus présentent le même impact négatif que les infarctus du myocarde connus sur le pronostic CV des patients, malgré une taille de la zone infarctée moins importante [318]. Dans la cardiomyopathie diabétique, la TEP ou le SPECT

permettent d'accéder à des informations métaboliques ou fonctionnelles telles que la perfusion en utilisant des traceurs radioactifs.

L'IRM et la SRM présentent de multiples avantages par rapport aux techniques citées précédemment. En effet, elles présentent une meilleure résolution, ne nécessitent pas l'injection de molécule radioactives ou l'utilisation de rayonnements ionisants. De plus, elles permettent d'étudier différents noyaux et plus particulièrement le proton et le phosphore-31. L'évaluation du métabolisme énergétique ne peut notamment pas être évaluée de manière non invasive par d'autres techniques que la SRM du phosphore-31. Quantifier la fibrose de manière non invasive reste également un réel défi, notamment dans le cadre de la cardiomyopathie diabétique. En effet, le « gold standard » pour établir l'étendue de la fibrose est la biopsie. Bien que cette technique permette une quantification absolue de la fibrose, celle-ci reste très invasive, une fibrose localisée peut être non détectée et l'atteinte fibrotique de l'ensemble du ventricule gauche ne peut être déterminée [319]. L'utilisation de l'IRM est donc très intéressante dans ce contexte.

## **B- Paramètres étudiés par IRM et SRM**

La résonance magnétique cardiaque représente une approche multimodale ayant une haute résolution spatiale et temporelle. Les développements méthodologiques de la résonance magnétique nucléaire permettent aujourd'hui une évaluation de la fonction et de la morphologie cardiaques ainsi que de la perfusion, des œdèmes, du métabolisme et de la fibrose myocardique (Figure 21) [317]. Son intérêt dans l'étude des maladies CV liées au diabète de type 2 est donc évident et grandissant.



CMR techniques and their applications for myocardial assessment in patients with diabetes

Pulse Sequence	Physiology/Myocardial Characteristics being assessed	Clinical or investigational	Relevance for Cardiac Disease in Diabetes
Steady-state free precession (SSFP)	Myocardial thickness, volume, and function	Clinical	Severity of ventricular dysfunction; left ventricular hypertrophy
Late Gadolinium Enhancement	Infarcted myocardium, scar, fibrosis, or infiltration	Clinical	Unrecognized myocardial infarction; myocardial fibrosis; other co-existing infiltrative cardiomyopathy
Stress Perfusion	First-pass perfusion defects	Clinical	Burden of myocardial ischemia from coronary artery disease
Tagging	Wall motion abnormalities, diastolic dysfunction, and strain	Investigational	Severity of diastolic dysfunction
Spectroscopy	<sup>1</sup> H: myocardial lipid content <sup>31</sup> P: myocardial energetics	Investigational	Severity of myocardial triglyceride deposition; abnormal profiles of cardiac energetics
T1-mapping	Expansion of extracellular volume, "diffuse fibrosis"	Clinical	Severity of myocardial fibrosis

**Figure 21** Techniques d'IRM cardiaque permettant une évaluation myocardique. Adapté de Shah et coll. [317]

### 1- Les pathologies ischémiques

Dans le cadre de la cardiopathie ischémique, la résonance magnétique cardiovasculaire permet la détection des maladies des artères coronaires et l'évaluation de la viabilité myocardique dans le cadre d'une revascularisation [320]. Plusieurs approches sont possibles pour la détection des maladies des artères coronaires : l'angiographie par résonance magnétique pour détecter des anomalies et la sténose des vaisseaux ; ou l'IRM de perfusion avec un stress induit par de la dobutamine ou de l'adénosine pour déterminer la réserve de perfusion. Dans le cadre d'un évènement ischémique, l'IRM avec mesure du rehaussement tardif suite à une injection de gadolinium est également utile pour déterminer l'étendue de la zone d'infarctus [317]. D'autre part, l'IRM de perfusion permet d'accéder à des altérations diffuses de la perfusion tissulaire associées à une dysfonction endothéliale précoce.

Haffner et coll. ont décrit une augmentation de l'incidence et de la mortalité par maladie des artères coronaires chez des patients diabétiques de type 2 n'ayant pas d'antécédents d'infarctus du myocarde [321]. Les auteurs suggèrent alors que les techniques actuelles sous-estiment les patients diabétiques de type 2 à risque et que l'IRM est intéressante dans ce contexte. En effet, la perfusion myocardique et plus particulièrement la réserve de perfusion sont diminuées chez les patients diabétiques de type 2 [322]. Liu et coll. ont notamment détecté par IRM une dysfonction myocardique infraclinique, associée à une altération de la perfusion

microvasculaire du myocarde dès les stades précoces du diabète de type 2 [322]. Des altérations précoces de la perfusion myocardique sous stress par adénosine ont également été rapportées chez des patients diabétiques de type 2, ne présentant pas de maladie obstructive des artères coronaires [323]. Iltis et coll. ont également montré une altération de la perfusion myocardique, chez des femelles GK âgées [324]. Une autre étude a montré par IRM une altération de la perfusion myocardique en absence de signe de défaillance cardiaque chez des rat hypertendus et diabétiques [325]. Les études utilisant la mesure du rehaussement tardif par le gadolinium, montrent que les patients avec une altération du métabolisme glucidique ou un diabète de type 2, présentent une zone d'infarctus plus importante que des patients non diabétiques [326].

La SRM du sodium présente également un fort intérêt pour l'identification d'un infarctus du myocarde sans ajout d'agent de contraste externe. La SRM du sodium permet une mesure du sodium intra- et extra-cellulaire et une augmentation de sodium intracellulaire a notamment été décrite dans le cadre d'une ischémie [327]. Dans ce contexte, une étude a par ailleurs montré que l'augmentation du sodium intracellulaire était plus importante dans le myocarde des souris db/db par rapport aux contrôles lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion. Dans cette étude, l'augmentation du sodium intracellulaire était associée à une dysfonction ventriculaire plus importante chez les souris db/db [328].

## **2- La cardiomyopathie diabétique**

Comme précédemment décrit dans la Partie 1, le diabète de type 2 altère la fonction et la morphologie cardiaque au cours du temps, avec un épaississement progressif du myocarde ainsi qu'une altération de la fonction cardiaque en diastole et en systole. Les critères de diagnostic de la cardiomyopathie diabétique reposent sur une dysfonction diastolique et/ou une diminution de la fraction d'éjection, ainsi qu'une hypertrophie ventriculaire gauche et une fibrose interstitielle [34, 174].

### **a- La morphologie et la fonction cardiaque**

Par la mesure de l'épaisseur de la paroi myocardique, de la masse du ventricule gauche et du volume des cavités myocardiques, l'IRM permet une évaluation précise de l'étendue de la cardiomyopathie chez des patients diabétiques. Dans l'étude de Framingham, Velagaleti et coll. ont établi une relation entre l'insulinorésistance/anomalies de la glycémie et la structure/fonction cardiaque grâce à une étude par résonance magnétique [329]. Dans cette

étude, l'insulinorésistance était associée à un remodelage concentrique du cœur par augmentation du ratio masse / volume du ventricule gauche en diastole [329]. Dans une autre étude, Heckbert et coll. ont également montré une augmentation de la masse du ventricule gauche ainsi qu'une diminution du volume systolique et de la fraction d'éjection chez des patients diabétiques [330]. Une autre étude par IRM de Widya et coll., a également montré que la cardiomyopathie diabétique affectait également le ventricule droit [331].

L'IRM est aussi utilisé chez l'animal pour l'étude des complications CV associées au diabète de type 2. Dans un modèle de singes diabétiques de type 2, Qian et coll. ont montré par IRM une modification morphologique du cœur avec une augmentation du diamètre interne du ventricule gauche, associée à une dysfonction systolique caractérisée par la diminution de la fraction d'éjection [332]. Sur un modèle de souris nourri avec un régime riche en graisse et en sucre, Abdesselam et coll. ont notamment réalisé un suivi longitudinal permettant d'observer l'évolution de la morphologie et de la fonction cardiaque *in vivo* [333]. Les auteurs ont montré une hypertrophie cardiaque, caractérisée par un épaissement de la paroi myocardique en diastole, et une dysfonction cardiaque caractérisée par une diminution de l'index cardiaque. Sur le rat GK, Iltis et coll. ont par ailleurs montré une altération de la fonction ventriculaire gauche chez des femelles âgées [324].

### **b- La fibrose myocardique**

Des biopsies myocardiques ont révélé une augmentation de la fibrose dans le myocarde de patients diabétiques de type 2 [334]. L'IRM cardiaque est un outil puissant pour détecter de manière précoce et non invasive la fibrose myocardique. Diverses séquences d'imagerie sont utilisées, telles que l'imagerie T1, T2 et le rehaussement tardif au gadolinium [319]. La présence de fibrose et la diminution de la perfusion au sein du myocarde peuvent également indiquer du tissu cicatriciel formé à la suite d'un épisode ischémique sévère [317]. La formation de fibrose dans le myocarde a été montrée chez les patients diabétiques de type 2 et dans des modèles animaux, par augmentation du temps de relaxation longitudinal T1 et par rehaussement tardif au gadolinium [319, 335, 336]. La cartographie T1, reflète notamment l'expansion de la matrice extracellulaire myocardique [337]. Chez des patients diabétiques de type 2 sans pathologie des artères coronaires, le temps de relaxation longitudinal T1 est diminué dans le myocarde et est associé à l'insulinorésistance [338]. Dans un modèle de souris rendues diabétiques par de la streptozotocine, Bun et coll. ont montré une augmentation de la fibrose

myocardique, évaluée par une diminution du temps de relaxation transversal T2 [336]. Ces mesures étaient corrélées avec l'évaluation de la fibrose par histologie.

### **c- Les dépôts ectopiques de graisse**

L'insulinorésistance et l'obésité dans le diabète de type 2 favorisent l'expansion du tissu adipeux viscéral et l'apparition de dépôts ectopiques de graisses dans les organes comme le foie et le cœur. Ces dépôts de graisses dans des sites inhabituels sont largement délétères et peuvent induire une défaillance fonctionnelle de l'organe [339]. Il existe des dépôts ectopiques autour du myocarde, constituant le tissu adipeux épicardique, et des dépôts intracellulaires de TG conduisant à la stéatose myocardique. Ces différents dépôts ont été observés chez des patients diabétiques de type 2 [340, 341]. Dans une étude IRM, Gaborit et coll. ont montré que l'accumulation de tissu adipeux épicardique était notamment associée à une diminution de la réponse vasculaire dépendante de l'endothélium chez des sujets sains, suggérant en lien entre le tissu adipeux épicardique et les altérations précoces de l'athérosclérose [342]. Chez des sujets obèses, Gaborit et coll. ont également montré que le volume de graisse épicardique est le meilleur marqueur de pathologie des artères coronaires chez des sujets obèses [343].

La stéatose myocardique est un facteur prédictif indépendant de la dysfonction myocardique chez les patients diabétiques de type 2 [48]. La spectroscopie par résonance magnétique du proton permet une évaluation à l'échelle moléculaire, de la composition des tissus par la mesure du contenu en lipides du cœur [344], mais aussi du foie [345] et du pancréas [346]. De manière intéressante, le contenu myocardique en TG est un facteur prédictif indépendant de l'altération du volume d'éjection systolique, suggérant un fort impact de la stéatose myocardique sur la fonction cardiaque [343]. D'autres études ont décrit l'impact délétère de la stéatose hépatique sur la fonction et le métabolisme cardiaque [347]. Rijzewijk et coll. ont montré par IRM et SRM que l'augmentation du contenu hépatique en TG était associé à une diminution de la perfusion myocardique et du métabolisme énergétique cardiaque chez des patients diabétiques de type 2 [347].

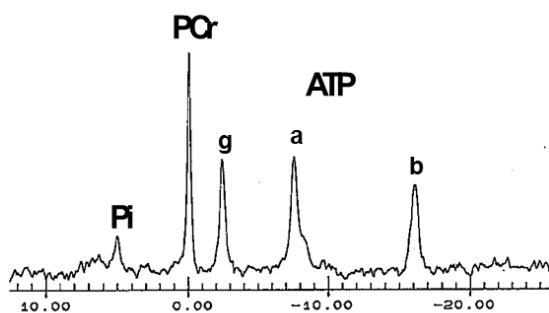
Dans une étude sur des souris nourries avec un régime riche en graisse et en sucre, l'IRM et la SRM ont permis de réaliser un suivi longitudinal mois par mois [333]. De manière intéressante, les auteurs ont montré une augmentation de la graisse viscérale et une stéatose hépatique dès le premier mois de régime, et une stéatose myocardique dès le deuxième mois de régime. Dès le troisième mois de régime, ces modifications étaient associées à une altération de la fonction

myocardique [333]. Quatorze jours de traitement avec de l'Exendin-4, un analogue du GLP-1 ont permis d'inverser ces altérations.

L'IRM et la SRM permettent également d'évaluer sur plusieurs mois ou années les effets d'un régime [348] ou d'une chirurgie bariatrique sur la modulation des différents dépôts de graisse [344, 349]. Dans ces deux études cliniques, les auteurs montrent que la modulation de la graisse cardiaque en réponse à une chirurgie bariatrique est plus tardive que pour la graisse viscérale ou pour d'autres stéatoses. En effet, six mois après chirurgie bariatrique, les patients présentent une diminution de la graisse épicaudique mais pas de la stéatose myocardique.

#### **d- Le métabolisme énergétique**

La SRM du phosphore-31 permet d'évaluer *in vivo* l'état énergétique du cœur par la mesure des composés riches en énergie. Les spectres de SRM du phosphore-31, permettent de distinguer l'ATP, la PCr, le Pi, les PME et de calculer le pH intracellulaire (Figure 22). *In vivo*, le ratio PCr/ATP est souvent utilisé pour décrire l'état énergétique du cœur [327]. Dans le cadre d'expérimentations *ex vivo* sur le modèle de cœur isolé perfusé, il est possible d'obtenir une quantification absolue des métabolites du cœur à l'aide de références externes calibrées [111]. La SRM du phosphore-31 permet également d'accéder à la mesure de cinétiques de réactions chimiques *in vivo*. En utilisant des méthodes spécifiques de transfert de saturation il est par exemple possible de mesurer la constante de vitesse de la réaction de synthèse d'ATP à partir de la PCr catalysée par la créatine kinase [350, 351].



**Figure 22** Spectre de SRM du phosphore-31

Dans le diabète de type 2, une altération du métabolisme énergétique a été montrée avec notamment une diminution du ratio PCr/ATP [130]. Levelt et coll. ont par ailleurs montré avec la SRM du phosphore-31, qu'une altération du métabolisme énergétique préexiste chez des patients atteints de cardiomyopathie diabétique, et qu'elle est exacerbée lors d'un stress par l'exercice physique. Le ratio PCr/ATP est également corrélé à la perfusion et à l'oxygénation

chez ces patients [133]. Dans une autre étude, il a été montré que le métabolisme énergétique au repos était normal chez les patients avec une sténose de l'artère coronaire descendante antérieure gauche en absence d'insuffisance cardiaque. Cependant, le ratio PCr/ATP était corrélé avec la gravité de l'insuffisance cardiaque [352].

Sur le modèle du cœur isolé perfusé de cochon, Brooks et coll. ont aussi établi un lien entre le ratio PCr/ATP et la fonction ventriculaire gauche [353]. Desrois et coll. ont montré une altération de la fonction cardiaque mais un métabolisme énergétique normal en absence d'insulte ischémique, caractérisé par des concentrations en ATP, PCr et un pHi identiques chez des mâles et des femelles GK par rapport aux contrôles [111]. Chez des mâles GK âgés, les auteurs ont également montré une forte sensibilité à un épisode d'ischémie-reperfusion malgré un métabolisme énergétique normal à la reperfusion [115].

### **III- Conclusion**

En conclusion, l'imagerie et la spectroscopie de résonance magnétique sont des outils permettant l'étude de nombreux paramètres impliqués dans les complications CV du diabète de type 2, tels que le remodelage et la dysfonction cardiaque, l'altération de la perfusion et du métabolisme énergétique ainsi que la stéatose myocardique. La diversité des mesures possibles en un seul examen présente un intérêt évident. Dans mon travail de thèse, le caractère non invasif de la RMN a permis de réaliser des suivis longitudinaux *in vivo* et *ex vivo* sur les mêmes animaux.

## **Matériels et Méthodes**

L'ensemble de ce travail a été réalisé au Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médical (CRMBM, CNRS UMR 7339), à l'exception des expériences de Western Blot de la première étude, qui ont été réalisées au Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire (LaPEC, EA 4278), en collaboration avec le Dr Cyril Reboul.

## **I- Modèles animaux**

Toutes les procédures impliquant des animaux ont été approuvées par le Comité d’Ethique en expérimentation animale de Marseille (n°2017070416019134) et sont en conformité avec la convention Européenne pour la protection des animaux de laboratoire (directive 2013/63/UE). Les animaux ont été hébergés dans des armoires ventilées avec une température contrôlée (22-24°C) et des cycles circadiens de 12 heures de jour/ 12 heures de nuit. Les animaux ont eu accès à la nourriture et à l’eau *ad libitum*.

### **A- Le rat soumis à un régime riche en graisse et en sucre (HFS)**

Le rat soumis à un régime riche en graisse et en sucre, appelé HFS ici, est un modèle de prédiabète et/ou de syndrome métabolique. Il permet de mimer un mode de vie sédentaire et une alimentation déséquilibrée, riche en graisse et en sucre. Afin d’obtenir ce modèle, nous avons nourri pendant cinq mois des rats mâles et femelles Wistar de sept semaines (Charles River, France) avec une alimentation obésogène et diabétogène, enrichie en graisse et en sucre (SAFE, U8978 v19 ; 19,4% de protéines, 35,8% de graisse et 32,1% de sucre ; composition détaillée Tableau 2). Les rats contrôles sont également des rats mâles et femelles Wistar nourris avec une alimentation standard (SAFE, A04C-10).

Caséine	22,8%
DL méthionine	0,2%
Maltodextrine	17,15%
Sucrose	16,633%
Beurre anhydre	33,35%
Huile de soja	2,5%
Minéral AIN 93G-mx	4,55%
Bicarbonate de sodium	1,05%
Citrate de potassium	0,4%
Vitamine AIN 93-vx	1,3%
Choline bitartrate	0,2%
Anti oxydant	0,002%

**Tableau 2:** Composition détaillée du régime U8978 v19 (SAFE)



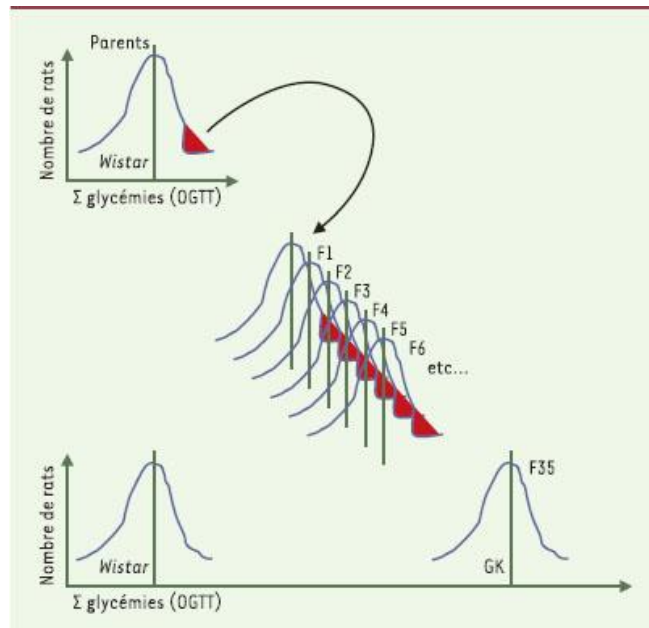
Dans la littérature, la diversité ainsi que la durée des régimes utilisés compliquent la comparaison des résultats [354]. Dans une revue de 2011, Panchal et coll. suggèrent l'utilisation d'un régime combinant à la fois une teneur élevée en graisse mais également en sucre [355]. Nous avons choisi le régime U8978 car celui-ci avait été précédemment utilisé au laboratoire sur des souris C57Bl6 et avait induit un diabète de type 2 [333]. Nous avons débuté le régime à sept semaines car il s'agit de l'âge moyen des animaux utilisés dans la littérature. Enfin, nous avons choisi un régime d'une durée de vingt semaines car des altérations cardiaques ont été observées à partir de seize semaines de régime [356-360].

## **B- Le rat Goto-Kakizaki (GK)**

Le second modèle animal utilisé est le rat GK, modèle spontané de diabète de type 2 sans obésité associée. Le rat GK est donc complémentaire au rat HFS et permet de s'affranchir du paramètre « obésité » dans l'étude des mécanismes liés aux complications CV du diabète de type 2. La lignée GK a été créée au Japon par les chercheurs Goto et Kakizaki à partir de rats Wistar normoglycémiques [361]. Des croisements consanguins répétés (sur plus de trente générations) de rats Wistar ayant une tolérance glucidique infranormale, ont permis d'obtenir des animaux avec une hyperglycémie à jeun modérée et stable dès trois à quatre semaines de vie (Figure 23) [362, 363]. L'hyperglycémie s'accompagne alors d'une hyperproduction hépatique de glucose, d'une insulino-résistance périphérique et d'un déficit de l'insulinosécrétion chez les animaux adultes [364].

Le rat GK fait partie des modèles polygéniques de diabète de type 2 où des altérations du métabolisme de l'insuline et du glucose sont causés par au moins six loci indépendants [365]. Il est très important de souligner que dans ce modèle, contrairement à beaucoup de modèles animaux de diabète de type 2, les mâles et les femelles sont affectés [193].

Au cours de ma thèse, les expériences ont été réalisées sur des rats GK de la sous-lignée GK/Par (Univ Paris-Diderot, Laboratoire de Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine, B2PE Unité BFA des Professeurs J. Movassat et B. Portha) qui sont des descendants de la génération F35 de la lignée originelle japonaise.



**Figure 23** Schéma représentant la façon dont la lignée GK a été créée. D'après Portha [366].  
OGTT : oral glucose tolerance test.

## **II- Expérimentations *in vivo***

### **A- Etude par Imagerie et Spectroscopie de Résonance magnétique**

L'ensemble des techniques d'IRM et de SRM sur le petit animal ont été mises au point au laboratoire [367, 368].

Les explorations IRM/SRM sont effectuées afin d'évaluer la morphologie, la fonction et la perfusion myocardique. Le contenu en triglycérides (TG) du cœur et du foie, et la quantité de tissu adipeux sous-cutané (TASC) et viscéral (TAV) dans l'ensemble du corps sont également mesurés.

#### **1- Préparation**

Avant les expériences, les rats sont sédatisés dans une chambre d'induction par inhalation d'isoflurane à 3,5%. Afin d'obtenir une respiration régulière d'environ 70 respirations / min pendant les examens IRM/SRM, l'anesthésie est maintenue via un masque délivrant 1,5-2,5% d'isoflurane dans un flux d'oxygène pur à un débit de 1 L/min. L'excès de gaz anesthésiant est aspiré en continu au moyen d'une pompe d'extraction. La respiration est surveillée grâce à un

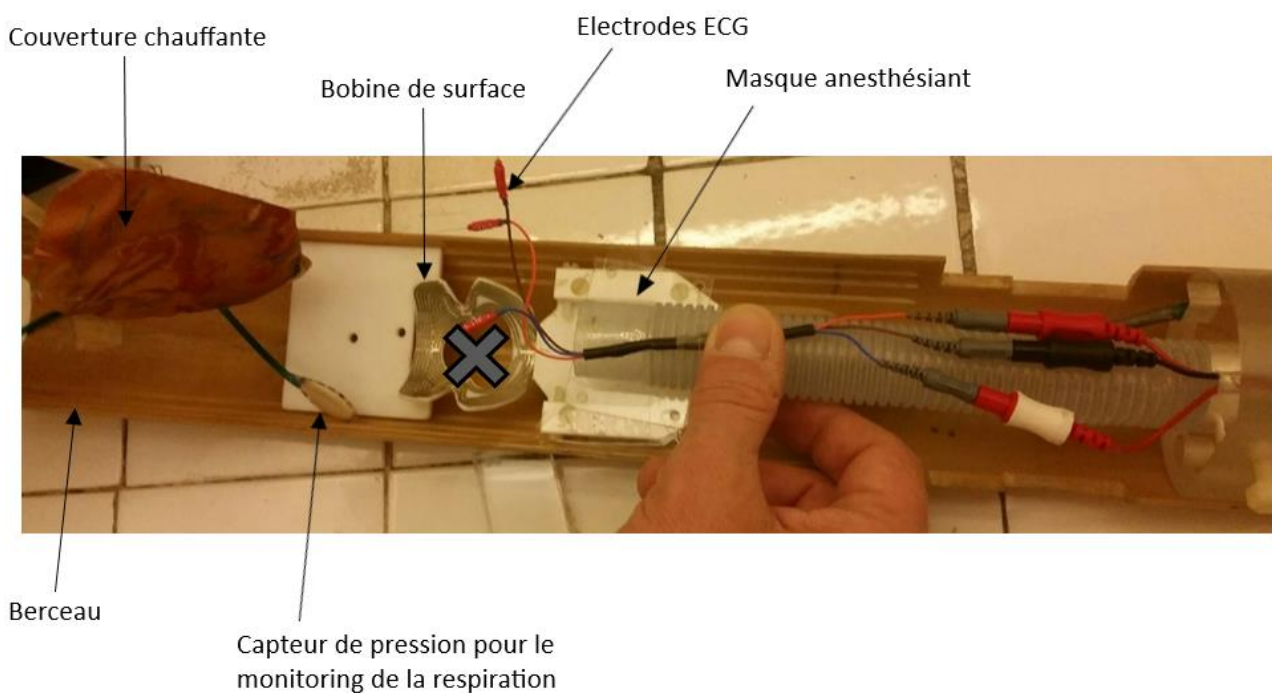
capteur de pression relié à un ballonnet rempli d'air, placé sous l'abdomen de l'animal. La température corporelle est maintenue à 37°C avec une couverture chauffante placée sur le dos de l'animal. L'électrocardiogramme (ECG) est mesuré via deux électrodes sous-cutanées placées sur les membres supérieurs des rats. Les électrodes sont connectées à une unité de déclenchement ECG afin d'estimer la fréquence cardiaque et d'initier les séquences IMR/SRM. Enfin, un gel ophtalmique est placé sur les yeux des animaux afin de prévenir le dessèchement de la cornée.

Toutes les acquisitions sont réalisées à l'aide d'un système de résonance magnétique Biospec Avance (Bruker, Ettlingen, Germany), équipé d'un aimant supraconducteur horizontal opérant à 4,7T et d'un résonateur proton volumique (diamètre 60 mm ; longueur homogène 80 mm) (Figure 24).



**Figure 24** Aimant Biospec 4,7T utilisé lors des examens cardiaques.

Les animaux sont placés en décubitus ventral sur une bobine de surface découplée (30 mm de diamètre, Rapid Biomedical, Rimpar, Allemagne). La région cardiaque est placée à l'iso-centre de la bobine (Figure 25) pour la mesure de la morphologie, la fonction, la perfusion myocardique et le contenu en TG du cœur et du foie. L'antenne volumique est utilisée pour la transmission et la bobine de surface est utilisée pour la réception radiofréquence. Pour l'évaluation de la quantité de tissu adipeux sous-cutané et viscéral, l'antenne volumique proton est utilisée à la fois pour la transmission et pour la réception radiofréquence.



**Figure 25** Berceau accueillant le rat pour l'examen IRM/SRM. L'animal est placé dans le berceau de manière à avoir la région cardiaque à l'iso-centre de la bobine (symbolisé par la croix grise).

## **2- Paramètres mesurés**

### **a- Morphologie et fonction cardiaque**

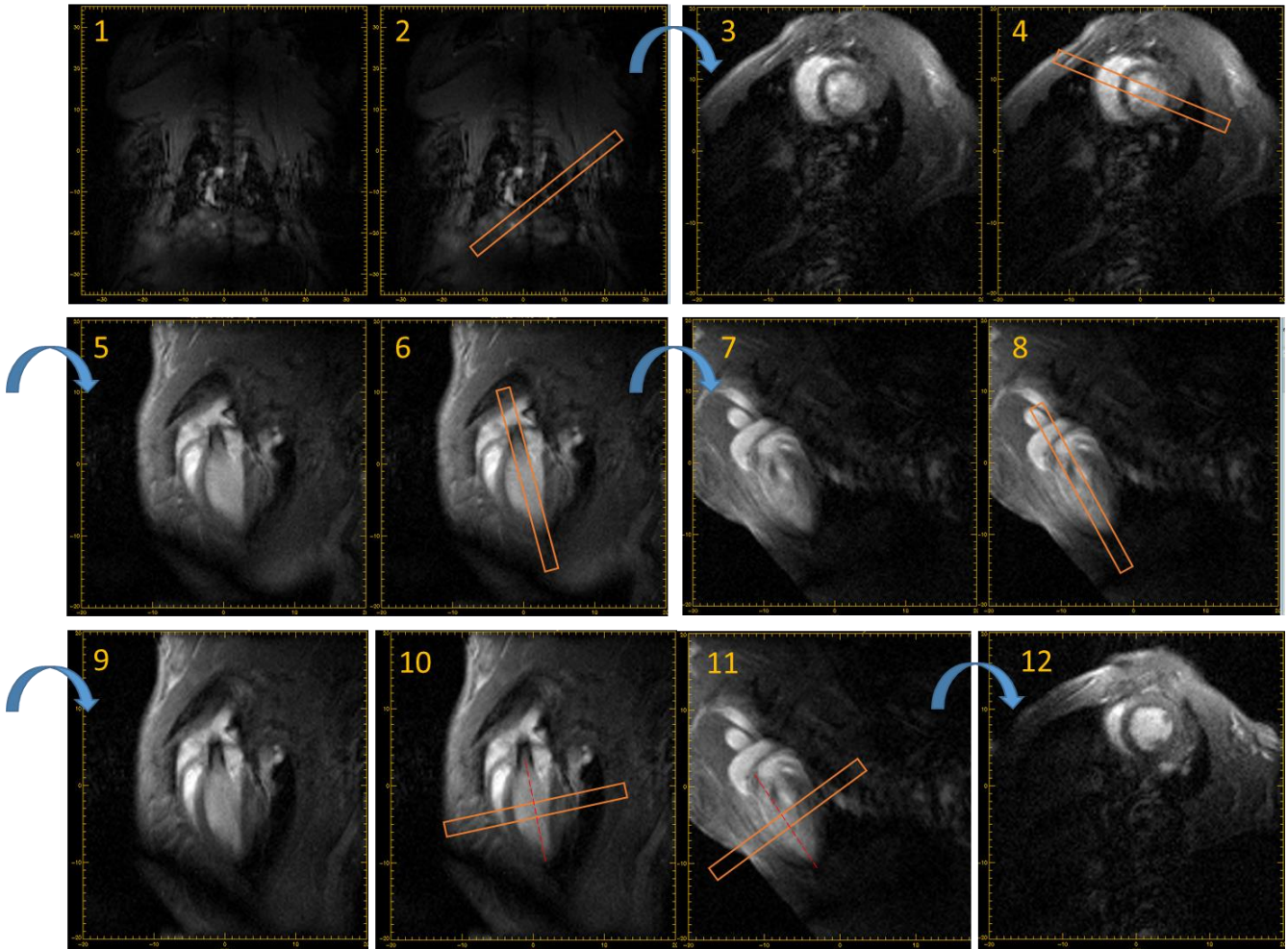
L'évaluation de la morphologie, la masse et la fonction myocardique est réalisée à l'aide d'une séquence IRM écho de gradient « cine-FLASH », synchronisée avec l'ECG. Des coupes strictement perpendiculaires dans l'orientation long axe (2 chambres et 4 chambres) et petit axe

au milieu du ventricule sont acquises. Les paramètres IRM suivants sont utilisés : Field of view (FOV) = 4 x 4 cm<sup>2</sup> ; épaisseur de la coupe = 2 mm ; taille de la matrice = 128 x 128 ; Nombre d'accumulation (NA) = 1 ; temps de répétition (TR) = 5,1 ms ; temps d'écho (TE) = 1,6 ms ; 45 phases par déclenchement cardiaque.

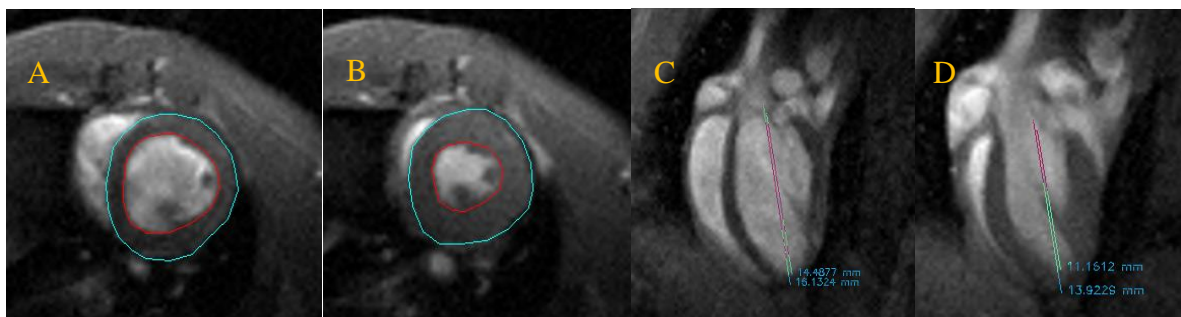
Afin d'obtenir ces coupes nous réalisons une série d'acquisitions (Figure 26). Premièrement, une acquisition coronale de l'animal à basse résolution est faite afin de déterminer rapidement la position du cœur (1). Puis une coupe transversale du cœur est réalisée (2-3). Cependant cette coupe ne peut être utilisée pour les mesures de volumes car elle n'est pas assez précise et strictement perpendiculaire à l'axe « chambre de chasse de l'aorte-apex ». A partir de cette image, une nouvelle coupe est placée, passant entre les piliers et par l'apex du cœur, afin d'obtenir une coupe « 4 chambres » (4-5). De la même manière cette coupe ne peut être utilisée pour les mesures. Ainsi une nouvelle coupe est placée de manière à passer par l'apex du cœur et par la chambre de chasse de l'aorte, pour obtenir une vue « 2 chambres » du cœur (6-7). A nouveau, une coupe est positionnée dans l'axe apex-chambre de chasse de l'aorte afin d'obtenir une image « 4 chambres » qui est utilisée pour les mesures (8-9). Enfin, une dernière coupe est placée perpendiculairement au ventricule gauche sur les images « 4 chambres » (10) et « 2 chambres » (11) pour obtenir une vue petit axe du cœur utilisable pour les mesures (12).

Le post-traitement des images est réalisé en utilisant un programme développé au laboratoire fonctionnant dans un environnement IDL (Interactive Data Language, ITT Visual Solutions, Boulder, CO, USA). Les volumes ventriculaires gauches sont déterminés en utilisant un modèle ellipsoïde [369].

Les zones endocardiques et épicaudiques sont délimitées manuellement sur les images petit axe, avec des longueurs ventriculaires déterminées à partir de vues long axe à quatre chambres, respectivement en diastole et en systole (Figure 27). Le volume télédiastolique (EDV), le volume télésystolique (ESV), le volume systolique (SV), la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG), l'épaisseur moyenne de la paroi en diastole (Wtdia) et systole (Wtsys) et l'épaississement de la paroi lors de la systole (sWtn) sont calculées à partir des mesures de volume. Le débit cardiaque (CO) et l'indice cardiaque (CI) sont calculés de la façon suivante :  $CO = \text{rythme cardiaque (HR)} \times SV$  ;  $CI = CO / \text{poids corporel}$ .



**Figure 26** Acquisitions IRM permettant l'obtention d'images du cœur en coupe « petit axe » et « 4 chambres ».

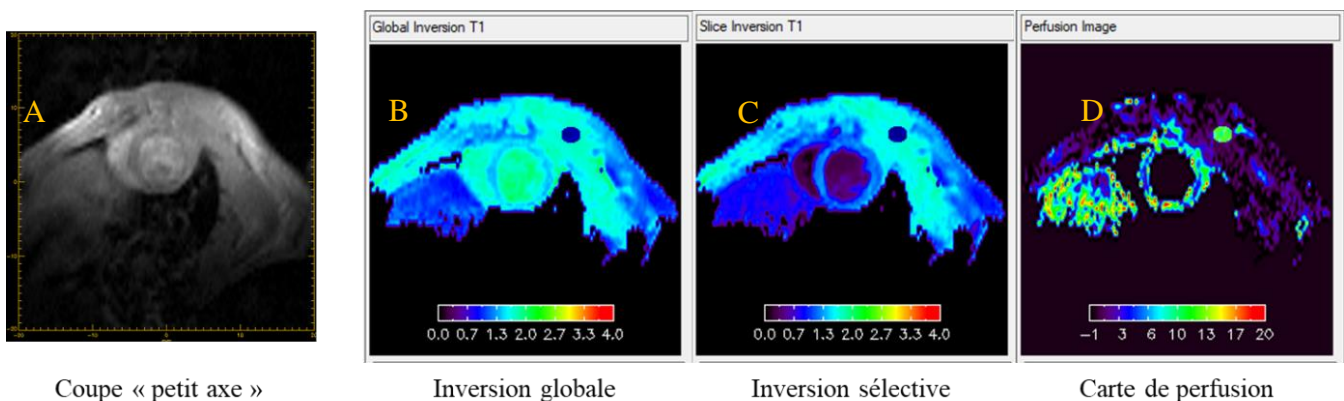


**Figure 27** Images utilisées pour les mesures des zones endocardiques (contours rouges) et épiscopardiques (contour en bleu) lors de la diastole (A) et la systole (B) ; et la mesure des longueurs ventriculaires en diastole (C) et systole (D).

## b- Perfusion myocardique

La perfusion myocardique *in vivo* est quantifiée en utilisant la technique de marquage des spins artériels ASL-FAIR (Arterial Spin Labelling-Flow sensitive Alternating Inversion Recovery). Cette technique de résonance magnétique cardiovasculaire est utilisée pour quantifier le flux sanguin tissulaire de manière non invasive sans utiliser de produit de contraste. Des impulsions radiofréquence sont utilisées pour réaliser des inversion-récupération de l'aimantation. Une première inversion globale, non sélective est effectuée sur l'ensemble du tissu cardiaque. Une seconde inversion sélective de la coupe d'intérêt, c'est-à-dire la coupe transversale « petit axe », précédemment acquise, est ensuite réalisée. La courbe de récupération de l'aimantation longitudinale est différente et permet d'en déduire un signal. La soustraction des deux acquisitions donne une intensité de signal proportionnelle à la perfusion myocardique.

Les paramètres IRM suivants sont utilisés : FOV = 4 x 4 cm<sup>2</sup> ; épaisseur de coupe = 3 mm ; taille de la matrice = 128 x 64 ; NA = 1 ; TR = 80 ms ; TE = 1,6 ms ; train de 50 échos de gradient. L'analyse de l'image est réalisée en utilisant un programme conçu au laboratoire, fonctionnant sous IDL (Figure 28) qui génère des cartes de flux sanguin myocardique absolu (MBF). Le flux sanguin myocardique, exprimé en mL/g/min, est déterminé comme la moyenne des valeurs de pixels dans les régions d'intérêt, délimitées manuellement dans la zone antéro-septale du ventricule gauche sur les cartes MBF correspondantes.



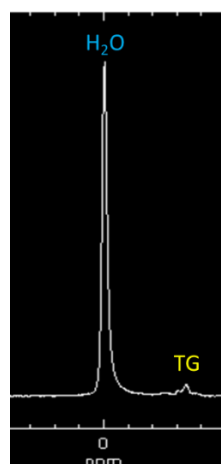
**Figure 28** Analyse des acquisitions de perfusion sur le logiciel IDL. (A) coupe « petit axe », (B) carte T1 de l'inversion globale de l'aimantation, (C) carte T1 de l'inversion sélective de l'aimantation et (D) carte de perfusion du myocarde.

### c- Contenu intra-cardiaque et intra-hépatique en triglycérides (TG)

La mesure des TG intra-myocardiques et intra-hépatiques a précédemment été validée au laboratoire. Abdesselam et coll. ont montré que celle-ci était corrélée avec la mesure des TG par analyses biochimiques [333]. Une séquence de SRM du proton de type « PRESS » est utilisée. Un voxel (volume d'intérêt =  $1 \times 1 \times 2 \text{ mm}^3$ ) est placé dans le tissu myocardique, au niveau de la région basale du septum, à l'aide des coupes petit axe et 4 chambres. Les acquisitions sont effectuées durant la phase systolique. Les paramètres IRM suivants sont utilisés : NA = 512 ; TR  $\approx$  800 ms (égal à l'intervalle respiratoire). Un second balayage est effectué pour obtenir un pic d'eau insaturé comme référence (TR = 5 s ; NA = 64). Le contenu moléculaire de l'eau est quantifié par intégration des résonances à 4,7 ppm et des TG à 1,3 ppm dans le domaine temporel.

Dans le foie, un voxel de taille supérieure ( $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ ) est placé dans la partie antérieure du foie et utilisé pour réduire le temps de balayage. Les paramètres IRM suivant sont utilisés : TR = 800 ms et NA = 128 (pour les paramètres de balayage de référence, TR = 5 s et NA = 32). Les TG du foie sont quantifiés à l'aide de la séquence PRESS avec une synchronisation uniquement respiratoire.

Les spectres obtenus sont ensuite analysés avec AMARES sous environnement IDL. La détermination de l'aire sous la courbe des pics de l'eau et des TG permet de quantifier le pourcentage de TG par rapport à l'eau (Figure 29).



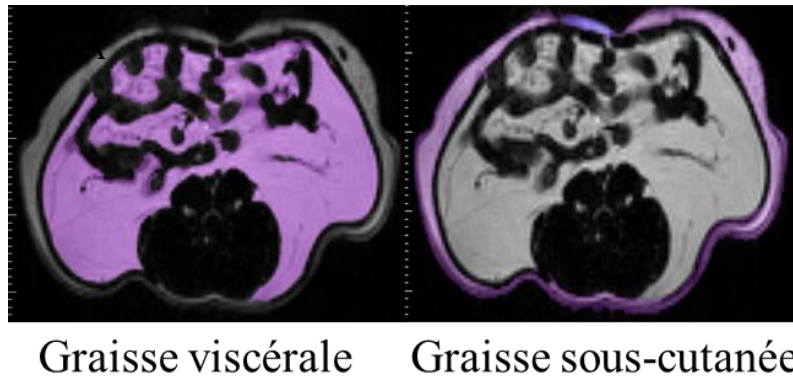
**Figure 29** Exemple de spectre de résonance magnétique du proton analysé par AMARES.

Deux pics sont visibles : le pic de l'eau et le pic de TG.



#### **d- Volume de tissu adipeux sous-cutané et viscéral (SCAT et VAT)**

Pour une carte quantitative de la distribution des tissus adipeux, une analyse du corps entier est réalisée. Soixante-quatre coupes axiales contiguës sont sélectionnées sur la longueur du corps de l'animal, à l'exclusion de la queue. Les images de résonance magnétique de ces coupes sont enregistrées en utilisant une séquence tridimensionnelle haute résolution « écho turbo spin ». Les paramètres IRM suivants sont utilisés : FOV = 80 x 60 x 70 mm<sup>3</sup> ; épaisseur de coupe = 70 mm ; taille de la matrice = 128 x 128 x 64 ; NA = 2 ; TE = 5,543 ms ; TE effectif = 88,69 ms ; TR = 350 ms. Les données sont traitées en utilisant un programme d'analyse personnalisé développé avec le logiciel IDL. Les quantifications du TAV et du SCAT sont effectuées à l'aide d'une méthode de segmentation semi-automatique basée sur une analyse de l'intensité des pixels des images IRM (Figure 30).



**Figure 30** Exemple de coupe transversale permettant l'évaluation de la distribution des tissus adipeux (en violet) viscéral (A) et sous cutané (B).

### **B- Mesures physiologiques**

#### **1- Test de tolérance au glucose**

Un test de tolérance au glucose est réalisé après 5 mois de régime afin d'évaluer l'homéostasie glucidique des rats. Les rats sont mis à jeun 6 heures avant le début du test. La glycémie est mesurée avec le glucomètre ACCU-CHECK Performa Nano (Roche, Suisse) par prélèvement de sang au bout de la queue du rat. Au point T0 (à jeun), un bolus d'une solution de glucose (1 g/kg) est injecté dans la cavité péritonéale. La glycémie est mesurée avant l'injection du bolus au point T0, et après l'injection du bolus aux points T15, T30, T60, T90 et T120 minutes.

## **2- Mesure de la pression artérielle**

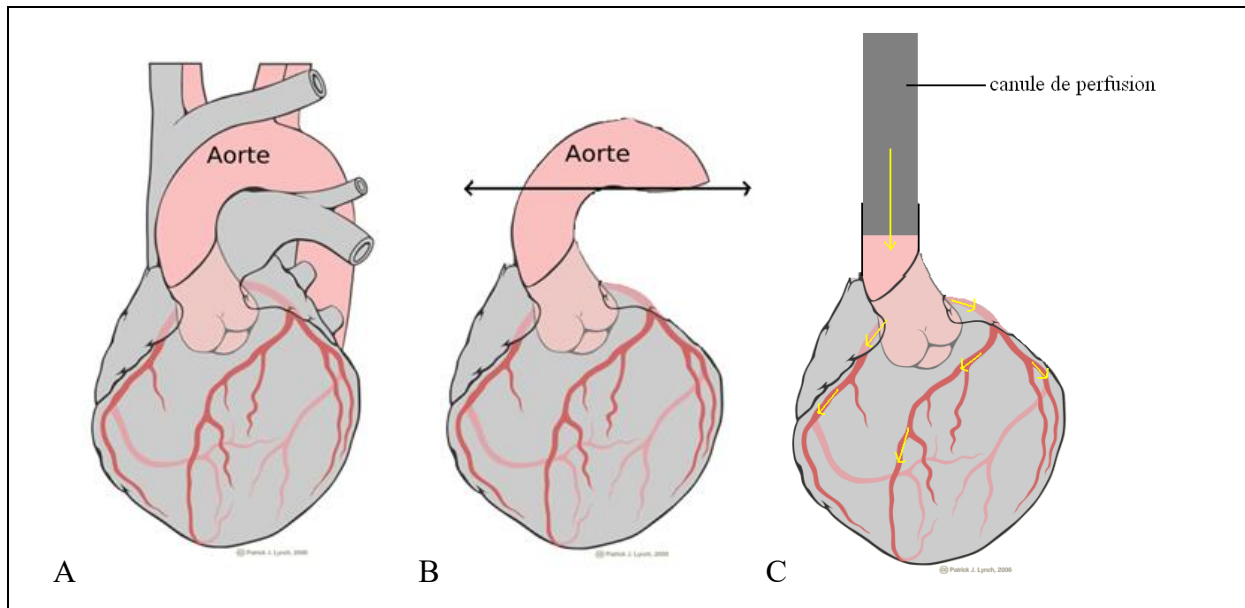
La pression artérielle est mesurée de manière non invasive à l'aide d'un brassard placé au niveau de la base de la queue du rat. En l'absence de tubes de contention, les animaux sont sédatisés avec 1,5-2% d'isoflurane et leur température est maintenue à 37,5 – 38°C à l'aide d'une couverture chauffante et d'une lampe infrarouge. Les pressions artérielles systolique et diastolique sont enregistrées 10 fois pour chaque rat (Bioseb, Chaville, France). Une moyenne des 10 valeurs est utilisée pour les analyses statistiques.

## **III- Expérimentations *ex vivo***

Des expérimentations *ex vivo* sont réalisées sur le modèle du cœur isolé perfusé afin d'étudier la tolérance myocardique à l'ischémie-reperfusion.

### **A- Préparation du cœur isolé perfusé**

Les rats sont anesthésiés par une injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique à la dose de 90 mg/kg. Le cœur est ensuite rapidement excisé de la cavité thoracique par une thoracotomie, puis arrêté dans un tampon Krebs-Henseleit à 4°C (contenant (en mM) : NaCl (118), KCl (4,7), MgSO<sub>4</sub> (1,2), CaCl<sub>2</sub> (1,75), NaHCO<sub>3</sub> (25), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2), EDTA (0,5), D-Glucose (11)). Du sang est aussi prélevé dans la cage thoracique pour des analyses biochimiques ultérieures. Le cœur est ensuite disséqué afin d'enlever les tissus pulmonaires, le thymus et les différents dépôts de graisse, parfois excisés en même temps que le cœur. L'aorte est ensuite dégagée et seule la partie verticale est conservée pour la canulation (Figure 31). Une fois nettoyé, le cœur est canulé par l'aorte ascendante et perfusé de manière rétrograde via le mode de Langendorff, à une pression constante de 100 mmHg et une température de 37°C. Il s'agit des conditions nécessaires à l'optimisation des performances et des indices métaboliques (PCr/Pi et PCr/ATP) du tissu normoxique. L'artère pulmonaire est ensuite incisée afin d'évacuer les effluents coronaires. L'oreillette gauche est excisée pour permettre la mise en place d'une petite canule de drainage transmyocardique à l'apex du cœur par voie endoventriculaire. Un ballonnet en latex est mis en place dans le ventricule gauche afin d'enregistrer les variations de pression intraventriculaires gauche systolo-diastoliques. Le cœur est alors placé dans un tube de SRM de 20 mm de diamètre que l'on insère dans l'aimant afin de suivre l'évolution de son état métabolique par SRM du phosphore-31.

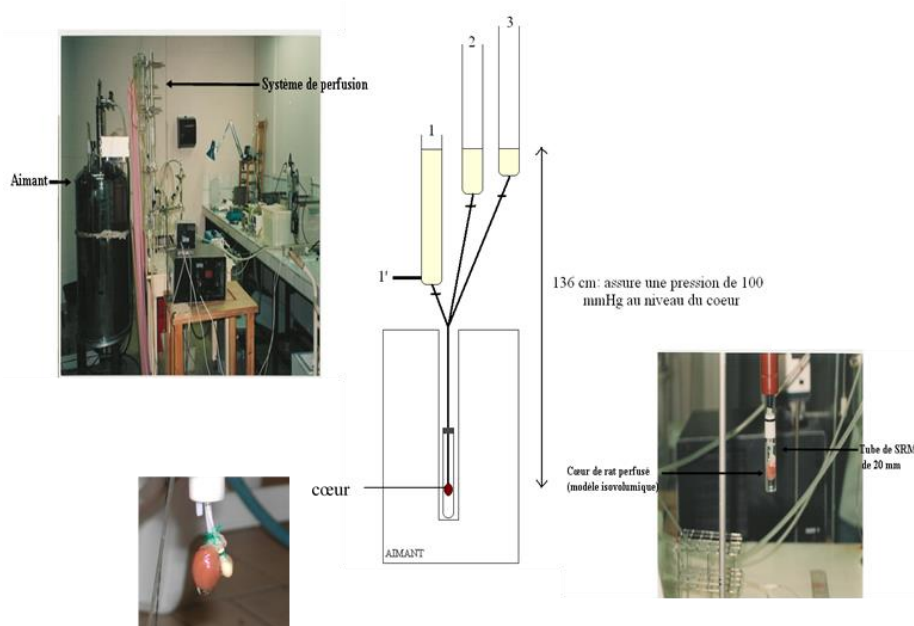


**Figure 31** Préparation du cœur isolé perfusé. (A) Configuration du cœur lorsqu'il est prélevé. (B) Dissection. (C) Mise en place de la canule de perfusion au niveau de l'aorte. Les flèches jaunes représentent la circulation du tampon de perfusion dans le réseau artériel coronaire (en rouge), permettant d'alimenter le cœur en nutriments et oxygène.

## **B- Appareillage et solution de perfusion**

Le système de perfusion (Figure 32) est composé de plusieurs réservoirs thermostatés à 37°C par une circulation continue d'eau. Les réservoirs contiennent différents tampons utilisés tout au long du protocole expérimental. Le premier réservoir contient du tampon Krebs-Henseleit (1). Il est alimenté en permanence par un second réservoir (1') par l'intermédiaire d'une pompe rotative, permettant de maintenir la pression de perfusion constante. Les deux autres réservoirs contiennent respectivement du tampon physiologique à 0,4 mM (2) (Krebs-Henseleit + 0,4 mM de palmitate ; 3% d'albumine ; 0,2 mM de pyruvate ; 0,8 mM de lactate et 3U/L d'insuline) et à 1,2 mM de palmitate (3) (Krebs-Henseleit + 1,2 mM de palmitate ; 3% d'albumine ; 0,2 mM de pyruvate ; 0,8 mM de lactate et 3 U/L d'insuline). Le coût important des tampons physiologiques ne permet pas d'alimenter les réservoirs à l'aide d'une pompe, le remplissage se fait donc manuellement. Les perfusats sont oxygénés par un mélange O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5) et sont utilisés à différents moments du protocole d'ischémie-reperfusion. Les réservoirs sont placés de manière à avoir la surface du tampon à une hauteur de 136 cm au-dessus du centre magnétique de l'aimant afin d'assurer une pression de 100 mmHg au niveau de l'aorte.

Un tampon physiologique est utilisé afin de se rapprocher au maximum des conditions *in vivo*. Il contient du palmitate, de l'albumine, du pyruvate, du lactate et de l'insuline que l'on ne retrouve pas dans un tampon Krebs-Henseleit classique. Des concentrations différentes en palmitate sont utilisées selon la période du protocole expérimental : 0,4 et 1,2 mM. La concentration en palmitate à 1,2 mM est utilisée à la fin de la période contrôle et pendant l'ischémie afin d'infliger un maximum de dommages au cœur. En effet, Oliver et coll. ont montré que lors d'un infarctus du myocarde, il se produit chez l'Homme une décharge adrénergique conduisant à une lipolyse du tissu adipeux [370]. Le relargage des acides gras dans la circulation est reconnu comme largement délétère dans le cœur ischémié.



**Figure 32** Système de perfusion du cœur isolé

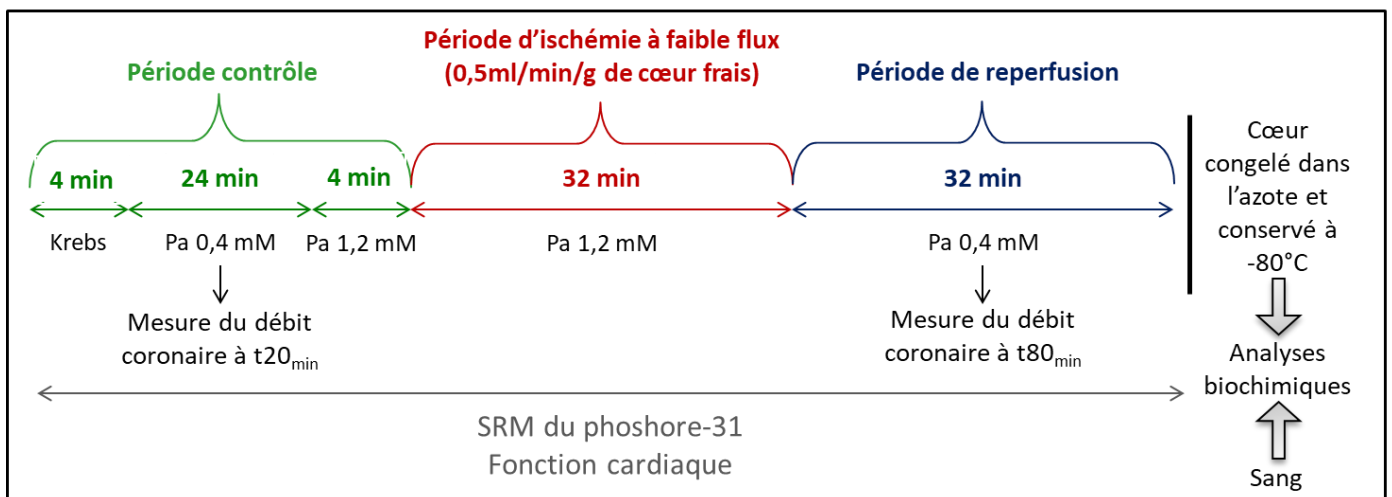
### **C- Protocole expérimental**

Une étude multiparamétrique est réalisée dans ces expérimentations. La fonction cardiaque, le métabolisme énergétique par SRM du phosphore-31 et le débit coronaire sont mesurés en simultané tout au long du protocole expérimental (Figure 33).

Le protocole d'ischémie-reperfusion a précédemment été mis au point au sein du laboratoire [115]. En particulier, l'emploi d'un tampon physiologique contenant une forte concentration en palmitate, a conditionné l'utilisation d'un débit résiduel de 0,5 mL/min/g de cœur au cours de l'ischémie [115]. Par ailleurs, les conditions expérimentales complexes, combinant cœur isolé

perfusé et spectroscopie de résonance magnétique, ne permettent pas une stimulation atriale, les cœurs présentent donc une fréquence spontanée. Cela permet néanmoins d'évaluer à la fois la pression développée et la fréquence cardiaque spontanée, potentiellement toutes les deux modifiées en situation pathologique.

Le protocole commence avec une période contrôle de 32 minutes comprenant 4 minutes d'équilibration du cœur avec le tampon Krebs-Henseleit, 24 minutes avec le tampon physiologique à une concentration en palmitate de 0,4 mM (Pa 0,4) et 4 minutes avec le tampon physiologique à une concentration en palmitate de 1,2 mM (Pa 1,2). Ensuite une ischémie à débit modéré de 32 minutes est réalisée avec le même tampon physiologique (Pa 1,2), à un débit ajusté au poids du cœur (0,5 mL/min par gramme de cœur). Enfin, une période de reperfusion de 32 minutes est effectuée avec le tampon physiologique Pa 0,4. A la fin du protocole les cœurs sont congelés avec une pince Wollenberger refroidie dans de l'azote liquide (technique du « freeze-clamp ») et conservés à -80°C pour des analyses biochimiques ultérieures.



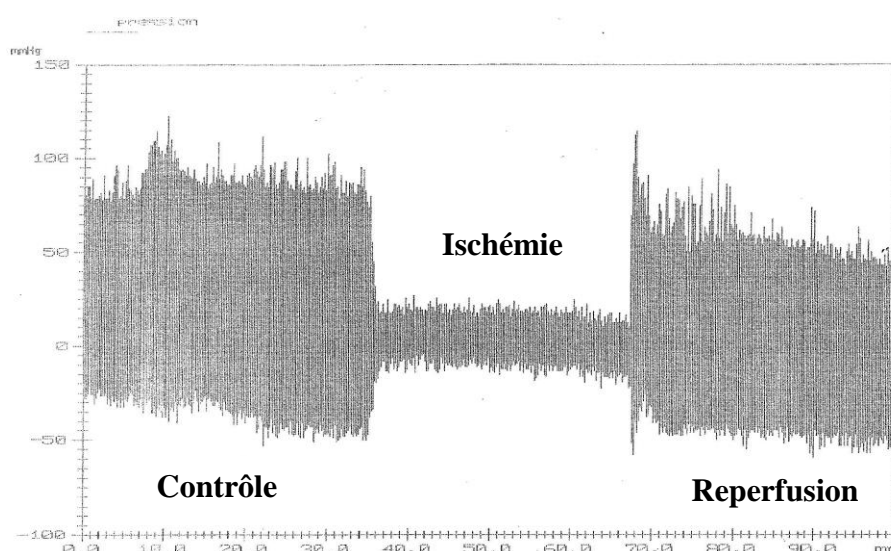
**Figure 33** Protocole expérimental d'ischémie-reperfusion. Pa = Palmitate.

## 1- Paramètres mesurés

### a- Fonction cardiaque

Le ballonnet en latex inséré dans le ventricule gauche est rempli d'eau distillée de manière à obtenir une pression diastolique de 10 à 12 mmHg. Il est relié à un capteur de pression pour permettre l'enregistrement des données fonctionnelles du cœur sur un enregistreur papier (KIPP & ZONEN). En parallèle, l'acquisition des signaux de pression est numérisée à la sortie de

l'amplificateur. Ce système rend l'étude des données plus rapide et permet un stockage des informations pour des traitements ultérieurs. L'échantillonnage est réalisé par une carte AX5412 (AXIOM) cadencée à 10 MHz. Cette carte est interfacée à un ordinateur compatible PC et pilotée par le logiciel ATS (SYSMA, Aix en Provence, France) permettant le traitement des données. Le système d'enregistrement des données permet d'étudier les contractions isovolumentiques du cœur, par la mesure de la pression développée, de la fréquence cardiaque et de la pression systolique tout au long de l'expérience (Figure 34). Une estimation du travail cardiaque est établie par le produit de la pression développée et de la fréquence cardiaque, proportionnel à la consommation d'oxygène. Le débit coronaire est déterminé en période contrôle et à la reperfusion, en mesurant le volume des effluents cardiaques évacués dans un temps donné.

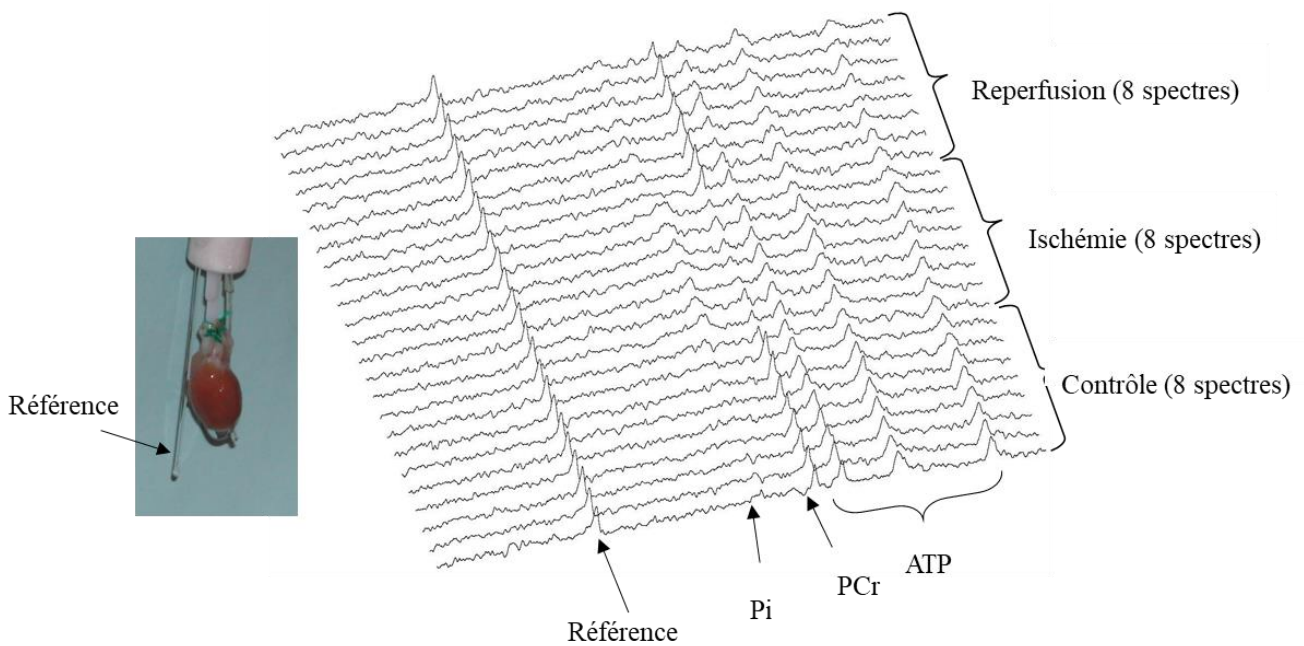


**Figure 34** Exemple d'acquisition de la fonction cardiaque avec le logiciel ATS

### **b- Métabolisme énergétique**

Les spectres de SRM du phosphore-31 sont obtenus à 81 MHz en utilisant un spectromètre Bruker-Nicolet WP-200 interfacé à un aimant vertical de 4,7 Tesla, équipé d'une sonde sélective de 20 mm de diamètre. L'homogénéité du champ magnétique est réalisée en utilisant le signal des protons de l'échantillon contenu dans le volume sensible de la bobine. Les spectres sont acquis en 4 minutes par la sommation de 328 signaux d'induction libre avec un angle d'impulsion de 45° et un temps de répétition de 0,7 seconde. La largeur spectrale est de 4500 Hz et la taille de mémoire est de 2K. Avant la transformation de Fourier, le signal d'induction libre est multiplié par une fonction exponentielle générant des raies de 20 Hz. Les signaux

observés sur le spectre de SRM du phosphore-31 sont ceux du phosphate inorganique (Pi), de la phosphocréatine (PCr) et des trois phosphores de l'ATP. Pour la quantification des dérivés phosphorés, un capillaire contenant de l'acide phénylphosphonique (PPA à 0,6 M) est placé près du cœur et est utilisé pour calibrer les aires de résonance. Le pH intracellulaire est calculé à partir du déplacement chimique du phosphate inorganique, relativement à la résonance de la phosphocréatine. Afin de tenir compte de la température pendant le protocole expérimental, la valeur du pH intracellulaire est corrigée selon la formule établie par Kost [371]. Huit spectres sont acquis pour chacune des périodes du protocole (Figure 35).



**Figure 35** Exemple d'acquisition des spectres de SRM du phosphore-31 permettant l'évaluation du métabolisme énergétique cardiaque.

Les aires et les positions des résonances sont déterminées avec un programme développé au laboratoire et fonctionnant sous environnement IDL (Interactive Data Language, ITT Visual Solutions, Boulder, CO, USA). La concentration de PPA dans le capillaire permet d'obtenir des valeurs absolues de concentrations en mM de PCr, d'ATP et de Pi après correction de la saturation des résonances.

Au préalable, des acquisitions en « full relax » sont effectuées afin de connaître la concentration absolue en PPA dans le capillaire. Trois solutions de Pi à 1 mM, 2 mM et 5 mM sont préparées.

Un spectre de SRM du phosphore-31 est acquis pour chacune des solutions contenant le capillaire. Deux pics sont représentés sur chaque spectre : un pic correspondant à la référence et un pic correspondant au phosphate inorganique. A partir des aires sous la courbe des différentes solutions en Pi, une concentration absolue dans le capillaire est déterminée. Cette concentration permet ensuite de quantifier les métabolites dans les cœurs lors des expérimentations de cœur isolé perfusé.

## **IV- Expérimentations *in vitro* / Analyses biochimiques**

### **A- Dissection et collecte d'échantillons**

Comme précisé précédemment, les cœurs et des échantillons de sang sont conservés afin de réaliser des analyses biochimiques. La quantité de tissu adipeux sous-cutané (SCAT) et viscéral (VAT) est mesurée. Le cœur est également pesé.

### **B- Analyses dans le plasma**

Plusieurs kits ont été utilisés pour doser dans le plasma la glycémie (Randox Laboratories, Crumlin, Antrim UK), les acides gras libres (NEFA kit, Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne), les TG (Abcam, ab 65336) et le cholestérol HDL/LDL (Abcam, ab 65390).

### **C- Analyses dans les cœurs**

#### **1- Activité des enzymes Créatine Kinase (CK) et Lactate Déshydrogénase (LDH)**

Des homogénats de cœur sont préparés en broyant au Polytron un morceau de cœur dans un tampon d'homogénéisation. La CK et la LDH sont dosées dans 1 mL d'homogénat contenant 10  $\mu$ L de Triton dilué au dixième.

##### **a- Dosage de la LDH :**

Une cuve en quartz contenant 2,92 mL de solution de pyruvate (75,4 mg/L de tampon phosphate), 30  $\mu$ L de solution de NADH (10 mg/mL) et 25  $\mu$ L d'eau distillée, est mise à chauffer pendant 5 minutes à 30°C dans le spectrophotomètre. 25  $\mu$ L d'homogénat sont ensuite ajoutés et l'évolution de la densité optique en fonction du temps, correspondant à l'activité enzymatique, est détectée à 340 nm et enregistrée. Les résultats sont exprimés en U/mg de protéines.



### **b- Dosage de la CK :**

1 mL de réactif (kit CK-NAC, laboratoire RANDOX) est mis à chauffer pendant 5 minutes à 30°C dans le spectrophotomètre dans une cuve en quartz. 40 µL d'homogénat (dilué au 1/5) sont ensuite ajoutés et l'évolution de la densité optique en fonction du temps, correspondant à l'activité enzymatique, est détectée à 340 nm et enregistrée. Les résultats sont exprimés en U/mg de protéines.

### **c- Dosage des protéines**

Le dosage quantitatif des protéines contenues dans les homogénats est réalisé par la méthode de Lowry. Le dosage est basé sur une réaction enzymatique colorimétrique. Le complexe coloré formé, par ajout d'un réactif cuivrique alcalin puis du réactif de Folin, est détecté par spectrophotométrie à 750 nm. Dans les mêmes conditions, une gamme étalon est réalisée avec une solution d'albumine de sérum bovin à 1 mg/mL. L'équation de régression de cette courbe permet de calculer la concentration en protéines des échantillons dosés.

## **2- Malondialdéhyde (MDA)**

La peroxydation lipidique est évaluée dans les cœurs congelés par la mesure du Malondialdéhyde [372] à l'aide du kit de dosage « lipid peroxidation assay kit » (MAK085, Sigma-Aldrich, St Louis, USA). La peroxydation des lipides est déterminée par la réaction du MDA avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un produit coloré, détecté à 532 nm et proportionnel au MDA présent.

## **3- Créatine, phosphocréatine et nucléotides adénylés**

La créatine (Cr), la phosphocréatine (PCr) et les nucléotides adénylés sont évalués par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) dans les cœurs congelés. Tout d'abord, une extraction perchlorique, adaptée de Lazzarino et coll. est réalisée par homogénéisation du tissu cardiaque (50 à 100 mg) avec un homogénéisateur Polytron dans de l'acide perchlorique (0,6 M) glacé [373]. Ensuite, les homogénats sont centrifugés à 5 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le calcul de la concentration en protéines est effectué selon la méthode de Lowry pour exprimer les résultats en µmole/g de protéines. La séparation de la Cr, la PCr et des nucléotides adénylés est réalisée à l'aide de la technique d'appariement d'ions en phase inverse. L'analyse qualitative et quantitative est effectuée à l'aide de monophosphate de thymine (Sigma, Poole, Dorset, UK) comme étalon interne. Dans ces conditions

chromatographiques, une séparation hautement résolue de la PCr, de la Cr, de l'ATP, de l'ADP, de l'AMP et du NAD est obtenue en 40 min. Les nucléotides adénine totaux (TAN) sont calculés à partir de la somme ATP + ADP + AMP. La charge énergétique (EC) est égale à  $(ATP + 0,5ADP) / (ATP + ADP + AMP) * 10$ .

#### **4- Activité de l'enzyme Citrate Synthase (CS)**

L'activité myocardique de l'enzyme CS est déterminée avec le kit « Citrate Synthase Assay Kit » (CS0720, Sigma Aldrich). Une extraction protéique est réalisée par broyage des tissus myocardiques dans un tampon de lyse (CelLytic MT, C3228, Sigma) contenant un inhibiteur de protéases (Protease Inhibitor Cocktail, P8340, Sigma-Aldrich). L'extrait protéique est centrifugé pendant 10 minutes à 14000 g à 4°C puis les protéines sont dosées dans le surnageant avec le kit de Pierce (Pierce® BCA Protein Assay Kit ; Thermo Scientific). Après ajout du réactif (Oxaloacétate), l'activité de l'enzyme est mesurée à 412 nm.

#### **5- Expression protéique par Western Blots**

Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés aux voies de l'apoptose, de l'oxyde nitrique (NO) et des sirtuines. Nous avons également étudié la S-Glutathionylation des protéines et plus particulièrement de la protéine eNOS.

Remarque : l'ensemble des anticorps utilisés ainsi que la composition des tampons sont détaillés en Annexe.

##### **a- Extraction des protéines**

*Caspase-3* : L'extraction des protéines contenues dans les cœurs est réalisée dans un tampon spécifique. Un morceau de cœur congelé est ajouté au tampon d'extraction et broyé grâce à un homogénéiseur Polytron 2100. L'homogénat est ensuite centrifugé à 13200 rpm pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant est prélevé.

*eNOS, P-eNOS, eNOS dimère/monomère et S-Glutathionylation* : 50 mg de cœur sont broyés dans 2 mL de tampon SB à l'aide d'un homogénéiseur (T10 Ultra Turrax® ; IKA). Puis l'homogénat est centrifugé à 17000g pendant 15 minutes à 4°C et le surnageant est prélevé. Dans le cas de la S-Glutathionylation, les étapes sont les mêmes avec une extraction des protéines dans un tampon HENS.

*eNOS, iNOS, Akt, P-Akt, SIRT1 et SIRT3* : L'extraction des protéines est réalisée dans un tampon de lyse RIPA complet. Un morceau de cœur congelé est ajouté au tampon d'extraction et broyé grâce à un homogénéiseur Polytron 2100. L'homogénat est ensuite centrifugé à 14000 rpm pendant 15 minutes à 4°C et le surnageant est prélevé.

#### **b- Dosage des protéines**

Le dosage quantitatif des protéines contenues dans les surnageants est réalisé avec le kit de Pierce (Pierce® BCA Protein Assay Kit ; Thermo Scientific). Le dosage est basé sur une réaction enzymatique colorimétrique par l'acide bicinchoninique (BCA). Le réactif BCA est ajouté à l'échantillon à doser. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, le complexe coloré formé est détecté par spectrophotométrie à 562 nm. Dans les mêmes conditions, une gamme étalon est réalisée avec une solution d'albumine de sérum bovin à 2 g/L. L'équation de régression de cette courbe permet de calculer la concentration en protéines des échantillons dosés.

#### **c- Préparation des échantillons**

*Caspase-3* : les échantillons sont dilués dans du PBS afin de déposer 50 µg de protéines dans un volume de 25 µL. 5,8 µL de tampon LB sont ajoutés, les échantillons sont chauffés 5 minutes à 95°C au bain-marie sec, puis chargés dans les puits d'électrophorèse.

*eNOS, P-eNOS, eNOS dimère/monomère et S-Glutathionylation* : Pour les expériences réalisées au LaPEC, les échantillons sont dilués dans du tampon SB ou HENS (selon le tampon d'extraction utilisé) afin de déposer 50 µg de protéines dans un volume de 40 µL. 2 µL de Bleu de Coomassie et 5 µL de β-Mercaptoéthanol sont ajoutés, puis les échantillons sont chauffés 5 minutes à 95°C au bain-marie. Pour l'évaluation de la S-Glutathionylation des protéines, 80 µg de protéines sont déposés dans les puits sans ajout de β-mercaptoéthanol. Des conditions particulières sont également utilisées pour l'évaluation de l'eNOS sous forme de monomère et dimère. En effet, des conditions non dénaturantes sont utilisées afin de pouvoir observer la forme dimérique d'eNOS. Les échantillons ne sont pas chauffés à 95°C et du β-mercaptoéthanol n'est pas ajouté.

*eNOS, iNOS, Akt, P-Akt, SIRT1 et SIRT3* : Les échantillons sont préparés en ajoutant du PBS et du tampon LB pour obtenir un volume total de 25µL à charger dans les puits. La quantité de protéines chargée dans les puits est de 50 µg pour la caspase-3, Akt, PAkt et SIRT3 ; 90 µg

pour eNOS, iNOS et SIRT1. Les échantillons sont chauffés 5 minutes au bain-marie sec à 95°C afin de dénaturer les protéines, puis chargés dans les puits des gels d'électrophorèse.

#### **d- Electrophorèse**

Afin de séparer les différentes protéines en fonction de leur poids moléculaire, une migration des protéines est réalisée en conditions dénaturantes sur des gels de polyacrylamide (SDS-PAGE). Nous avons utilisé soit des gels pré-coulés 4-20% (Biorad), soit des gels « maison » à 6%, 8% ou 10% d'acrylamide, en fonction des protocoles et du poids moléculaire des protéines à observer. Des marqueurs de poids moléculaire (Marqueur « précision Plus Protein Standards », réf 161-0375, Biorad ; Cruz marker Molecular Weight Standards, ref sc2035, Santa Cruz Biotechnology, en chimiluminescence) sont également déposés sur le gel afin de vérifier la position des protéines d'intérêt.

*Caspase-3* : Des gels pré-coulés 4-20% (Biorad) sont utilisés. La migration des protéines est réalisée à 150V pendant 45 minutes.

*eNOS, P-eNOS, et S-Glutathionylation* : Des gels « maison » 8% sont utilisés. La migration des protéines est faite à 150V pendant 1h20. *eNOS dimère/monomère* : Des gels « maison » 6% sont utilisés. L'étape de migration a lieu à froid, à 0,05 A pendant 1h20.

*eNOS, iNOS, Akt, P-Akt, SIRT1 et SIRT3* : Des gels « maison » 8% (eNOS, SIRT1 et iNOS) ou 10 % (Akt, P-Akt et SIRT3) sont utilisés pour la séparation des protéines par électrophorèse à 110V pendant environ 1h45.

#### **e- Transfert des protéines**

*Caspase-3* : Les bandes protéiques sont transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (Trans-Blot SD, semi-dry transfer cell, BIORAD) à 20V pendant 30 minutes. La qualité du transfert est vérifiée avec une solution de Rouge Ponceau. La membrane est ensuite lavée à l'eau distillée et au TBS-T (Tris Buffered Saline contenant du Tween 20 à 0,1%) jusqu'à disparition du Rouge Ponceau.

*eNOS, P-eNOS, eNOS dimère/monomère et S-Glutathionylation* : Les bandes protéiques sont transférées sur une membrane PVDF en milieu liquide, à 0,30 A pendant 1h10. Pour eNOS d/m le transfert est réalisé à froid pendant 2h.

*eNOS, iNOS, Akt, P-Akt, SIRT1 et SIRT3* : Les bandes protéiques sont transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec, à 0,07 A pendant 2 heures. La qualité du transfert est vérifiée avec une solution de Rouge Ponceau. La membrane est ensuite lavée à l'eau distillée et au TBS-T jusqu'à disparition du Rouge Ponceau.

**f- Inhibition des interactions non-spécifiques**

*eNOS, P-eNOS, eNOS dimère/monomère et S-Glutathionylation* : Les interactions non spécifiques sont inhibées avec une solution de saturation de TBS-T contenant 10% de lait (5% pour la S-Glutathionylation). Les membranes sont incubées entre 1 et 2 heures dans la solution de blocage selon la protéine d'intérêt. Ensuite les membranes sont rincées avec du TBS-T.

*Caspase-3, eNOS, iNOS, Akt, P-Akt, SIRT1 et SIRT3* : Le blocage des interactions non spécifiques est réalisé avec du TBS-T contenant 5% de lait pendant 2h.

**g- Anticorps primaires**

Les membranes sont incubées toute la nuit, sous agitation à 4°C en présence d'un anticorps primaire spécifique de la protéine que l'on souhaite étudier (Tableau 3).

<b>Protéine</b>	<b>Concentration</b>	<b>Solution d'incubation</b>
eNOS	1/1000	TBS-T 1% de lait
P-eNOS	1/1000	TBS-T 1% de lait
eNOS d/m	1/1000	TBS-T 1% de lait
Glutathione	1/500	TBS-T 5% de lait
Caspase-3	1/1000	TBS-T 5% de lait
eNOS	1/1000	TBS-T 5% de lait
iNOS	1/500	TBS-T 5% de lait
Akt	1/1000	TBS-T 5% de BSA
P-Akt	1/500	TBS-T 5% de BSA
SIRT1	1/1000	TBS-T 5% de lait
SIRT3	1/1000	TBS-T 5% de lait
Actine	1/2000	TBS-T 5% de lait
GAPDH	1/3000	TBS-T 1% de lait

**Tableau 3** Concentrations et solutions d'incubation des anticorps primaires

#### **h- Anticorps secondaires**

Le lendemain, les membranes sont rincées avec du TBS-T puis incubées pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire (Tableau 4).

<b>Protéine</b>	<b>Concentration</b>	<b>Solution d'incubation</b>
eNOS	1/2000	TBS-T 0,5% de lait
P-eNOS	1/3000	TBS-T 0,5% de lait
eNOS d/m	1/7500	TBS-T 5% de lait
Glutathione	1/5000	TBS-T 5% de lait
Caspase-3	1/2000	TBS-T 5% de lait
eNOS	1/2000	TBS-T 5% de lait
iNOS	1/2000	TBS-T 5% de lait
Akt	1/2000	TBS-T 5% de lait
P-Akt	1/2000	TBS-T 5% de lait
SIRT1	1/2000	TBS-T 5% de lait
SIRT3	1/2000	TBS-T 5% de lait
Actine	1/2000	TBS-T 5% de lait
GAPDH	1/10000	TBS-T 0,5% de lait

**Tableau 4** Concentrations et solutions d'incubation des anticorps secondaires

#### **i- Détection du signal**

*eNOS, P-eNOS, eNOS dimère/monomère, S-Glutathionylation* : Les membranes sont incubées pendant cinq minutes dans un réactif afin de détecter les protéines par chimiluminescence (SuperSignal West Pico Chemiluminescence Substrat, Thermo Scientific ; ou Luminata Forte Western HRP Substrate, Millipore Corporation). Le signal des protéines est révélé en exposant un film autoradiographique sur la membrane. Le film est scanné et les protéines sont quantifiées avec le logiciel Image J. L'expression des protéines est définie comme le ratio signal de la protéine d'intérêt / signal de la protéine GAPDH.

*Caspase-3, eNOS, iNOS, Akt, P-Akt, SIRT1 et SIRT3* : Les membranes sont incubées pendant 5 minutes dans un réactif afin de détecter les protéines par chimiluminescence (ECL Prime

Western Blotting Detection Reagent, RPN 2232, GE Healthcare). Le signal des protéines est évalué en utilisant l'appareil de détection MicroChemi 4.2 Sytem (DNR Bio-Imaging System Ltd, Israel) et les protéines sont quantifiées avec le logiciel Quantiscan. L'expression des protéines est définie comme le ratio signal de la protéine d'intérêt / signal de la protéine Actine.

## **V- Analyses statistiques**

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide de la version 5 du logiciel GraphPad Prism (La Jolla, CA). Les résultats sont présentés sous la forme de valeurs moyennes  $\pm$  l'écart type moyen (SEM). Une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs (groupe et temps) avec des mesures répétées sur le temps est utilisée pour comparer les résultats du suivi cardiaque *in vivo*, de la fonction myocardique et du métabolisme énergétique (PCr, ATP, Pi) *ex vivo*. Ces analyses sont suivies de tests post-hoc de Bonferroni lorsque l'ANOVA est significative de manière à déterminer quels groupes sont significativement différents. Pour les autres résultats, un test *t* student pour les séries non appariées est appliqué lorsqu'il y a deux groupes ; et une ANOVA à un facteur (groupe) est utilisée lorsqu'il y a plus de deux groupes. Une valeur de *p* égale ou inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

## **Résultats**



Au cours de ma thèse, nous avons réalisé trois études. Les deux premières études avaient pour objectif principal d'étudier les altérations cardiaques induites par le prédiabète et le diabète de type 2 dans le sexe féminin, et de proposer une approche thérapeutique par le Resvératrol. Pour cela nous avons utilisé un modèle de rat nourri avec un régime riche en graisse et en sucre (HFS) et un modèle de rat spontanément diabétique de type 2, le rat GK. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux altérations morphologiques, fonctionnelles, métaboliques et endothéliales du cœur chez le rat HFS et le rat GK. La troisième étude avait pour objectif de déterminer si le sexe influence la réponse physiologique à un régime riche en graisse et en sucre et la tolérance myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion. Lors de ces trois études, nous avons réalisé des mesures cardiaques *in vivo* par IRM, des expérimentations *ex vivo* sur le modèle du cœur isolé perfusé, ainsi que des analyses biochimiques dans le plasma et les cœurs congelés.

- **Étude 1 : Remodelage cardiaque et forte sensibilité à une séquence d'ischémie-reperfusion chez des rates soumises à un régime riche en graisse et en sucre : Suivi longitudinal *in vivo* et *ex vivo*.**

Cette étude fait l'objet d'un article scientifique publié dans *The Journal of Nutritional Biochemistry*: "Cardiac remodeling and higher sensitivity to ischemia-reperfusion injury in female rats submitted to high-fat high-sucrose diet: an *in vivo* / *ex vivo* longitudinal follow-up." <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.03.022>.

- **Étude 2 : Effet protecteur du Resvératrol contre les lésions d'ischémie-reperfusion via l'augmentation des composés riches en énergie et de l'expression des protéines eNOS et SIRT1 dans le cœur de rates diabétiques de type 2.**

Cette étude fait l'objet d'un article scientifique publié dans *Nutrients* : "Protective effect of Resveratrol against ischemia-reperfusion injury via Enhanced High Energy Compounds and eNOS-SIRT1 Expression in Type 2 Diabetic Female Rat Heart". doi: 10.3390/nu11010105.



- **Étude 3 : Est-ce que le sexe influence la réponse physiologique à un régime riche en graisse et en sucre et la tolérance myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion**

Les expérimentations *ex vivo* ont été réalisées et nécessitent d'être complétées par des analyses biochimiques afin de faire l'objet d'un article scientifique.

## ETUDE 1

### **Remodelage cardiaque et forte sensibilité à une séquence d'ischémie-reperfusion chez des rates soumises à un régime riche en graisse et en sucre : Suivi longitudinal *in vivo* et *ex vivo*.**

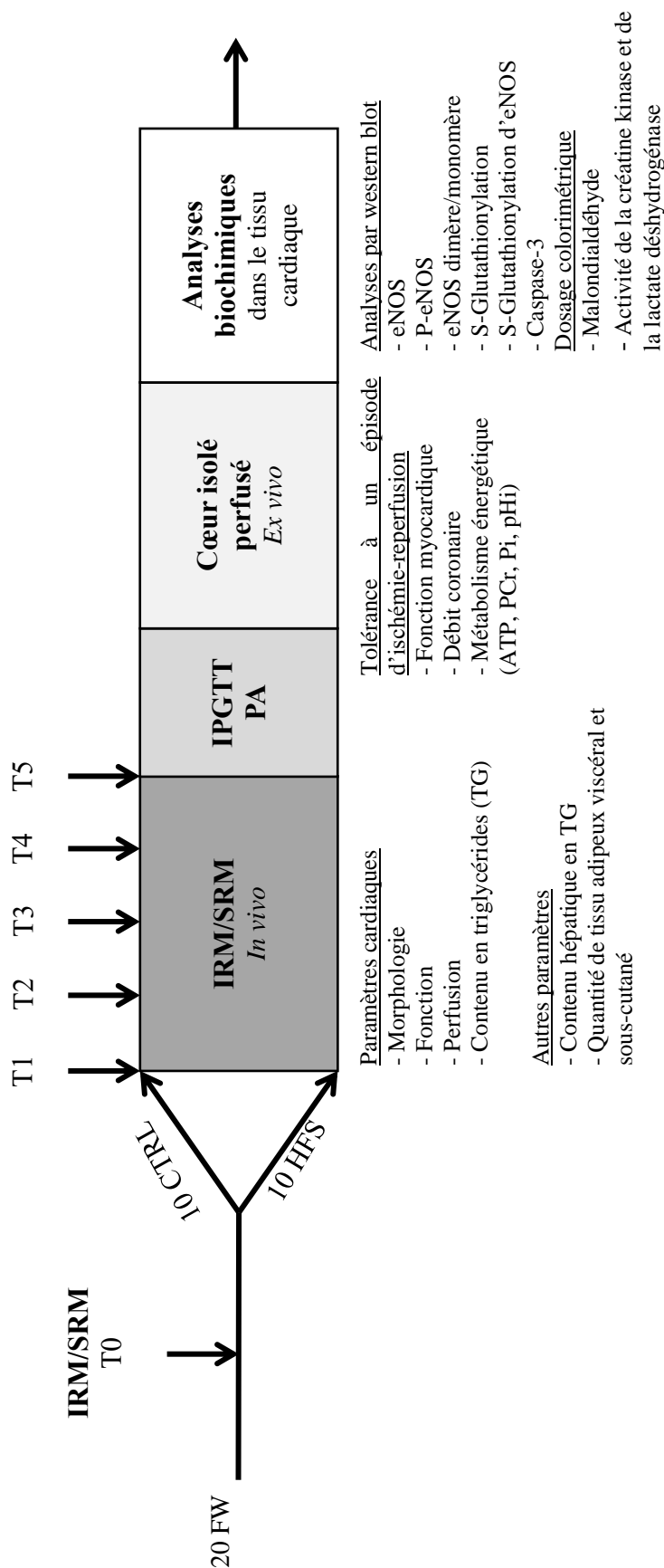
Article

 ELSEVIER	 CrossMark	Available online at <a href="http://www.sciencedirect.com">www.sciencedirect.com</a> <b>ScienceDirect</b> Journal of Nutritional Biochemistry 69 (2019) 139–150	<b>Journal of Nutritional Biochemistry</b>
<p><b>Cardiac remodeling and higher sensitivity to ischemia–reperfusion injury in female rats submitted to high-fat high-sucrose diet: An <i>in vivo/ex vivo</i> longitudinal follow-up☆</b></p> <p>Natacha Fourny<sup>a,*</sup>, Carole Lan<sup>a</sup>, Frank Kober<sup>a</sup>, Doria Boulghobra<sup>b</sup>, Jordan Bresciani<sup>a</sup>, Cyril Reboul<sup>b</sup>, Monique Bernard<sup>a</sup>, Martine Desrois<sup>a</sup></p> <p><sup>a</sup>Aix Marseille Univ, CNRS, CRMBM, Marseille, France <sup>b</sup>Université d'Avignon, LaPEc EA4278, Avignon, France</p> <p>Received 16 November 2018; received in revised form 14 March 2019; accepted 25 March 2019</p>			

Publié dans

The Journal of Nutritional Biochemistry

Le 11 mai 2019



**Protocole expérimental de l'étude 1. PA= pression artérielle ; IPGTT= test de tolérance au glucose en intrapéritonéal.**

## **Résumé de l'étude**

**Contexte scientifique :** Le prédiabète est un facteur de risque important de diabète de type 2 et des complications cardiovasculaires qui y sont associées, telles que l'infarctus du myocarde. Bien que les femmes aient un risque élevé de développer ses complications, peu d'études explorent le genre féminin dans ce contexte.

L'objectif de cette première étude était donc d'étudier *in vivo* et *ex vivo* les effets d'un régime riche en graisse et en sucre sur différents paramètres cardiaques et sur la sensibilité à l'ischémie-reperfusion de rats Wistar femelles.

**Méthodes :** Deux groupes de dix femelles Wistar étaient constitués ; l'un recevant un régime standard (groupe contrôle : CTRL), l'autre recevant un régime riche en graisse et en sucre (groupe HFS) pendant 5 mois. Chaque mois, un examen IRM était effectué afin de suivre la morphologie, la fonction et la perfusion myocardique ; la teneur en triglycérides du cœur et du foie ; et la quantité de tissus adipeux sous-cutané et viscéral. Après 5 mois de régime, un test de tolérance au glucose et une mesure de la pression artérielle étaient effectués. Ensuite, des expériences *ex vivo* sur le modèle du cœur isolé perfusé étaient réalisées afin d'évaluer la tolérance à un épisode d'ischémie-reperfusion (décrit en page 93 de la partie Matériels et Méthodes). Le métabolisme énergétique (ATP, PCr, Pi) et le pH intracellulaire (pHi) étaient mesurés pendant tout le protocole à l'aide de la SRM du Phosphore-31, en simultané avec la mesure de la fonction myocardique. Le débit coronaire était également mesuré avant et après l'ischémie. A la fin des expériences, les cœurs étaient congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C pour des analyses biochimiques ultérieures.

**Résultats :** Cinq mois d'alimentation riche en graisse et en sucre a induit un état prédiabétique chez les femelles Wistar, associé à des altérations du métabolisme lipidique. L'IRM a révélé une augmentation de la perfusion myocardique à partir du deuxième mois de régime, un épaississement de la paroi myocardique en systole et en diastole à partir du troisième mois de régime et une fonction myocardique normale. Les animaux soumis à un régime riche en graisse et en sucre présentent également une sensibilité plus élevée aux lésions d'ischémie-reperfusion que les animaux contrôles, caractérisée par une altération de la fonction cardiaque, du métabolisme énergétique et de la fonction endothéliale. Les analyses biochimiques dans les cœurs ont mis en évidence le découplage de la protéine eNOS, un taux plus élevé de malondialdéhyde et une diminution de la modification post-traductionnelle par S-

Glutathionylation, indiquant un stress oxydatif plus élevé chez les animaux soumis à un régime riche en graisse et en sucre.

**Conclusion :**

En conclusion, l'état prédiabétique induit par le régime riche en graisse et en sucre, est associé à un remodelage myocardique et à une sensibilité accrue aux lésions d'ischémie-reperfusion. Le stress oxydant semble jouer un rôle primordial dans les mécanismes impliqués dans la dysfonction myocardique. Ces résultats peuvent être associés à l'augmentation des complications cardiovasculaires chez les femmes atteintes de prédiabète et de diabète de type 2.

**Cardiac remodeling and higher sensitivity to ischemia-reperfusion injury in female rats submitted to high-fat high-sucrose diet: an *in vivo* / *ex vivo* longitudinal follow-up.**

Natacha Fourny <sup>a</sup>, Carole Lan <sup>a</sup>, Frank Kober <sup>a</sup>, Doria Boulghobra <sup>b</sup>, Jordan Bresciani <sup>a</sup>, Cyril Reboul <sup>b</sup>, Monique Bernard <sup>a</sup> and Martine Desrois <sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Aix Marseille Univ, CNRS, CRMBM, Marseille, France

<sup>b</sup> Université d'Avignon, LaPEC EA4278, Avignon, France

**Running title:** Prediabetes and female rat heart

**Corresponding author:** Natacha Fourny, Phone: +33 (0) 4 91 32 48 08 / Fax: +33 (0) 4 91 25 65 39, [natacha.fourny@etu.univ-amu.fr](mailto:natacha.fourny@etu.univ-amu.fr)

Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale (CRMBM), UMR 7339, Aix-Marseille Université, CNRS, Faculté de Médecine, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France.

[carole.lan@univ-amu.fr](mailto:carole.lan@univ-amu.fr) ; [frank.kober@univ-amu.fr](mailto:frank.kober@univ-amu.fr) ; [doriaboulghobra@gmail.com](mailto:doriaboulghobra@gmail.com) ; [jordan.bresciani@etu.univ-amu.fr](mailto:jordan.bresciani@etu.univ-amu.fr) ; [cyril.reboul@univ-avignon.fr](mailto:cyril.reboul@univ-avignon.fr) ; [monique.bernard@univ-amu.fr](mailto:monique.bernard@univ-amu.fr) ; [martine.desrois@univ-amu.fr](mailto:martine.desrois@univ-amu.fr)

This work was supported by Aix-Marseille Université, CNRS (UMR 7339) and France Life Imaging (ANR-11-INBS-0006). We further acknowledge funding from Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE17-0016 – COFLORES) and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM DBS20140930772).

## **Abstract**

Prediabetes is an important risk factor for type 2 diabetes and cardiovascular complications, such as myocardial infarction. However, few studies explore female sex in this context. Here, we aim to investigate the effects of high-fat high-sucrose diet on cardiac parameters and sensitivity to ischemia-reperfusion injury of female Wistar rats. Female Wistar rats received for 5 months normal diet (CTRL group) or high-fat high-sucrose diet (HFS group). Every month MRI was performed to follow myocardial morphology, function and perfusion; cardiac and hepatic triglyceride content; and amount of sub-cutaneous and visceral adipose tissues. Then, *ex vivo* experiments were performed on isolated perfused hearts to evaluate tolerance to ischemia-reperfusion, with simultaneous measurement of energy metabolism by <sup>31</sup>P MRS and contractile function. Coronary flow was measured before and after ischemia. At the end of the experiments, hearts were freeze-clamped for biochemical assays. Five months of high-fat high-sucrose diet induced a prediabetic condition in female Wistar rats, associated with an increase in myocardial perfusion, systolic and diastolic wall thickness. HFS rats also exhibited higher sensitivity to ischemia-reperfusion injury in comparison to controls, characterized by impaired cardiac function, energy metabolism and endothelial function. Biochemical analyses in hearts highlighted eNOS uncoupling, higher malondialdehyde level and lower S-Glutathionylation of proteins in HFS rats, indicating higher oxidative stress. Prediabetes induced by energy-dense diet was associated with modification of cardiac morphology and higher myocardial sensitivity to ischemia-reperfusion injury. These results may be related to the high risk of cardiovascular complications among type 2 diabetic women.

**Key words:** Prediabetes; High-fat high-sucrose diet; Female gender; Cardiac MRI; Ischemia-reperfusion; Oxidative stress.

## **1. Introduction**

Type 2 diabetes is worldwide recognized as a public healthcare issue affecting 425 million of people [1]. The leading cause of mortality and morbidity in type 2 diabetic patients remains cardiovascular (CV) complications. Interestingly, type 2 diabetes leads to CV complications [2] and mortality [3] more frequently in women than men. The risk of myocardial infarction is indeed 5 times higher in diabetic women than in non-diabetic women, whereas this risk increases only twice in men [2]. However, until now, only a small number of studies focus on female sex.

Prediabetes, a condition characterized by increased fasting plasma glucose and/or intolerance to glucose, is also related to an increase of type 2 diabetes and CV risk [4]. Recently, the Maastricht study showed that there are already sex differences in CV risk before the onset of type 2 diabetes, with more adverse cardiometabolic profile in prediabetic women [5]. During the transition from normoglycemia to impaired fasting glucose and type 2 diabetes, women present higher levels of endothelial factors and fibrinolytic / thrombotic factors than men, leading to greater endothelial dysfunction and insulin resistance [6]. The risk of heart and coronary disease is also higher at lower glucose levels in women [7]. Factors such as oxidative stress, inflammation, dyslipidemia and mitochondrial dysfunction can contribute to endothelial dysfunction, to microvascular and macrovascular damage, leading to CV complications [8]. Prediabetes is often associated with other risk factors of type 2 diabetes and CV diseases, such as abdominal obesity, hypertriglyceridemia, low HDL-cholesterol and raised blood pressure, clustered as metabolic syndrome (MetS) [9]. MetS is a strong predictor of the onset of type 2 diabetes with a higher risk of 52%. MetS could be responsible for 17% of CV events and 7 % of death by CV disease [10] and contributes to the increase by 78% of CV risk and death in MetS patients [11]. Therefore, more studies are needed to better understand prediabetic and metabolic syndrome conditions leading to higher CV risk in type 2 diabetes, particularly in women. As prediabetes and metabolic syndrome are strongly associated with obesity [12], it becomes clear that our environment and life habits play an important role in the disease pathogenesis. The increased intake of western diet and the decrease of physical activity combined with genetic predisposition have strongly contributed to appearance and spreading of MetS [13]. Thus, energy-dense-diet-induced animal model could help us explore CV complications of prediabetes and MetS conditions.

The first objective of our study was to investigate the effect of a high-fat high-sucrose diet on cardiac morphology and function in parallel to the development of prediabetes in female rats, with a longitudinal follow-up *in vivo* using magnetic resonance imaging (MRI) and spectroscopy (MRS). The second objective was to assess the impact of high-fat high-sucrose diet on the sensitivity of heart during an ischemia-reperfusion injury, in which we combined measurement of myocardial and endothelial function with simultaneous evaluation of energy metabolism using <sup>31</sup>P MRS. Finally, at the end of the experiments, we have explored cellular integrity, nitric oxide (NO) pathway, apoptosis and oxidative stress in the myocardial tissue to probe further into the molecular mechanisms induced by high-fat high-sucrose diet. To our knowledge, this is the first study to consider cardiac longitudinal follow-up and tolerance to



ischemic insult in prediabetic female rats under high-fat high-sucrose diet, using MRI and MRS combined with biochemical analyses.

## **2. Materials and Methods**

For details, see Supplementary Material.

### **2.1 Animal model**

Seven-week-old female Wistar rats (around 170 g, Charles River, France) (n=20) were housed in a ventilated rack cabinet, with controlled temperature (22-24°C) and multiple environmental enrichments. All procedures involving animals were approved by the Animal experiment ethic committee of the University (APAFIS#10547-2017071009112930) and were performed in conformity with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes. Animals had access to food and water *ad libitum*. Female Wistar rats were divided randomly in two groups of 10: The control group (CTRL) was fed with standard diet (SAFE, A04C-10); and the HFS group was fed with high-fat high-sucrose diet (SAFE, U8978 v19; composition detailed in Table 1). Rats received diets for five months, and weight and food intake were measured every week. Food efficiency was calculated as the ratio of weight gain on food intake over the 5 months of diet.

### **2.2 Study design**

The experimental protocol is summarized in Figure 1. At 7 weeks of age, twenty female rats underwent an initial MRI/MRS investigation (T0). They were randomized into two groups (CTRL and HFS), and an MRI/MRS exam was performed on all rats every month. After 5 months of diet, they underwent an intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) to evaluate their metabolic status, and arterial blood pressure (BP) was measured. After sacrificing the animals, *ex vivo* experiments on isolated perfused heart were performed to assess myocardial function and tolerance to ischemia-reperfusion injury. At the end of the experiments, hearts were freeze-clamped for biochemical analyses.

### **2.3 Magnetic Resonance Imaging (MRI) and Spectroscopy (MRS) investigations**

The MRI and MRS examinations were performed to evaluate *in vivo* cardiac morphology, cardiac function, myocardial perfusion, cardiac and hepatic triglycerides (TG) content and the amount of visceral (VAT) and subcutaneous (SCAT) adipose tissue in the body. All acquisitions

were performed using a Bruker Biospec Avance MR system equipped with a 4.7 Tesla magnet (Bruker, Ettlingen, Germany) and a proton volume resonator (diameter 60 mm; homogeneous length 80 mm).

Before the experiments, rats were sedated by inhalation of 3.5% isoflurane. During MRI/MRS investigations, anesthesia was maintained at 1.5-2.5% isoflurane in 1 L/min pure oxygen-flow to obtain regular breathing at a rate of around 70 breaths per minute. Respiration, ECG signal and temperature were monitored during the whole procedure.

Every month, an ECG-gated gradient-echo cine-MRI sequence (cine-FLASH) was used for the assessment of myocardial mass and function [14]. *In vivo* myocardial perfusion was quantified using the Arterial Spin Labeling (ASL) technique [15]. At 5 months, cardiac and hepatic <sup>1</sup>H MR spectra were acquired for TG assessment using an ECG- and respiratory-gated Point-Resolved Spectroscopy (PRESS) sequence [16]. The TG/water signal ratio was calculated to obtain TG concentration. For a quantitative map of adipose tissue distribution, whole-body scanning was performed. Sixty-four contiguous axial imaging slices were selected across the animal body length excluding the tail [17, 18]. After each experiment, animals were kept alone under infrared light during wakefulness.

#### **2.4 Intra-peritoneal Glucose Tolerance Test (IPGTT) and Blood Pressure assessment at T5 months**

An IPGTT was performed after 6 hours of fasting to evaluate glucose homeostasis. Glycemia was measured before and 15, 30, 60, 90, 120 minutes after injection of a bolus of glucose, using ACCU-CHEK Performa Nano Glucometer (Roche, Switzerland).

BP was recorded non-invasively by the tail cuff method (Bioseb, Chaville, France) [19].

#### **2.5 Isolated perfused heart preparation and tolerance to ischemia-reperfusion injury**

Rats were anesthetized by intraperitoneal injection of 90mg/kg pentobarbital sodium. Hearts were cannulated and perfused in the Langendorff mode at constant pressure as described previously [20].

### **2.5.1 Experimental protocol**

After stabilization, hearts were perfused for 24 minutes with a physiological Krebs-Henseleit buffer containing 0.4 mM palmitate, 3% albumin, 11 mM glucose, 3U/L insulin, 0.8 mM lactate and 0.2 mM pyruvate. Before low-flow ischemia, they were perfused with physiological Krebs-Henseleit buffer containing 1.2 mM palmitate and then underwent a low-flow ischemia (0.5 mL/min/g wet wt) of 32 minutes with the same buffer. A higher concentration of palmitate (1.2 mM) was provided during ischemia to cause maximal damage during ischemia and reperfusion [21]. Finally, flow was restored entirely for 32 minutes with the physiological Krebs-Henseleit buffer containing 0.4 mM palmitate. This protocol was previously reported to provide sufficient level of ischemia in a type 2 diabetic animal model [20].

### **2.5.2 Evaluation of myocardial function and energy metabolism**

A water-filled latex balloon was inserted in the left ventricle to record developed left ventricular pressure (DP) and heart rate (HR) [22]. The product of DP and HR (in mmHg/min) was used as an index of myocardial function. Coronary flow (CF) was measured by collection of coronary effluent before and after ischemia (at 20 minutes and 80 minutes of protocol). CF is expressed in mL/min/g wet weight.

Energy metabolism was evaluated as previously described [23]. Briefly, perfused rat hearts were placed in a 20-mm magnetic resonance sample tube and inserted in a 4.7 Tesla magnet (Oxford instruments, Oxford, UK) interfaced with a Bruker-Nicolet Avance WP-200 spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany). A series of eight <sup>31</sup>P NMR spectra were recorded during every period of the experimental protocol to quantify phosphorus metabolite signals (ATP, PCr and Pi) and intracellular pH.

### **2.6 Dissection and collection of samples**

VAT, SCAT, tibia and blood were collected for evaluation of physiological parameters. At the end of the experiments, hearts were freeze-clamped in liquid nitrogen with a Wollenberger clamp and kept at -80°C for subsequent analysis.

### **2.7 Biochemical analyses**

In plasma, assay kits were used to determine glucose (Randox Laboratories, Crumlin, Antrim UK), Free Fatty Acids (FFAs) (NEFA kit; Roche Diagnostics, Roche Applied Science,

Mannheim, Germany), TG (Abcam, ab 65336), HDL- and LDL-Cholesterol (Abcam, ab 65390).

In freeze-clamped hearts, cellular integrity was evaluated by measurement of creatine kinase (CK) (CK-NAC, Randox Laboratories, Crumlin, UK) and lactate dehydrogenase (LDH) activities [23]; apoptosis with expression of cleaved caspase-3 by Western Blot [24]; NO pathway with the expression of total eNOS (endothelial NO synthase), P-eNOS (phosphorylated on Ser1177) and eNOS dimer-to-monomer ratio (eNOS d/m) by Western Blot [25, 26]; proteins post-translational modification with evaluation of S-Glutathionylation by Western Blot; and oxidative stress with assessment of Malondialdehyde (MDA), an index of lipid peroxidation, with the lipid peroxidation assay kit (MAK085, Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

## **2.8 Expression of results and statistical analyses**

Data are graphically provided as mean  $\pm$  SEM of absolute values. Graph Pad Prism software 5.0 (La Jolla, CA) was used for all statistical processing. Significant differences between groups were determined using two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures over time for the time-dependent variables followed by Bonferroni post-hoc test. An unpaired Student's *t*-test was used for the other parameters. Correlation analyses were also performed between imaging and other parameters. A *p* value of less than or equal to 0.05 was considered to indicate significant difference.

## **3. Results**

### **3.1 Effect of high-fat high-sucrose diet on physiological parameters**

Physiological parameters are summarized in Table 2. Food intake was significantly lower in HFS versus CTRL during the whole diet ( $p < 0.0001$ ), while calorie intake and food efficiency were significantly increased (respectively  $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ ). After 5 months of diet, the weight and the lean mass of animals was not different between groups, and neither systolic or diastolic arterial blood pressure. However, fat mass percentage was significantly higher in HFS vs. CTRL. Amount of VAT and SCAT measured by MRI was significantly higher at T5 ( $p = 0.014$  and  $p = 0.01$ , respectively), as well as VAT measured by dissection ( $p < 0.05$  vs. CTRL;  $p = 0.08$  for SCAT) in HFS vs. CTRL. Measurement by MRI and dissection were strongly correlated (VAT,  $r = 0.98$ ; SCAT,  $r = 0.90$ ). The percentage of cardiac TG was not different

between groups, but the percentage of hepatic TG was significantly higher in HFS vs. CTRL at T5 ( $p < 0.001$ ). Heart weight-to-tibia-length ratio was similar in both groups. Plasma FFAs and fasting plasma glucose were significantly higher in HFS compared with CTRL ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  respectively). No difference was found in plasma TG and HDL-Cholesterol, but LDL-Cholesterol was significantly higher in HFS compared with CTRL ( $p < 0.05$ ). The IPGTT highlighted a significant glucose intolerance in HFS compared with CTRL ( $p < 0.01$ ).

### **3.2 Effect of high-fat high-sucrose diet on cardiac morphology, perfusion and function**

The effects of high-fat high-sucrose diet on cardiac parameters are shown in Figure 2. The high-fat high-sucrose diet led to thickening of the myocardial wall in both diastole ( $p < 0.01$ , Figure 2A) and systole ( $p < 0.01$ , Figure 2B), and to increased left ventricular mass ( $p < 0.05$ , Figure 2C) starting at the 3<sup>rd</sup> month of diet in HFS vs. CTRL. Myocardial perfusion (Figure 2D) was significantly increased in HFS ( $p < 0.01$ ) from T2 month vs. CTRL. However, the high-fat high-sucrose diet had no effect on cardiac function parameters (supplemental material) compared to CTRL.

### **3.3 Effect of high-fat high-sucrose diet on myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury**

#### **3.3.1 *Ex vivo* myocardial function and coronary flow**

Myocardial function (Figure 3A) evaluated by the product of DP and HR was significantly lower in baseline conditions ( $p < 0.05$ ) and during reperfusion ( $p < 0.01$ ) in HFS vs. CTRL. The percentage of recovery, expressed as percentage of control values, was significantly lower in HFS compared with CTRL ( $53 \% \pm 6 \%$  vs.  $29 \% \pm 6 \%$ ;  $p < 0.05$ ) during reperfusion. CF was not different between groups in baseline conditions (Figure 3B). However, CF was significantly lower in HFS vs. CTRL during reperfusion ( $p < 0.05$ ) (Figure 3C).

#### **3.3.2 *Ex vivo* energy metabolism and intracellular pH (pHi)**

Figure 4 shows kinetics of PCr (A), ATP (B), Pi (C) and pHi (D) during the ischemia-reperfusion protocol. During the control period, no difference in PCr, ATP and Pi content was found between the two groups. During ischemia, PCr and ATP were significantly decreased in HFS compared with CTRL ( $p < 0.05$ ) and Pi was similar in both groups. During reperfusion, PCr and ATP were significantly decreased, and Pi was significantly increased in HFS vs. CTRL

(respectively  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  and  $p < 0.05$ ). pH<sub>i</sub> was similar in both groups during the whole protocol.

### **3.3.3 Biochemical analyses in freeze-clamped hearts**

At the end of the *ex vivo* experiments, we studied NO pathway involved in the endothelial function. The expression of total eNOS and P-eNOS (Figures 5A and 5B) was similar between CTRL and HFS. However, we found an increase of uncoupled eNOS (inactive form) in HFS, characterized by significantly lower eNOS dimer-to-monomer ratio (Figure 5C) in comparison to CTRL ( $p < 0.01$ ), indicating an impaired endothelial function. Total S-Glutathionylation (Figure 5D) of proteins was decreased ( $p = 0.052$ ) in HFS compared with CTRL, indicating a potentially diminished protection against oxidative stress. S-Glutathionylation of eNOS (Figure 5E) was similar between groups. Malondialdehyde, a lipid peroxidation marker, was significantly increased in HFS vs. CTRL ( $p < 0.05$ ;  $90.4 \pm 6.3$  vs.  $73.4 \pm 4.7$  nmol/g).

Myocardial CK and LDH activities as markers of cellular integrity were similar in CTRL ( $11.03 \pm 0.44$  and  $3.97 \pm 0.28$  U/mg protein) and HFS ( $10.65 \pm 0.55$  and  $3.97 \pm 0.25$  U/mg protein) groups after ischemia-reperfusion injury. In both groups, the active form of caspase-3 protein, was not expressed in hearts (data not shown) suggesting absence of apoptosis.

### **3.4 Correlation analyses**

Correlation analyses are shown in Figure 6. FFAs, intrahepatic TG and percentage of functional recovery during reperfusion were correlated with the amount of VAT measured by MRI (respectively  $r^2 = 0.68$ ;  $r^2 = 0.88$  and  $r^2 = 0.46$ ).

## **4. Discussion**

The aim of this study was to investigate the effects of long-term high-fat high-sucrose diet-feeding i) on the development of prediabetes and/or metabolic syndrome (MetS), ii) on cardiac parameters and iii) on myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in female Wistar rats. Here, the emergence of a prediabetic state combined with metabolic disturbances has led to cardiac remodeling characterized by thickening of the myocardial wall, and to increased myocardial perfusion. High-fat high-sucrose diet also decreased the sensitivity of the heart to ischemia-reperfusion injury characterized by an impairment of cardiac function, energy metabolism and endothelial function. Finally, biochemical analyses in heart tissue highlighted

eNOS uncoupling, decreased S-Glutathionylation of proteins and increased MDA in HFS compared with CTRL, indicating exacerbated oxidative stress.

Diet-induced models appear to be one of the best strategies to study prediabetic and MetS conditions associated with CV complications. In 2016, Wong et al. reviewed the different existing types of diet [27]. To get closer to human disease, Panchal et al. suggested to use a combination of fat- and carbohydrate-enriched diet, which groups a maximum of criteria and leads to cardiac dysfunction and hypertrophy in rats after 16 weeks of diet [28]. Here we used high-fat high-sucrose diet containing 19.4% of protein, 35.8% of fat and 32.1% of carbohydrate. After five months of diet, animals displayed the typical characteristics for diagnosis of prediabetes (higher fasting glucose and lower glucose tolerance), which were associated with metabolic disturbances that could lead to MetS and type 2 diabetes. While many studies [29] showed increased body weight in animals under various high-fat diets, we found that the weight of female HFS rats was not significantly increased in comparison with the control group. Aubin et al. reported the same observation in their study on female Sprague Dawley rats fed with HFD for 8 weeks [30]. Nishikawa et al. suggested that the female sex could be more resistant to high-fat diet-induced obesity, which could explain our results [31]. Also, food intake was lower in HFS rats, possibly because the high-fat high-sucrose diet was more caloric. Consistent with this explanation, an increase of serum leptin, the hormone regulating satiety, has been previously reported in rats under high-fat diet [32]. Despite a possible regulatory mechanism via leptin, HFS animals had a higher caloric intake leading to abdominal obesity. Indeed, HFS rats did not display weight gain but MRI and dissection highlighted an abdominal obesity with significant increase of fat mass percentage (of both VAT and SCAT). Multiple human studies have shown that waist circumference, an indicator of abdominal obesity, is more representative of total body fat than BMI [33]. Interestingly, the amount of VAT was correlated with changes in plasma FFAs and hepatic TG content. Moreover, VAT was also correlated to the percentage of functional recovery after ischemia-reperfusion injury. These observations confirm that the anatomical distribution of excess fat is closely related to the occurrence of cardiovascular and metabolic complications [34], even in subject with normal weight [35]. Expansion and dysfunction of visceral adipose tissue both result in the release of fatty acids into the circulation and in ectopic fat deposition in organs like heart, liver or pancreas [36]. Here, we found an increase in plasma free fatty acids and LDL-cholesterol associated with an increase in intrahepatic TG content. The increase in myocardial TG content seems to occur later than the increase of hepatic TG content, as shown in male mice under high-fat high-sucrose diet [17].

This may explain why we found no difference between groups regarding cardiac TG content in this study. Finally, in this model we would expect an increase in arterial blood pressure, as described by Aubin et al. in female high-fat fed rats [30]. Here, only a non-significant tendency to elevated systolic and diastolic blood pressures was observed in the HFS group, warranting further investigation on a larger animal group.

The combination of these risk factors predisposes women to CV complications. As shown by Levitzky et al. the risk of CV disease at lower glucose levels is higher in women than in men [7]. However, the mechanisms involved are not yet fully understood, and literature studies on female sex are scarce. Here, we followed female rats over months using cardiac MRI and observed multiple cardiac abnormalities. First, cardiac morphology was modified starting at the third month of diet with an increased myocardial wall thickness in systole and diastole. Left ventricular mass evaluated by MRI was increased at three and four months of high-fat high-sucrose diet. Concentric remodeling may occur, for example, as a result of pressure overload (such as high blood pressure or aortic stenosis) whether or not there is ventricular hypertrophy (defined as an increase in mass) [37]. Cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibrosis [37] could also explain the cardiac remodeling found here. However, we note that heart weight to tibia length ratio obtained *ex vivo* was not significantly higher in HFS compared to CTRL. We attribute this apparent inconsistency to the difference in methodology of measurement *in vivo* and *ex vivo*. MRI evaluation of hypertrophy was based on an ellipsoid model [14] evaluating the left ventricle only. *Ex vivo*, we measured the weight of the entire heart just before cannulation, i.e. without potential biases by blood pressure and circulation. Dedicated histology experiments may help confirm this result in future studies.

Left-ventricular cardiac function parameters evaluated by MRI were not different in female rats submitted to high-fat high-sucrose diet for 5 months compared with CTRL, whereas *ex vivo* basal cardiac function was significantly weaker. The *in vivo* cardiac function measurements reflect dynamic volume measurements whereas *ex vivo* function reflects pressure developed during contraction. Also, *ex vivo* cardiac function is not submitted to the effective regulations and demands *in vivo*. A similar difference between *in vivo* and *ex vivo* cardiac function was found by Cole et al., who found normal cardiac function *in vivo* in rats submitted to high-fat diet but 21% decreased cardiac efficiency *ex vivo* compared with controls [38]. They related the lower cardiac efficiency to an increase in myocardial oxygen consumption. In our study, along with cardiac function we monitored myocardial perfusion *in vivo*, which may be linked to oxygen consumption. Interestingly, myocardial perfusion was significantly higher in HFS



vs. CTRL, despite normal *in vivo* cardiac function, consistent with the study by Cole et al. We thus hypothesized that HFS hearts needed higher capillary blood flow to produce the same work indicating decreased cardiac efficiency. Moreover, increased myocardial perfusion might be a transient condition found in prediabetic animals [39]. In fact, a previous study in our laboratory showed decreased myocardial perfusion in type 2 diabetic male mice under high-fat high-sucrose diet [17]. Also, Iltis et al. showed defective myocardial blood flow in 8-13 months type 2 diabetic GK rats [40]. Then, it would be interesting to test this diet over a longer period to evaluate whether myocardial perfusion decreases below normal values at later stages in this model as well. Another study in type 1 diabetic patients reported higher myocardial perfusion at rest than in healthy controls [41]. Finally, it is well known that myocardial perfusion can be modified by isoflurane concentration, temperature or heart rate, and that perfusion values likely reflect partial vasodilation [42]. However, these parameters were monitored during the MRI exam and were not different between the groups (data not shown).

In summary, 5 months of high-fat high-sucrose diet induced modification of cardiac morphology and efficiency. Using the ischemia-reperfusion *ex vivo* protocol, we further found higher sensitivity to ischemia-reperfusion injury in HFS compared with CTRL, characterized by a significant decrease in myocardial function and energy metabolism during reperfusion. Under physiological conditions mitochondria play a fundamental role in oxidative catabolism leading to the production of energy in the form of ATP. Multiple mitochondrial impairments could be responsible for lower energy metabolism. Among these are mitochondrial uncoupling [38], decreased expression of mitochondrial respiratory chain complex or increased ROS production. Moreover, a loss of nucleotide precursors limiting ATP repletion during reperfusion could contribute to our observation. Because these alterations may be correlated with oxidative stress, we particularly focused on myocardial MDA content as lipid peroxidation marker, which was significantly higher in HFS vs. CTRL. Pakdechote et al. have previously reported higher vascular superoxide production as well as higher MDA levels in plasma in metabolic syndrome rats [43]. Poudyal et al. also showed lowered capacity to neutralize free radicals characterized by the decrease of antioxidant capacity [29]. Finally, ischemia and mostly reflow are well-known to induce high oxidative stress, which is exacerbated here by the 5-month high-fat high-sucrose diet. We also assessed the S-Glutathionylation of proteins, which is the reversible addition of glutathione to cysteine residues inactivating the target proteins [44], and which could be involved in CV complications [45]. Protein S-Glutathionylation occurs mainly at the beginning of reflow in an ischemia-reperfusion protocol and has been shown to be increased in

some studies. For example, De Pascali et al. showed an increase in eNOS S-Glutathionylation during ischemia-reperfusion injury in endothelial cells [46]. However, Belcastro et al. explained that S-Glutathionylation can also be a protective mechanism coping with irreversible oxidation [45]. This would explain the lower rate of S-Glutathionylation found here in HFS vs. CTRL. We have shown that S-Glutathionylation of all the proteins was significantly decreased in HFS compared with CTRL, but we found no difference in specific S-Glutathionylation of eNOS. Here, we suggest that S-Glutathionylation was decreased by high-fat high-sucrose diet, leading to higher level of damage by oxidative stress in hearts. This result was consistent with the higher MDA heart content mentioned before.

Prediabetes and MetS increase the risk of cardiovascular events and have a deleterious impact on endothelial function with enhanced coronary artery disease prevalence [47]. Altered vasodilatation has been previously described. Poudyal et al. showed lower vascular response to noradrenaline, acetylcholine and sodium nitroprusside in a MetS model [29] while Senaphan et al. found decreased eNOS expression in mesenteric arteries [48]. Here, no significant difference was found in coronary flow before ischemia. During reperfusion, however, coronary flow was significantly impaired in HFS vs. CTRL, indicating higher sensitivity of coronary arteries to ischemia-reperfusion injury. We found no difference between the groups concerning the expression of total eNOS or its phosphorylated form. However, we found higher eNOS uncoupling in HFS compared with CTRL, with a lower dimeric (active) form of eNOS and a higher monomer form of eNOS in hearts, indicating that high-fat high-sucrose diet impaired eNOS activity. eNOS uncoupling is known to be responsible for the increase in superoxide anion  $O_2^{\cdot-}$  production instead of NO [49].  $O_2^{\cdot-}$  is highly deleterious for the cells and can also react with NO to form peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot-}$ ), making it less available for endothelial function.  $ONOO^{\cdot-}$  has been shown to inhibit mitochondrial respiratory chain complex [50]. During reperfusion this phenomenon is amplified because the free electrons couple to oxygen to form  $O_2^{\cdot-}$ . Moreover, patients with MetS show lower levels of superoxide dismutase able to handle superoxide anion [51]. Endothelial function also seems to be a key point in cardiac complications of type 2 diabetes. Desrois et al. showed endothelial impairment in female Goto-Kakizaki rats, with lower coronary flow and reduced up-regulation of the NO pathway [22]. Zhang et al. revealed a predisposition of females to vascular lesions after induction of diabetes, in the mesenteric arteries [52] and the aorta [53]. Thus, endothelial dysfunction found in our model of prediabetes could be related to the higher cardiovascular risk in prediabetic and type 2 diabetic women.

As a perspective, it would be interesting to measure plasma hormones in order to fully elucidate their role in high-fat high-sucrose diet-induced cardiovascular modifications. Baseline cardiac function differs between sexes in terms of heart rate, systolic output, ejection fraction [54]. Studies on rodents [55] have shown that cardiac myocytes of male rats contract stronger and faster than the myocytes of female rats. Estrogen receptors (ER $\alpha$  and  $\beta$ ) are both found in cardiomyocytes and may have a strong impact on cardiovascular function [56]. Estrogens have been shown to protect the heart from ischemic injury [57]. The loss of estrogens also leads to aggravation of mitochondrial dysfunction, inflammation and cardiac remodeling [58]. Sex hormones could also explain the differences found in endothelial function, as reported by Khalil et al., who showed that estrogen might directly stimulate NO production in women [59]. Interestingly, Al-Mulla et al reported a decrease in estrogens and an increase in testosterone levels in the GK rat model [60]. However, in a model of high-fat diet, Chakraborty et al. reported an increase in estradiol level with high-fat diet [61]. In addition, assessing the cytokine profiles in HFS rats could help us understand diet-induced metabolic and structural changes that occur before ischemia-reperfusion injury. Indeed, Pakdeechote et al. reported higher plasma TNF $\alpha$  and increased expression of iNOS in aorta of rat with diet-induced metabolic syndrome [43]. In future studies it would also be interesting to have dedicated groups for histology investigations. Previous studies showed that 16 weeks of high-carbohydrate high-fat diet could induce cardiomyocyte hypertrophy, as well as left ventricular interstitial collagen deposition and inflammatory cell infiltration in rat hearts [29, 37, 62]. Finally, dietary interventions could prevent cardiac changes observed in prediabetic female rats. Abdurrachim et al. showed that intermittent fasting could delay the progression of left ventricular hypertrophy and prevent cardiac dysfunction in prediabetic obese spontaneous hypertensive heart failure rats, by modulating cardiac substrate metabolism [63]. Alam et al. showed for example that chronic L-Arginine treatment improved metabolic, cardiovascular and liver complications in diet-induced obesity in rats [62]. We also believe that an antioxidant approach would be of great interest in our context. For example, Resveratrol, a polyphenol, well-known for its anti-oxidant property, can protect the heart of high-fat fed rats [64].

## **5. Limitation of the study**

One limitation of our study might be the absence of male groups, which could help us demonstrate sex-specific response to high-fat high-sucrose diet on cardiovascular alterations. However, we believe this is an original study on female sex which is little explored in the

literature. Indeed, most of the studies use male population only, although type 2 diabetic women have a higher cardiovascular risk than type 2 diabetic men. Here, our objective was to study the female population by performing a longitudinal follow-up at the beginning of the disease and to observe the early adaptation of the heart to prediabetes. It brings new insights on cardiovascular complications in female rats during the development of prediabetes, with increased myocardial perfusion as well as high sensitivity to ischemia-reperfusion injury via impaired energy metabolism, S-Glutathionylation and eNOS uncoupling.

## **6. Conclusion**

To our knowledge, this is the first study combining a longitudinal cardiac MRI follow-up with an assessment of tolerance to ischemic insult in prediabetic female rats under high-fat high-sucrose diet. In female rats, prediabetes led to myocardial adaptation over months characterized by thickening of the myocardial wall and increase in myocardial perfusion. It also led to higher cardiac sensitivity to ischemia-reperfusion injury. Oxidative stress seems to be at the intersection of the pathways elucidated here, as shown in Figure 7. Oxidative stress, induced by ischemia-reperfusion, was exacerbated under high-fat high-sucrose diet. Here, it might be responsible for i) cardiac dysfunction via impaired energy metabolism with altered ATP and PCr production during ischemia-reperfusion injury, ii) endothelial dysfunction via eNOS uncoupling and decreased NO bioavailability leading to lower coronary flow, and iii) decrease of protective protein S-Glutathionylation mechanism. This work provides insights that may contribute to understanding the cardiovascular complications related to prediabetes and type 2 diabetes in the female sex.

## **Declarations**

**Author's contribution:** All the authors participated substantially in the investigations reported here as indicated : N.F contributed to design, performed the experiments, data analysis and wrote the paper; C.L contributed to experiments; F.K contributed to interpretation of the overall study and manuscript writing; D.B, C.R and J.B contributed to biochemical analyses; M.B and M.D contributed to design, interpretation of the overall study and manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

**Acknowledgements:** We thank Sandrine Gayrard and Sydney Risdon from LaPEC and Dr Michel Grino from NORT for their technical support.

**Funding:** This work was supported by Aix-Marseille Université, CNRS (UMR 7339) and France Life Imaging (ANR-11-INBS-0006). We further acknowledge funding from Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE17-0016 – COFLORES) and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM DBS20140930772). Funding was not involved in study design; in collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

**Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.

### **List of abbreviations**

CF: Coronary Flow, CK: Creatine Kinase, CV: Cardiovascular, DP: Developed Pressure, eNOS: Endothelial NO Synthase, P-eNOS: Phosphorylated form of eNOS, HR: Heart Rate, LDH: Lactate Dehydrogenase, MDA: Malondialdehyde, MetS: Metabolic Syndrome, MRS: Magnetic Resonance Spectroscopy, NO: Nitric Oxide, ONOO<sup>-</sup>: Peroxynitrite, SCAT: Subcutaneous Adipose Tissue, TG: Triglycerides, VAT: Visceral Adipose Tissue.

### **References**

- [1] Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 2018;138:271-81. 10.1016/j.diabres.2018.02.023.
- [2] Huxley R, Barzi F and Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *BMJ : British Medical Journal* 2006;332:73-8. 10.1136/bmj.38678.389583.7C.
- [3] Wannamethee S, Papacosta O, Lawlor D, Whincup P, Lowe G, Ebrahim S, et al. Do women exhibit greater differences in established and novel risk factors between diabetes and non-diabetes than men? The British Regional Heart Study and British Women's Heart Health Study. *Diabetologia* 2012;55:80-7.
- [4] Grundy SM. Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:635-43. 10.1016/j.jacc.2011.08.080.
- [5] Veugen M, Onete V, Koster A, Dagnelie P, Schaper N, van der Kallen C, et al. 54(th) EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes : Berlin, Germany, 1 - 5 October 2018. *Diabetologia* 2018;61:1-620. 10.1007/s00125-018-4693-0.
- [6] Donahue RP, Dorn JM, Stranges S, Swanson M, Hovey K and Trevisan M. Impaired fasting glucose and recurrent cardiovascular disease among survivors of a first acute myocardial infarction: evidence of a sex difference? The Western New York experience. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD* 2011;21:504-11. 10.1016/j.numecd.2009.11.012.
- [7] Levitzky Y, Pencina M, D'Agostino R, Meigs J, Murabito J, Vasan R, et al. Impact of impaired fasting glucose on cardiovascular disease: the Framingham Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:264-70.

- [8] Huang D, Refaat M, Mohammedi K, Jayyousi A, Al Suwaidi J and Abi Khalil C. Macrovascular Complications in Patients with Diabetes and Prediabetes. *Biomed Res Int* 2017;2017:7839101. 10.1155/2017/7839101.
- [9] Alberti K, Eckel R, Grundy S, Zimmet P, Cleeman J, Donato K, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2008;120:1640-5.
- [10] Ford E. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care* 2005;28:1769-78.
- [11] Hu G, Qiao Q, Tuomilehto J, Balkau B, Borch-Johnsen K, Pyorala K, et al. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. - PubMed - NCBI. *Archives of Internal Medicine* 2004;164:1066-76.
- [12] Mainous AG, 3rd, Tanner RJ, Jo A and Anton SD. Prevalence of Prediabetes and Abdominal Obesity Among Healthy-Weight Adults: 18-Year Trend. *Ann Fam Med* 2016;14:304-10. 10.1370/afm.1946.
- [13] Wagner A, Dallongeville J, Haas B, Ruidavets JB, Amouyel P, Ferrières J, et al. Sedentary behaviour, physical activity and dietary patterns are independently associated with the metabolic syndrome. *Diabetes & Metabolism* 2012;38:428-35. 10.1016/j.diabet.2012.04.005.
- [14] Kober F, Iltis I, Cozzone P and Bernard M. Cine-MRI assessment of cardiac function in mice anesthetized with ketamine/xylazine and isoflurane. *MAGMA* 2004;17:157-61. 10.1007/s10334-004-0086-0.
- [15] Kober F, Iltis I, Izquierdo M, Desrois M, Ibarrola D, Cozzone P, et al. High-resolution myocardial perfusion mapping in small animals in vivo by spin-labeling gradient-echo imaging. *Magnetic Resonance in Medicine* 2004;51:62-7. 10.1002/mrm.10676.
- [16] Gaborit B, Kober F, Jacquier A, Moro PJ, Cuisset T, Boullu S, et al. Assessment of epicardial fat volume and myocardial triglyceride content in severely obese subjects: relationship to metabolic profile, cardiac function and visceral fat. *International Journal of Obesity (2005)* 2012;36:422-30. 10.1038/ijo.2011.117.
- [17] Abdesselam I, Pepino P, Troalen T, Macia M, Ancel P, Masi B, et al. Time course of cardiometabolic alterations in a high fat high sucrose diet mice model and improvement after GLP-1 analog treatment using multimodal cardiovascular magnetic resonance. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance: Official Journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 2015;17:95. 10.1186/s12968-015-0198-x.
- [18] Mattei J, Fur Y, Cuge N, Guis S, Cozzone P and Bendahan D. Segmentation of fascias, fat and muscle from magnetic resonance images in humans: the DISPIMAG software. *MAGMA* 2006;19:275-9.
- [19] Achard V, Sanchez C, Tassistro V, Verdier M, Alessi M and Grino M. Immediate Postnatal Overfeeding in Rats Programs Aortic Wall Structure Alterations and Metalloproteinases Dysregulation in Adulthood. *Am J Hypertens* 2016;29:719-26.
- [20] Desrois M, Clarke K, Lan C, Dalmasso C, Cole M, Portha B, et al. Upregulation of eNOS and unchanged energy metabolism in increased susceptibility of the aging type 2 diabetic GK rat heart to ischemic injury. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2010;299:H1679-86. 10.1152/ajpheart.00998.2009.
- [21] Lopaschuk G. Alterations in fatty acid oxidation during reperfusion of the heart after myocardial ischemia. *The American Journal of Cardiology* 1997;80:11A-6A.

- [22] Desrois M, Lan C, Movassat J and Bernard M. Reduced up-regulation of the nitric oxide pathway and impaired endothelial and smooth muscle functions in the female type 2 diabetic goto-kakizaki rat heart. *Nutrition & Metabolism* 2017;14:6. 10.1186/s12986-016-0157-z.
- [23] Desrois M, Sciaky M, Lan C, Cozzone PJ and Bernard M. L-arginine during long-term ischemia: effects on cardiac function, energetic metabolism and endothelial damage. *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 2000;19:367-76.
- [24] Huffman L, Koch S and Butler K. Coronary effluent from a preconditioned heart activates the JAK-STAT pathway and induces cardioprotection in a donor heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H257-62.
- [25] Farah C, Kleindienst A, Bolea G, Meyer G, Gayraud S, Geny B, et al. Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *Basic Research in Cardiology* 2013;108:389.
- [26] Kleindienst A, Battault S, Belaidi E, Tanguy S, Rosselin M, Boulghobra D, et al. Exercise does not activate the  $\beta 3$  adrenergic receptor-eNOS pathway, but reduces inducible NOS expression to protect the heart of obese diabetic mice. *Basic Research in Cardiology* 2016;111:40. 10.1007/s00395-016-0559-0.
- [27] Wong SK, Chin K-Y, Suhaimi FH, Fairus A and Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutrition & Metabolism* 2016;13:65. 10.1186/s12986-016-0123-9.
- [28] Panchal SK and Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2011;2011:351982. 10.1155/2011/351982.
- [29] Poudyal H, Campbell F and Brown L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *The Journal of Nutrition* 2010;140:946-53. 10.3945/jn.109.117812.
- [30] Aubin MC, Lajoie C, Clement R, Gosselin H, Calderone A and Perrault LP. Female rats fed a high-fat diet were associated with vascular dysfunction and cardiac fibrosis in the absence of overt obesity and hyperlipidemia: therapeutic potential of resveratrol. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;325:961-8. 10.1124/jpet.107.135061.
- [31] Nishikawa S, Yasoshima A, Doi K, Nakayama H and Uetsuka K. Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice. *Exp Anim* 2007;56:263-72.
- [32] Balasubramanian P, Jagannathan L, Mahaley RE, Subramanian M, Gilbreath ET, Mohankumar PS, et al. High fat diet affects reproductive functions in female diet-induced obese and dietary resistant rats. *J Neuroendocrinol* 2012;24:748-55. 10.1111/j.1365-2826.2011.02276.x.
- [33] Wilner B, Garg S, Ayers CR, Maroules CD, McColl R, Matulevicius SA, et al. Dynamic Relation of Changes in Weight and Indices of Fat Distribution With Cardiac Structure and Function: The Dallas Heart Study. *J Am Heart Assoc* 2017;6. 10.1161/jaha.117.005897.
- [34] Mantatzis M, Milousis T, Katargari S, Delistamatis A, Papachristou DN and Prassopoulos P. Abdominal adipose tissue distribution on MRI and diabetes. *Academic Radiology* 2014;21:667-74. 10.1016/j.acra.2014.01.009.
- [35] De Laroche E, Côté J, Gilbert G, Bibeau K, Ross M, Dion-Roy V, et al. Visceral/epicardial adiposity in nonobese and apparently healthy young adults: association with the cardiometabolic profile. *Atherosclerosis* 2014;234:23-9.
- [36] Després J-P, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, et al. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk.

- Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2008;28:1039-49. 10.1161/ATVBAHA.107.159228.
- [37] Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam MA, Diwan V, et al. High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2011;57:611-24. 10.1097/FJC.0b013e31821b1379.
- [38] Cole MA, Murray AJ, Cochlin LE, Heather LC, McAleese S, Knight NS, et al. A high fat diet increases mitochondrial fatty acid oxidation and uncoupling to decrease efficiency in rat heart. *Basic Research in Cardiology* 2011;106:447-57. 10.1007/s00395-011-0156-1.
- [39] Nagarajan V, Kohan L, Holland E, Keeley EC and Mazimba S. Obesity paradox in heart failure: a heavy matter. *ESC Heart Failure* 2016;3:227-34. 10.1002/ehf2.12120.
- [40] Iltis I, Kober F, Desrois M, Dalmaso C, Lan C, Portha B, et al. Defective myocardial blood flow and altered function of the left ventricle in type 2 diabetic rats: a noninvasive in vivo study using perfusion and cine magnetic resonance imaging. *Investigative Radiology* 2005;40:19-26.
- [41] Byrne C, Jensen T, Hjortkjaer HO, Mogensen UM, Kuhl JT, Fuchs A, et al. Myocardial perfusion at rest in patients with Diabetes Mellitus Type 1 compared with healthy controls assessed with Multi Detector Computed Tomography. *Diabetes Res Clin Pract* 2015;107:15-22. 10.1016/j.diabres.2014.10.011.
- [42] Iltis I, Kober F, Dalmaso C, Lan C, Cozzone PJ and Bernard M. In vivo assessment of myocardial blood flow in rat heart using magnetic resonance imaging: effect of anesthesia. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI* 2005;22:242-7. 10.1002/jmri.20352.
- [43] Pakdeechote P, Bunbupha S, Kukongviriyapan U, Prachaney P, Khrisanapant W and Kukongviriyapan V. Asiatic acid alleviates hemodynamic and metabolic alterations via restoring eNOS/iNOS expression, oxidative stress, and inflammation in diet-induced metabolic syndrome rats. *Nutrients* 2014;6:355-70. 10.3390/nu6010355.
- [44] Belcastro E, Gaucher C, Corti A, Leroy P, Lartaud I and Pompella A. Regulation of protein function by S-nitrosation and S-glutathionylation: processes and targets in cardiovascular pathophysiology. *Biological Chemistry* 2017;398:1267-93. 10.1515/hsz-2017-0150.
- [45] Goel A, Thor D, Anderson L and Rahimian R. Sexual dimorphism in rabbit aortic endothelial function under acute hyperglycemic conditions and gender-specific responses to acute 17beta-estradiol. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2008;294:H2411-20. 10.1152/ajpheart.01217.2007.
- [46] De Pascali F, Hemann C, Samons K, Chen C-A and Zweier JL. Hypoxia and reoxygenation induce endothelial nitric oxide synthase uncoupling in endothelial cells through tetrahydrobiopterin depletion and S-glutathionylation. *Biochemistry* 2014;53:3679-88. 10.1021/bi500076r.
- [47] Wilson PW, Kannel WB, Silbershatz H and D'Agostino RB. Clustering of metabolic factors and coronary heart disease. *Archives of Internal Medicine* 1999;159:1104-9.
- [48] Senaphan K, Kukongviriyapan U, Sangartit W, Pakdeechote P, Pannangpetch P, Prachaney P, et al. Ferulic Acid Alleviates Changes in a Rat Model of Metabolic Syndrome Induced by High-Carbohydrate, High-Fat Diet. *Nutrients* 2015;7:6446-64. 10.3390/nu7085283.
- [49] Forstermann U and Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012;33:829-37, 37a-37d. 10.1093/eurheartj/ehr304.
- [50] Brown GC and Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc Res* 2007;75:283-90. 10.1016/j.cardiores.2007.03.022.



- [51] Sabir AA, Bilbis LS, Saidu Y, Jimoh A, Iwuala SO, Isezuo SA, et al. Oxidative stress among subjects with metabolic syndrome in Sokoto, North-Western Nigeria. *Nigerian Journal of Clinical Practice* 2016;19:128-32. 10.4103/1119-3077.173705.
- [52] Zhang R, Thor D, Han X, Anderson L and Rahimian R. Sex differences in mesenteric endothelial function of streptozotocin-induced diabetic rats: a shift in the relative importance of EDRFs. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2012;303:H1183-98. 10.1152/ajpheart.00327.2012.
- [53] Han X, Zhang R, Anderson L and Rahimian R. Sexual dimorphism in rat aortic endothelial function of streptozotocin-induced diabetes: possible involvement of superoxide and nitric oxide production. *European Journal of Pharmacology* 2014;723:442-50. 10.1016/j.ejphar.2013.10.052.
- [54] Parks RJ and Howlett SE. Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling. *Pflugers Arch* 2013;465:747-63. 10.1007/s00424-013-1233-0.
- [55] Blenck CL, Harvey PA, Reckelhoff JF and Leinwand LA. The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res* 2016;118:1294-312. 10.1161/circresaha.116.307509.
- [56] Murphy E. Estrogen signaling and cardiovascular disease. *Circ Res* 2011;109:687-96. 10.1161/circresaha.110.236687.
- [57] Knowlton AA and Korzick DH. Estrogen and the female heart. *Mol Cell Endocrinol* 2014;389:31-9. 10.1016/j.mce.2014.01.002.
- [58] Li S and Gupte AA. The Role of Estrogen in Cardiac Metabolism and Diastolic Function. *Methodist Deakey Cardiovasc J* 2017;13:4-8. 10.14797/mdcj-13-1-4.
- [59] Khalil RA. Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. *Hypertension* 2005;46:249-54. 10.1161/01.HYP.0000172945.06681.a4.
- [60] Al-Mulla F, Leibovich SJ, Francis IM and Bitar MS. Impaired TGF-beta signaling and a defect in resolution of inflammation contribute to delayed wound healing in a female rat model of type 2 diabetes. *Mol Biosyst* 2011;7:3006-20. 10.1039/c0mb00317d.
- [61] Chakraborty TR, Donthireddy L, Adhikary D and Chakraborty S. Long-Term High Fat Diet Has a Profound Effect on Body Weight, Hormone Levels, and Estrous Cycle in Mice. *Med Sci Monit* 2016;22:1601-8.
- [62] Alam MA, Kauter K, Withers K, Sernia C and Brown L. Chronic l-arginine treatment improves metabolic, cardiovascular and liver complications in diet-induced obesity in rats. *Food & Function* 2013;4:83-91. 10.1039/c2fo30096f.
- [63] Abdurrachim D, Teo XQ, Woo C-C, Lalic J and Lee P. 54(th) EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes : Berlin, Germany, 1 - 5 October 2018. *Diabetologia* 2018;61:1-620. 10.1007/s00125-018-4693-0.
- [64] Meng C, Liu JL and Du AL. Cardioprotective effect of resveratrol on atherogenic diet-fed rats. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7:7899-906.

<b>Compounds</b>	<b>%</b>
<b>Casein</b>	22.8
<b>DL methionine</b>	0.2
<b>Maltodextrin</b>	17.15
<b>Sucrose</b>	16.64
<b>Anhydrous butter</b>	33.35
<b>Soya oil</b>	2.5
<b>Mineral (AIN 93G-mx)</b>	4.55
<b>Sodium bicarbonate</b>	1.05
<b>Potassium citrate</b>	0.4
<b>Vitamin (AIN 93-vx)</b>	1.3
<b>Choline bitartrate</b>	0.2
<b>Antioxidant</b>	0.002

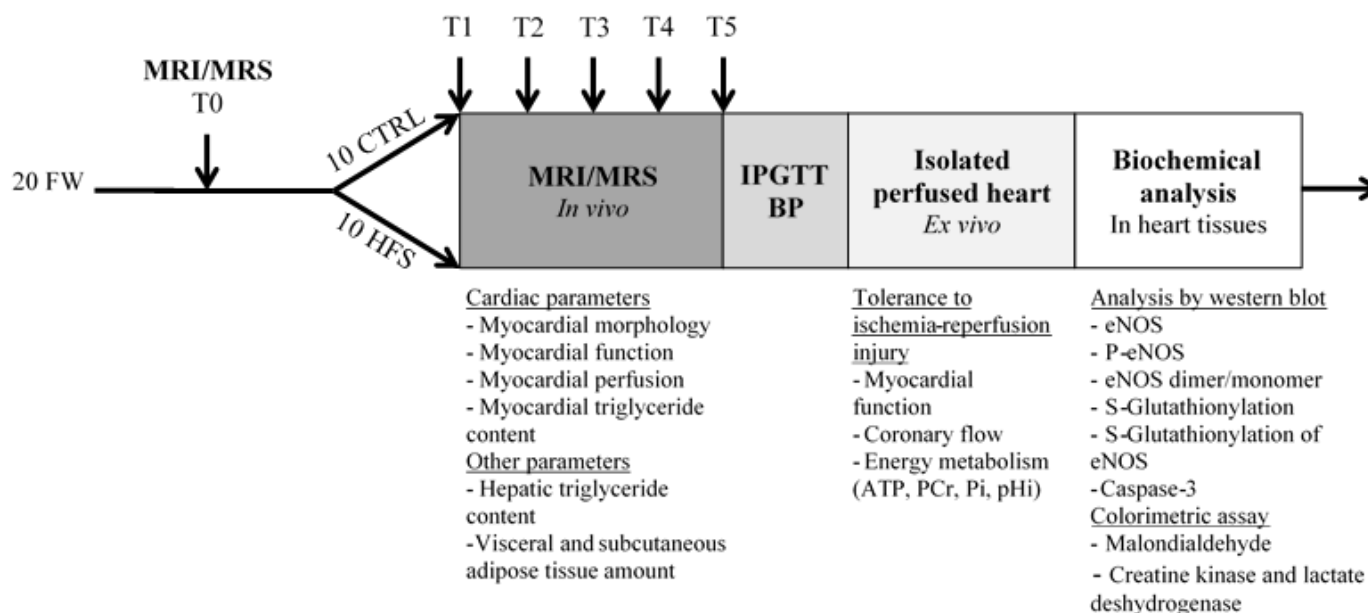
**Table 1: Composition of the high-fat high-sucrose diet (SAFE, U8978).**

	<b>CTRL</b>	<b>HFS</b>	<b>note</b>
<b>Body weight (g)</b>	270.1 ± 11.2	297.8 ± 17.3	
<b>Lean mass (g)</b>	262.8 ± 7.4	271.7 ± 9.1	
<b>Food intake for 5 months (g)</b>	1514 ± 26	1031 ± 10.8 *	
<b>Calories intake for 5 months (kcal)</b>	5054 ± 87	5669 ± 59 *	
<b>AUC Food efficiency (weight gain/food intake)</b>	0.31 ± 0.04	0.50 ± 0.05 †	
<b>Systolic blood pressure (mm Hg)</b>	111.7 ± 3.3	128.7 ± 10.4	
<b>Diastolic blood pressure (mm Hg)</b>	76.1 ± 2.9	90.1 ± 8.1	
<b>VAT MRI (volume mm<sup>3</sup>/slice)</b>	700 ± 63	1122 ± 128 ‡	Correlation
<b>VAT Dissection (g)</b>	19.3 ± 3.1	38.4 ± 6.7 ‡	r <sup>2</sup> =0.90
<b>SCAT MRI (volume mm<sup>3</sup>/slice)</b>	233 ± 13	402 ± 52 †	Correlation
<b>SCAT Dissection (g)</b>	9.89 ± 1.5	18.9 ± 4.3	r <sup>2</sup> =0.98
<b>Cardiac TG (%)</b>	0.28 ± 0.28	0.14 ± 0.14	
<b>Fat mass (%)</b>	9.8 ± 1.2	16.8 ± 2.1 ‡	
<b>Hepatic TG (%)</b>	0.88 ± 0.28	6.10 ± 1.27 *	
<b>Heart weight (g)</b>	0.76 ± 0.02	0.78 ± 0.02	
<b>Tibia length (cm)</b>	3.50 ± 0.04	3.48 ± 0.04	
<b>Heart weight / Tibia length (g/cm)</b>	0.220 ± 0.005	0.230 ± 0.006	
<b>FFAs (mM)</b>	0.09 ± 0.01	0.21 ± 0.04 *	
<b>Fasting glucose (mM)</b>	4.78 ± 0.22	5.72 ± 0.17 †	
<b>TG (mM)</b>	125.2 ± 14.4	90.5 ± 15.2	
<b>HDL-Cholesterol (mM)</b>	1.24 ± 0.07	1.24 ± 0.13	
<b>LDL-Cholesterol (mM)</b>	0.83 ± 0.10	1.19 ± 0.13 ‡	
<b>AUC IPGTT (mM/min)</b>	7.1 ± 0.5	10.4 ± 0.8 †	

**Table 2: Physiological characteristics of rats after 5 months of diet.** Data are means ± SEM, two-way ANOVA was used for statistical analysis of IPGTT and t-test was used for all the other parameters. HFS group had lower food intake, higher calorie intake, food efficiency, amount of visceral and subcutaneous adipose tissue, % of fat mass, % of hepatic TG, plasma FFAs, fasting glucose, LDL-Cholesterol and intolerance to glucose. We found no difference

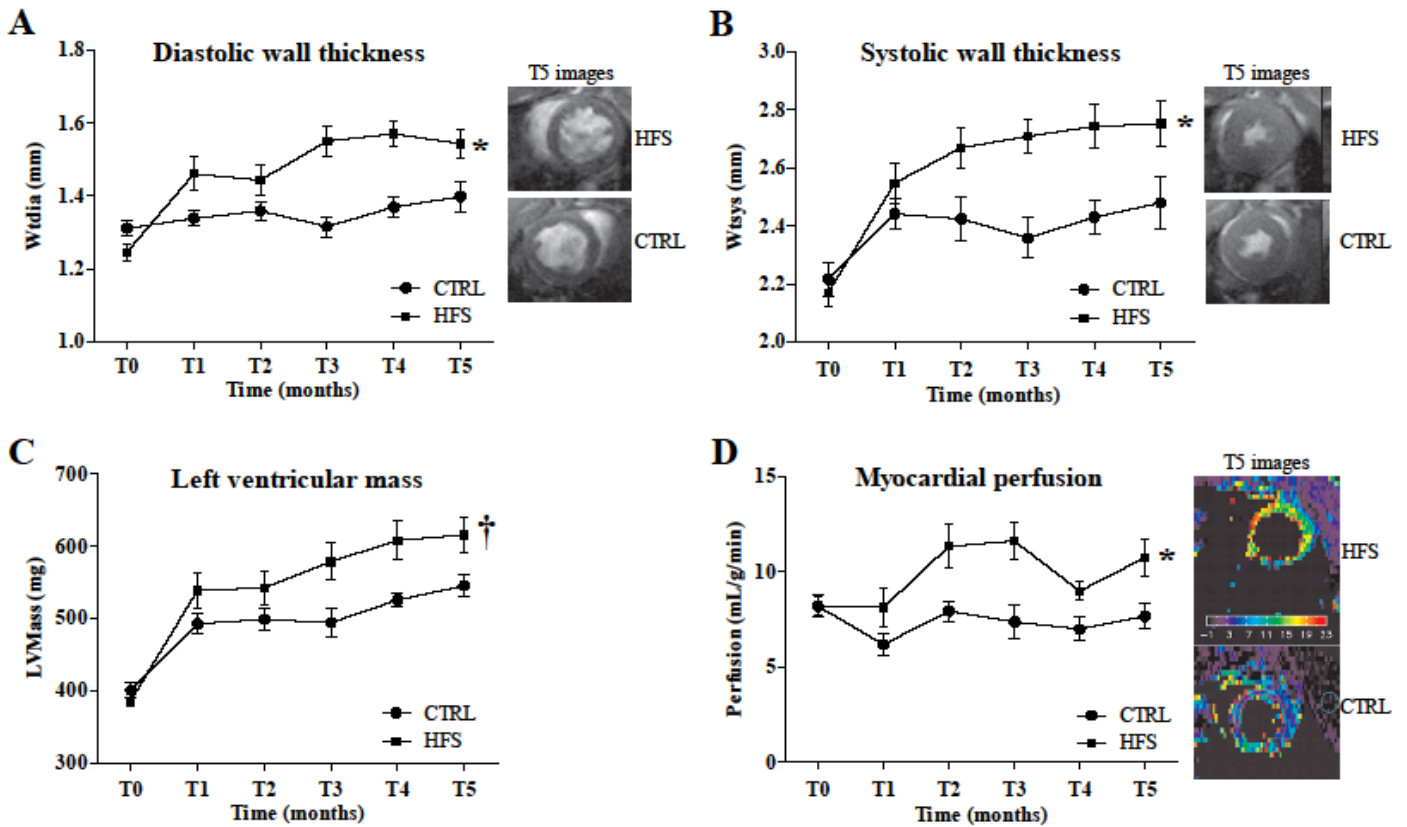
between groups for body weight, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, cardiac TG content, heart weight-to-tibia length ratio, plasma TG and HDL-Cholesterol. AUC: area under the curve. \*  $p < 0.001$ ; †  $p < 0.01$  and ‡  $p < 0.05$  vs. CTRL.

**Figure 1**



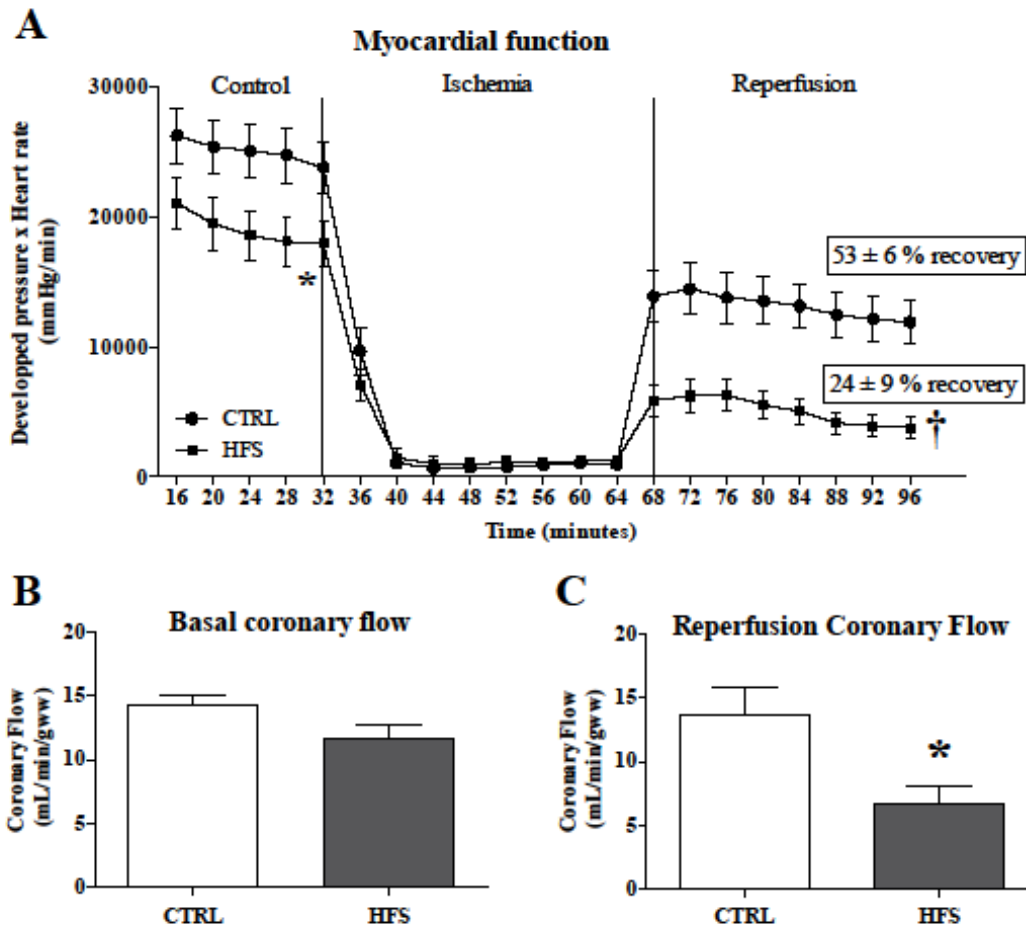
**Figure 1: Experimental protocol.** At 7 weeks of age, animals (n=20) underwent a first MRI/MRS investigation (T0). Female Wistar rats were randomized in two groups (CTRL and HFS), and every month an MRI/MRS exam was performed on each rat. The following parameters were evaluated: myocardial morphology, function, perfusion, triglyceride content, hepatic triglycerides and visceral and subcutaneous adipose tissue amount. After 5 months of diet, rats underwent an intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) to evaluate their metabolic status, and arterial blood pressure (BP) was measured. Then, *ex vivo* experiments on isolated perfused heart were performed to evaluate tolerance to ischemia-reperfusion injury with simultaneous measurement of myocardial function, energy metabolism and coronary flow. At the end of the experiments, hearts were freeze-clamped for biochemical analysis. Western blots were performed to analyze expression of eNOS, P-eNOS, eNOS dimer/monomer, S-Glutathionylation, eNOS S-Glutathionylation and Caspase-3 proteins. Colorimetric assays were performed to assess MDA heart content and activity of creatine kinase and lactate dehydrogenase enzymes.

**Figure 2**



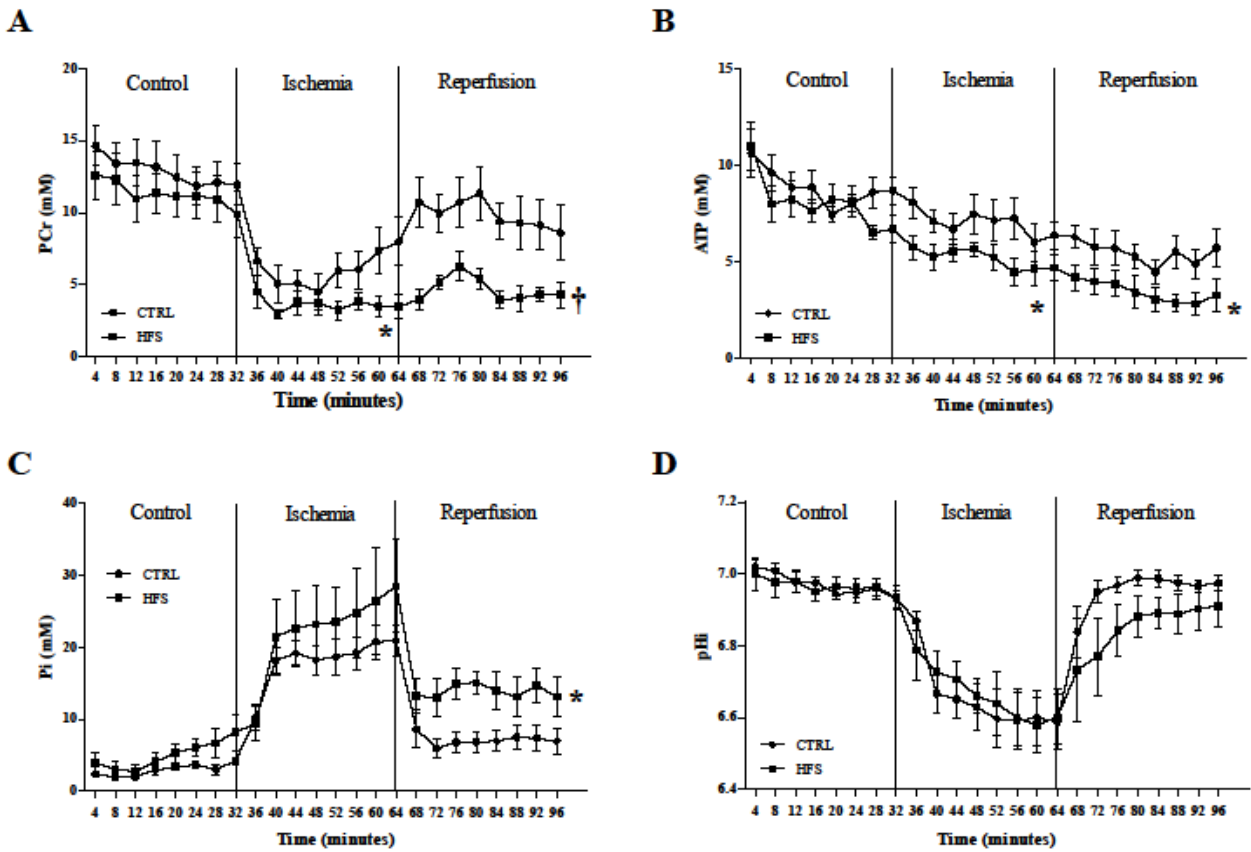
**Figure 2: Monitoring of cardiac morphology and perfusion over time by MRI.** Diastolic myocardial wall thickness (Wtdia) (A), Systolic myocardial wall thickness (Wtsys) (B), Left ventricular mass (LVMass) (C), Myocardial perfusion (D). Data are means  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA was performed to observe the effect of group and time. Wtdia (ANOVA:  $p < 0.01$ ; Bonferroni post-hoc test: T3  $p < 0.001$ , T4  $p < 0.001$  and T5  $p < 0.05$ ) and Wtsys (ANOVA:  $p < 0.01$ ; Bonferroni post-hoc test: T3  $p < 0.01$ , T4  $p < 0.01$  and T5  $p < 0.05$ ) were significantly increased in HFS vs. CTRL from the third month. LVMass was significantly increased in HFS at T3 and T4 months (ANOVA:  $p < 0.05$ ; Bonferroni post-hoc test: T3  $p < 0.05$  and T4  $p < 0.01$ ). Myocardial perfusion was significantly increased from the second month of diet (ANOVA:  $p < 0.01$ ; Bonferroni post-hoc test: T2  $p < 0.05$ , T3  $p < 0.01$  and T5  $p < 0.05$ ). \*  $p < 0.01$  and †  $p < 0.05$  vs. CTRL (Two-way ANOVA).

**Figure 3**



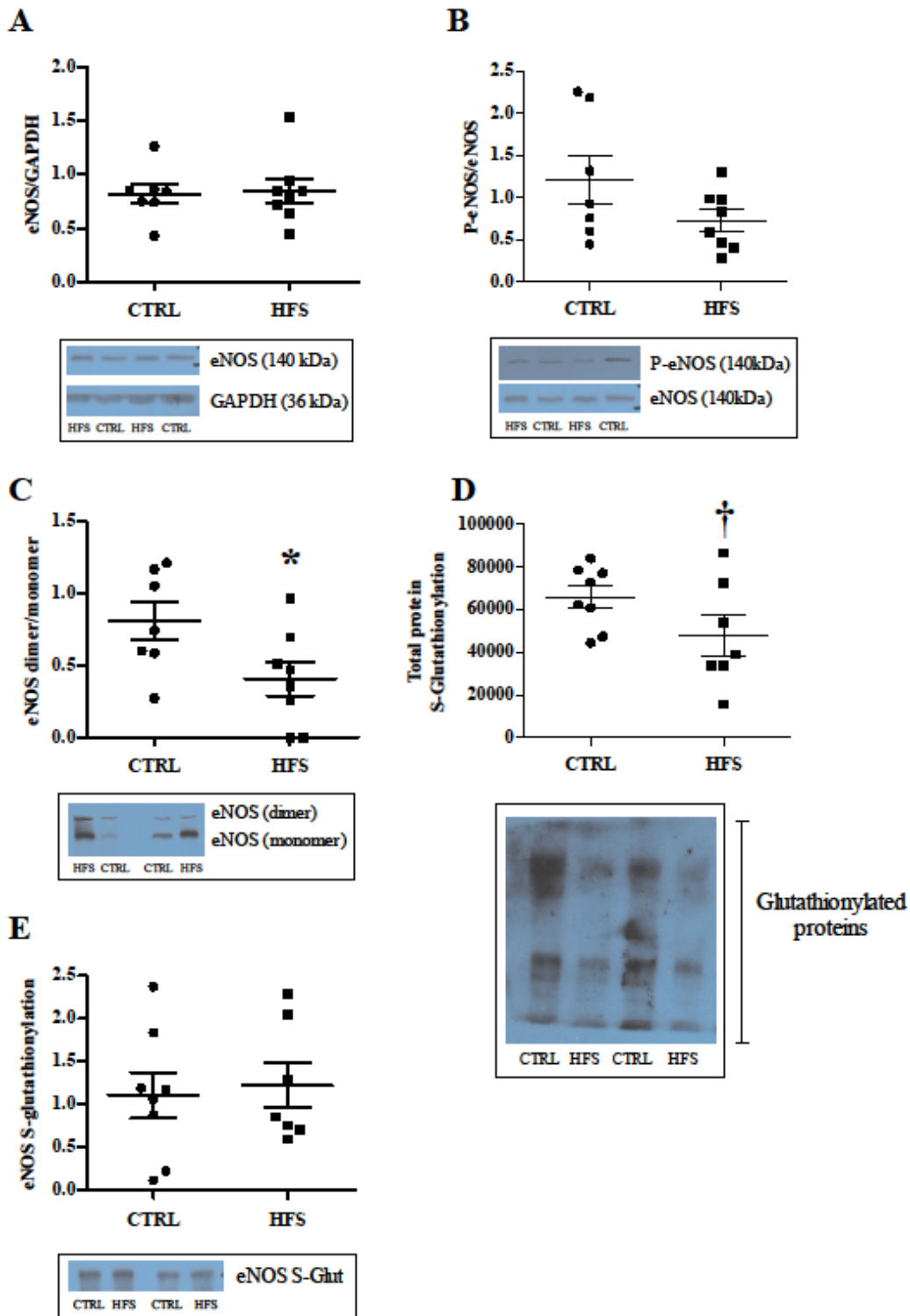
**Figure 3:** *Ex vivo* evaluation of myocardial function. Myocardial function (A) was evaluated by the product of developed pressure and heart rate, during the experimental time course in CTRL and HFS rat hearts. Coronary flow was measured during the control period at 20 minutes (B) and during reperfusion at 80 minutes (C) of protocol. Results are expressed as means  $\pm$  SEM. For myocardial function statistical analysis, two-way ANOVA was performed to observe the effect of group and time. T-test was performed for statistical analysis of coronary flow. In HFS, myocardial function was significantly decreased during the control period and reperfusion, % of recovery and coronary flow were significantly impaired compared with CTRL. \*  $p < 0.05$  and †  $p < 0.01$  vs. CTRL.

**Figure 4**



**Figure 4:** *Ex vivo* evaluation of energy metabolism with  $^{31}\text{P}$ -MRS. Kinetics of phosphocreatine (PCr) (A), ATP (B), Pi (C) and intracellular pH (pHi) (D) during the experimental time course in CTRL and HFS rat hearts. Data are means  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA was performed to observe the effect of group and time. Myocardial PCr and ATP contents were significantly decreased in HFS vs. CTRL during low-flow ischemia and reperfusion. Pi was significantly increased in HFS compared with CTRL only during reperfusion. pHi was similar in both groups during the whole protocol. \*  $p < 0.05$  and †  $p < 0.01$  vs. CTRL (Two-way ANOVA).

**Figure 5**

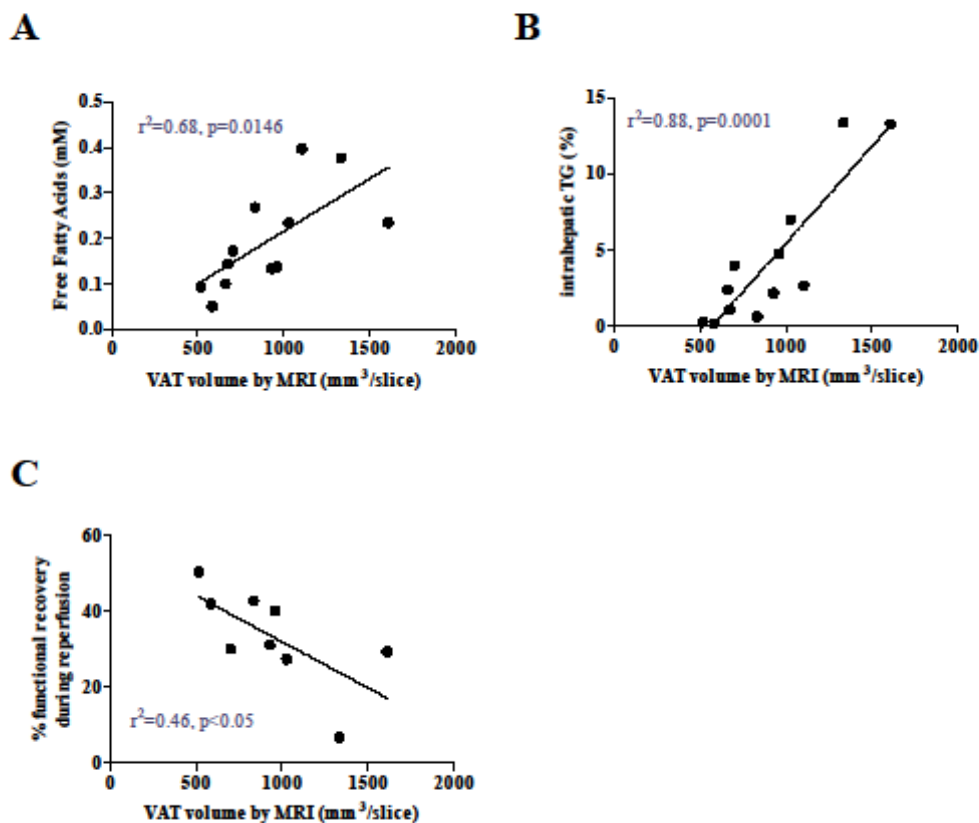


**Figure 5: Biochemical analysis in freeze-clamped hearts at the end of ischemia-reperfusion injury.** Determination of protein expression of total eNOS (A), P-eNOS (B), eNOS dimer-to-monomer ratio (C) and determination of S-Glutathionylation of total (D) and eNOS (E) proteins by western blot. Data are means  $\pm$  SEM and t-test was used for all the



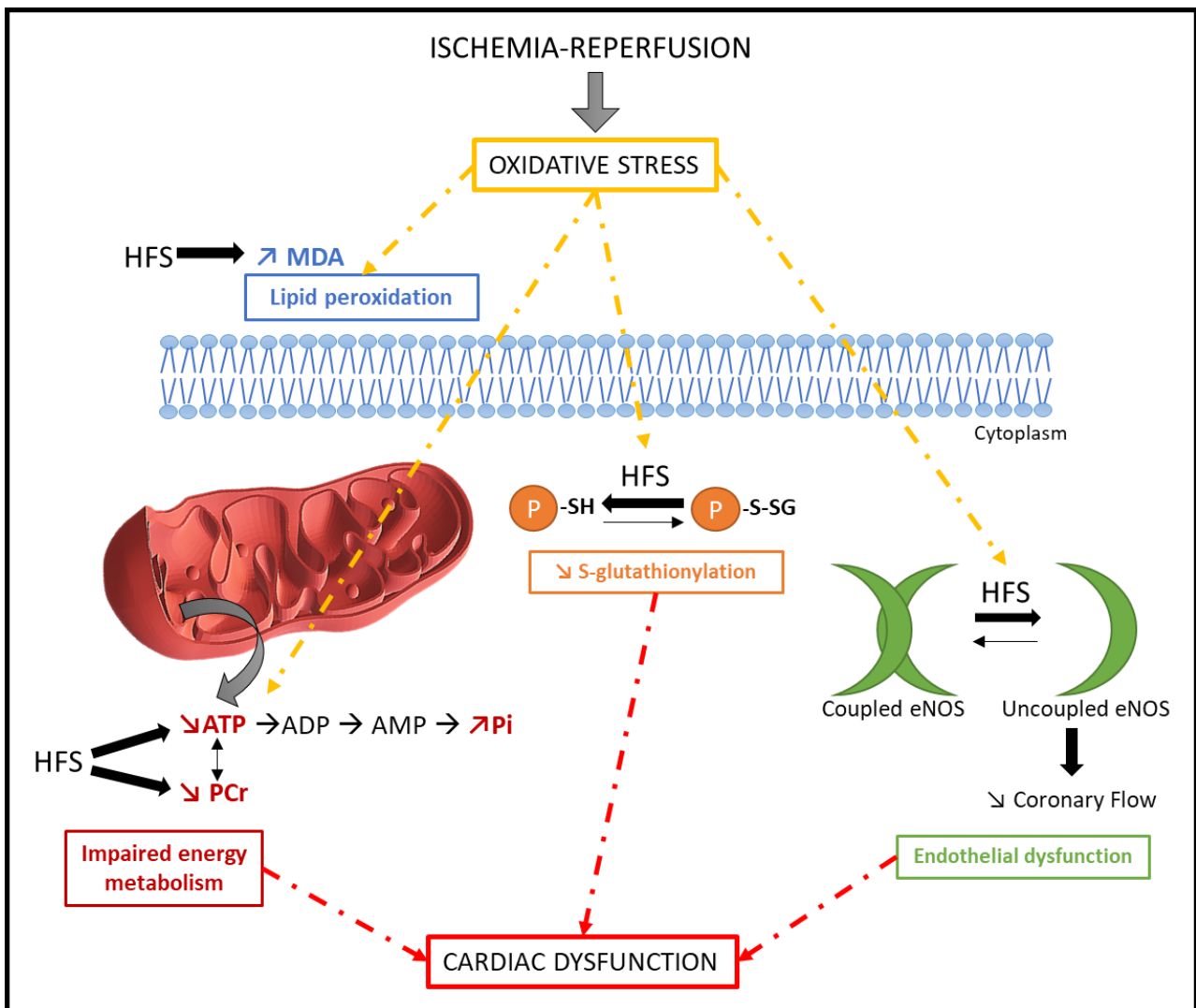
parameters. No difference was found between groups for expression of eNOS, and P-eNOS; eNOS uncoupling was significantly higher in HFS vs. CTRL. No difference was found between groups regarding eNOS, P-eNOS expression and S-Glutathionylation of eNOS. The ratio eNOS d/m was significantly decreased in HFS vs. CTRL, indicating eNOS uncoupling. S-Glutathionylation of total proteins was also decreased in HFS vs. CTRL. \*  $p < 0.05$  vs. CTRL; †  $p < 0.05$  vs. CTRL.

**Figure 6**



**Figure 6: Correlation analysis between imaging and outcomes.** Plasma FFAs (A) and hepatic TG content (B) were correlated to the amount of VAT measured by MRI. Percent of functional recovery during reperfusion was also correlated to the amount of VAT (C).

Figure 7



**Figure 7: Potential mechanisms involved in the lower tolerance to ischemia-reperfusion in prediabetic female rats.** High-fat high-sucrose diet (HFS) increased sensitivity to ischemia-reperfusion injury *ex vivo*. Oxidative stress was exacerbated, with higher MDA level, eNOS uncoupling and lower protection mechanism by S-Glutathionylation in female rat hearts. It might explain the impaired energy metabolism and endothelial function leading to cardiac dysfunction in female gender. P: Protein; MDA: Malondialdehyde.

## **Supplementary material**

### **MRI/MRS investigations**

Animals were placed prone on an actively decoupled surface coil (diameter 30mm, Rapid Biomedical, Rimpar, Germany) used for radiofrequency reception. The cardiac region of the thorax was placed at the isocenter of the coil. For assessment of the amount of visceral and subcutaneous adipose tissue in the body the proton volume resonator was used for both radiofrequency transmit and receive. Respiration was monitored using a pressure sensor connected to an air-filled balloon positioned under the rat abdomen. Body temperature was maintained at 37°C using a warming blanket positioned on the back of the animal. The Electrocardiogram (ECG) signal was monitored by two subcutaneous electrodes placed on the upper limbs of the rats. The electrodes were connected to an ECG trigger unit (Rapid Biomedical, Rimpar, Germany) to estimate the heart rate (HR) and to trigger the MR sequences.

### **Myocardial function and mass**

We acquired strictly perpendicular slices in two- and four-chamber long-axis orientation and short-axis orientation at mid-ventricular level (FLASH, field of view, 4 x 4 cm<sup>2</sup>; slice thickness = 2 mm; matrix size = 128 x 128; TR = 5.1 ms; TE = 1.2 ms; 45 phases per cardiac trigger). Image post processing was performed using an in-house developed program running under an IDL environment (Interactive Data Language, ITT Visual Solutions, Boulder, CO, USA). Left ventricular volumes were determined using an ellipsoid model. Endocardial and epicardial areas were manually delineated on short-axis images, with ventricular lengths determined from four-chamber long-axis views in diastole and systole respectively. End-diastolic volume (EDV), end-systolic volume (ESV), stroke volume (SV), left ventricular ejection fraction (LVEF), mean wall thicknesses in diastole (Wtdia) and systole (Wtsys), and systolic wall thickening (sWtn) were calculated from the volume measurements. Cardiac output (CO) was calculated as  $CO = HR \times SV$ , and Cardiac Index (CI) =  $CO / \text{Body weight}$ .

### **Myocardial perfusion**

An ECG and respiration-gated Look-Locker gradient-echo flow-sensitive alternating inversion recovery ASL technique was used to acquire two T1 maps from a single short-axis slice placed at the ventricular mid-level, one after a slice selective inversion pulse and one after global inversion pulse. The following parameters were used: field of view = 4 x 4 cm<sup>2</sup>; slice thickness

= 3 mm; matrix size = 128 x 64; train of 50 gradient echoes; flip angle = 12°. Image analysis was performed using a home-made program running under IDL environment which generated absolute myocardial blood flow (MBF) maps. MBF, expressed in mL/g/min, was determined as average of pixel values in manually delineated regions of interest in the entire left ventricular myocardium on the corresponding MBF maps.

### Cardiac and hepatic TG

The measurement of TG fraction with MRI has been previously validated in our laboratory and was correlated with TG content measured by biochemical analyses.

Voxels were positioned using the short-axis and four-chamber view cine scans as reference. The volume of interest had a size of 1 x 1 x 2 mm<sup>3</sup> and was placed in the basal region of the septum. Acquisitions were done in the systolic phase. The following parameters were used: number of averages (NA) = 512, repetition time equal to the respiratory interval (about 800ms). A second scan was acquired to obtain an unsaturated water peak as reference (TR = 5 s; NA = 64). Molecular content of water was quantified by integration of the resonances at 4.7 ppm and triglycerides at 1.3 ppm in time domain (AMARES fitting). In the liver, a larger voxel size (2 x 2 x 2 mm<sup>3</sup>) was used to reduce scan time. It was placed in the anterior part of the liver. Parameters were TR = Respiratory interval (about 800ms) and NA = 128. For the reference scan parameters were TR = 5 s and NA = 32. Liver TG were quantified using PRESS with respiratory gating only.

### VAT and SCAT

For a quantitative map of adipose tissue distribution, whole-body scanning was performed. Sixty-four contiguous axial imaging slices were selected across the animal body length excluding the tail. Magnetic resonance images of these slices were recorded using a high-resolution three-dimensional (turbo spin echo) sequence with the following parameters: TE = 5.543 ms; effective TE = 88.69 ms; TR = 350 ms; NA = 2; field of view = 80 x 60 x 70 mm<sup>3</sup>; matrix size = 128 x 128 x 64. MR data were processed using a custom-written analysis program developed with the IDL software. Quantification of both VAT and SCAT was performed using an automatic segmentation method based on a pixel intensity analysis of MR images.

## **Isolated perfused heart**

### Energy metabolism assessment by <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy – Quantification of phosphorus metabolites and determination of intracellular pH.

<sup>31</sup>P spectra were obtained by accumulating 328 free induction decay signals acquired for 4 minutes (flip angle 45°, repetition time 0.7 s, spectral width 4500 Hz, 2,048 data points). Quantification of the signal integrals was carried out using an external reference containing an aqueous solution of 0.6 mM phenylphosphonic acid.

## **Biochemical analyses in freeze-clamped heart**

### Apoptosis

The expression of cleaved caspase-3 (active form) was determined in heart homogenates by Western Blot. Samples (50 µg) were run in Tris-Glycine-SDS with 4-20% gradient gel (Bio-Rad, Mini-PROTEAN TGX, Precast Gels) and transferred to pure nitrocellulose membrane (0.45 µm, Bio-Rad) with a semi-dry transfer device (Transblot SD system, Biorad). After blocking, membranes were incubated overnight at 4°C with primary anti-rabbit antibody against Caspase-3 (1/1000; Cell Signaling Technology, Inc, USA) and secondarily with HRP-conjugated anti-rabbit antibody (1/2000; Santa Cruz Biotech).

### NO pathway

The expression of total eNOS, eNOS -Pser1177 and eNOS dimer-to-monomer ratio (eNOS d/m) were determined in heart homogenates by Western Blot. Proteins were separated by gel electrophoresis and transferred onto PVDF membranes. After blocking, membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibody: anti-mouse eNOS (1/1000 for eNOS and eNOS d/m, BD Biosciences), anti-mouse eNOS-Pser1177 (1/1000, BD Biosciences); and secondarily with HRP-conjugated antibody.

### Post-translational modification of proteins

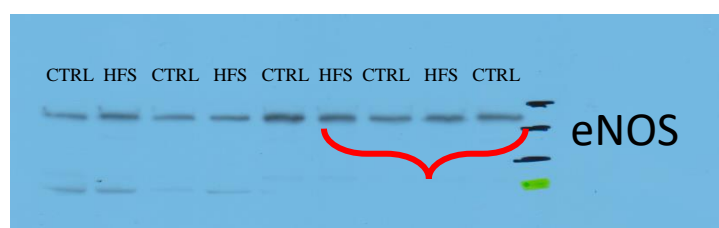
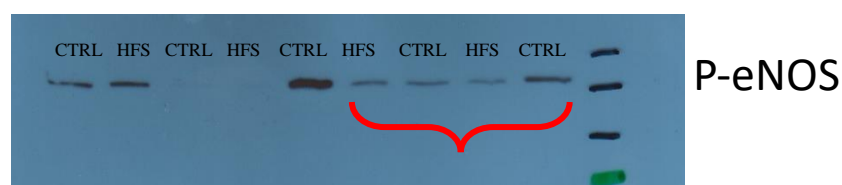
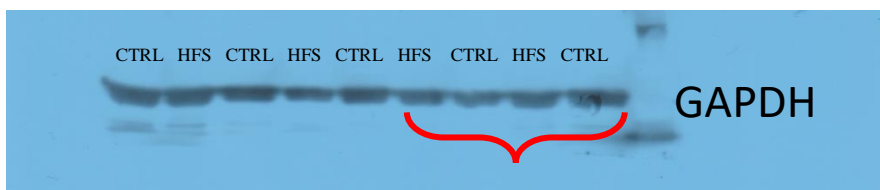
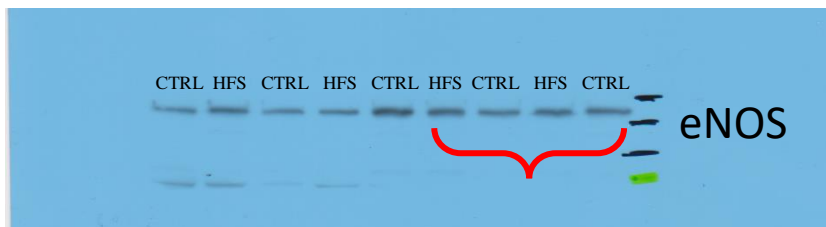
S-Glutathionylation of proteins was evaluated by Western Blot. Protein samples (80µg) were run in SDS-PAGE (8%) and transferred to PVDF membrane. After blocking, membranes were incubated with primary anti-mouse antibody against Glutathione (1/500; Santa Cruz Biotech) and secondarily with HRP-conjugated antibody (1/5000; BD Bioscience). eNOS S-

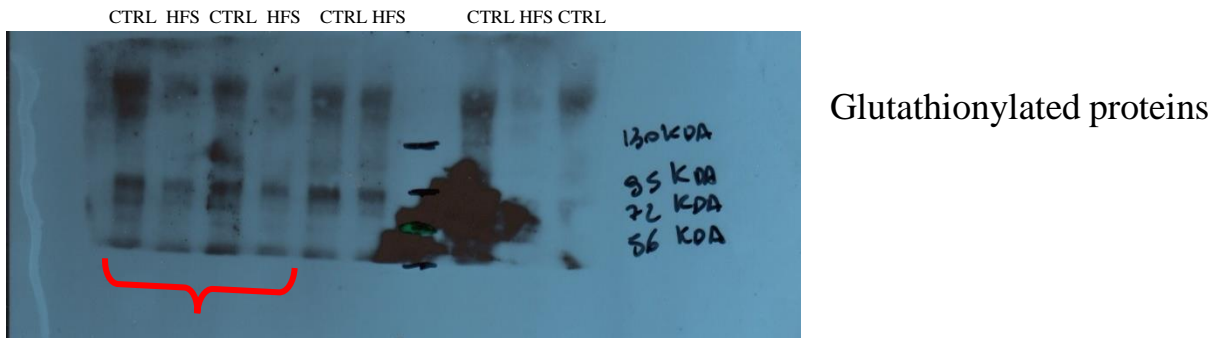
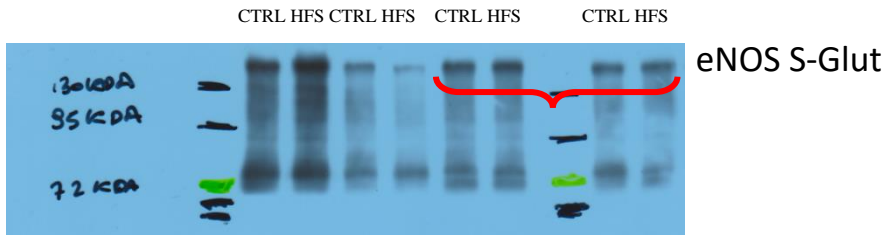
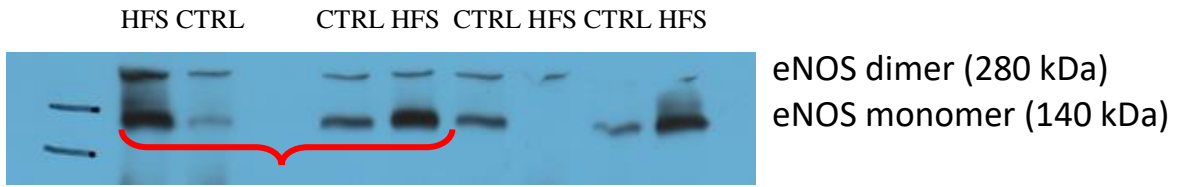
Glutathionylation was determined by stripping and incubating the same membrane with primary anti-mouse antibody against eNOS as described above.

**Table 2:** Cardiac function parameters measured by MRI after 5 months of diet in CTRL and HFS. Results are expressed as means  $\pm$  SEM.

	CTRL	HFS
<b>LVVdia (<math>\mu</math>L)</b>	890 $\pm$ 26	948.9 $\pm$ 34.5
<b>EDV (<math>\mu</math>L)</b>	403.6 $\pm$ 16.5	397 $\pm$ 14
<b>LVVsys (<math>\mu</math>L)</b>	666.5 $\pm$ 20.9	719 $\pm$ 32
<b>ESV (<math>\mu</math>L)</b>	114 $\pm$ 9	98.1 $\pm$ 11.6
<b>SV (<math>\mu</math>L)</b>	289.6 $\pm$ 9.9	298.5 $\pm$ 7.3
<b>EF (%)</b>	72 $\pm$ 1	76 $\pm$ 2
<b>CO (mL/min)</b>	109.3 $\pm$ 5.7	128.4 $\pm$ 3.8
<b>CI (<math>\mu</math>L/min/g)</b>	408.7 $\pm$ 23.3	453.9 $\pm$ 31.3

**Western Blot used for figure 5**





## **Conclusion générale de l'étude**

Dans cette première étude, nous avons montré chez les femelles qu'il existe une adaptation du cœur lors du développement d'un prédiabète, avec notamment une augmentation de la perfusion myocardique dès le deuxième mois de régime et un épaississement de la paroi du myocarde dès le troisième mois de régime, associés à une fonction normale *in vivo*. Les 5 mois de régime riche en graisse et en sucre ont également induit une sensibilité plus importante du cœur à une séquence d'ischémie-reperfusion, avec une altération de la fonction myocardique, du métabolisme énergétique et de la fonction endothéliale. Cette étude a permis de montrer qu'il existe un risque important de complications CV dès le stade de prédiabète dans le sexe féminin.

Pour donner suite à ce travail, nous souhaitons porter notre attention sur les complications cardiovasculaires reliées à un diabète de type 2 avéré, dans le sexe féminin. Dans une seconde étude, nous avons donc évalué la tolérance myocardique à l'ischémie-reperfusion chez des rates Goto-Kakizaki (GK). Dans ce travail nous avons également étudié l'effet potentiellement protecteur du Resvératrol contre les lésions d'ischémie-reperfusion.



## ETUDE 2

**Effet protecteur du Resvératrol contre les lésions d'ischémie-reperfusion via l'augmentation des composés riches en énergie et de l'expression des protéines eNOS et SIRT1 dans le cœur de rates diabétiques de type 2**

Article

Open Access Article

### **Protective Effect of Resveratrol against Ischemia-Reperfusion Injury via Enhanced High Energy Compounds and eNOS-SIRT1 Expression in Type 2 Diabetic Female Rat Heart**

by Natacha Fourny, Carole Lan, Eric Sérée, Monique Bernard and Martine Desrois

*Nutrients* **2019**, *11*(1), 105; <https://doi.org/10.3390/nu11010105> (registering DOI)

Received: 26 November 2018 / Revised: 19 December 2018 / Accepted: 28 December 2018 / Published: 6 January 2019

Publié dans

Nutrients

Le 6 janvier 2019

## **Contexte de l'étude**

Comme précédemment décrit en Introduction, la littérature montre que les femmes diabétiques de type 2 présentent un risque cardiovasculaire plus élevé que les hommes diabétiques de type 2. Notamment, le risque d'infarctus du myocarde est multiplié par cinq chez les femmes diabétiques de type 2, et par deux chez les hommes diabétiques de type 2 par rapport à des individus sains.

Une étude précédente au laboratoire par Desrois et coll. [111], a par ailleurs montré une altération de la fonction cardiaque et un métabolisme énergétique normal chez des rats GK mâles et femelles, en absence de blessure ischémique. Dans ce travail, le débit coronaire était altéré chez les animaux diabétiques mais plus fortement chez les femelles GK par rapport aux mâles GK. Par ailleurs, les vasodilatations dépendante et indépendante de l'endothélium étaient significativement altérées uniquement chez les femelles GK. Les analyses biochimiques dans les cœurs ont montré que la voie du NO était sur-réglée chez les mâles et femelles GK mais de manière moins importante chez les femelles GK. Ces résultats suggèrent que des altérations endothéliales préexistent dans le diabète de type 2, et ce de manière plus importante chez les femelles.

Pour donner suite à ce travail, nous avons réalisé au cours de mon stage de master 2, une étude évaluant le cœur de femelles GK lors d'un stress ischémique suivi d'une reperfusion.

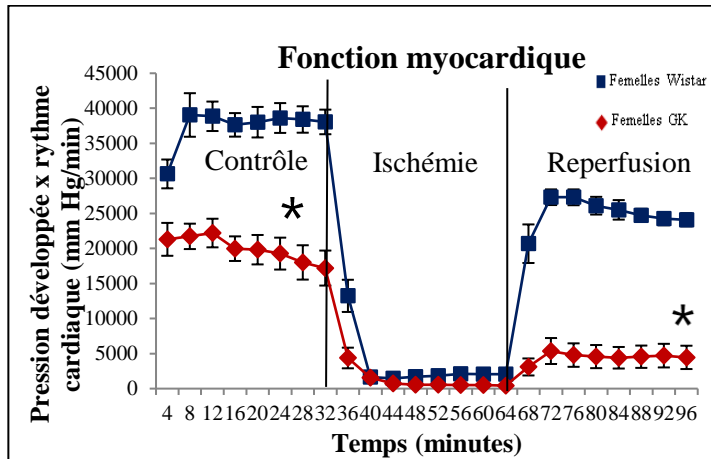
### **Synthèse des résultats obtenus :**

La fonction myocardique, évaluée par le produit de la pression développée et de la fréquence cardiaque, est significativement diminuée en période contrôle et à la reperfusion chez les femelles GK par rapport à des femelles Wistar (Figure 1).

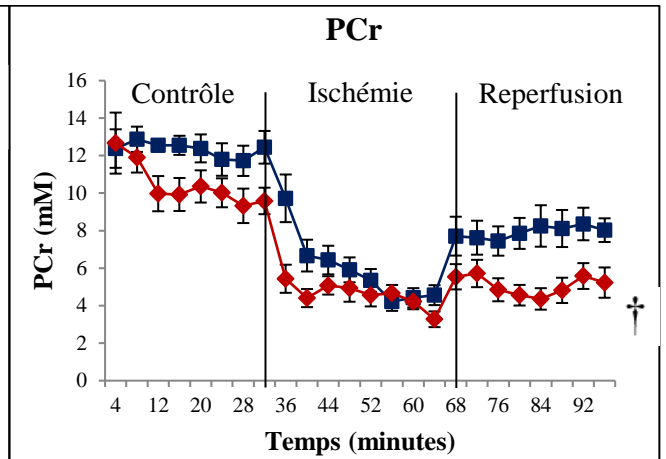
Le métabolisme énergétique, évalué par SRM du phosphore-31, est également significativement altéré chez les femelles GK par rapport aux femelles Wistar, avec une diminution de la PCr, de l'ATP et une diminution du pHi à la reperfusion (Figure 2). Enfin, le débit coronaire était significativement altéré à la reperfusion (Figure 3).

Graphiques illustrant l'altération de la fonction cardiaque, du métabolisme énergétique et du débit coronaire chez les femelles GK par rapport aux femelles Wistar (FW).

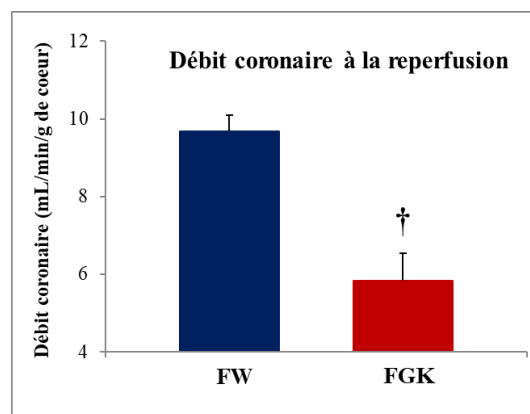
**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**



\* $p < 0,0001$  ; †  $p < 0,001$  femelles GK vs. femelles Wistar.

Au cours de mon master 2 nous avons montré une forte sensibilité du myocarde à un épisode d'ischémie-reperfusion chez les rates GK, caractérisée par une altération de la fonction cardiaque, du métabolisme énergétique et du débit coronaire lors de la reperfusion. Ces résultats ont été présentés à l'EASD en 2016 [374]. Pour donner suite aux résultats de Desrois et coll. et de mon master 2, nous avons réalisé une deuxième étude sur les effets potentiellement protecteurs du Resvératrol contre les lésions d'ischémie-reperfusion chez la femelle GK. Notre hypothèse était que le Resvératrol pouvait moduler le métabolisme énergétique ainsi que la fonction endothéliale, et donc améliorer la tolérance myocardique à l'ischémie-reperfusion de rates GK diabétiques de type 2.

## **Résumé de l'étude**

**Contexte scientifique :** Les femmes diabétiques de type 2 ont un risque de morbidité et de mortalité cardiovasculaire plus élevé que les hommes diabétiques de type 2 et les femmes non diabétiques. En particulier, le diabète de type 2 double le risque d'infarctus du myocarde chez les femmes mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore entièrement élucidés.

Jusqu'à présent, la plupart des médicaments anti-diabétiques ne permettaient pas une diminution du risque cardiovasculaire. Ainsi, de nouvelles approches telles que les compléments alimentaires pourraient être utilisées en combinaison avec les traitements anti-diabétiques afin de résoudre cette problématique. Le Resvératrol (RSV) est un polyphénol retrouvé dans le raisin, décrit dans la littérature comme bénéfique contre le stress oxydant, la dysfonction endothéliale et la fonction mitochondriale. Ces facteurs étant impliqués dans les complications cardiovasculaires du diabète de type 2, le RSV pourrait avoir un fort intérêt dans ce contexte. En conséquence, nous avons étudié les effets du RSV sur la tolérance myocardique à l'ischémie-reperfusion dans le modèle de rat femelles GK diabétiques de type 2.

**Méthodes :** Les expériences ont été réalisées sur des femelles GK âgées de 8 mois et des femelles Wistar comme contrôles. Quatre groupes étaient créés : un groupe contrôle (CTRL), un groupe GK, un groupe diabétique de type 2 sous Placebo (GK-P) et un groupe diabétique de type 2 sous RSV (GK-RSV). Le traitement par le RSV consistait en un apport de RSV dans l'eau de boisson à la dose de 1 mg/kg/jour pendant 8 semaines. Ensuite, des expériences de cœur isolé perfusé étaient réalisées afin d'évaluer la tolérance à un épisode d'ischémie-reperfusion (décrit en page 93 de la partie Matériels et Méthodes). Le métabolisme énergétique (ATP, PCr, Pi) et le pH intracellulaire (pHi) étaient mesurés pendant tout le protocole à l'aide de la SRM du phosphore-31, en simultané avec la mesure de la fonction myocardique. Le débit coronaire était également évalué avant et après l'ischémie. A la fin des expériences *ex vivo*, des analyses biochimiques étaient réalisées dans les cœurs afin d'étudier la voie du NO (eNOS, iNOS, Akt, PAkt), la voie des sirtuines (SIRT1 et SIRT3), l'activité de la citrate synthase et le MDA. Dans le sang, la glycémie et les acides gras libres (FFAs) étaient également mesurés.

**Résultats :** Chez les rates GK, le RSV a permis de maintenir les contenus myocardiques en ATP et en PCr aux valeurs du groupe contrôle lors de la reperfusion et d'améliorer la récupération fonctionnelle. Les analyses complémentaires dans les cœurs ont montré que le RSV augmentait la concentration en créatine, en nucléotides adénylés totaux et l'activité de la

citrate synthase, ce qui pourrait contribuer à un meilleur fonctionnement mitochondrial. De plus, l'amélioration du débit coronaire par le RSV pendant la reperfusion était associée à une augmentation de l'expression des protéines eNOS, SIRT1 et P-Akt dans le cœur des rates GK.

**Conclusion :** En conclusion, le RSV a induit une cardioprotection contre les lésions d'ischémie-reperfusion dans le cœur de femelles GK diabétiques de type 2, par une augmentation des composés riches en énergie et des protéines impliquées dans la voie du NO. Le RSV présente donc un fort potentiel dans le cadre de la prévention des complications cardiovasculaires du diabète de type 2 chez les femmes.

## **Protective Effect of Resveratrol against Ischemia-Reperfusion Injury via Enhanced High Energy Compounds and eNOS-SIRT1 Expression in Type 2 Diabetic Female Rat Heart**

[Natacha Fourny](#)<sup>1,\*</sup>, [Carole Lan](#)<sup>1</sup>, [Eric Séréé](#)<sup>2</sup>, [Monique Bernard](#)<sup>1</sup> and [Martine Desrois](#)<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Aix-Marseille University, CNRS, Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale (CRMBM), Faculté de Médecine, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, CEDEX 05, France

<sup>2</sup> Aix-Marseille University, INSERM, INRA, Centre de Recherche en Cardiovasculaire et Nutrition (C2VN), Faculté de Médecine, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, CEDEX 05, France

\* Author to whom correspondence should be addressed.

Received: 26 November 2018 / Accepted: 28 December 2018 / Published: 6 January 2019

### **Abstract:**

Type 2 diabetic women have a high risk of mortality via myocardial infarction even with anti-diabetic treatments. Resveratrol (RSV) is a natural polyphenol, well-known for its antioxidant property, which has also shown interesting positive effects on mitochondrial function. Therefore, we aim to investigate the potential protective effect of 1 mg/kg/day of RSV on high energy compounds, during myocardial ischemia-reperfusion in type 2 diabetic female Goto-Kakizaki (GK) rats. For this purpose, we used <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy in isolated perfused heart experiments, with a simultaneous measurement of myocardial function and coronary flow. RSV enhanced adenosine triphosphate (ATP) and phosphocreatine (PCr) contents in type 2 diabetic hearts during reperfusion, in combination with better functional recovery. Complementary biochemical analyses showed that RSV increased creatine, total adenine nucleotide heart contents and citrate synthase activity, which could be involved in

better mitochondrial functioning. Moreover, improved coronary flow during reperfusion by RSV was associated with increased eNOS, SIRT1, and P-Akt protein expression in GK rat hearts. In conclusion, RSV induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in type 2 diabetic female rats via increased high energy compound contents and expression of protein involved in NO pathway. Thus, RSV presents high potential to protect the heart of type 2 diabetic women from myocardial infarction.

**Keywords:** resveratrol; type 2 diabetes; ischemia-reperfusion; cardiac function; energy metabolism; mitochondria; endothelial function

## **1. Introduction**

Cardiovascular (CV) complications are the first causes of morbidity and mortality in type 2 diabetic patients, particularly in women [1]. Cardio-protection is widely recognized in women, and surprisingly, is suppressed with type 2 diabetes, with more serious CV consequences in women than in men [2]. It is known that the risk of myocardial infarction is five times higher in type 2 diabetic women compared with non-diabetic women, while this risk is only multiplied by two in men [3,4]. In addition, mortality due to myocardial infarction is higher in women than in men in type 2 diabetes [5]. Few studies explore female gender and the reasons for higher deterioration of the cardiovascular system are not yet fully understood. Endothelial damage is one likely hypothesis for CV complications in type 2 diabetes. Interestingly, Desrois et al. reported a higher endothelial damage in female GK rat hearts than in males in the absence of ischemic insult, which could explain the higher risk of CV in type 2 diabetic women [6].

Although this is one of the current objectives, most of antidiabetic treatments fail to decrease the CV risk [7]. For this purpose, dietary supplements could be interesting in combination with existing antidiabetic medication to improve CV outcomes in diabetic patients. Resveratrol (RSV), or trans-3,5,4'-trihydroxy stilbene, is a natural polyphenol found in more than 70 plant species like grapes, peanuts, and blackberries [8]. This molecule has shown pleiotropic and beneficial effects on both type 2 diabetes and cardiovascular complications [9]. Various studies, using models of type 2 diabetes or metabolic syndrome, showed that RSV could decrease chronic inflammation [10], improve insulin sensitivity [11], lipid profile [12], and decrease oxidative stress [13]. Other studies also demonstrated the effects of RSV on endothelial function mainly through mechanisms involving nitric oxide (NO) and sirtuin pathways [14,15,16,17]. Interestingly, RSV has shown beneficial effects on mitochondrial function by increasing

mitochondrial DNA and biogenesis [13]. Consequently, RSV could be an interesting candidate to improve cardiac energy metabolism and CV outcomes of type 2 diabetic women [18,19,20].

In the literature, the dose of RSV is very different depending on the study. Doses range from 0.1 mg/kg/day [18] to 500 mg/kg/day [21] and even 4g/kg/day [22]. Here we choose a “low-dose” of RSV at 1 mg/kg/day based on Rocha et al. and Lin et al.’s studies. Indeed, Rocha et al. [23] chose a dose of 1 mg/kg based on the actual wine consumption in occidental countries, and the kinetics and bioavailability of resveratrol in the body. Lin et al.’s [18] study showed that a lower dose (0.1 mg/kg) was not sufficient to induce beneficial effects on the heart, while a dose of 1 mg/kg/day improved cardiac function. On the other hand, higher doses (25 mg/kg/day) have shown negative effects on infarct size [24]. Thus, we suppose that the “low-dose” of 1 mg/kg/day of RSV will be sufficient to observe beneficial effects on myocardial energy metabolism.

Here, we aim to determine the effects of a low-dose oral administration of RSV on myocardial sensitivity to ischemia-reperfusion injury in female GK rats, a polygenic model of type 2 diabetes, with the hypothesis that RSV could improve high energy compound contents. We believe this is an original study exploring the effects of RSV on high-energy compounds during an ischemia-reperfusion injury, using <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy (MRS) and biochemical analysis, combined with measurement of myocardial function and coronary flow. Secondly, we assessed the effects of RSV on coronary flow and expression of proteins involved in NO pathway, as indicators of endothelial function.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Materials and Antibodies**

Assay kits were used to determine plasma glucose (Randox Laboratories, Crumlin, Antrim, UK) and free fatty acids (FFAs) (NEFA kit; Roche Diagnostics, Roche Applied Science, Mannheim, Germany). A radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) lysis buffer was used to extract proteins (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Total protein concentration was determined using the Pierce BCA protein assay kit (ref 23227, Thermo scientific, Rockford, USA). Anti-eNOS (ref 610296, BD Transduction Laboratories, USA), anti-SIRT1 (ref 9475, Cell Signaling Technology), anti-Akt (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-PAkt (Ser 473) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-SIRT3 (#2627, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), and anti-Actin (sc47 778,



Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) primary antibodies were used for western blots. HRP-conjugated antibodies were used as secondary antibodies (Goat anti-mouse sc2031 or Goat anti-rabbit sc2030, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The immunoblots were developed using an ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Amersham™, Buckinghamshire, U.K.). The protein signals were assessed using the MicroChemi 4.2 System (DNR Bio-Imaging System Ltd., Jerusalem, Israel). Citrate synthase activity was evaluated using the citrate synthase assay kit (CS0720, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). First, protein extraction was performed using the CellLytic MT extraction buffer (C3228, Sigma, St. Louis, MO, USA). Malondialdehyde (MDA) was assessed with the lipid peroxidation assay kit (MAK085, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

## 2.2. Animals

Age-matched (7–8 months) female control Wistar rats (Charles River, France) and type 2 diabetic female Goto-Kakizaki (GK) rats (GK/Par subline; Laboratoire de Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine UMR8251-CNRS—Université Paris Diderot, Paris, France [25]) were used in the experiments. All procedures involving animals were approved by the Animal Experiment Ethics Committee of Aix-Marseille University (n°2017070416019134) and were in conformity with the European Convention for protection of animals used for experimental purpose. The animals were housed in a temperature controlled ventilated cabinet (22–24 °C) and were exposed to light–dark cycles of 12:12 h. Animals had access to food (diet 113, SAFE, Augy, France) and water ad libitum. Four groups were designed for this study: the control group (CTRL; n = 11), the type 2 diabetic group (GK; n = 14), the type 2 diabetic group under placebo treatment (GK-P; n = 9), and the type 2 diabetic group with RSV treatment (GK-RSV; n = 8).

## 2.3. Treatment

RSV was provided for 8 weeks in drinking water at the dose of 1 mg/kg/day as suggested before by Rocha et al. [23,26]. As RSV solubility is higher in ethanol, we first dissolved RSV in ethanol and then in water. The placebo treatment corresponded to 1‰ ethanol in drinking water. Daily water ingestion was evaluated a few weeks before the beginning of the study, to calculate the concentration of RSV solution. During the 8 weeks of RSV treatment, water consumption was also measured to adjust RSV concentration if necessary [23].

## 2.4. Myocardial Tolerance to Ischemia-Reperfusion Injury

After 8 weeks of RSV treatment, isolated perfused heart experiments were performed to evaluate ex vivo the tolerance to ischemia-reperfusion injury, by measuring energy metabolism, cardiac function and coronary flow during the whole protocol. As previously described, rats were anesthetized by intraperitoneal injection of 90 mg/kg pentobarbital sodium [27]. The hearts were quickly removed from the chest cavity by thoracotomy and arrested in ice-cold Krebs-Henseleit buffer (containing (mM): NaCl (118), KCl (4.7), MgSO<sub>4</sub> (1.2), CaCl<sub>2</sub> (1.75), NaHCO<sub>3</sub> (25), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2), EDTA (0.5) and D-glucose (11)). Hearts were weighed and then cannulated via the ascending aorta for retrograde Langendorff-perfusion of coronary arterial network at a constant pressure of 100 mm Hg. A drain was placed at the apex of the heart to evacuate coronary effluents. In the same time, blood samples were immediately taken for glucose and free fatty acids (FFAs) determination in plasma.

### 2.4.1. Experimental Protocol

After 4 min of stabilization with a Krebs–Henseleit buffer, hearts were perfused for 24 min with a physiological recirculating Krebs–Henseleit buffer (Pa 0.4) containing 0.4 mM palmitate, 3% albumin, 11 mM glucose, 3U/L insulin, 0.8 mM lactate, and 0.2 mM pyruvate. Four minutes before low-flow ischemia, hearts were perfused with a physiological non-recirculating Krebs–Henseleit buffer (Pa 1.2) containing 1.2 mM palmitate, 3% albumin, 11 mM glucose, 3U/L insulin, 0.8 mM lactate, and 0.2 mM pyruvate. Then, the hearts underwent a low-flow ischemia (0.5 mL/min/g wet wt) of 32 min with the same buffer. Finally, flow was restored entirely for 32 min with the physiological Krebs–Henseleit buffer containing 0.4 mM palmitate. The palmitate concentration was increased at the end of the control period and during ischemia to induce a maximum damage [28]. The perfusates were continually gassed with a mixture of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> to maintain pH at 7.40. The buffer temperature was maintained at 37 °C during the entire protocol.

### 2.4.2. Myocardial Function

A water-filled latex balloon was inserted in the left ventricle via the mitral valve and inflated to produce an end diastolic pressure (EDP) of  $\approx$ 10 mm Hg at the beginning of perfusion. Left ventricular developed pressure (DP) and heart rate (HR) were recorded using a pressure sensor connected to the balloon, as previously described [6]. The product of heart rate and developed pressure was used as an index of cardiac function. During reperfusion, we calculated the

percentage recovery between the pre-ischemic and post-ischemic cardiac function. Coronary flow (CF) was measured via collection of coronary effluent before and after ischemia (at 20 min and 80 min), expressed in mL/min/g wet weight.

#### 2.4.3. Myocardial Energy Metabolism

##### <sup>31</sup>P Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS)

Perfused rat hearts were placed in a 20-mm magnetic resonance sample tube and inserted in a <sup>31</sup>P probe that was seated in the bore of a superconducting wide-bore (89-mm) 4.7 Tesla magnet (Oxford instruments, Oxford, U.K.) interfaced with a Bruker-Nicolet Avance WP-200 spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany). <sup>31</sup>P spectra were obtained by accumulating 328 free induction decay signals acquired for 4 min (flip angle 45°, repetition time 0.7 s, spectral width 4500 Hz, 2048 data points) [29]. Prior to Fourier transformation, the free induction decay was multiplied by an exponential function which generated a 20 Hz line broadening. Quantification of the signal integrals was carried out using an external reference containing an aqueous solution of 0.6 mM phenylphosphonic acid. A series of eight <sup>31</sup>P spectra were recorded during each period of the experimental protocol to quantify phosphorus metabolites (ATP, PCr, and Pi) and intracellular pH.

##### Biochemical Analyses in Freeze-Clamped Heart

As a complement to <sup>31</sup>P MRS, high performance liquid chromatography (HPLC) analysis, as well as citrate synthase (CS) activity, were performed as indicators of mitochondrial function. First, PCr, creatine, adenine nucleotides, and derivatives were assessed using ion-exchange high performance liquid chromatography (HPLC). A perchloric extraction, adapted from Lazzarino et al., was performed by homogenizing cardiac tissue (50 to 100 mg) with a Polytron homogenizer (Kinematica, Luzern, Switzerland) in ice-cold 0.6 M perchloric acid [30]. Then, homogenates were centrifuged at 5000× g for 10 min at 4 °C and supernatants were preserved for the comparative metabolite determination. Protein concentration calculation was carried out according to Lowry et al. to express the results in μmol/g protein [31]. Separation of adenine nucleotide derivatives, phosphocreatine, and creatine was performed using the ion-pairing reverse phase technique. Qualitative and quantitative analyses were carried out using adenine nucleotide standards and thymine monophosphate (Sigma, Poole, Dorset, UK) as an internal standard. Under these chromatographic conditions, a highly resolved separation of ATP, ADP, AMP, PCr, and creatine was obtained in 40 min. Total adenine nucleotide pool (TAN) was

calculated from the sum ATP + ADP + AMP. Energy charge (EC) is equal to  $((\text{ATP} + 0.5\text{ADP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})) \times 10$ .

Secondly, CS activity was evaluated using the citrate synthase assay kit. Protein extraction was performed, extracts were centrifuged at 14,000× g for 10 min at 4 °C and total protein concentration in the supernatant was determined using the Pierce BCA protein assay kit. Activity of citrate synthase was assessed at 412 nm in a 96-well plate with a kinetic program. Results are expressed in nmol/g of protein/minute.

#### 2.4.4. Expression of Proteins Involved in NO Pathway

Complementary to coronary flow measurement, we assessed the expression of eNOS, SIRT1, Akt, and P-Akt proteins in freeze-clamped hearts. A piece of left ventricle tissue ( $\approx 60$  mg) was homogenized in a RIPA lysis buffer and centrifuged at 14,000 rpm for 15 min at 4 °C. Total protein concentration in the supernatant was determined using the Pierce BCA protein assay kit. Equal amounts of proteins (90  $\mu\text{g}$  for eNOS and SIRT1, 50  $\mu\text{g}$  for Akt and P-Akt) were separated by 8% or 10% polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes. After blocking with 5% skim milk, membranes were incubated overnight at 4 °C with eNOS (1/1000), SIRT1 (1/1000), Akt (1/1000), P-Akt (Ser 473) (1/500), or Actin (1/2000) primary antibodies. Second, membranes were incubated with HRP-conjugated antibodies (1/2000). The immunoblots were developed and the protein signal was quantified using the Quantiscan software (Biosoft, Cambridge, U.K.). The intensity of each protein signal was normalized to the corresponding  $\beta$ -actin stain signal. Data are expressed as ratios between the protein and the corresponding  $\beta$ -actin signal density, except for P-Akt, which was expressed according to Akt.

#### 2.4.5. Oxidative Stress

SIRT3 protein expression, a mitochondrial sirtuin involved in oxidative stress, was assessed in freeze-clamped hearts following the same protocol as described above, with 50  $\mu\text{g}$  of protein separated by 10% polyacrylamide gel. Primary antibody against SIRT3 was used at 1/1000.

MDA was assessed to evaluate lipid peroxidation in freeze-clamped hearts. Lipid peroxidation was determined by the reaction of MDA with thiobarbituric acid (TBA) to form a colorimetric (532 nm)/fluorometric ( $\lambda_{\text{ex}} = 532/\lambda_{\text{em}} = 553$  nm) product, proportional to the MDA present.

## 2.5. Statistical Analyses

Data are graphically provided as means  $\pm$  SEM of absolute values. GraphPad Prism software 5.0 (La Jolla, CA, USA) was used for all statistical processing. Significant differences between groups were determined using two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures over time for the time-dependent variables followed by Bonferroni post-hoc test. An unpaired Student's t-test was used for the other parameters. A p-value of less than or equal to 0.05 was considered to indicate significant difference.

## 3. Results

### 3.1. Effect of Resveratrol on Physiological Parameters

Physiological parameters are shown in [Table 1](#). Plasma glucose was significantly increased in GK, GK-P, and GK-RSV in comparison to CTRL ( $p < 0.0001$ ). RSV treatment did not reduce plasma glucose in GK rats. Plasma-free fatty acids and weight of animals were similar in the four groups. The weight of the heart was significantly higher in the GK group compared to the three other groups ( $p < 0.001$ ). However, the heart weight to body weight ratio was increased in GK ( $p < 0.001$ ), GK-P ( $p < 0.01$ ), and GK-RSV ( $p < 0.01$ ) versus CTRL. The heart weight to body weight ratio was decreased in GK-RSV ( $p < 0.05$ ) and GK-P ( $p < 0.01$ ) in comparison to GK, indicating decreased cardiac hypertrophy by RSV treatment.

**Table 1.** Physiological parameters of experimental animals.

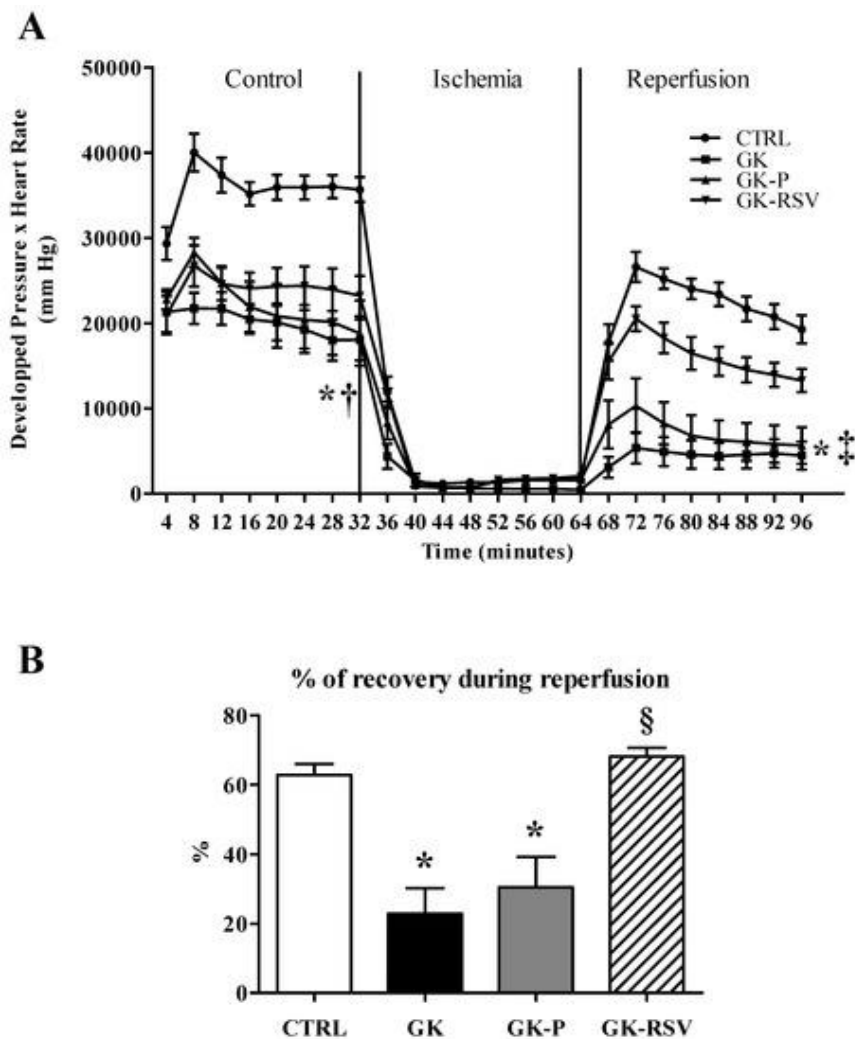
	CTRL	GK	GK-P	GK-RSV
<b>Glycemia (g/dL)</b>	1.64 $\pm$ 0.07	<b>2.46 <math>\pm</math> 0.09 *</b>	<b>2.52 <math>\pm</math> 0.15 *</b>	<b>2.49 <math>\pm</math> 0.07 *</b>
<b>Free Fatty Acids (mM)</b>	0.21 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.04	0.16 $\pm$ 0.04
<b>Body Weight (g)</b>	289.4 $\pm$ 6.6	284.6 $\pm$ 4.4	267.5 $\pm$ 5.7	269.7 $\pm$ 6.4
<b>Heart Weight (g)</b>	0.85 $\pm$ 0.02	<b>1.05 <math>\pm</math> 0.03 * + ‡</b>	0.89 $\pm$ 0.02	0.91 $\pm$ 0.02
<b>Ratio Heart/Body Weight*1000</b>	2.95 $\pm$ 0.09	<b>3.69 <math>\pm</math> 0.06 * II ¶</b>	<b>3.32 <math>\pm</math> 0.06 §</b>	<b>3.38 <math>\pm</math> 0.09 §</b>

Data are expressed as means  $\pm$  SEM. One-way ANOVA test was used for all the parameters. \*  $p < 0.0001$  vs. CTRL; †  $p < 0.0001$  vs. GK-P; ‡  $p < 0.0001$  vs. GK-RSV; §  $p < 0.01$  vs. CTRL; II  $p < 0.01$  vs. GK-P; ¶  $p < 0.05$  vs. GK-RSV.

### 3.2. Effect of Resveratrol on Tolerance to Ischemia-Reperfusion Injury

#### 3.2.1. Myocardial Function

Myocardial function (Figure 1A) was impaired in GK, GK-P, and GK-RSV compared with CTRL in baseline conditions ( $p < 0.001$  GK and GK-P vs. CTRL;  $p < 0.01$  GK-RSV vs. CTRL). RSV did not improve cardiac function in GK-RSV in comparison to CTRL in baseline conditions. After ischemia, GK and GK-P groups presented a higher sensitivity to ischemia-reperfusion injury since myocardial function was significantly impaired compared with CTRL ( $p < 0.001$ ) and the percentage of recovery (Figure 1B) was significantly decreased (respectively  $p < 0.001$  and  $p < 0.01$  vs. CTRL). Interestingly, GK-RSV rats had a better tolerance to ischemia-reperfusion injury than GK and GK-P rats, with an improvement of cardiac function up to CTRL values.



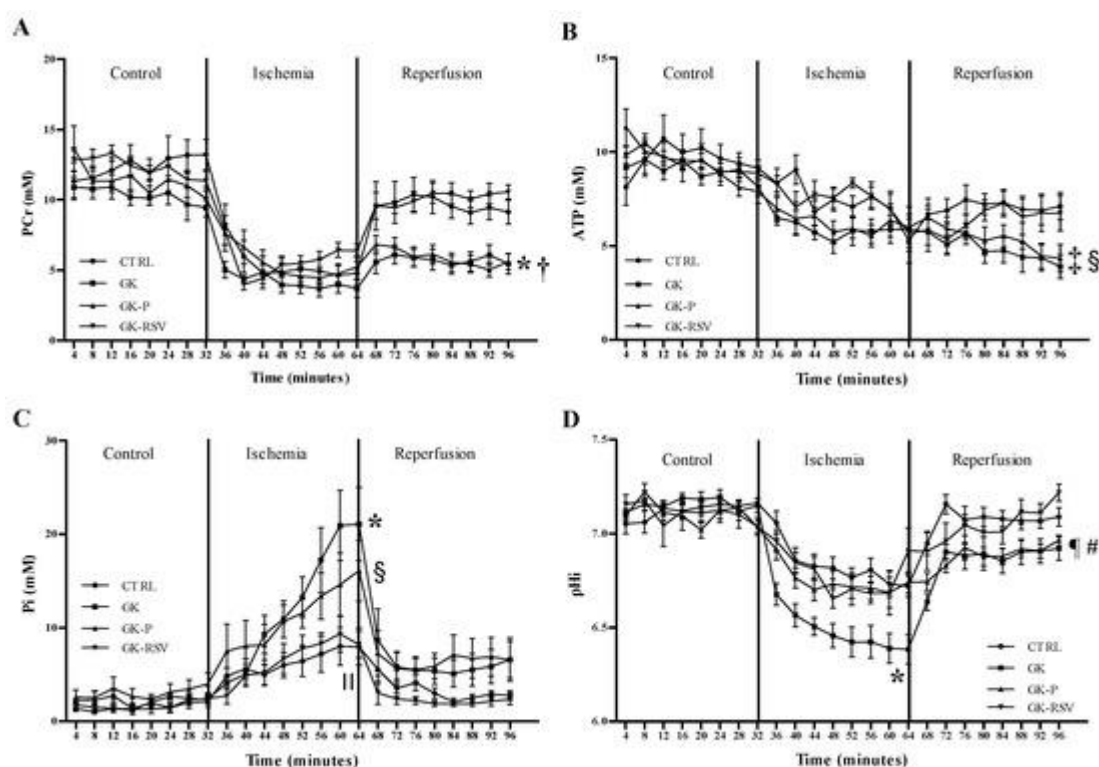
**Figure 1.** Myocardial function evaluated by the product of developed pressure and heart rate during the experimental time course (A) and % of recovery during reperfusion (B). Results are

expressed as means  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA was performed to observe the effect of group and time. \*  $p < 0.001$  GK and GK-P vs. CTRL, †  $p < 0.01$  GK-RSV vs. CTRL, ‡  $p < 0.01$  GK and GK-P vs. GK-RSV, and §  $p < 0.001$  vs. GK and GK-P.

### 3.2.2. Myocardial Energy Metabolism

#### <sup>31</sup>P MRS

Kinetics of PCr, ATP, Pi, and pH<sub>i</sub> during the experimental time course are shown in [Figure 2](#). No difference was found between groups in baseline conditions and during ischemia for PCr ([Figure 2A](#)) and ATP ([Figure 2B](#)) heart contents. However, during reperfusion, PCr and ATP heart contents were significantly decreased in GK and GK-P when compared with CTRL ( $p < 0.05$ ). RSV restored PCr and ATP contents to control values during reperfusion. In baseline conditions, Pi ([Figure 2C](#)) was not different between groups. During ischemia, Pi was significantly higher in GK and GK-P in comparison with CTRL (respectively  $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ ). RSV was able to prevent the increase in Pi in GK-RSV rats. No statistical difference was found between CTRL and GK-RSV, and Pi was significantly lower in GK-RSV vs. GK ( $p < 0.001$ ). Finally, pH<sub>i</sub> ([Figure 2D](#)) was identical between groups in baseline conditions. During ischemia, pH<sub>i</sub> was significantly decreased in GK ( $p < 0.01$  vs. CTRL). During reperfusion, pH<sub>i</sub> was significantly decreased in GK and GK-P compared with GK-RSV (respectively  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ ). RSV treatment restored pH<sub>i</sub> in GK-RSV to control values.

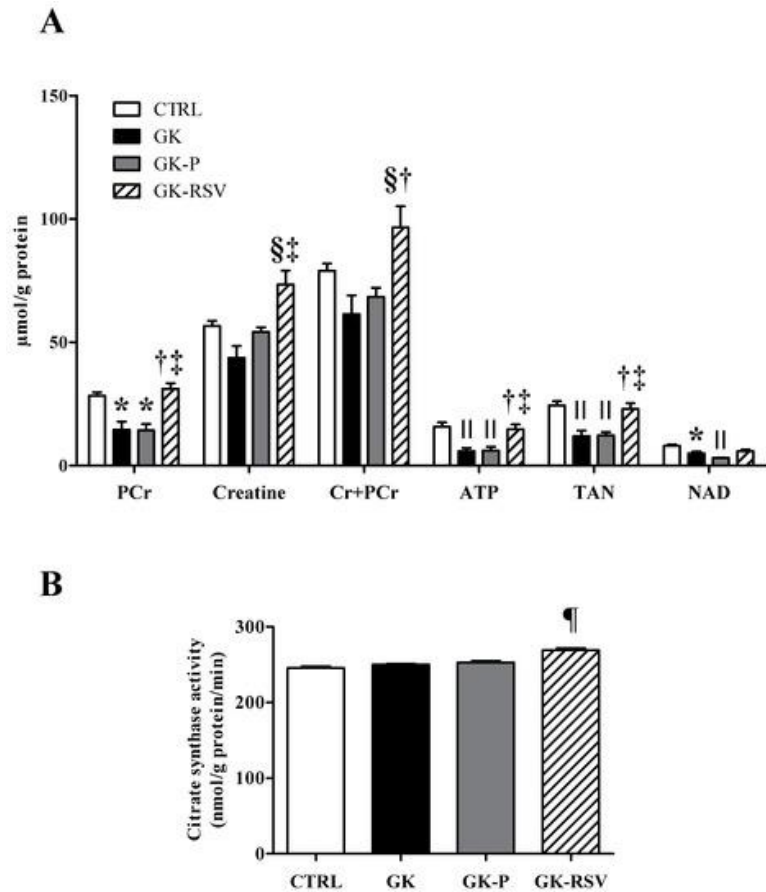


**Figure 2.** Kinetics of phosphocreatine (PCr) (A), ATP (B), Pi (C), and intracellular pH (pHi) (D) during the experimental time course in rat hearts. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA was performed to observe the effect of group and time. \*  $p < 0.01$  GK vs. CTRL, †  $p < 0.01$  GK-P vs. CTRL, ‡  $p < 0.05$  GK vs. CTRL, §  $p < 0.05$  GK-P vs. CTRL, ||  $p < 0.001$  GK-RSV vs. GK, ¶  $p < 0.05$  GK-P vs. GK-RSV, and #  $p < 0.01$  GK vs. GK-RSV.

### Biochemical Analysis in Freeze-Clamped Hearts

Considering the improvements made by the RSV on high-energy compound contents during *ex vivo* experiments, we carried out additional biochemical analyses in freeze-clamped hearts. First, a total pool of PCr, creatine, ATP, and total adenine nucleotides (TAN) were assessed using HPLC as shown in [Figure 3A](#). PCr was significantly decreased in GK and GK-P in comparison to CTRL ( $p < 0.05$ ). RSV restored PCr heart content in GK-RSV, which was significantly different compared with GK ( $p < 0.01$ ) and GK-P ( $p < 0.05$ ). Creatine was not different between CTRL, GK, and GK-P groups. RSV treatment increased creatine heart content in GK-RSV versus GK ( $p < 0.001$ ) and GK-P ( $p < 0.05$ ). The sum of creatine and phosphocreatine was significantly increased in GK-RSV in comparison to GK ( $p < 0.001$ ) and GK-P ( $p < 0.01$ ). ATP was significantly decreased in GK and GK-P in comparison to CTRL ( $p < 0.01$ ). RSV increased ATP content in GK-RSV versus GK and GK-P (respectively  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ ). TAN was significantly decreased in GK and GK-P in comparison to CTRL ( $p < 0.01$ ). RSV restored TAN in GK-RSV, which was increased in comparison to GK ( $p < 0.01$ ) and GK-P ( $p < 0.05$ ). These results are in line with energy metabolism measured by  $^{31}\text{P}$  MRS. AMP, ADP, and energy charge results are shown in the [supplementary material \(Figure S1\)](#). No statistical difference was found between groups for AMP content. ADP content was significantly decreased only in GK versus CTRL ( $p < 0.05$ ). RSV increased ADP content but it did not reach statistical difference. No difference was found between groups for energy charge. Second, citrate synthase activity ([Figure 3B](#)) was also assessed in freeze-clamped hearts. Citrate synthase activity was significantly increased by RSV treatment in GK-RSV in comparison to the other groups ( $p < 0.0001$ ). Together these results indicate that RSV could improve cardiac mitochondrial function in type 2 diabetic female rats.

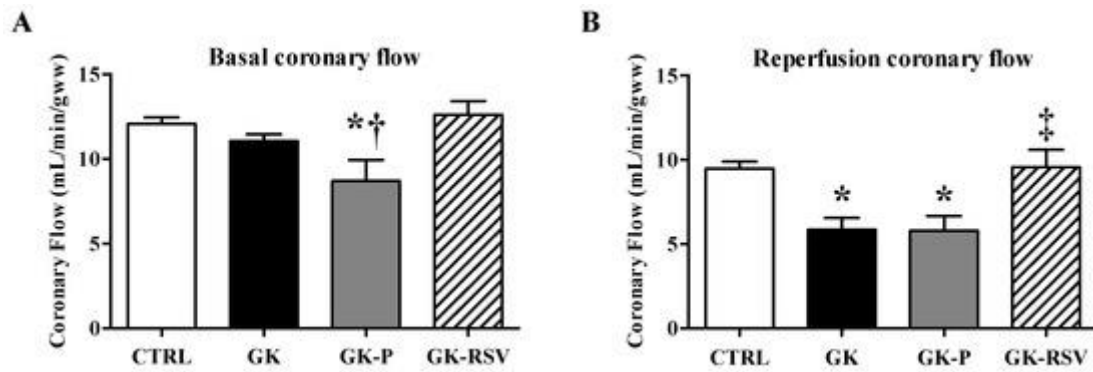




**Figure 3.** Total pool of phosphocreatine, creatine, PCr + Cr, ATP, total adenine nucleotides (TAN) (**A**) and citrate synthase activity (**B**) in rat hearts. Data are expressed as means  $\pm$  SEM and one-way ANOVA was used to compare the groups. \*  $p < 0.05$  vs. CTRL, †  $p < 0.01$  vs. GK, ‡  $p < 0.05$  vs. GK-P, §  $p < 0.001$  vs. GK; ¶  $p < 0.01$  vs. CTRL; and ¶¶  $p < 0.0001$  vs. CTRL, GK, and GK-P.

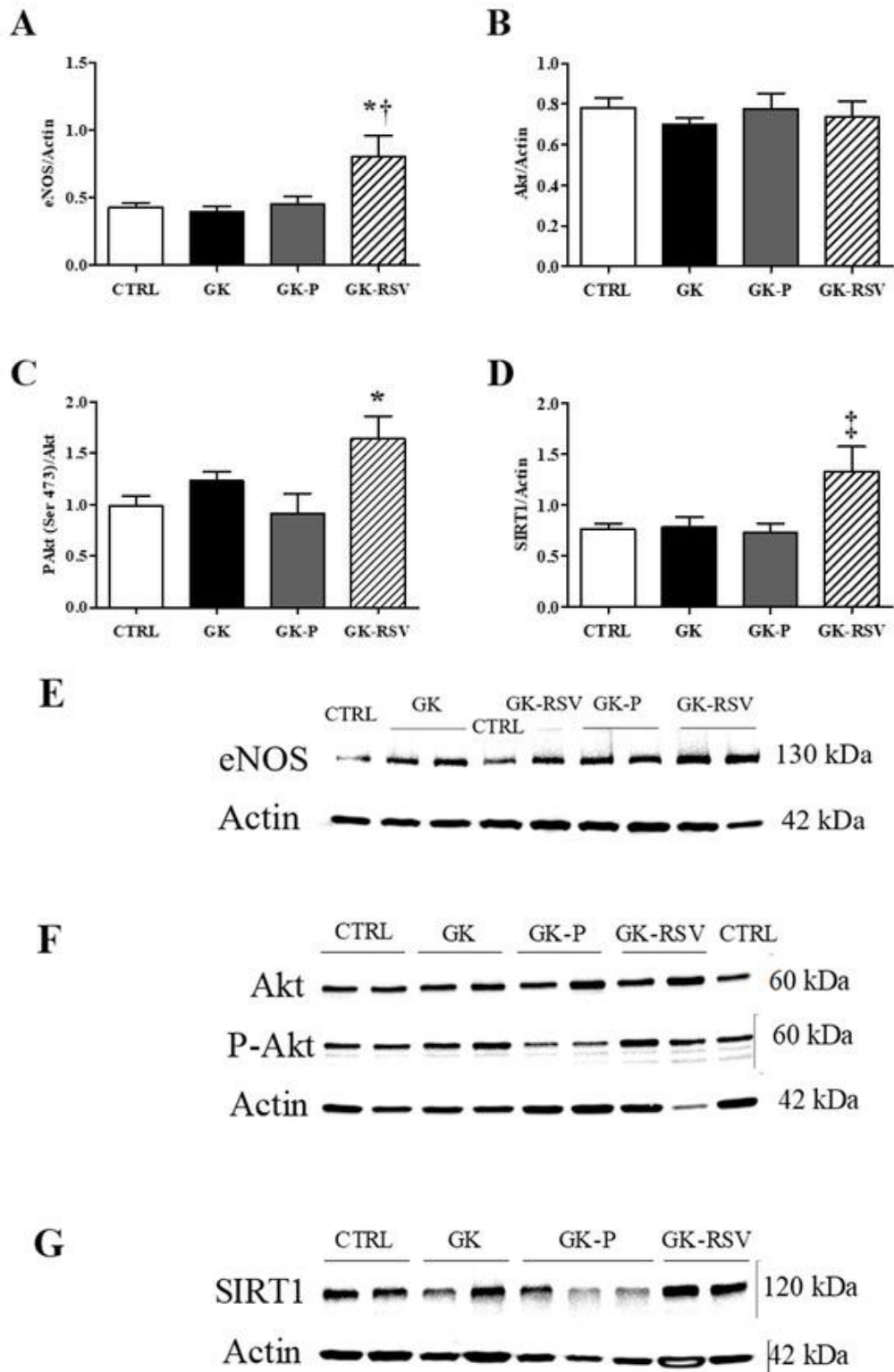
### 3.2.3. Coronary Flow and Expression of Proteins Involved in NO Pathway

Before ischemia ([Figure 4A](#)), CF was significantly decreased in GK-P in comparison to GK-RSV ( $p < 0.05$ ). During reperfusion ([Figure 4B](#)), CF was significantly impaired in GK and GK-P in comparison to CTRL ( $p < 0.01$ ). Treatment with RSV maintained CF during reperfusion to control values in GK-RSV.



**Figure 4.** Baseline coronary flow evaluated at 20 min (**A**) and reperfusion coronary flow evaluated at 80 min (**B**). Data are expressed as means  $\pm$  SEM and one-way ANOVA was used to compare the groups. \*  $p < 0.05$  vs. CTRL, †  $p < 0.01$  vs. GK-RSV, and ‡  $p < 0.05$  vs. GK and GK-P.

Complementary to the coronary flow measurement, we assessed the expression of eNOS, SIRT1, Akt and P-Akt proteins involved in the NO pathway in freeze-clamped hearts. Expression of eNOS, Akt, PAkt (Ser 473), and SIRT1 protein is shown in [Figure 5](#). eNOS protein expression was significantly increased in GK-RSV in comparison to the three other groups ( $p < 0.05$  vs. CTRL and GK-P;  $p < 0.01$  vs. GK). Akt protein was similarly expressed in the four groups. The phosphorylated form of Akt was significantly increased in GK-RSV vs. CTRL and GK-P ( $p < 0.05$ ). SIRT1 was increased in GK-RSV compared to the other groups ( $p < 0.05$ ). These results suggest an improvement of NO pathway by RSV leading to higher coronary flow during reperfusion. iNOS was not expressed in the four groups (data not shown).



**Figure 5.** Protein expression of eNOS (A), Akt (B), PAKt (Ser 473) (C), and SIRT1 (D). Representative western blot of eNOS (E), Akt and its phosphorylated form (F), and SIRT1 (G). Data are expressed as means  $\pm$  SEM and one-way ANOVA to compare the groups. \*  $p < 0.05$  vs. CTRL and GK-P; †  $p < 0.01$  vs. GK; and ‡  $p < 0.05$  vs. CTRL, GK, and GK-P.

## Oxidative Stress

SIRT3 protein expression and MDA heart content were not different between groups, with no effect of RSV ([Supplementary Material, Figures S2 and S3](#)).

## **4. Discussion**

The main objective of this study was to investigate the potential protective effects of RSV on high-energy compounds during ischemia-reperfusion injury in type 2 diabetic female rat hearts. We found in GK rat hearts a lower tolerance to ischemia-reperfusion injury, characterized by impaired energy metabolism and associated with a decrease in functional recovery and coronary flow. Eight-week treatment with a low dose of RSV was able to protect the heart from the loss of energetic compounds during reperfusion and to improve cardiac function and coronary flow. Biochemical analyses confirmed the positive effects of RSV on ATP and PCr, as well as TAN, creatine, and citrate synthase activity, which are indicators of mitochondrial function. Moreover, the improvement of coronary flow during reperfusion by RSV was associated to increased eNOS, SIRT1, and P-Akt protein expression in GK rat hearts.

RSV has been associated to the French paradox, which reflects the lower incidence and mortality by CV disease in the French population, as a link with daily consumption of red wine [32]. As specified in the introduction, a dose of less than 1 mg/kg/day may not have cardiovascular effects [18], while a high dose may damage the heart during an ischemia-reperfusion injury [24]. Thus, the dose used in our study seems to be a good compromise.

The Goto-Kakizaki rat is one of the best characterized animal models of spontaneous type 2 diabetes [33] presenting cardiac insulin resistance and CV complications [34]. Here we found cardiac hypertrophy and basal cardiac dysfunction in GK vs. CTRL due to the decrease of both developed pressure and heart rate. The modification of high energy compounds does not explain the impaired cardiac function found in baseline conditions. Interestingly, the alteration of excitation–contraction coupling [35] and the downregulation and upregulation of multiple genes, such as *Trpc6* or *Ryr2*, involved in the activity of the sinoatrial node [36] have been previously reported in GK rats and could explain the impairment in myocardial function shown here. RSV had no effect on cardiac function prior to ischemic insult, as previously reported by Robich et al. [37]. However, 1 mg/kg/day of RSV decreased cardiac hypertrophy and improved the myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury. Recently, Bagul et al. showed cardiac hypertrophy with increased cardiac cell size in rats under a high-fat diet, with a reverse effect

of RSV administered in the food at 10 mg/kg/day for 8 weeks [19]. Lin et al. pointed out the decrease of atrial natriuretic peptide and TGF1 $\beta$  related to reduced infarct size in animals treated with RSV by intraperitoneal injection for 4 weeks [18]. RSV has also been shown to reduce pro-hypertrophic markers such as ANP, BNP, and  $\beta$ -MHC, and improve redox balance by increasing SOD [13] in streptozotocin (STZ) and high-fat model of type 2 diabetes. Interestingly, placebo treatment also showed a decrease in cardiac hypertrophy in type 2 diabetic rats. Placebo treatment (ethanol 1‰) may have an effect on cardiac hypertrophy, as suggested by Ninh et al. in a rodent model of pressure overload with cardiac hypertrophy [38]. Moreover, Miyamae et al. also showed a higher myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in animals treated with ethanol [39]. Nonetheless, the authors used up to 20% of ethanol in the drinking water, which might explain why we did not see an effect on the tolerance to ischemia-reperfusion injury in our study.

Myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury was impaired in type 2 diabetic GK rats and was associated with altered energy metabolism, characterized by a decrease in high energy compound contents. Indeed, mitochondrial dysfunction has been widely suggested to explain the mechanisms involved in heart failure of diabetic patients [40]. Studies on type 2 diabetic animals also showed decreased expression of mitochondrial respiratory chain complexes, and mitochondrial biogenesis through PGC1 $\alpha$  [41]. Interestingly, a previous study on the GK model showed impaired cardiac function during ischemia-reperfusion injury, without alteration of energy metabolism in male gender [27]. In addition, Billimoria et al. showed a decrease of mitochondrial respiration in diabetic STZ rat hearts with a higher impairment in female than in male [42], unlike female GK here. Remarkably, RSV improved high energy compounds during reperfusion in GK-RSV rats and this observation may explain the better myocardial functional recovery. ATP and PCr were significantly increased in GK-RSV rats, up to control values. In parallel RSV prevented the high increase in Pi during ischemia and decrease in pHi during reperfusion. Consistent with these results, HPLC analysis in the cardiac tissue highlighted the restoration in ATP and PCr heart contents in GK-RSV at the end of reperfusion. In addition, we showed a preservation in the pool of creatine and TAN, crucial for ATP and PCr synthesis, in type 2 diabetic animals under RSV after ischemic insult. Here, RSV treatment also increased CS activity in GK rat hearts, as recently reported by Lagouge et al. in mice treated orally with a dose of 400 mg/kg/day RSV, indicating enhanced mitochondrial enzymatic activity [43]. Consequently, taken together, our results suggest that the RSV-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in type 2 diabetes could be associated to better

mitochondrial functioning. In the literature, mitochondrial function has been shown to be improved by RSV via increase in mitochondrial DNA, biogenesis mitochondrial factor PGC1 $\alpha$  [13], Nrf-1, and Tfam mRNA expression [44], and decrease in the opening of mitochondrial transition pore [21]. Further studies need to be performed to elucidate the molecular mechanisms involved in the RSV-induced mitochondrial protection.

On the other hand, the expression of the SIRT3 protein, a mitochondrial sirtuin involved in mitochondrial function and oxidative stress [45], was the same in all groups. This result is consistent with MDA heart content which was also similar in all groups. Thus, the improvement of energy metabolism by RSV was independent from SIRT3 and oxidative stress.

Multiple studies have shown the effect of RSV, a well-known SIRT1 activator, on endothelial function [14,15,16,17]. Here, we assessed coronary flow and expression of proteins involved in NO pathway as indicators of endothelial function. During reperfusion, coronary flow was altered in both GK and GK-P versus CTRL. No difference was shown in eNOS, Akt, P-Akt, and SIRT1 expression, between CTRL and GK rats, although previous studies reported decreased eNOS expression in type 2 diabetes. The literature is still inconclusive concerning the expression of eNOS in type 2 diabetes. Indeed, some studies reported a decrease [46] while others showed an increase [27] in eNOS expression. Interestingly, RSV was able to fully restore the coronary flow during reperfusion and to significantly increase the expression of eNOS, P-Akt, and SIRT1 proteins in GK rat hearts. Previously, Huang et al. showed that RSV increased the expression of P-Akt and eNOS in the thoracic aorta of rats under high-fat diet [47]. In type 2 diabetic db/db mice, RSV also enhance cardiac NO production and eNOS protein expression [48]. More generally, RSV has also been shown to enhance NO production, increase NOS expression and activity, prevent eNOS uncoupling and increase NO bioavailability [9]. In fact, increasing NO production and bioavailability via eNOS is one of the mechanisms involved in cardioprotection against ischemia-reperfusion [49]. Then, exploring the phosphorylated form of eNOS, eNOS uncoupling or NO availability could help us understand the higher coronary flow reported in GK-RSV rats during reperfusion. Remarkably, RSV increased tolerance to ischemia-reperfusion injury independently from glycemic improvements. Indeed, we did not observe any effect on glycemia with a low-dose of 1 mg/kg/day. Some studies present RSV as a new potential anti-diabetic treatment when used at high dose [13,50]. The mechanisms involved might go through the increase in GLP-1 secretion [50], beta cell insulin secretion, beta cell gene expression, or improvement of insulin sensitivity [51]. At this point, it is important to remind that the GK model presents mild hyperglycemia, which could explain why effects of

RSV might go unnoticed. Therefore, we may suppose an estrogen-like effect of RSV on mitochondrial and endothelial pathways, which could improve tolerance to ischemia-reperfusion injury, independently from glycemic control. Estrogens have positive effects on vessels by improving vasorelaxation [52] and on key regulators of energy metabolism and mitochondrial biogenesis (PGC1 $\alpha$ ) [13]. Moreover, RSV has an estrogen-like effect by activating estrogen receptors at nuclear and extracellular levels [53]. Recently, RSV has shown better effects on metabolic parameters in female controls than in ovariectomized female rats [54]. It would, therefore, be interesting to assess the effects of RSV on ovariectomized female GK rats to better understand the involvement of hormones in cardiovascular RSV effects.

In conclusion, RSV had a protective effect against ischemia-reperfusion injury via increased high energy compound contents and eNOS-SIRT1 expression in type 2 diabetic female rat heart. We believe our results could contribute to a better understanding of the mechanisms involved in RSV-induced cardioprotection. As type 2 diabetic women present a high risk of mortality by myocardial infarction, low dose of RSV supplementation could be an interesting way to improve myocardial infarction survival. Indeed, mitochondrial and endothelial dysfunctions have been reported in the type 2 diabetic patients, with a decrease in PCr/ATP ratio in the heart and a high rate of coronary artery diseases. Thus, RSV presents high potential for preventing and treating cardiovascular complications of type 2 diabetic women.

### **Supplementary Materials**

The following are available online at <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/1/105/s1>. Figure S1: AMP (A), ADP (B) and EC\*10 (C) in rat hearts, Figure S2: Protein expression of SIRT3 in rat hearts, Figure S3: MDA heart content in rat hearts.

### **Author Contributions**

All the authors participated substantially in the investigations reported here as indicated: N.F. contributed to design, performed the experiments, data analysis, and wrote the paper; C.L. contributed to experiments; E.S. contributed to the design of the study; M.B. and M.D. contributed to design, interpretation of the overall study, and manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

## **Funding**

This work was supported by Aix-Marseille Université, CNRS (UMR 7339), and France Life Imaging (ANR-11-INBS-0006). We further acknowledge funding from Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE17-0016–COFLORES) and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM DBS20140930772).

## **Acknowledgments**

We thank Laurent Pechere from YVERY for providing RSV treatment. We also would like to thank Jamileh Movassat and Danielle Bailbé who contributed to animal supply.

## **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest. The providing funding were not involved in the study design; in collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the article for publication.

## **References**

1. Peters, S.A.; Huxley, R.R.; Woodward, M. Diabetes as risk factor for incident coronary heart disease in women compared with men: A systematic review and meta-analysis of 64 cohorts including 858,507 individuals and 28,203 coronary events. *Diabetologia* **2014**, *57*, 1542–1551. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Regensteiner, J.G.; Golden, S.; Huebschmann, A.G.; Barrett-Connor, E.; Chang, A.Y.; Chyun, D.; Fox, C.S.; Kim, C.; Mehta, N.; Reckelhoff, J.F.; et al. Sex Differences in the Cardiovascular Consequences of Diabetes Mellitus: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* **2015**, *132*, 2424–2447. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kannel, W.B.; Hjortland, M.; Castelli, W.P. Role of diabetes in congestive heart failure: The Framingham study. *Am. J. Cardiol.* **1974**, *34*, 29–34. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
4. Wannamethee, S.G.; Papacosta, O.; Lawlor, D.A.; Whincup, P.H.; Lowe, G.D.; Ebrahim, S.; Sattar, N. Do women exhibit greater differences in established and novel risk factors between diabetes and non-diabetes than men? The British Regional Heart Study and British Women's Heart Health Study. *Diabetologia* **2012**, *55*, 80–87. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Hu, G.; Jousilahti, P.; Qiao, Q.; Katoh, S.; Tuomilehto, J. Sex differences in cardiovascular and total mortality among diabetic and non-diabetic individuals with or without history of



- myocardial infarction. *Diabetologia* **2005**, 48, 856–861. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Desrois, M.; Lan, C.; Movassat, J.; Bernard, M. Reduced up-regulation of the nitric oxide pathway and impaired endothelial and smooth muscle functions in the female type 2 diabetic goto-kakizaki rat heart. *Nutr. Metab.* **2017**, 14, 6. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  7. Cefalu, W.T.; Kaul, S.; Gerstein, H.C.; Holman, R.R.; Zinman, B.; Skyler, J.S.; Green, J.B.; Buse, J.B.; Inzucchi, S.E.; Leiter, L.A.; et al. Cardiovascular Outcomes Trials in Type 2 Diabetes: Where Do We Go From Here? Reflections From a Diabetes Care Editors' Expert Forum. *Diabetes Care* **2018**, 41, 14–31. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
  8. Selvaraju, V.; Joshi, M.; Kotha, S.R.; Parinandi, N.L.; Maulik, N. Resveratrol Emerges as a Miracle Cardioprotective Phytochemical Polyphenol and Nutraceutical. In *Cardiovascular Diseases: Nutritional and Therapeutic Interventions*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2013; pp. 401–420. [[Google Scholar](#)]
  9. Xia, N.; Forstermann, U.; Li, H. Resveratrol and endothelial nitric oxide. *Molecules* **2014**, 19, 16102–16121. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
  10. Luciano, T.F.; Marques, S.D.O.; Pieri, B.L.D.S.; Souza, D.R.D.; Lira, F.S.D.; Souza, C.T.D. Resveratrol reduces chronic inflammation and improves insulin action in the myocardium of high-fat diet-induced obese rats. *Rev. Nutr.* **2014**, 27, 151–159. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
  11. Su, H.C.; Hung, L.M.; Chen, J.K. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2006**, 290, E1339–E1346. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)][[Green Version](#)]
  12. Do, G.M.; Kwon, E.Y.; Kim, H.J.; Jeon, S.M.; Ha, T.Y.; Park, T.; Choi, M.S. Long-term effects of resveratrol supplementation on suppression of atherogenic lesion formation and cholesterol synthesis in apo E-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 374, 55–59. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  13. Fang, W.J.; Wang, C.J.; He, Y.; Zhou, Y.L.; Peng, X.D.; Liu, S.K. Resveratrol alleviates diabetic cardiomyopathy in rats by improving mitochondrial function through PGC-1 $\alpha$  deacetylation. *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, 39, 59–73. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  14. Li, H.; Forstermann, U. Pharmacological prevention of eNOS uncoupling. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, 20, 3595–3606. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  15. Silan, C. The effects of chronic resveratrol treatment on vascular responsiveness of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, 31, 897–902. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Bhatt, S.R.; Lokhandwala, M.F.; Banday, A.A. Resveratrol prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling and attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *667*, 258–264. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Fukuda, S.; Kaga, S.; Zhan, L.; Bagchi, D.; Das, D.K.; Bertelli, A.; Maulik, N. Resveratrol ameliorates myocardial damage by inducing vascular endothelial growth factor-angiogenesis and tyrosine kinase receptor Flk-1. *Cell. Biochem. Biophys.* **2006**, *44*, 43–49. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
18. Lin, J.F.; Lin, S.M.; Chih, C.L.; Nien, M.W.; Su, H.H.; Hu, B.R.; Huang, S.S.; Tsai, S.K. Resveratrol reduces infarct size and improves ventricular function after myocardial ischemia in rats. *Life Sci.* **2008**, *83*, 313–317. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
19. Bagul, P.K.; Banerjee, S.K. Application of resveratrol in diabetes: Rationale, strategies and challenges. *Curr. Mol. Med.* **2015**, *15*, 312–330. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
20. Chen, T.; Li, J.; Liu, J.; Li, N.; Wang, S.; Liu, H.; Zeng, M.; Zhang, Y.; Bu, P. Activation of SIRT3 by resveratrol ameliorates cardiac fibrosis and improves cardiac function via the TGF-beta/Smad3 pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2015**, *308*, H424–H434. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
21. Meng, Z.; Jing, H.; Gan, L.; Li, H.; Luo, B. Resveratrol attenuated estrogen-deficient-induced cardiac dysfunction: Role of AMPK, SIRT1, and mitochondrial function. *Am. J. Transl. Res.* **2016**, *8*, 2641–2649. [[Google Scholar](#)]
22. Shah, A.; Reyes, L.M.; Morton, J.S.; Fung, D.; Schneider, J.; Davidge, S.T. Effect of resveratrol on metabolic and cardiovascular function in male and female adult offspring exposed to prenatal hypoxia and a high-fat diet. *J. Physiol.* **2016**, *594*, 1465–1482. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
23. Rocha, K.K.; Souza, G.A.; Ebaid, G.X.; Seiva, F.R.; Cataneo, A.C.; Novelli, E.L. Resveratrol toxicity: Effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 1362–1367. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Dudley, J.I.; Lekli, I.; Mukherjee, S.; Das, M.; Bertelli, A.A.A.; Das, D.K. Does White Wine Qualify for French Paradox? Comparison of the Cardioprotective Effects of Red and White Wines and Their Constituents: Resveratrol, Tyrosol, and Hydroxytyrosol (Retraction of vol 56, pg 9362, 2008). *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2767. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

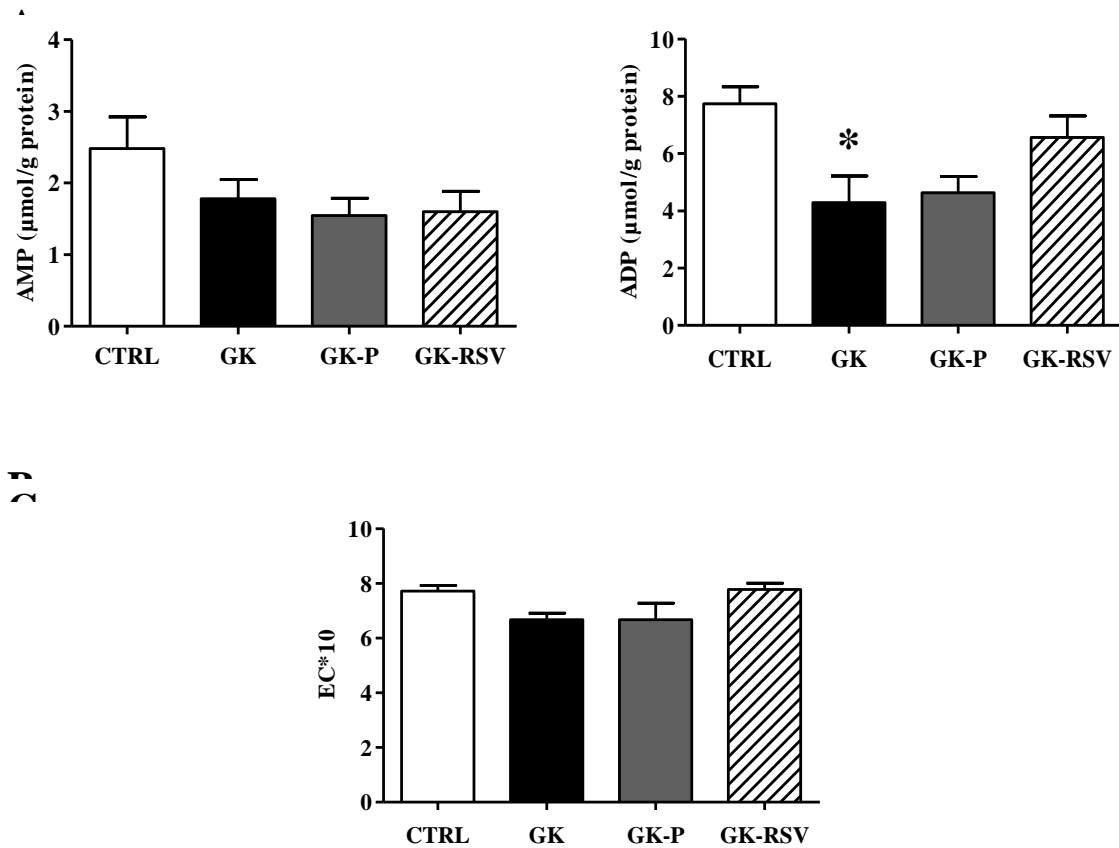
25. Portha, B. Programmed disorders of beta-cell development and function as one cause for type 2 diabetes? The GK rat paradigm. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2005**, 21, 495–504. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ferreira, M.P.; Willoughby, D. Alcohol consumption: The good, the bad, and the indifferent. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2008**, 33, 12–20. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Desrois, M.; Clarke, K.; Lan, C.; Dalmasso, C.; Cole, M.; Portha, B.; Cozzone, P.J.; Bernard, M. Upregulation of eNOS and unchanged energy metabolism in increased susceptibility of the aging type 2 diabetic GK rat heart to ischemic injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2010**, 299, H1679–H1686. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)][[Green Version](#)]
28. Oliver, M.F. Fatty acids and the risk of death during acute myocardial ischaemia. *Clin. Sci.* **2015**, 128, 349–355. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
29. Desrois, M.; Sciaky, M.; Lan, C.; Cozzone, P.J.; Bernard, M. L-arginine during long-term ischemia: Effects on cardiac function, energetic metabolism and endothelial damage. *J. Heart Lung Transpl.* **2000**, 19, 367–376. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
30. Lazzarino, G.; Nuutinen, M.; Tavazzi, B.; Di Pierro, D.; Giardina, B. A method for preparing freeze-clamped tissue samples for metabolite analyses. *Anal. Biochem.* **1989**, 181, 239–241. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
31. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265–275. [[Google Scholar](#)]
32. Renaud, S.; de Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **1992**, 339, 1523–1526. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
33. Portha, B.; Giroix, M.H.; Turrel-Cuzin, C.; Le-Stunff, H.; Movassat, J. The GK rat: A prototype for the study of non-overweight type 2 diabetes. *Methods Mol. Biol.* **2012**, 933, 125–159. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Desrois, M.; Sidell, R.J.; Gauguier, D.; King, L.M.; Radda, G.K.; Clarke, K. Initial steps of insulin signaling and glucose transport are defective in the type 2 diabetic rat heart. *Cardiovasc. Res.* **2004**, 61, 288–296. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)][[Green Version](#)]
35. Salem, K.A.; Qureshi, M.A.; Sydorenko, V.; Parekh, K.; Jayaprakash, P.; Iqbal, T.; Singh, J.; Oz, M.; Adrian, T.E.; Howarth, F.C. Effects of exercise training on excitation-contraction coupling and related mRNA expression in hearts of Goto-Kakizaki type 2 diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.* **2013**, 380, 83–96. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Howarth, F.C.; Qureshi, M.A.; Jayaprakash, P.; Parekh, K.; Oz, M.; Dobrzynski, H.; Adrian, T.E. The Pattern of mRNA Expression Is Changed in Sinoatrial Node from Goto-Kakizaki Type

- 2 Diabetic Rat Heart. *J. Diabetes Res.* **2018**, 2018, 8454078. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Robich, M.P.; Chu, L.M.; Burgess, T.A.; Feng, J.; Han, Y.; Nezafat, R.P.; Leber, M.P.; Laham, R.J.; Manning, W.J.; Sellke, F.W. Resveratrol Preserves Myocardial Function and Perfusion in Remote Nonischemic Myocardium in a Swine Model of Metabolic Syndrome. *J. Am. College Surg.* **2012**, 215, 681–689. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)][[Green Version](#)]
38. Ninh, V.K.; El Hajj, E.C.; Mouton, A.J.; El Hajj, M.C.; Gilpin, N.W.; Gardner, J.D. Chronic Ethanol Administration Prevents Compensatory Cardiac Hypertrophy in Pressure Overload. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2018**. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Miyamae, M.; Diamond, I.; Weiner, M.W.; Camacho, S.A.; Figueredo, V.M. Regular alcohol consumption mimics cardiac preconditioning by protecting against ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 3235–3239. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)][[Green Version](#)]
40. Montaigne, D.; Marechal, X.; Coisne, A.; Debry, N.; Modine, T.; Fayad, G.; Potelle, C.; El Arid, J.M.; Mouton, S.; Sebti, Y.; et al. Myocardial contractile dysfunction is associated with impaired mitochondrial function and dynamics in type 2 diabetic but not in obese patients. *Circulation* **2014**, 130, 554–564. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
41. Rovira-Llopis, S.; Banuls, C.; Diaz-Morales, N.; Hernandez-Mijares, A.; Rocha, M.; Victor, V.M. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol.* **2017**, 11, 637–645. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
42. Billimoria, F.R.; Katyare, S.S.; Patel, S.P. Insulin status differentially affects energy transduction in cardiac mitochondria from male and female rats. *Diabetes Obes. Metab.* **2006**, 8, 67–74. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Lagouge, M.; Argmann, C.; Gerhart-Hines, Z.; Meziane, H.; Lerin, C.; Daussin, F.; Messadeq, N.; Milne, J.; Lambert, P.; Elliott, P.; Geny, B.; Laakso, M.; Puigserver, P.; Auwerx, J. Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell.* **2006**, 127, 1109–1122. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)][[Green Version](#)]
44. Csiszar, A.; Labinsky, N.; Pinto, J.T.; Ballabh, P.; Zhang, H.; Losonczy, G.; Pearson, K.; de Cabo, R.; Pacher, P.; Zhang, C.; et al. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, 297, H13–H20. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)][[Green Version](#)]
45. Osborne, B.; Bentley, N.L.; Montgomery, M.K.; Turner, N. The role of mitochondrial sirtuins in health and disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, 100, 164–174. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

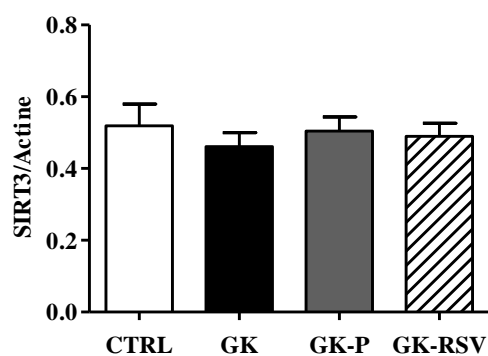
46. Zhang, R.; Thor, D.; Han, X.; Anderson, L.; Rahimian, R. Sex differences in mesenteric endothelial function of streptozotocin-induced diabetic rats: A shift in the relative importance of EDRFs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2012**, *303*, H1183–H1198. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Huang, J.P.; Hsu, S.C.; Li, D.E.; Chen, K.H.; Kuo, C.Y.; Hung, L.M. Resveratrol Mitigates High-Fat Diet-Induced Vascular Dysfunction by Activating the Akt/eNOS/NO and Sirt1/ER Pathway. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2018**, *72*, 231–241. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Zhang, H.; Morgan, B.; Potter, B.J.; Ma, L.; Dellsperger, K.C.; Ungvari, Z.; Zhang, C. Resveratrol improves left ventricular diastolic relaxation in type 2 diabetes by inhibiting oxidative/nitrative stress: In vivo demonstration with magnetic resonance imaging. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2010**, *299*, H985–H994. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
49. Brunner, F.; Maier, R.; Andrew, P.; Wolkart, G.; Zechner, R.; Mayer, B. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc. Res.* **2003**, *57*, 55–62. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)][[Green Version](#)]
50. Dao, T.M.; Waget, A.; Klopp, P.; Serino, M.; Vachoux, C.; Pechere, L.; Drucker, D.J.; Champion, S.; Barthelemy, S.; Barra, Y.; et al. Resveratrol increases glucose induced GLP-1 secretion in mice: A mechanism which contributes to the glycemic control. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20700. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
51. Kong, W.; Chen, L.L.; Zheng, J.; Zhang, H.H.; Hu, X.; Zeng, T.S.; Hu, D. Resveratrol supplementation restores high-fat diet-induced insulin secretion dysfunction by increasing mitochondrial function in islet. *Exp. Biol. Med.* **2015**, *240*, 220–229. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
52. Ventura-Clapier, R.; Moulin, M.; Piquereau, J.; Lemaire, C.; Mericskay, M.; Veksler, V.; Garnier, A. Mitochondria: A central target for sex differences in pathologies. *Clin. Sci.* **2017**, *131*, 803–822. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Turan, B.; Tuncay, E.; Vassort, G. Resveratrol and diabetic cardiac function: Focus on recent in vitro and in vivo studies. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2012**, *44*, 281–296. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sharma, R.; Sharma, N.K.; Thungapathra, M. Resveratrol regulates body weight in healthy and ovariectomized rats. *Nutr. Metab.* **2017**, *14*, 30. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## Supplementary materials

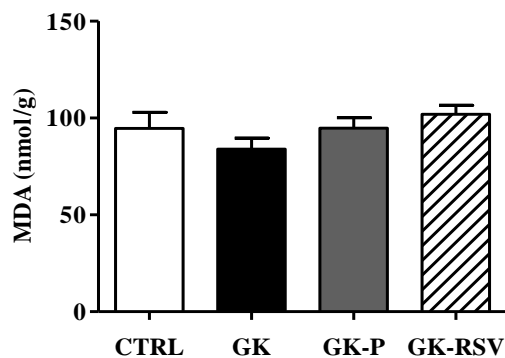
Natacha Fourny, Carole Lan, Eric S erie, Monique Bernard and Martine Desrois.



**Figure S1.** AMP (A), ADP (B) and EC\*10 (C) in rat hearts. Data are expressed as means  $\pm$  SEM and one-way ANOVA was used to compare the groups. No statistical difference was found between groups for AMP content. ADP content was significantly decreased only in GK versus CTRL (\* $p < 0.05$ ). RSV increased ADP content but it did not reach statistical difference. No difference was found between groups for energy charge.



**Figure S2.** Protein expression of SIRT3 in rat hearts. Data are expressed as means  $\pm$  SEM and one-way ANOVA was used to compare the groups. No statistical difference was found between groups.



**Figure S3.** MDA heart content in rat hearts. Data are expressed as means  $\pm$  SEM and one-way ANOVA was used to compare the groups. No statistical difference was found between groups.

## **Conclusion générale de l'étude**

Dans cette deuxième étude nous avons donc montré que les femelles GK diabétiques de type 2 présentent une diminution importante de la tolérance à l'ischémie-reperfusion, caractérisée par une diminution de la fonction myocardique, du débit coronaire mais également du métabolisme énergétique. Huit semaines de traitement par une faible dose de RSV ont permis de protéger le cœur de la perte des composés riches en énergie lors de la reperfusion et d'améliorer la fonction cardiaque et le débit coronaire. Les analyses biochimiques ont confirmé les effets bénéfiques du RSV sur le contenu myocardique en créatine, en nucléotides adénylés totaux et sur l'activité de la citrate synthase, qui sont des indicateurs de la fonction mitochondriale. De plus, l'amélioration du débit coronaire lors de la reperfusion par le RSV était associée à une augmentation de l'expression des protéines eNOS, SIRT1 et P-Akt dans les cœurs des rates GK. Les altérations montrées chez les femelles GK pourraient expliquer le risque important de complications CV chez les femmes diabétiques de type 2. Notamment, les altérations du métabolisme énergétique et de la fonction endothéliale semblent être des pistes à approfondir. Le RSV paraît donc une approche thérapeutique intéressante dans le diabète de type 2 afin d'améliorer la tolérance myocardique à l'ischémie-reperfusion, par l'augmentation des composés riches en énergie et des protéines impliquées dans la voie du NO.

Les deux premières études de mon travail de thèse ont mis en évidence de fortes altérations du cœur de femelles prédiabétiques et diabétiques de type 2. Dans une dernière partie, nous avons commencé des études complémentaires sur l'effet du sexe dans la tolérance myocardique à l'ischémie-reperfusion. Afin de déterminer si des différences préexistent au stade du prédiabète, nous avons inclus des mâles HFS. Ce travail fait l'objet de la troisième étude présentée dans ce manuscrit. Les expérimentations *ex vivo* ont été réalisées et des analyses biochimiques sont en cours afin de compléter l'étude.



## ETUDE 3

### **Est-ce que le sexe influence la réponse physiologique à un régime riche en graisse et en sucre et la tolérance myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion ?**

Natacha Fourny, Carole Lan, Monique Bernard et Martine Desrois

Aix Marseille Univ, CNRS, CRMBM, Marseille, France

Cette troisième étude a pour but de déterminer si le sexe influence la réponse physiologique à un régime riche en graisse et en sucre et la tolérance myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion. Afin de respecter la règle des 3R et de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous avons dans un premier temps ajouté des mâles (M-HFS et M-CTRL) aux femelles de la première étude. Les expériences *ex vivo* ont été réalisées et ont montré des résultats intéressants sur la fonction, le débit coronaire et le métabolisme énergétique. Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans les altérations métaboliques et fonctionnelles induites par le régime HFS chez les mâles et les femelles, des analyses biochimiques sont actuellement en cours et seront abordées dans la Discussion.

## **Résumé de l'étude**

**Introduction :** Le prédiabète est un fort prédicteur du diabète de type 2 et des complications cardiovasculaires associées. Cependant, peu d'études explorent les différences entre les sexes dans ce contexte. L'objectif de cette étude était de déterminer si le sexe influence la réponse physiologique à un régime riche en graisse et en sucre et la tolérance myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion.

**Méthodes :** Des mâles et des femelles Wistar étaient soumis à un régime riche en graisse et en sucre (mâles : M-HFS, femelles : F-HFS) ou standard (mâles : M-CTRL, femelles : F-CTRL) pendant 5 mois. Ensuite un test de tolérance au glucose et une mesure de la pression artérielle étaient réalisés. Enfin, des expérimentations *ex vivo* sur le modèle du cœur isolé perfusé étaient effectuées afin d'évaluer la tolérance myocardique à une séquence d'ischémie-reperfusion (décrit en page 93 du Matériels et Méthodes). La fonction myocardique, le métabolisme énergétique et le débit coronaire étaient mesurés en simultané pendant tout le protocole d'ischémie-reperfusion. A la fin des expérimentations, les cœurs étaient congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C pour des analyses biochimiques ultérieures.

**Résultats :** Après 5 mois de régime HFS, le poids des animaux était augmenté chez les M-HFS vs. M-CTRL ( $p < 0,001$ ) mais pas chez les F-HFS (vs. F-CTRL). Cependant, le pourcentage de masse grasseuse était significativement augmenté chez les M-HFS et les F-HFS ( $p < 0,01$  et  $p < 0,05$  vs. leurs contrôles respectifs). Le test de tolérance au glucose a montré une intolérance au glucose chez les M-HFS et les F-HFS ( $p < 0,001$  vs. leurs contrôles respectifs,), plus prononcée pour les F-HFS vs. M-HFS ( $p < 0,05$ ). Le régime HFS a également augmenté la glycémie à jeun chez les M-HFS et les F-HFS ( $p < 0,05$ ). Les acides gras libres plasmatiques étaient augmentés uniquement chez les F-HFS vs. F-CTRL ( $p < 0,05$ ). Le ratio poids du cœur sur longueur du tibia, signe d'hypertrophie cardiaque, était significativement augmenté uniquement chez les M-HFS vs. M-CTRL ( $p < 0,001$ ). Les expériences *ex vivo* ont montré que 5 mois de régime HFS induisait une altération de la fonction myocardique à la reperfusion chez les M-HFS et les F-HFS ( $p < 0,001$  et  $p < 0,05$  vs. leurs contrôles respectifs) sans effet du sexe. Le débit coronaire était altéré à la reperfusion chez les M-HFS et les F-HFS par rapport à leurs contrôles respectifs ( $p < 0,01$  and  $p < 0,05$ ). Enfin, le métabolisme énergétique était également diminué à la reperfusion chez les groupes HFS, avec une diminution de l'ATP chez les M-HFS ( $p < 0,05$  vs. M-CTRL) et une diminution de la PCr chez les M-HFS et les F-HFS ( $p < 0,001$  et  $p < 0,05$  vs. leurs contrôles respectifs).

**Conclusion :** Cinq mois de régime riche en graisse et en sucre ont induit un prédiabète chez les mâles et les femelles, avec des différences entre les sexes concernant la prise de poids, la tolérance au glucose et l'hypertrophie cardiaque. Le régime HFS a également diminué la tolérance à une séquence d'ischémie-reperfusion chez les mâles et les femelles, caractérisé par une altération du métabolisme énergétique, de la fonction cardiaque et du débit coronaire à la reperfusion. Cependant, aucune différence entre les sexes n'a été trouvée concernant la tolérance à l'ischémie-reperfusion.

## **1. Introduction**

Le prédiabète est caractérisé par une hyperglycémie à jeun modérée (>100 ou 110 mg/dL) et/ou une intolérance au glucose [1]. De nos jours, cet état prédiabétique concerne déjà plus de 33% de la population américaine et devient un réel problème de santé publique [2]. Une mauvaise hygiène de vie, caractérisée par une alimentation trop grasse et trop sucrée, ainsi qu'une absence d'activité physique, favorise le développement du prédiabète puis du diabète de type 2.

La population prédiabétique présente un risque élevé de développer un diabète de type 2 et les comorbidités qui y sont associées [3]. Le prédiabète et le diabète de type 2 sont tous deux liés à une augmentation de complications et de mortalité cardiovasculaires (CV) [4]. De manière intéressante, des différences entre les hommes et les femmes ont été rapportées concernant les complications CV avant l'apparition du diabète de type 2. Les femmes présentent une détérioration plus importante que les hommes du système CV pendant la transition d'une normoglycémie vers un diabète de type 2 [5]. La prévalence de la coronaropathie est plus élevée chez les femmes diabétiques de type 2 par rapport aux hommes diabétiques de type 2 [6]. Un dysfonctionnement endothélial plus important chez les femmes avec une altération de la vasodilatation endothélium-dépendante et une élévation des facteurs fibrinolytiques/thrombotiques ont été suggérés pour expliquer ces différences [5, 7]. De plus, le risque d'infarctus du myocarde a été décrit comme étant plus élevé chez les femmes diabétiques de type 2 que chez les hommes diabétiques de type 2 [8].

Cependant, peu d'études explorent les différences entre les sexes dans le contexte du développement d'un prédiabète. L'évaluation des paramètres physiologiques et cardiaques d'animaux mâles et femelles recevant un régime HFS pourrait nous aider à comprendre pourquoi le risque CV est élevé chez les femmes prédiabétiques et diabétiques de type 2. Par conséquent, notre objectif était de déterminer si le sexe influence la réponse physiologique à un régime riche en graisse et en sucre et la tolérance myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion

Pour cela nous avons utilisé le modèle de rat nourri avec un régime riche en graisse et en sucre (HFS). Nous avons évalué l'impact de 5 mois de régime HFS sur la tolérance à l'ischémie-reperfusion sur le modèle du cœur isolé perfusé. Nous avons évalué simultanément la fonction cardiaque, le débit coronaire et le métabolisme énergétique en utilisant la spectroscopie de

résonance magnétique (SRM) du phosphore-31. À la fin des expériences, les cœurs ont été congelés dans de l'azote liquide pour des analyses biochimiques ultérieures.

## **2. Méthodes**

### **2.1 Animaux**

Vingt femelles et vingt-quatre mâles rats Wistar (sept semaines, Charles River, France) sont utilisés dans cette étude. Ils sont hébergés dans un environnement contrôlé (température 22-24°C, cycle lumière-obscurité de 12-12 heures, enrichissements environnementaux multiples). Toutes les procédures sont approuvées par le Comité d'Ethique en expérimentation animale de Marseille (n°2017070416019134) et sont effectuées conformément à la Directive 2010/63/UE du Parlement européen sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

### **2.2 Alimentation**

Les animaux ont accès à la nourriture et à l'eau à volonté. Le groupe des femelles est divisé au hasard en deux sous-groupes de dix animaux et le groupe des mâles est divisé au hasard en deux sous-groupes de douze animaux. Les groupes contrôles (femelles : F-CTRL, n=10 ; mâles : M-CTRL, n=12) sont nourris avec un régime standard (SAFE, A04C-10) ; et les groupes HFS (femelles : F-HFS, n=10 ; mâles : M-HFS, n=12) sont nourris avec un régime riche en graisse et en sucre (SAFE, U8978 v19 ; 19,4% de protéine, 35,8% de graisse et 32,1% de sucre) durant cinq mois. Chaque semaine, le poids et la prise alimentaire sont mesurés.

### **2.3 Tolérance au glucose et pression artérielle**

Après 5 mois de régime, la tolérance au glucose et la pression artérielle sont mesurées. Pour cela, un test de tolérance au glucose en intrapéritonéal (IPGTT) est effectué après 6 heures de jeûne pour évaluer l'homéostasie glucidique. La glycémie est mesurée à l'aide du nano-glucomètre ACCU-CHEK Performa (Roche, Suisse) par prélèvement de sang à la queue. La pression artérielle est enregistrée de manière non invasive à l'aide d'un brassard autour de la queue du rat (Bioseb, Chaville, France).

### **2.4 Évaluation de la tolérance myocardique aux lésions d'ischémie-reperfusion**

Afin d'évaluer la tolérance myocardique aux lésions d'ischémie-reperfusion, des expériences *ex vivo* sont réalisées sur le modèle du cœur isolé perfusé selon la méthode de Langendorff. Les cœurs sont rapidement excisés de la cavité thoracique par thoracotomie, pesés et arrêtés dans

un tampon Krebs-Henseleit glacé (contenant (mM) : NaCl (118), KCl (4,7), MgSO<sub>4</sub> (1,2), CaCl<sub>2</sub> (1,75), NaHCO<sub>3</sub> (25), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2), EDTA (0,5) et D-glucose (11)). Dans le même temps, des échantillons de sang sont immédiatement prélevés et centrifugés pour des analyses biochimiques ultérieures. Les cœurs sont pesés puis canulés par l'aorte ascendante pour une perfusion rétrograde du réseau artériel coronarien à une pression constante de 100 mm Hg. Un drain est placé à l'apex du cœur pour évacuer les effluents coronaires.

#### **2.4.1 Protocole expérimental**

Le protocole commence avec une période contrôle de 32 minutes comprenant 4 minutes d'équilibration du cœur avec le tampon Krebs-Henseleit, 24 minutes avec le tampon physiologique à une concentration en palmitate (Pa) de 0,4 mM et 4 minutes avec le tampon physiologique à une concentration en palmitate de 1,2 mM. Ensuite une ischémie à débit modéré de 32 minutes est réalisée avec le tampon physiologique à 1,2 mM de palmitate, à un débit ajusté par rapport au poids du cœur (0,5 mL/min par gramme de cœur). Enfin, une période de reperfusion de 32 minutes est effectuée avec le tampon physiologique à une concentration en palmitate de 0,4 mM. A la fin du protocole, les cœurs sont congelés et conservés à -80°C pour des analyses biochimiques ultérieures.

#### **2.4.1 Évaluation de la fonction cardiaque et du métabolisme énergétique**

Un ballon en latex rempli d'eau est inséré dans le ventricule gauche pour enregistrer la pression développée (DP) du ventricule gauche et la fréquence cardiaque (HR). Le produit de la pression développée et du rythme cardiaque (en mmHg/min) est utilisé comme indice de la fonction cardiaque. Le débit coronaire est mesuré par prélèvement des effluents coronaires avant et après l'ischémie (à 20 minutes et 80 minutes) et exprimé en mL/min/g de poids frais.

Le métabolisme énergétique est évalué par la SRM du phosphore-31. Brièvement, les cœurs perfusés de rats sont placés dans un tube spécifique de résonance magnétique de 20 mm de diamètre et insérés dans un aimant de 4,7 Tesla (instruments Oxford, Oxford, Royaume-Uni) interfacé à un spectromètre Bruker-Nicolet Avance WP-200 (Bruker, Ettlingen, Allemagne). Une série de huit spectres de SRM du phosphore-31 sont enregistrés pendant chaque période du protocole expérimental pour quantifier les métabolites phosphorés (ATP, PCr et Pi) et le pH intracellulaire. A la fin des expériences, les cœurs sont congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C pour des analyses biochimiques ultérieures.

## 2.5 Analyses biochimiques

Dans le plasma, des kits sont utilisés pour déterminer le taux de glucose (Randox Laboratories, Crumlin, Antrim UK) et d'acides gras libres (AGL) (trousse NEFA ; Roche Diagnostics, Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne).

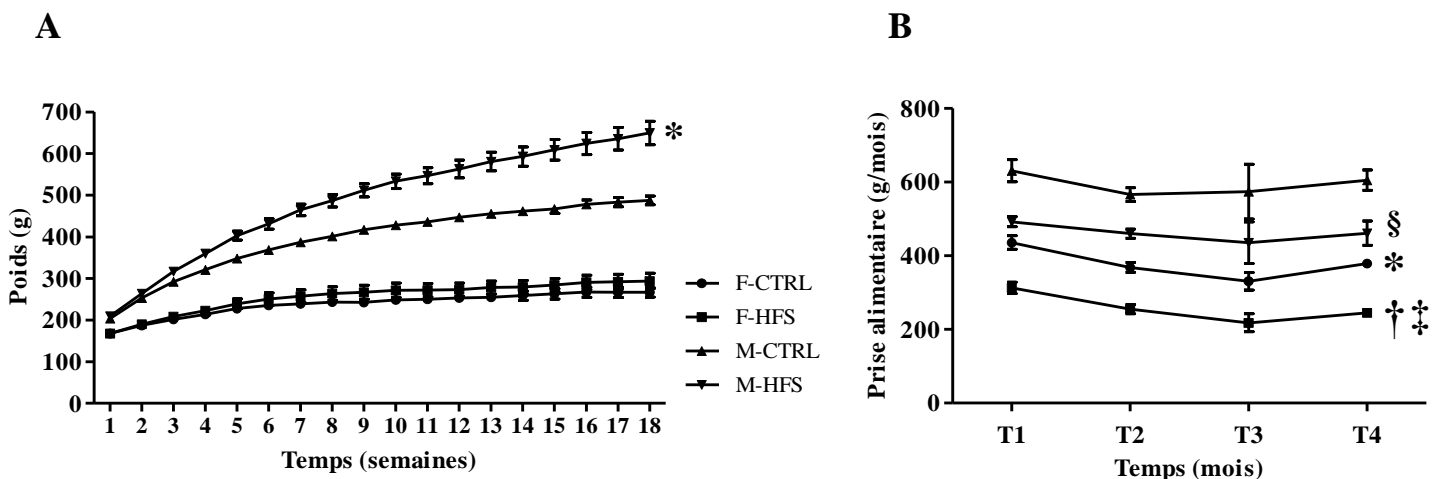
## 2.6 Expression des résultats et analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 5.0 (La Jolla, CA). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM. Des différences significatives entre les groupes sont déterminées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs avec des mesures répétées dans le temps pour les variables dépendantes du temps, suivies d'un test post-hoc de Bonferroni. Une ANOVA à un facteur est utilisée pour les autres paramètres. Une valeur de p inférieure ou égale à 0,05 est considérée comme significativement différente.

## 3. Résultats

### 3.1 Paramètres physiologiques

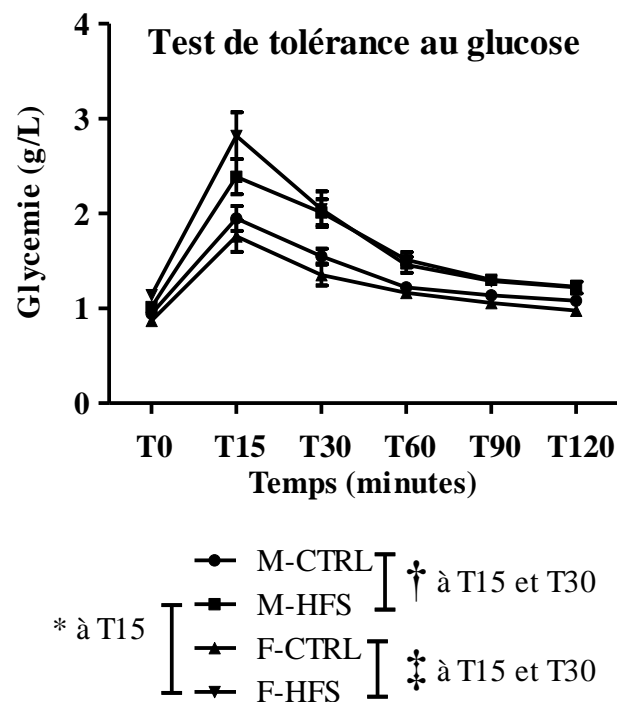
Après cinq mois de régime, nous avons constaté un poids corporel plus élevé chez les M-HFS par rapport aux M-CTRL ( $p < 0,001$ ) et aucune différence entre les F-CTRL et les F-HFS (Figure 1A). Nous avons aussi montré une diminution de la prise alimentaire chez les M-HFS et les F-HFS ( $p < 0,01$  et  $p < 0,05$ ) par rapport à leurs contrôles respectifs (Figure 1B).



**Figure 1 :** Poids des animaux au cours du temps. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. Une ANOVA à deux facteurs est effectuée pour observer l'effet du groupe et du temps.

\*  $p < 0,001$  M-HFS vs M-CTRL, †  $p < 0,05$  F-HFS vs. F-CTRL, ‡  $p < 0,001$  F-HFS vs. M-HFS et §  $p < 0,01$  M-HFS vs. M-CTRL.

L'IPGTT (Figure 2) indique une intolérance au glucose dans les groupes M-HFS et F-HFS par rapport aux contrôles respectifs ( $p < 0,001$ ). De manière intéressante, l'intolérance au glucose est plus marquée chez les F-HFS par rapports aux M-HFS ( $p < 0,05$  à T15min).



**Figure 2 :** Test de tolérance au glucose (IPGTT). Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Une ANOVA à deux facteurs est effectuée pour observer l'effet du groupe et du temps. \*  $p < 0,05$  vs M-HFS, †  $p < 0,01$  vs M-CTRL, ‡  $p < 0,001$  vs F-CTRL.

Les autres paramètres physiologiques sont présentés dans le Tableau 1. La glycémie à jeun est significativement plus élevée dans les deux groupes HFS ( $p < 0,05$ ) par rapport aux groupes contrôles, sans différence entre les sexes. Les acides gras libres plasmatiques sont augmentés uniquement chez les rats F-HFS versus F-CTRL ( $p < 0,05$ ) et non chez les rats M-HFS versus M-CTRL, dû à une faible valeur des acides gras libre chez les F-CTRL. Le pourcentage de graisse est significativement plus élevé chez les rats M-HFS et F-HFS par rapport aux contrôles



respectifs ( $p < 0,01$  et  $p < 0,05$ ). Le poids du cœur ainsi que le rapport entre le poids du cœur et la longueur du tibia ne sont augmentés de façon significative que chez les rats M-HFS ( $p < 0,001$  vs. M-CTRL). La pression artérielle n'est pas significativement différente entre les groupes.

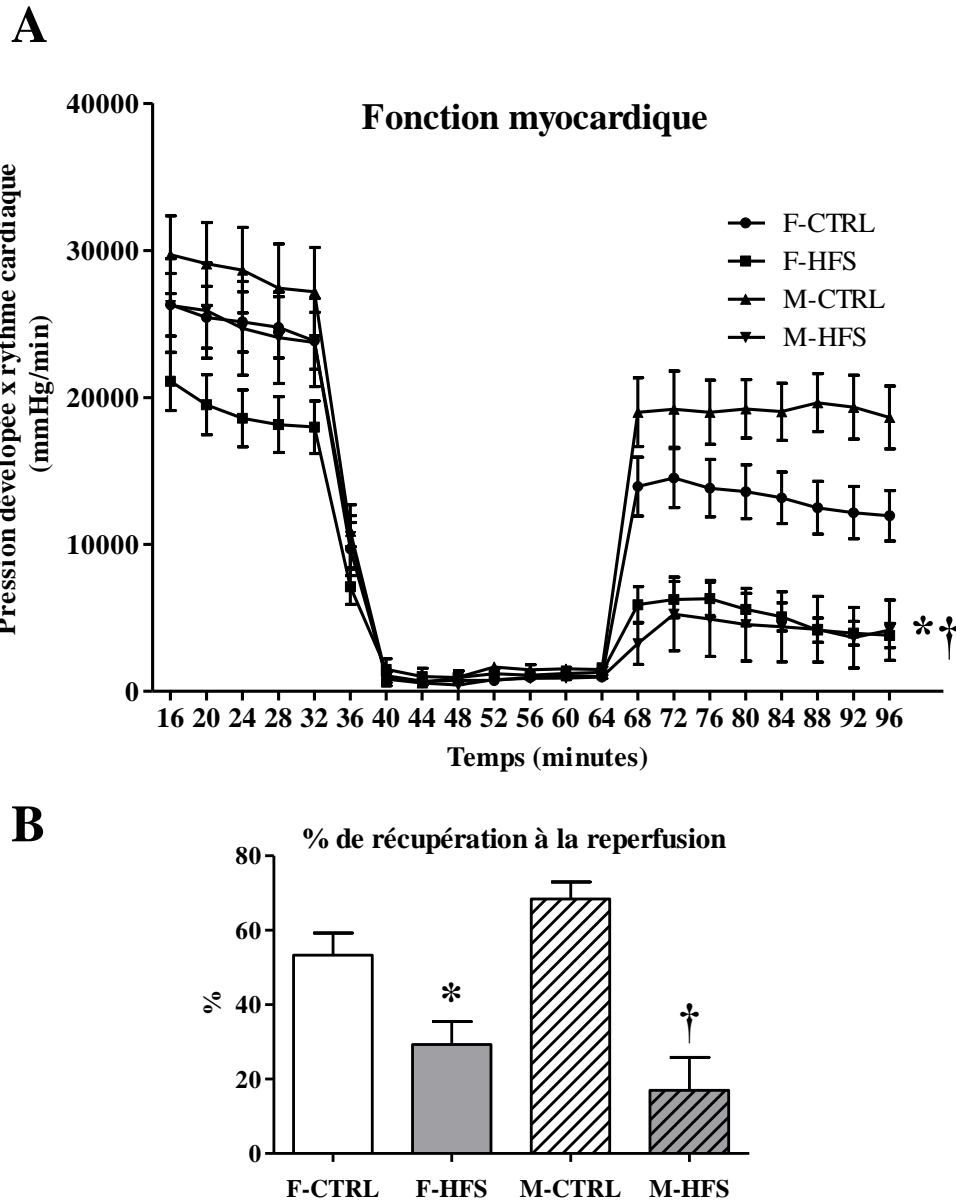
	<b>F-CTRL</b>	<b>F-HFS</b>	<b>M-CTRL</b>	<b>M-HFS</b>
<b>Glycémie à jeun (g/L)</b>	0,86 ± 0,04	<b>1,03 ± 0,03 *</b>	0,90 ± 0,03	<b>1,09 ± 0,03 †</b>
<b>Acides gras libres (mM)</b>	0,09 ± 0,01	<b>0,20 ± 0,04 †</b>	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,02
<b>Masse graisseuse (%)</b>	9,8 ± 0,9	<b>16,8 ± 1,6 ‡</b>	10,4 ± 0,5	<b>21,4 ± 1,5 *</b>
<b>Poids du cœur (g)</b>	0,76 ± 0,02	0,79 ± 0,02	1,22 ± 0,02	<b>1,45 ± 0,03 *</b>
<b>Longueur du tibia (cm)</b>	3,5 ± 0,04	3,48 ± 0,04	4,04 ± 0,03	4,08 ± 0,03
<b>Cœur / Tibia (g/cm)</b>	0,22 ± 0,00	0,23 ± 0,01	0,30 ± 0,01	<b>0,36 ± 0,01*</b>
<b>Pression artérielle systolique (mm Hg)</b>	112 ± 3,3 (n=4)	128 ± 10,4 (n=4)	134 ± 4,3 (n=6)	143 ± 3,9 (n=6)
<b>Pression artérielle diastolique (mm Hg)</b>	76 ± 2,9 (n=4)	90 ± 8,1 (n=4)	97 ± 3,1 (n=6)	101 ± 3,2 (n=6)

**Tableau 1 : Paramètres physiologiques.** Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM. Une ANOVA à un facteur est effectuée pour tous les paramètres. \*  $p < 0,001$  vs M-CTRL, †  $p < 0,01$  vs F-CTRL, ‡  $p < 0,05$  vs F-CTRL.

### **3.2 Tolérance aux lésions d'ischémie-reperfusion**

#### **3.2.1 Fonction myocardique**

La fonction myocardique (Figure 3A) n'est pas significativement différente entre les groupes en période contrôle, malgré une tendance à la diminution chez les F-HFS par rapport aux autres groupes. Par contre, la fonction myocardique est significativement altérée à la reperfusion dans les groupes M-HFS et F-HFS ( $p < 0,001$  et  $p < 0,05$  vs. leurs contrôles respectifs). Le pourcentage de récupération pendant la reperfusion (Figure 3B) est significativement diminué chez les M-HFS et F-HFS par rapport aux contrôles respectifs ( $p < 0,001$  et  $p < 0,05$ ), sans différence entre les sexes.

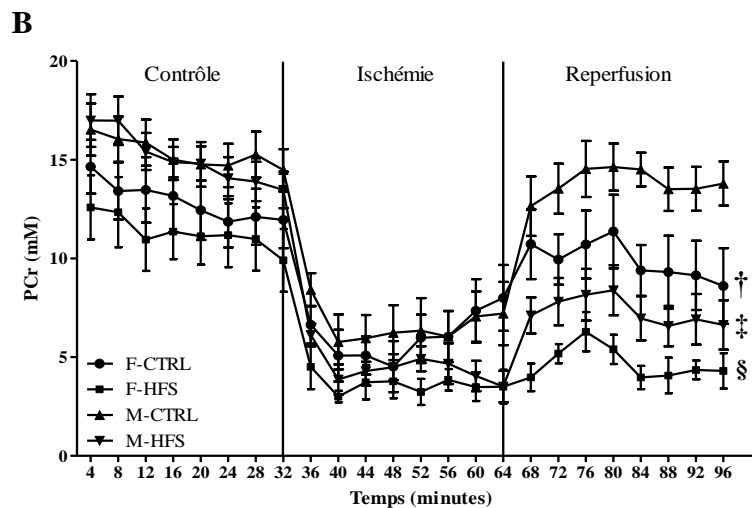
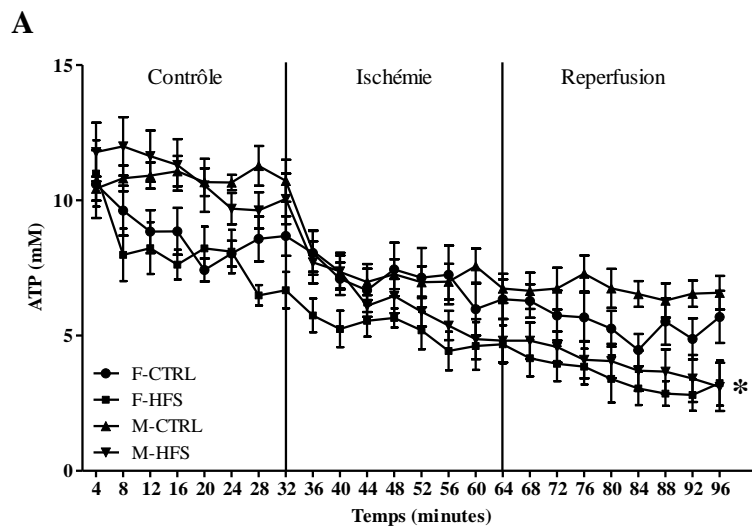


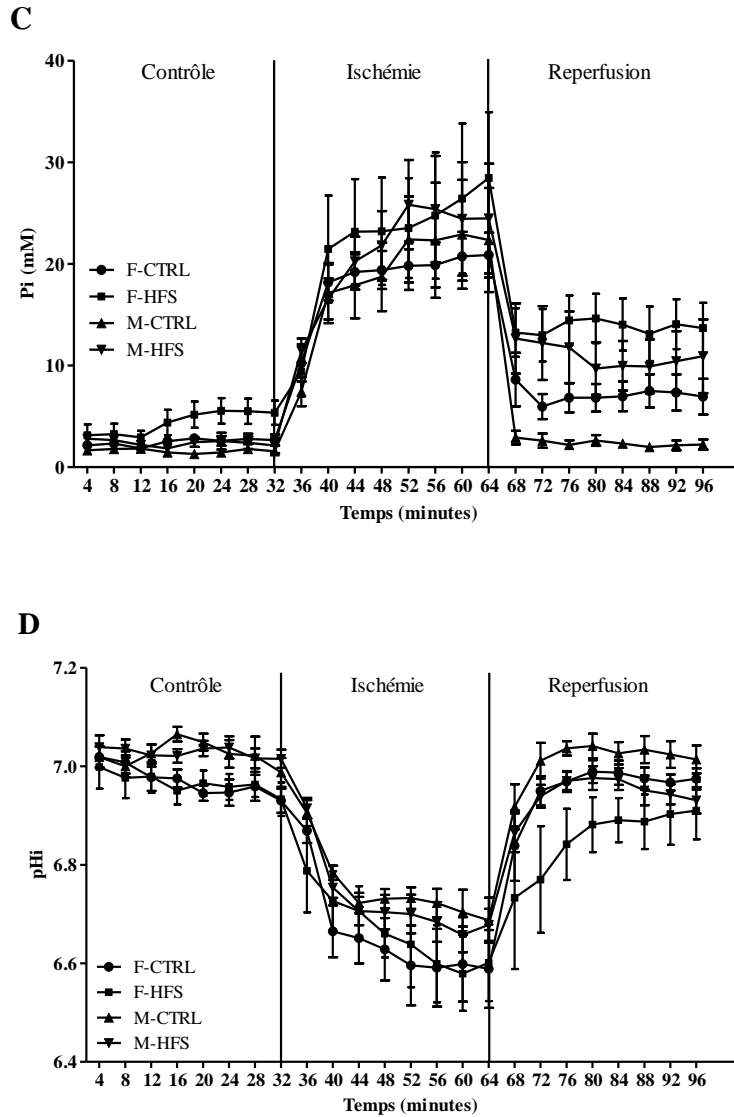
**Figure 3 : Fonction myocardique.** La fonction myocardique (A) est évaluée par le produit de la pression développée et de la fréquence cardiaque. Le % de récupération pendant la reperfusion (B) est exprimée en pourcentage de la valeur contrôle. Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Une ANOVA à deux facteurs est effectuée pour observer l'effet du groupe et du temps. \*  $p < 0,001$  M-HFS vs. M-CTRL, †  $p < 0,05$  F-HFS vs. F-CTRL.

### 3.2.2 Métabolisme énergétique

Les cinétiques de l'ATP, de la phosphocréatine (PCr), du Pi et du pH<sub>i</sub> sont présentées respectivement dans les Figures 4A, 4B, 4C et 4D. En période contrôle et pendant l'ischémie, les concentrations myocardiques en ATP, PCr, Pi, ainsi que le pH<sub>i</sub> ne sont pas significativement différents entre les quatre groupes.

Lors de la reperfusion, l'ATP est significativement diminué à la reperfusion uniquement chez les M-HFS par rapport aux M-CTRL ( $p < 0,05$ ). La PCr est significativement diminuée chez les F-HFS et M-HFS par rapports à leur contrôles respectifs ( $p < 0,05$  et  $p < 0,001$ ), sans différence entre les sexes. La PCr est également significativement diminuée chez les F-CTRL par rapport aux M-CTRL ( $p < 0,05$ ). Aucune différence n'est observée à la reperfusion pour le Pi et le pH<sub>i</sub> entre les groupes HFS et leurs contrôles respectifs, ainsi qu'entre les sexes.

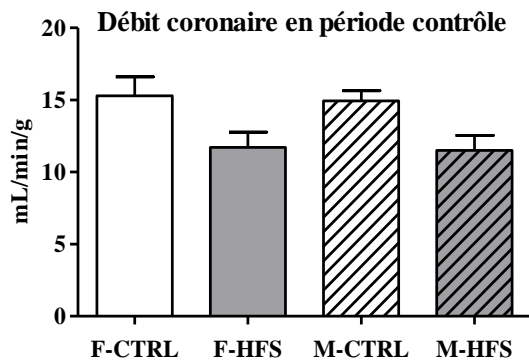
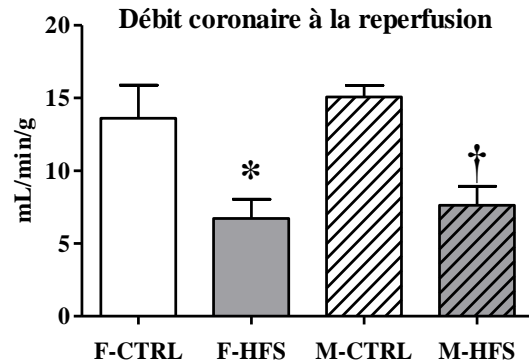




**Figure 4 : Métabolisme énergétique.** Cinétique de l'ATP (A), de la PCr (B), du Pi (C) et du pH<sub>i</sub> (D). Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Une ANOVA à deux facteurs est effectuée pour observer l'effet du groupe et du temps. \*  $p < 0,05$  M-HFS vs. M-CTRL ; †  $p < 0,05$  F-CTRL vs. M-CTRL, ‡  $p < 0,01$  M-HFS vs. M-CTRL, §  $p < 0,05$  F-HFS vs. F-CTRL.

### 3.2.3 Débit coronaire

Le débit coronaire n'est pas significativement différent entre les groupes lors de la période contrôle (Figure 5A). Au cours de la reperfusion (Figure 5B), le débit coronaire est significativement diminué chez les F-HFS et les M-HFS par rapport à leur contrôles respectifs ( $p < 0,01$  et  $p < 0,05$ ), sans différence entre les sexes.

**A****B**

**Figure 5 : Débit coronaire en période contrôle (A) et à la reperfusion (B).** Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Une ANOVA à un facteur est réalisée pour comparer les quatre groupes. \*  $p < 0,05$  vs. F-CTRL et †  $p < 0,01$  vs. M-CTRL.

#### **4. Discussion**

L'objectif de cette étude était dans un premier temps de déterminer si le sexe influence la réponse physiologique à un régime riche en graisse et en sucre. Dans un deuxième temps nous avons étudié l'effet du sexe dans la tolérance myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion. Les cinq mois de régime HFS ont induit un prédiabète chez les mâles et les femelles HFS, caractérisé par une élévation de la glycémie à jeun ainsi qu'une intolérance au glucose. De manière intéressante, des différences ont été observées entre les sexes en réponse au régime HFS. Les femelles HFS n'ont pas pris plus de poids que les femelles contrôles, alors que les mâles HFS ont un poids significativement plus élevé que les mâles contrôles. Les femelles présentent également une intolérance au glucose plus marquée que les mâles HFS. Enfin, une hypertrophie cardiaque est observée uniquement chez les mâles HFS. Les expériences *ex vivo* de cœur isolé perfusé ont montré une plus forte sensibilité des rats HFS à une séquence d'ischémie-reperfusion caractérisée par une altération de la fonction myocardique, du métabolisme énergétique (ATP et PCr) et du débit coronaire à la reperfusion chez les rats HFS par rapport aux rats contrôles. Dans notre étude nous n'avons pas observé de différence liée au sexe dans la tolérance myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion.

Le prédiabète est un fort prédicteur de l'apparition du diabète de type 2 et des complications cardiovasculaires associées. Divers régimes sont utilisés dans la littérature afin de reproduire un état prédiabétique et/ou un syndrome métabolique [9]. Par exemple des auteurs utilisent de l'eau de boisson sucrée [10-12], quand d'autres utilisent des éléments sucrés dans la nourriture [13, 14], ou des régimes uniquement enrichis en graisse [15, 16]. Dans notre étude nous avons choisi un régime enrichi en graisse et en sucre. Ce régime avait précédemment été utilisé dans le laboratoire sur la souris C57Bl/6 et avait induit une obésité ainsi qu'un diabète de type 2. Les études montrent des altérations cardiaques à partir de 4 et 5 mois de régime chez les rats [13, 14, 17, 18], nous avons donc nourri les animaux avec le régime HFS sur une durée de 5 mois. Ici nous avons montré que le régime induit le développement d'un prédiabète chez les rats HFS, sans atteindre un diabète de type 2 bien établi comme pour la souris. Le prédiabète peut être associé à un syndrome métabolique qui est caractérisé par une obésité, une élévation du taux de TG et de la pression artérielle, une diminution du taux de Cholestérol HDL, et une augmentation de la glycémie à jeun [19]. Des mesures de cholestérol et de TG sont en cours afin de déterminer si un syndrome métabolique s'est développé chez les mâles et les femelles HFS.

Les femelles HFS n'augmentaient pas leur poids mais les deux groupes HFS présentent une obésité viscérale qui est connue pour être associée à un risque cardiométabolique plus important [20]. Récemment, une conférence au congrès de l'EASD 2018 à Berlin a montré que les femelles pouvaient être plus résistantes aux régimes obésogènes [21], comme reporté ici. Dans notre étude, la prise alimentaire était diminuée dans les groupes HFS. Une régulation différente selon le sexe de la voie de la leptine en réponse au régime HFS pourrait être à l'origine de la différence de prise de poids entre les mâles et les femelles. En effet, à l'état basal les femmes présentent un taux de leptine presque trois fois supérieurs aux hommes et celui-ci est indirectement relié aux différents facteurs de risque cardiométaboliques [22]. Notamment la leptine pourrait être associée au contrôle de la fonction cardiovasculaire [23]. La leptine sera donc mesurée dans le plasma afin de voir si elle peut être impliquée dans les différences de prise alimentaire et de poids observées ici entre les mâles et les femelles HFS. Lin et coll. montrent en effet qu'en réponse à un régime riche en graisse, plusieurs stades peuvent être observés. Premièrement une phase d'augmentation de la sensibilité à l'insuline, puis une deuxième phase de réduction de la prise alimentaire avec une sensibilité à la leptine stable et enfin une dernière phase avec une réduction de la sensibilité centrale à la leptine [24]. De manière intéressante, la « Dallas heart study » a montré que la leptine est associée à la protéine C réactive (CRP), une protéine impliquée dans les processus inflammatoires. Abdullah et coll.

suggèrent que les différences entre les sexes dans la CRP pourraient être médiées par la leptine et reflèteraient les différences de réponse inflammatoire dans l'obésité. Les niveaux des marqueurs inflammatoires circulants peuvent prédire les événements cardiovasculaires des années à l'avance [25]. Des études suggèrent que, parmi les marqueurs inflammatoires, la CRP est associée au risque coronarien, indépendamment des facteurs de risque traditionnels [26]. Ainsi nous mesurerons la CRP dans le plasma afin d'étudier l'état inflammatoire systémique, notamment avant un épisode d'ischémie-reperfusion.

Par ailleurs, il serait également intéressant de mesurer le stress oxydant dans le plasma afin de voir si des différences préexistent avant les expérimentations *ex vivo* entre les mâles et les femelles HFS. En particulier, nous mesurerons dans le plasma le 8-iso-PGF2 $\alpha$ , un fort indicateur du stress oxydant, qui est augmenté dans le plasma de patients ayant un syndrome métabolique [27]. De plus, une étude de Thomson et coll. montre que le 8-iso-PGF2 $\alpha$  est fortement lié à l'indice de masse corporelle [28]. Nous pourrions donc voir si les différences de poids entre les mâles et les femelles HFS sont liées au taux de 8-iso-PGF2 $\alpha$  dans le plasma dans notre étude. Nous mesurerons également dans le plasma les enzymes participant aux défenses antioxydantes dans l'organisme comme la superoxyde dismutase et la catalase, car des études ont montré une diminution de ces enzymes dans le tissu adipeux et le plasma chez des rats nourris avec des régimes enrichis en graisse et/ou en sucre [29, 30].

De manière intéressante, nous avons également montré que les femelles HFS présentaient une intolérance au glucose plus prononcée que chez les mâles HFS. Dans une revue, Mauvais-Jarvis suggère que l'altération de la glycémie à jeun est plus répandue chez les hommes alors que l'intolérance au glucose est plus répandue chez les femmes. Les raisons de ces différences pourraient être dues aux hormones sexuelles. En effet, la supplémentation en œstrogènes chez les femmes ménopausées diminue la glycémie à jeun et améliore ainsi la tolérance au glucose [31]. Saengsirisuwan et coll. ont également montré que des femelles Sprague-Dawley ovariectomisées présentaient une moins bonne tolérance au glucose que les femelles non ovariectomisées [32]. En perspective nous pourrions évaluer la glycémie à jeun et la tolérance au glucose sur un groupe de femelles HFS ovariectomisées afin de déterminer le rôle des hormones sexuelles sur ces paramètres.

Une hypertrophie cardiaque a été retrouvée uniquement chez les mâles HFS par rapport aux femelles HFS. La première étude de ce travail de thèse n'avait également pas montré d'hypertrophie cardiaque chez les femelles HFS suivies par IRM. Une prolifération des

fibroblastes et une augmentation du taux de collagène dans les tissus pourraient expliquer les différences entre les deux sexes. Wang et coll. ont en effet montré une hypertrophie et une fibrose cardiaque après un régime riche en graisse chez des souris mâles [33], alors qu'une étude [34] sur des rates nourries avec un régime riche en graisse, n'avait pas montré d'hypertrophie cardiaque. D'autres études [11, 18] ont montré une hypertrophie cardiaque chez des rats mâles nourris avec des régimes gras et sucrés. Ces travaux rapportent notamment une augmentation du collagène interstitiel myocardique, associé à une augmentation de l'infiltration de cellules inflammatoires. Böhm C et coll. ont montré un dimorphisme sexuel dans l'hypertrophie ventriculaire gauche médiée par l'obésité chez des souris C57/B16. Après 25 semaines de régime riche en graisse, les auteurs montrent une augmentation de la masse ventriculaire gauche significativement plus importante chez les souris mâles que chez les souris femelles. En parallèle, les mâles présentaient un poids et une masse graisseuse plus élevées que les femelles [35]. Afin d'expliquer pourquoi seulement les mâles HFS présentent une hypertrophie cardiaque, nous allons mesurer dans les cœurs congelés les ARNm codant pour les collagènes I et III. En effet Beam et coll. montrent qu'un régime gras peut notamment perturber la balance collagène I/collagène III et favoriser la fibrose cardiaque [36].

Dans notre étude, nous avons également montré une plus forte sensibilité myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion chez les animaux soumis au régime HFS. L'altération de la fonction cardiaque à la reperfusion peut être expliquée ici par une altération du métabolisme énergétique et du débit coronaire. Des analyses complémentaires dans les cœurs après ischémie-reperfusion pourraient nous permettre de comprendre les mécanismes impliqués dans les altérations liées au régime HFS.

La diminution de la PCr et de l'ATP chez les mâles et les femelles HFS lors de la reperfusion pourrait être expliquée par une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale et de l'activité des enzymes du cycle de Krebs, nécessaires pour la production d'énergie au sein de la cellule. En effet une étude très récente de Chen et coll. sur des rats nourris avec un régime riche en graisse, a montré une diminution de l'expression des complexes I, II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale, ainsi qu'une diminution de l'activité de la citrate synthase, associé à une diminution des nucléotides adénylés totaux dans les cœurs [37]. Nous explorerons donc ces voies dans notre étude, afin de déterminer si elles participent également à l'altération du métabolisme énergétique chez les mâles et les femelles HFS. Dans le cadre du diabète et de l'obésité il est également connu qu'il y a une augmentation de l'oxydation des lipides dans les cœurs [38]. La voie de la beta oxydation des lipides sera donc étudiée, par la mesure dans les



cœurs de différents marqueurs tels que les ARNm du « peroxisome proliferator-activated receptor » (PPAR $\alpha$ ), de la « Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase » (MCAD), de la « long-chain acyl-CoA dehydrogenase » (LCAD) et de la « carnitine palmitoyltransferase I » (CPT1). L'augmentation de l'oxydation des lipides contribue aux altérations du métabolisme énergétique et de la fonction cardiaque dans la cardiomyopathie diabétique [39]. Ces altérations du métabolisme énergétique cardiaque précèdent le développement de l'intolérance au glucose et l'hypertrophie cardiaque [40].

La dysfonction endothéliale est décrite dès le stade de prédiabète ou de syndrome métabolique et pourrait expliquer l'altération du débit coronaire observé à la reperfusion dans les deux groupes HFS. L'étude de la voie du NO semble donc nécessaire dans notre contexte. Des altérations de la réponse vasculaire à divers agents pharmacologiques ont été rapportées dans des modèles de rat nourris avec un régime riche en graisse et/ou en sucre [10, 14, 18, 41]. Nous étudierons à la fois les ARNm et les protéines impliquées dans la voie du NO comme eNOS, Akt, P-Akt et SIRT1.

De manière intéressante, aucune différence n'a pu être observée entre les mâles et les femelles HFS concernant la tolérance myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion. Dans les deux sexes, la diminution de la fonction cardiaque à la reperfusion peut être expliquée par une altération similaire du métabolisme énergétique et du débit coronaire. Peu d'études abordent l'effet du sexe face à un régime riche en graisse et en sucre, et à notre connaissance, il n'y a pas de données sur la tolérance à l'ischémie-reperfusion dans ce modèle.

Concernant la fonction mitochondriale, certaines pistes nous semblent cependant intéressantes à étudier. En absence de pathologie, il a été montré que les femmes présentent un taux plus important d'enzymes de la  $\beta$ -oxydation dans le muscle strié squelettique [42]. Par ailleurs, Lagranha et coll. ont montré une augmentation de la phosphorylation des protéines mitochondriales chez des femelles Sprague-Dawley par rapport aux mâles, comme par exemple l'aldéhyde déshydrogénase 2 [43]. Ceci conduirait à la diminution de la production d'EROs et donc à une cardioprotection suite à une séquence d'ischémie-reperfusion. De plus dans cette étude, l'ovariectomie des femelles conduit à une perte de protection contre les lésions d'ischémie-reperfusion. Les œstrogènes sont également capables d'augmenter l'expression de régulateurs clés de la biogénèse mitochondriale comme le facteur PGC1 $\alpha$ . Dans notre contexte de régime riche en graisse et en sucre, il est possible que cette « protection » soit perdue et conduise à une altération similaire des mâles et des femelles. Par la suite, nous mesurerons donc

en particulier les ARNm de PGC1 $\alpha$  et de PPAR $\alpha$  afin de déterminer leurs rôles dans la tolérance à l'ischémie-reperfusion chez des animaux prédiabétiques mâles et femelles.

En conclusion, cinq mois de régime riche en graisse et en sucre ont induit un prédiabète chez les mâles et les femelles, avec des différences entre les sexes concernant la prise de poids, la tolérance au glucose et l'hypertrophie cardiaque. Le régime HFS a également diminué la tolérance à une séquence d'ischémie-reperfusion dans les deux sexes, caractérisé par une altération du métabolisme énergétique, de la fonction cardiaque et du débit coronaire à la reperfusion. Cependant, aucune différence entre les sexes n'a été trouvée concernant la tolérance à l'ischémie-reperfusion. Comme discuté ci-dessus, des analyses biochimiques plasmatiques et cardiaques sont en cours afin de i) comprendre les différences entre les mâles et les femelles sous régime HFS et ii) approfondir les mécanismes liés à la forte susceptibilité du myocarde prédiabétique aux lésions d'ischémie-reperfusion.

## Références

1. Bansal, N., *Prediabetes diagnosis and treatment: A review*. World J Diabetes, 2015. **6**(2): p. 296-303.
2. Centers for Disease Control and Prevention, U.D.o.H.a.H.S., *National Diabetes Statistics Report, 2017*. . 2017.
3. Tabak, A.G., et al., *Prediabetes: a high-risk state for diabetes development*. Lancet, 2012. **379**(9833): p. 2279-90.
4. Huang, D., et al., *Macrovascular Complications in Patients with Diabetes and Prediabetes*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 7839101.
5. Donahue, R., *Sex differences in endothelial function markers before conversion to pre-diabetes: does the clock start ticking earlier among women? The Western New-York experience*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2011. **21**: p. 504-511.
6. Duda-Pyszny, D., P. Trzeciak, and M. Gasior, *Coronary artery disease in women*. Kardiochir Torakochirurgia Pol, 2018. **15**(1): p. 44-48.
7. Desrois, M., et al., *Reduced up-regulation of the nitric oxide pathway and impaired endothelial and smooth muscle functions in the female type 2 diabetic goto-kakizaki rat heart*. Nutrition & Metabolism, 2017. **14**: p. 6.
8. Mehta, L.S., et al., *Acute Myocardial Infarction in Women: A Scientific Statement From the American Heart Association*. Circulation, 2016. **133**(9): p. 916-47.
9. Wong, S.K., et al., *Animal models of metabolic syndrome: a review*. Nutrition & Metabolism, 2016. **13**: p. 65.
10. Alam, M.A., et al., *Chronic l-arginine treatment improves metabolic, cardiovascular and liver complications in diet-induced obesity in rats*. Food & Function, 2013. **4**(1): p. 83-91.
11. Iyer, A. and L. Brown, *Fermented wheat germ extract (avemar) in the treatment of cardiac remodeling and metabolic symptoms in rats*. Evid Based Complement Alternat Med, 2011. **2011**: p. 508957.
12. Pakdeechote, P., et al., *Asiatic acid alleviates hemodynamic and metabolic alterations via restoring eNOS/iNOS expression, oxidative stress, and inflammation in diet-induced metabolic syndrome rats*. Nutrients, 2014. **6**(1): p. 355-370.
13. Ramli, N.S., et al., *Effects of red pitaya juice supplementation on cardiovascular and hepatic changes in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome rats*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014. **14**: p. 189.
14. Panchal, S.K., et al., *High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats*. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2011. **57**(5): p. 611-624.
15. Cole, M.A., et al., *A high fat diet increases mitochondrial fatty acid oxidation and uncoupling to decrease efficiency in rat heart*. Basic Research in Cardiology, 2011. **106**(3): p. 447-457.
16. Liu, H., J.W. Choi, and J.W. Yun, *Gender differences in rat plasma proteome in response to high-fat diet*. Proteomics, 2012. **12**(2): p. 269-83.
17. Poudyal, H., et al., *Chronic high-carbohydrate, high-fat feeding in rats induces reversible metabolic, cardiovascular, and liver changes*. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 2012. **302**(12): p. E1472-1482.
18. Poudyal, H., F. Campbell, and L. Brown, *Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats*. The Journal of Nutrition, 2010. **140**(5): p. 946-953.
19. Alberti, K., et al., *Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention;*

- National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. Circulation, 2008. 120: p. 1640-1645.*
20. Després, J.-P., et al., *Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2008. 28(6): p. 1039-1049.*
  21. *54(th) EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes : Berlin, Germany, 1 - 5 October 2018. Diabetologia, 2018. 61(Suppl 1): p. 1-620.*
  22. de Castro, M.A., et al., *Sex differences in serum leptin and its relation to markers of cardiometabolic risk in middle-aged adults: evidence from a population-based study. Nutrition, 2015. 31(3): p. 491-7.*
  23. Belin de Chantemele, E.J., *Sex Differences in Leptin Control of Cardiovascular Function in Health and Metabolic Diseases. Adv Exp Med Biol, 2017. 1043: p. 87-111.*
  24. Lin, S., et al., *Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. 24(5): p. 639-46.*
  25. Pischon, T., et al., *Inflammation, the metabolic syndrome, and risk of coronary heart disease in women and men. Atherosclerosis, 2008. 197(1): p. 392-9.*
  26. Pai, J.K., et al., *Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. N Engl J Med, 2004. 351(25): p. 2599-610.*
  27. Petersson, H., et al., *Effects of dietary fat modification on oxidative stress and inflammatory markers in the LIPGENE study. Br J Nutr, 2010. 104(9): p. 1357-62.*
  28. Simao, A.N.C., et al., *Oxidative stress in overweight and obesity. 2014: p. 123.*
  29. Amengual-Cladera, E., et al., *Sex differences in the effect of high-fat diet feeding on rat white adipose tissue mitochondrial function and insulin sensitivity. Metabolism, 2012. 61(8): p. 1108-17.*
  30. Vinothiya, K. and N. Ashokkumar, *Modulatory effect of vanillic acid on antioxidant status in high fat diet-induced changes in diabetic hypertensive rats. Biomed Pharmacother, 2017. 87: p. 640-652.*
  31. Mauvais-Jarvis, F., *Gender differences in glucose homeostasis and diabetes. Physiol Behav, 2018. 187: p. 20-23.*
  32. Saengsirisuwan, V., et al., *Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. Metabolism, 2009. 58(1): p. 38-47.*
  33. Wang, Z., et al., *Chronic high fat diet induces cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. Metabolism, 2015. 64(8): p. 917-25.*
  34. Dudele, A., et al., *Chronic exposure to low doses of lipopolysaccharide and high-fat feeding increases body mass without affecting glucose tolerance in female rats. Physiol Rep, 2015. 3(11).*
  35. Bohm, C., et al., *Sexual dimorphism in obesity-mediated left ventricular hypertrophy. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. 305(2): p. H211-8.*
  36. Beam, J., et al., *Excess Linoleic Acid Increases Collagen I/III Ratio and "Stiffens" the Heart Muscle Following High Fat Diets. Journal of Biological Chemistry, 2015. 290(38): p. 23371-23384.*
  37. Chen, D., et al., *A high-fat diet impairs mitochondrial biogenesis, mitochondrial dynamics, and the respiratory chain complex in rat myocardial tissues. J Cell Biochem, 2018. 119(11): p. 9602.*
  38. Fillmore, N., J. Mori, and G.D. Lopaschuk, *Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. Br J Pharmacol, 2014. 171(8): p. 2080-90.*

39. Jia, G., A. Whaley-Connell, and J.R. Sowers, *Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease*. *Diabetologia*, 2018. **61**(1): p. 21-28.
40. Buchanan, J., et al., *Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity*. *Endocrinology*, 2005. **146**(12): p. 5341-9.
41. Senaphan, K., et al., *Ferulic Acid Alleviates Changes in a Rat Model of Metabolic Syndrome Induced by High-Carbohydrate, High-Fat Diet*. *Nutrients*, 2015. **7**(8): p. 6446-6464.
42. Maher, A.C., et al., *Women have higher protein content of beta-oxidation enzymes in skeletal muscle than men*. *PLoS One*, 2010. **5**(8): p. e12025.
43. Lagranha, C.J., et al., *Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females*. *Circ Res*, 2010. **106**(11): p. 1681-91.

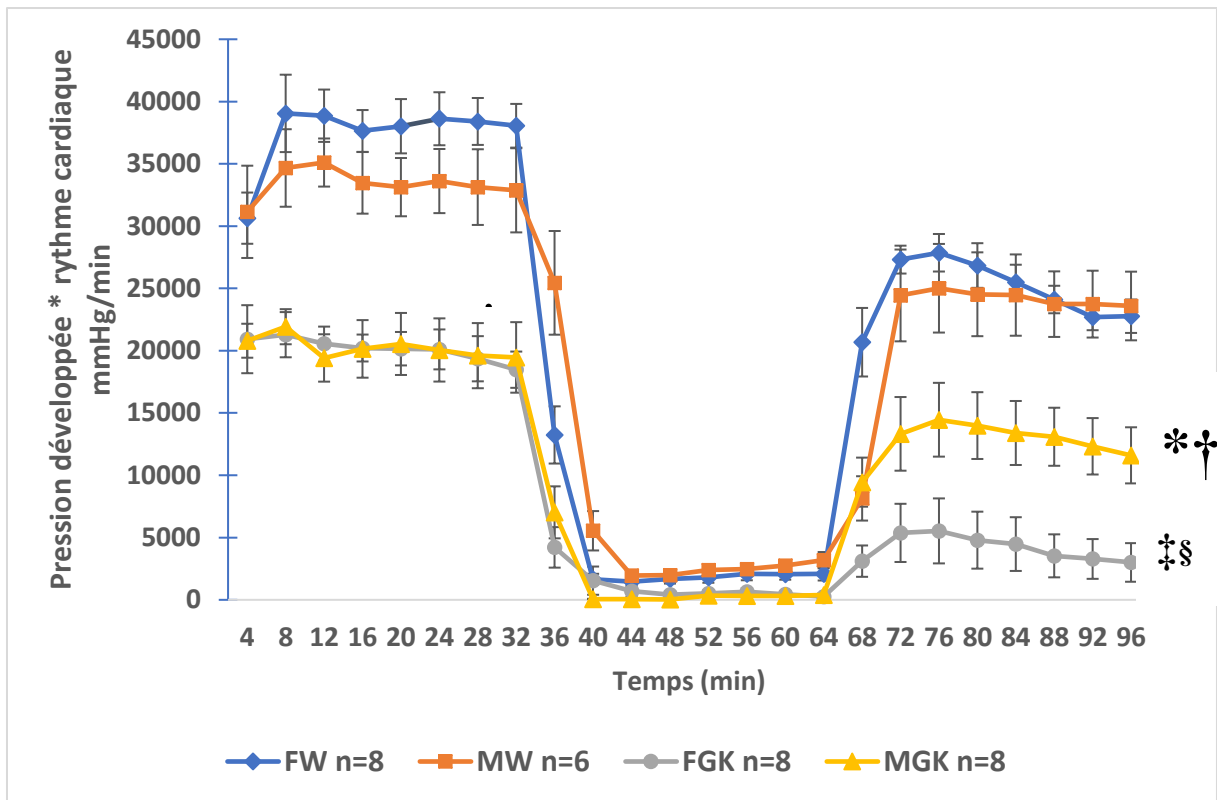
## **Conclusion générale de l'étude**

Nous avons mis en évidence des différences dans la prise de poids, la tolérance au glucose et l'hypertrophie cardiaque entre les mâles et les femelles HFS. Nous avons également mis en évidence une forte sensibilité du myocarde à une séquence d'ischémie-reperfusion chez des rat HFS prédiabétiques mâles et femelles, avec une altération de la fonction myocardique, du métabolisme énergétique ainsi que du débit coronaire au cours de la reperfusion. Cependant, dans notre modèle de prédiabète, il ne semble pas exister de différences entre les mâles et les femelles concernant la tolérance à l'ischémie-reperfusion.

Parallèlement à l'étude sur l'effet du sexe dans le modèle HFS, nous avons commencé une quatrième étude comparant des mâles et des femelles dans le cadre du diabète de type 2. Le rat GK étant un modèle particulièrement compliqué à obtenir, nous n'avons pu démarrer cette étude qu'à la fin de ma thèse.

Les expérimentations *ex vivo* ont été réalisées et nous sommes en mesure de présenter un résultat préliminaire sur la fonction cardiaque lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion (Figure 36). A l'état basal, nous avons mis en évidence une altération de la fonction cardiaque chez les mâles et les femelles GK par rapport à leurs contrôles respectifs, sans différence entre les sexes. A la reperfusion, nous avons également trouvé une altération de la récupération fonctionnelle chez les mâles et les femelles GK en comparaison de leurs contrôles respectifs. Par contre, il est important de souligner dans ce modèle de diabète de type 2, une altération de la fonction myocardique plus importante chez les femelles GK par rapport aux mâles GK à la reperfusion.

L'étude du métabolisme énergétique par SRM du phosphore-31 est actuellement en cours de traitement. En parallèle, des analyses biochimiques sont également envisagées dans les plasmas et les cœurs afin de déterminer les mécanismes impliqués dans la plus forte altération fonctionnelle des femelles GK par rapport aux mâles GK soumis à un épisode d'ischémie-reperfusion.



**Figure 36** Résultat préliminaire sur la fonction myocardique de rats diabétiques de type 2 GK mâles (MGK) et femelles (FGK) vs. rats Wistar contrôles mâles (MW) et femelles (FW). En bleu : les femelles Wistar ; en orange : les mâles Wistar ; en gris : les femelles GK ; en jaune : les mâles GK. \*  $p < 0,001$  FGK et MGK vs. contrôles respectifs ; †  $p < 0,01$  MGK vs MW ; ‡  $p < 0,001$  FGK vs. FW et §  $p < 0,05$  FGK vs. MGK.

## **Discussion générale et Perspectives**



La première cause de mortalité des patients diabétiques de type 2 reste à ce jour les maladies cardiovasculaires. Le développement d'un prédiabète puis d'un diabète de type 2, conduit à des altérations vasculaires et métaboliques favorisant la survenue d'évènements cardiovasculaires, ainsi qu'à une cardiomyopathie spécifique. De manière intéressante, les femmes diabétiques de type 2 présentent un risque cardiovasculaire plus élevé que les hommes diabétiques de type 2. Malgré ce constat, les études cliniques et pré-cliniques sont majoritairement réalisées uniquement sur des hommes ou des animaux mâles. Pourtant, l'étude des altérations précoces se produisant lors du développement du prédiabète et du diabète de type 2 permettrait une meilleure prise en charge des patientes diabétiques de type 2. Dans mon travail de thèse, notre objectif principal était d'étudier les altérations fonctionnelles, morphologiques, métaboliques et endothéliales du cœur d'animaux femelles prédiabétiques et diabétiques de type 2. Ainsi, dans une première étude, nous avons évalué les altérations cardiaques précoces au cours du développement d'un prédiabète induit par un régime riche en graisse et en sucre chez des femelles.

Par ailleurs, le développement de nouvelles approches thérapeutiques semble indispensable afin de réduire la mortalité cardiovasculaire des patients diabétiques de type 2, et plus particulièrement des femmes diabétiques de type 2. Dans un second temps, nous avons donc testé une approche thérapeutique par le Resvératrol contre les lésions myocardiques liées à l'ischémie-reperfusion dans le diabète de type 2.

Enfin, dans une dernière partie de ce travail, nous avons déterminé si le régime HFS induisait les mêmes modifications physiologiques chez les mâles et les femelles et s'il existait des différences liées au sexe dans la tolérance myocardique à l'ischémie-reperfusion.

Afin d'atteindre nos objectifs, nous avons utilisé diverses techniques complémentaires permettant de réaliser sur les mêmes animaux un suivi *in vivo* et *ex vivo*, ainsi que des analyses biochimiques. L'IRM et la SRM représentent des techniques riches en information permettant l'évaluation de paramètres physiologiques et morphologiques ainsi que des paramètres métaboliques comme le contenu en TG ou en composés phosphorés. Parallèlement, les analyses biochimiques dans les plasmas et les cœurs congelés ont permis d'approfondir les mécanismes moléculaires impliqués dans le cœur pathologique.

## **I- Développement des complications cardiovasculaires chez des femelles prédiabétiques**

Les études évaluant les différences de risque de mortalité cardiovasculaire entre les hommes et les femmes dans le cadre du prédiabète sont peu nombreuses. Dans une revue de 2014, Anagnostis et coll. présentent les données cliniques existantes sur le prédiabète et les différences entre les sexes [375]. Notamment la « DECODE Study », réalisée en 2003, est l'une des études les plus importantes dans ce domaine. Dans cette étude réalisée sur plus de 8000 hommes et 9000 femmes, Hu G et coll. montrent que les hommes présentent un risque CV absolu plus élevé que les femmes mais que cette différence s'atténue lors de l'altération de la régulation du statut glycémique. Par ailleurs, le risque de mortalité CV est plus élevé chez les femmes nouvellement diagnostiquées diabétiques de type 2 par rapport aux hommes diabétiques de type 2 [37]. Dans une autre étude, Donahue et coll. montrent que l'altération de la glycémie à jeun est fortement associée au risque CV chez les femmes [189]. En effet, le risque de récurrence après un infarctus du myocarde est deux fois plus élevé chez les femmes présentant une altération de la glycémie à jeun par rapport aux femmes normoglycémiques. Cette association n'est pas retrouvée chez les hommes avec une altération de la glycémie à jeun [189]. L'hypothèse de la dysfonction endothéliale a été émise pour expliquer l'augmentation du risque CV lors de l'évolution du prédiabète vers le diabète de type 2. Notamment, une augmentation de facteurs circulants favorisant la dysfonction endothéliale et la thrombose est observée chez les femmes progressant d'une normoglycémie vers un prédiabète et non chez les hommes [188].

Au cours de ma thèse, nous avons montré chez des femelles Wistar, que le développement d'un prédiabète induit par un régime riche en graisse et en sucre (HFS), était également associé à un risque CV élevé par rapport à des animaux contrôles. En effet, nous avons montré une augmentation de la perfusion et un épaissement du myocarde dès deux mois et trois mois de régime HFS. Ce travail de doctorat suggère une modification précoce de la morphologie et de la perfusion cardiaque chez des femelles, en réponse au développement d'un prédiabète induit par un régime riche en graisse et en sucre. Des études ont par ailleurs montré que la cardiomyopathie diabétique est liée au contrôle glycémique. Dans une étude sur plus de 2600 patients, Rutter et coll. montrent en effet que la masse du ventricule gauche ainsi que l'épaisseur de la paroi augmentent avec l'aggravation de l'intolérance au glucose. Les auteurs décrivent ce phénomène comme étant plus marqué chez les femmes par rapport aux hommes [79]. En

perspective il serait donc intéressant de réaliser une nouvelle campagne d'expérimentations, avec des groupes mâles et femelles dédiés à un suivi glycémique mois par mois, comme réalisé par Abdesselam et coll. sur des souris HFS [333]. De cette manière, nous pourrions évaluer la corrélation entre l'augmentation de la glycémie et la modification de la morphologie du cœur induite par le régime HFS au cours du temps, comme suggéré par Rutter et coll.

Les mesures hygiéno-diététiques demeurent la meilleure manière de prévenir l'apparition d'un diabète de type 2 avéré chez les patients prédiabétiques [18, 376]. Nous émettons donc l'hypothèse que le retour vers un régime standard chez les rates HFS, pourrait éviter les altérations morphologiques observées dans notre étude. Nous avons montré une augmentation de la perfusion myocardique et un épaississement du myocarde dès deux et trois mois de régime HFS. Dans une étude future, nous pourrions ajouter des groupes expérimentaux avec des animaux qui reprendraient un régime standard au bout de cinq mois de régime HFS afin de déterminer si ces altérations précoces sont réversibles ou non. Bidar et coll. ont par ailleurs montré par IRM qu'un régime riche en graisse et en sucre pendant trois mois augmentait le poids des animaux ainsi que le tissu adipeux et la graisse hépatique. Un retour à un régime standard pendant quatre semaines, permettait une réduction du poids des animaux, ainsi que de la graisse hépatique, fortement associée aux complications CV [348]. Une autre étude récemment présentée à l'EASD à Berlin en 2018 a également montré qu'une restriction calorique par un jeûne intermittent pouvait retarder la progression de la cardiomyopathie dans un modèle de rats obèses prédiabétiques. Grâce à la SRM du carbone-13, les auteurs ont montré une modulation des substrats utilisés par le cœur avec une augmentation de l'oxydation du pyruvate [377].

Ces adaptations morphologiques et fonctionnelles du cœur étaient associées à une fonction normale *in vivo*, mais à une forte sensibilité du myocarde à une séquence d'ischémie-reperfusion *ex vivo*. Un autre résultat majeur de notre travail, a été de montrer le rôle prépondérant du stress oxydatif dans la forte sensibilité des femelles HFS aux lésions d'ischémie-reperfusion. Dans les cœurs de rates HFS, nous avons montré une augmentation du MDA, ainsi qu'un découplage de la eNOS et une diminution de la S-Glutathionylation des protéines dans le myocarde. Le rôle du stress oxydant dans les lésions d'ischémie-reperfusion n'est plus à démontrer mais son importance dans le cadre du prédiabète et du genre féminin reste encore à approfondir. Une étude de Amengual-Cladera et coll. sur des rats Wistar mâles et femelles nourris avec un régime riche en graisse, a notamment montré une production moindre de l'enzyme antioxydante catalase chez les femelles par rapport aux mâles [378]. Une

autre étude sur des rates recevant de l'eau concentrée en fructose, a montré une diminution des enzymes superoxyde dismutase (SOD2) et glutathione peroxydase (GPx) dans le tissu adipeux [379]. Afin d'aller plus loin dans nos résultats, nous pourrions également mesurer les enzymes antioxydantes dans les cœurs de femelles HFS.

Nos résultats suggèrent également que des altérations de la mitochondrie dans le prédiabète pourraient jouer un rôle majeur dans la dysfonction cardiaque rapportée dans cette étude, notamment via une production exacerbée de molécules pro-oxydantes et via la diminution de la production des composés riches en énergie. Dans une revue, Ventura-Clapier et coll. expliquent notamment qu'un dimorphisme sexuel existe au niveau de la mitochondrie [138]. A l'état basal, dans le sexe féminin, les mitochondries sont moins nombreuses mais plus efficaces, utilisent davantage les acides gras, produisent moins d'EROs et ont un taux de captation du calcium plus faible mais une capacité de rétention du calcium plus importante. Ce dimorphisme sexuel ne conduit pas à une différence de respiration et d'efficacité mitochondriale à l'état basal, mais pourrait jouer un rôle dans des situations pathologiques comme les maladies métaboliques et les complications cardiovasculaire comme l'infarctus du myocarde. Notamment, un régime riche en graisse a été rapporté comme induisant une adaptation mitochondriale différente entre les mâles et les femelles au niveau du tissu adipeux [378]. Les mâles présentent plutôt une augmentation de la prolifération mitochondriale alors que les femelles présentent une augmentation de la différenciation mitochondriale et une plus grande capacité d'expansion du tissu adipeux, leur permettant de préserver une meilleure sensibilité à l'insuline [378]. Il serait donc intéressant en perspective d'envisager des mesures de la fonction mitochondriale dans le cœur des rats HFS, afin de mieux comprendre les altérations du métabolisme énergétique observées lors des expérimentations *ex vivo* sur le modèle du cœur isolé. Nous pourrions par exemple, évaluer la respiration mitochondriale avec des expériences d'oxymétrie sur des mitochondries isolées et évaluer les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale par western blot [380].

## **II- Effets du Resvératrol sur la sensibilité myocardique à l'ischémie-reperfusion dans un modèle de diabète de type 2**

Les complications cardiovasculaires restent les premières causes de mortalité chez les patients diabétiques, même lors d'un contrôle glycémique intense. De nouvelles molécules, comme les

inhibiteurs des SGLT-2 émergent et permettent une réduction de la mortalité CV associée notamment à une réduction de la glycémie [214]. Cependant, ces approches thérapeutiques ne sont pas systématiquement utilisées et les compléments alimentaires semblent donc intéressants et complémentaires afin de réduire la mortalité CV chez les patients diabétiques de type 2.

Comme décrit dans l'Introduction, le RSV est connu pour son action pléiotrope au sein de l'organisme. De manière intéressante, le RSV a montré des effets bénéfiques à la fois sur la fonction cardiaque et le diabète de type 2. Par ses propriétés antioxydante, anti-inflammatoire, anti-apoptotique et hypoglycémiant, le RSV représente un fort intérêt dans la prévention des complications cardiovasculaires associées au diabète de type 2. Par ailleurs le RSV a montré des effets intéressants sur les fonctions mitochondriale et endothéliale, fortement altérées dans la première étude sur le modèle HFS et dans mon travail de master 2 sur le modèle GK. Enfin, le RSV aurait un effet direct sur les récepteurs aux œstrogènes, rendant son utilisation dans la population féminine particulièrement intéressante.

Ainsi, l'objectif de la deuxième étude de ce travail de thèse était d'évaluer l'effet potentiellement protecteur du RSV contre les lésions d'ischémie-reperfusion chez des femelles GK diabétiques de type 2. Notre hypothèse de départ était que le RSV pouvait moduler le métabolisme énergétique et la fonction endothéliale afin d'améliorer la tolérance myocardique à une séquence d'ischémie-reperfusion.

Un résultat important de mon travail de thèse a été de montrer qu'une faible dose de RSV améliorait le métabolisme énergétique lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion dans le sexe féminin, par la modulation des composés riches en énergie, peu étudiés dans la littérature. Nous avons montré en effet une augmentation par le RSV de l'ATP, la PCr, la créatine et les nucléotides adénylés totaux, mais également de l'activité de la citrate synthase impliquée dans le cycle de Krebs. Dans la littérature, le RSV a montré des effets positifs sur la fonction mitochondriale. Notamment, dans un modèle de rats diabétiques induit par de la streptozotocine et un régime riche en graisse, Fang et coll. ont montré que le RSV pouvait augmenter le contenu myocardique en ATP, en ADN mitochondrial et l'expression des protéines PGC1 $\alpha$  et Nrf1 impliquées dans la biogénèse mitochondriale. De plus le RSV, augmentait le potentiel membranaire mitochondrial et diminuait le stress oxydant par une élévation de la SOD et une diminution du MDA [304]. Csizar et coll., sur des cellules endothéliales, ont montré une augmentation de l'expression des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et des protéines de la biogénèse mitochondriale (PGC1 $\alpha$ , Nrf1, Tfam). Ces effets sont dépendants de

SIRT1 puisqu'une délétion du gène codant pour SIRT1 (« Knock-Out » = « KO ») annulait les effets du RSV sur les paramètres mitochondriaux [262]. Ma et coll. ont également montré dans un modèle de souris « KO » pour SIRT1 que la cardiomyopathie diabétique, était associée à une altération de la mitochondrie. Dans ce modèle, le RSV permettait une restauration de la fonction et de la biogénèse mitochondriale, caractérisée par une augmentation de l'expression des facteurs PGC1 $\alpha$ , Nrf1, Nrf2 et Tfam [281]. De manière intéressante, Meng et coll. ont montré chez des souris ovariectomisées que le RSV permettait une protection du cœur contre l'ischémie. En effet, le RSV augmentait l'expression SIRT1, l'activité des complexes I, IV et V de la chaîne respiratoire mitochondriale, tandis qu'il diminuait l'ouverture du pore mitochondrial et le MDA [261].

La fonction mitochondriale est étroitement liée à la fonction endothéliale. Au cours de ma thèse, le RSV a montré une amélioration du débit coronaire chez les rates GK lors de la reperfusion, associée à une augmentation de l'expression des protéines eNOS, P-Akt et SIRT1 impliquées dans la voie du NO. Nos résultats confirment l'action connue du RSV sur la fonction endothéliale [284]. Chez des rats STZ, Joshi et coll. montrent notamment que l'inhibition de la fonction mitochondriale entraîne une altération de la fonction vasculaire, avec une diminution de la réactivité des vaisseaux et de la prolifération endothéliale. Le RSV est capable d'améliorer chez ces animaux diabétiques la réactivité vasculaire et le débit coronaire [381].

En perspective, il serait intéressant de tester le RSV sur le modèle de prédiabète induit par le régime HFS et de déterminer si le RSV peut prévenir les modifications cardiaques observées par IRM dans la première étude. En effet, Fang et coll. ont montré que le RSV diminue les marqueurs de l'hypertrophie ANP, BNP et  $\beta$ -MHC dans les cœurs de rats diabétiques de type 2 induits par de la streptozotocine et un régime riche en graisse [304]. Le RSV, également reconnu pour ses propriétés antioxydantes [382], pourrait aussi améliorer la tolérance à l'ischémie-reperfusion des rates HFS. En effet, le RSV pourrait potentiellement diminuer le MDA, le découplage d'eNOS et restaurer la S-Glutathionylation des protéines chez nos rates HFS. Une action du RSV sur le métabolisme énergétique est également envisageable chez les rats HFS, comme montré chez les rates GK. Le RSV serait donc d'un grand intérêt dans un autre modèle que le rat GK, comme par exemple le rat HFS prédiabétique afin de prévenir les altérations précoces du cœur lié à l'hypertrophie, le stress oxydant, les dysfonctions endothéliale et mitochondriale.

L'ensemble de ces résultats contribuent à la meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la cardioprotection par le RSV dans les complications CV du diabète de type 2 dans le sexe féminin. Le RSV semble une approche intéressante afin de protéger le cœur contre les lésions ischémiques chez les femmes diabétiques de type 2.

### **III- Dimorphisme sexuel dans la réponse physiologique au régime riche en graisse et en sucre**

La littérature concernant le dimorphisme sexuel dans la réponse physiologique face à un régime riche en graisse et en sucre reste peu documentée. Dans la troisième étude de mon travail de thèse, nous avons observé une prise de poids et une hypertrophie cardiaque uniquement chez les mâles HFS ainsi qu'une intolérance au glucose plus marquée chez les femelles HFS. Taraschenko et coll. ont également montré une prise de poids plus importante sous régime riche en graisse uniquement chez les mâles. Dans deux autres études de Liu et coll. [383] et Amengual-Cladera et coll. [378], l'index HOMA représentant l'insulino-résistance et la glycémie était significativement plus élevé uniquement chez les femelles et pas chez les mâles. Comme discuté dans la troisième étude, nous tenterons de comprendre pourquoi ce dimorphisme sexuel existe, par la mesure de la leptine et de l'inflammation systémique.

### **IV- Dimorphisme sexuel dans la tolérance à l'ischémie-reperfusion dans le prédiabète et le diabète de type 2**

L'un des objectifs de ma thèse était également de comparer la tolérance myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion de mâles et de femelles prédiabétiques et diabétiques de type 2. L'ensemble des résultats montrés dans ce travail de thèse ont soulevé plusieurs questions abordées dans les points suivant.

#### **A- Existe-t-il des différences entre les femelles et les mâles dans nos modèle de prédiabète et de diabète de type 2 ?**

La troisième étude de ma thèse consistait à étudier des mâles et des femelles soumis à un régime HFS. Des expériences *ex vivo* sur la tolérance à l'ischémie-reperfusion ont été réalisées. Les

mâles et les femelles HFS présentaient une altération de la fonction myocardique, du débit coronaire et du métabolisme énergétique à la reperfusion. Nous avons montré qu'au stade de prédiabète, il n'y a pas de différences entre les sexes concernant la tolérance myocardique à l'ischémie-reperfusion, malgré des différences concernant le poids, la tolérance au glucose et l'hypertrophie cardiaque. Ces résultats sont en accord avec la littérature selon laquelle les femmes prédiabétiques ne présentent pas un risque CV plus élevé que les hommes [37].

Dans une quatrième étude préliminaire, nous avons cependant montré que la tolérance myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion était différente en fonction du sexe dans le cadre d'un diabète de type 2 avéré. En effet, les mâles et les femelles GK présentent une altération de la fonction cardiaque en période contrôle et à la reperfusion par rapport aux contrôles respectifs. De manière intéressante, les femelles GK présentent une altération de la fonction cardiaque plus importante que les mâles GK à la reperfusion, phénomène non retrouvé dans le modèle HFS. Notre hypothèse porte sur une altération plus importante du métabolisme énergétique chez les femelles GK par rapport aux mâles GK. En effet, dans l'étude sur le RSV, nous avons montré que les femelles GK présentaient une altération du métabolisme énergétique par rapport au groupe contrôle, alors qu'une étude de Desrois et coll. a précédemment montré que les mâles GK ne présentaient pas d'altération du métabolisme énergétique lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion [115].

Il sera donc important de déterminer si les femelles GK présentent une altération plus importante du contenu en ATP, PCr, nucléotides adénylés totaux, créatine et citrate synthase lors de la reperfusion par rapport aux mâles GK. De plus, si le débit coronaire est également plus altéré chez les femelles GK, nous pourrions approfondir les analyses biochimiques dans les cœurs sur la voie du NO. En effet, comme décrit dans l'Introduction, les dysfonctions endothéliale et mitochondriale pourraient être fortement impliquées dans les atteintes CV des patients diabétiques de type 2 et plus particulièrement chez les femmes.

## **B- Existe-t-il des différences entre les femelles prédiabétiques et diabétiques de type 2 dans la tolérance aux lésions d'ischémie-reperfusion?**

Comme précisé précédemment, nous n'avons pas observé d'effet du sexe dans la tolérance myocardique à l'ischémie-reperfusion chez le rat HFS prédiabétique, mais nous avons montré une tolérance moindre chez les femelles dans le cadre du diabète de type 2. La comparaison de nos deux modèles pourrait être utile afin de comprendre ce phénomène.



Nous remarquons que les femelles GK et les femelles HFS présentent une altération de la fonction myocardique similaire lors de la reperfusion. Le contenu en ATP et PCr est également similairement altéré chez les femelles GK et les femelles HFS. Cependant, nous pouvons observer une augmentation de Pi et une diminution du pHi chez les femelles GK, non observées chez les femelles HFS. De ce fait, une détérioration de la fonction mitochondriale entre le prédiabète et le diabète de type 2 pourrait expliquer la plus forte sensibilité des femelles GK aux lésions d'ischémie-reperfusion.

De plus, nous remarquons une altération du débit coronaire en période contrôle et au cours de la reperfusion chez les femelles GK, alors que celui-ci est altéré uniquement à la reperfusion chez les femelles HFS. Une détérioration plus importante de la fonction endothéliale pourrait donc expliquer pourquoi les femelles GK sont plus sensibles aux lésions d'ischémie reperfusion. En effet, une étude sur le rat GK a montré une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium à l'état basal, chez les femelles et pas chez les mâles [111].

Enfin, nous avons montré chez les femelles HFS un stress oxydant exacerbé par rapport aux contrôles, caractérisé par une augmentation du MDA, un découplage d'eNOS et une diminution de la S-Glutathionylation des protéines. Chez les femelles GK, nous n'avons pas observé de modification du contenu myocardique en MDA dans notre deuxième étude. Pour conclure qu'il n'y a pas de différence entre les femelles GK et les femelles contrôles, d'autres marqueurs du stress oxydant devront être explorés comme chez le rat HFS. Par ailleurs, l'évaluation du stress oxydant dans des échantillons plasmatiques pourrait nous permettre d'évaluer si des différences préexistent avant un stress ischémique. En effet, des études ont montré une élévation du marqueur 8-isoPGF<sub>2α</sub> dans le plasma de rats GK et de rats nourris avec un régime riche en graisse et en fructose [384, 385]. Ces analyses sont actuellement en cours afin de le déterminer.

### **C- Existe-t-il des différences physiologiques entre les femelles prédiabétiques et diabétiques de type 2 ?**

De manière intéressante, nous n'avons pas noté de différences dans la tolérance myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion. Les femelles HFS présentent une fonction myocardique aussi altérée que les femelles GK, alors que la glycémie à jeun est moins élevée chez les femelles HFS. Le rat GK est un modèle non obèse de diabète de type 2 alors que chez le rat HFS, d'autres facteurs que l'hyperglycémie doivent être pris en compte. En effet, les femelles HFS présentent une élévation de la quantité de tissu adipeux viscérale et une stéatose hépatique

importante, qui ont été fortement reliés aux complications CV. Dans une étude chez l'Homme, Lee et coll. montrent également que la stéatose et la fibrose hépatiques sont associées à une dysfonction myocardique ainsi qu'à une altération de l'utilisation du glucose dans le cœur [386]. Par ailleurs, Abdesselam et coll. ont montré que l'augmentation du contenu en triglycérides dans le foie en réponse à un régime riche en graisse et en sucre précède l'altération de la fonction et de la perfusion cardiaques [333].

#### **D- Quel est le rôle des hormones ?**

Comme présenté en Introduction, la littérature montre que les hormones sexuelles féminines et plus particulièrement les œstrogènes sont impliquées dans les voies de signalisation endothéliale et mitochondriale et pourraient jouer un rôle dans des situations pathologiques comme le prédiabète et le diabète de type 2. Leur rôle protecteur dans le phénomène de tolérance à l'ischémie-reperfusion a par ailleurs été évoqué dans différentes études [186, 187].

Une perspective intéressante serait donc de déterminer le rôle des hormones dans la tolérance à l'ischémie-reperfusion chez des rates prédiabétiques et diabétiques de type 2, et plus particulièrement sur le métabolisme énergétique et la fonction endothéliale. Dans les études futures, nous pourrions ici inclure des groupes de femelles ovariectomisées HFS et GK.

Pour finir, les récepteurs aux œstrogènes sont des cibles connues du RSV. Dans le cadre du traitement par le RSV, un groupe de femelles GK ovariectomisées recevant du RSV, nous permettrait également de déterminer le rôle des hormones dans la cardioprotection induite par le RSV.

#### **V- Importance du choix du modèle pour l'étude des pathologies cardiovasculaires et pour tester des nouvelles approches thérapeutiques.**

Un modèle animal strictement similaire à l'Homme n'existe pas et le choix du modèle est délicat afin de pouvoir transférer les résultats obtenus chez l'animal à l'Homme. La physiopathologie du diabète de type 2 humain reste complexe et peut donc nécessiter l'utilisation de plusieurs modèles animaux pour sa compréhension.

De plus, l'étude du sexe féminin n'est pas possible dans tous les modèles animaux de diabète de type 2. Voici ci-dessous quelques exemples d'autres modèles animaux de diabète de type 2 où des disparités existent dans la survenue du diabète de type 2 entre les mâles et les femelles :

- Le rat Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF), dont le diabète est transmis uniquement par les mâles.
- Le rat Zucker Diabetic Fatty (ZDF), dont les femelles développent un diabète de type 2 uniquement sous un régime riche en graisse [387].
- La souris TallyHo, dont les femelles ne présentent pas d'hyperglycémie contrairement aux mâles [388].
- La souris Nagoya-Shibata-Yasuda (NSY), dont les femelles présentent une faible incidence de diabète de type 2 par rapport aux mâles (31% vs. 98 %) [389].

Au cours de ma thèse nous avons choisi deux modèles animaux différents mais complémentaires, compatibles avec l'étude de l'effet du sexe. Premièrement, nous avons utilisé le modèle de rat HFS, induit par un régime riche en graisse et en sucre, reproduisant une alimentation comparable à l'Homme. En effet, la prévalence mondiale de l'obésité augmente et conduit à un risque élevé de diabète de type 2. Ce constat rend donc légitime l'utilisation de modèles animaux induits par des régimes obésogènes et diabétogènes. Dans la littérature, les régimes riches en graisse et/ou en sucre sont responsables chez les rats d'un prédiabète ou d'un syndrome métabolique associé à une obésité. Parallèlement, nous avons utilisé le modèle de rat GK diabétique de type 2. Ce modèle est intéressant car il est polygénique et il n'a pas d'obésité associée, permettant d'explorer uniquement le rôle du diabète sur le cœur. Chez l'Homme, le diabète de type 2 et l'obésité sont étroitement liés, rendant difficile la compréhension des mécanismes mis en jeu notamment dans les complications CV associées au diabète de type 2.

Dans un article de Kuwabara et coll. [390], une comparaison des modèles GK et HFS a été proposée, pour l'étude du diabète de type 2. L'objectif de cette étude était de comparer les deux modèles et de déterminer leur fiabilité dans l'étude du diabète de type 2. Le rat GK et le rat HFS permettent une approche basée soit sur l'influence de l'environnement, soit sur l'influence de la génétique. En résumé, les auteurs montrent que les deux modèles sont importants afin de comprendre la part de responsabilité des facteurs génétiques intrinsèques et des facteurs extrinsèques comme l'alimentation, sur les altérations métaboliques et physiologiques. Cependant, Kuwabara et coll. concluent que seul le modèle de rat GK est fiable pour étudier les conséquences du diabète de type 2 sur l'organisme. En effet dans leur étude, le régime riche en

graisse était incapable d'induire un diabète de type 2 avéré. Dans nos travaux, nous avons également constaté que le régime HFS n'induisait pas un diabète de type 2 franc mais plutôt un prédiabète chez le rat. De manière intéressante, Abdesselam et coll. ont montré un diabète de type 2 avéré avec le même régime, chez des souris mâles C57Bl/6 [333]. A l'heure actuelle, nous ne pouvons pas expliquer la différence de réponse au régime entre les rats et les souris. Le rat HFS demeure tout de même un modèle très utile pour reproduire une condition prédiabétique et/ou un syndrome métabolique, conduisant à un risque élevé de diabète de type 2.

Enfin, le choix de l'âge des animaux est important. En effet, le diabète de type 2 est une pathologie qui se développe avec l'âge chez l'Homme. Afin de se rapprocher au maximum de ces conditions et de pouvoir détecter des altérations cardiaques, les animaux diabétiques de type 2 doivent présenter un âge relativement avancé. Dans une étude sur le rat Zucker, Sidell et coll. ont montré une insulino-résistance du cœur à l'âge de 12 mois et pas à l'âge de 6 mois, en mesurant la capture du glucose stimulée par l'insuline. Les auteurs ont également montré que l'insulino-résistance était associée à une altération de la fonction cardiaque et du métabolisme énergétique à 12 mois mais pas à 6 mois [391]. Dans nos études, les rats GK avaient 8 mois car de précédents travaux au laboratoire ont montré des altérations cardiaques dès cet âge avancé [193].

## **VI- Futures approches thérapeutiques**

D'autres approches thérapeutiques pourraient également être envisagées afin d'améliorer spécifiquement les fonctions endothéliale et mitochondriale dans nos deux modèles animaux.

L'ajout de L-Arginine (précurseur du NO) dans la nourriture des rats HFS et GK, pourrait permettre d'augmenter la production du NO et donc d'améliorer la fonction endothéliale, altérée dans les deux modèles. Alam et coll. ont notamment montré que la L-Arginine pouvait atténuer les altérations structurelles et fonctionnelles du ventricule gauche, induites par un régime riche en graisse, par la réduction de l'inflammation et du stress oxydant [357]. La supplémentation en tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), cofacteur important d'eNOS serait aussi d'un fort intérêt. Une étude de Li et coll. a montré que la supplémentation en BH<sub>4</sub> induisait un recouplage de la protéine eNOS dans un modèle de souris ApoE<sup>-/-</sup>, contribuant à la diminution de l'athérosclérose [392]. Cette approche serait donc particulièrement intéressante chez le rat HFS, puisque nous avons montré une altération du débit coronaire associé à un découplage d'eNOS.

Enfin, une approche ciblant le métabolisme mitochondrial serait également intéressante. L'utilisation du dichloroacétate, un activateur de l'enzyme pyruvate déshydrogénase modulant l'oxydation du glucose et la production de NADH mitochondriale, pourrait être intéressante chez les rats HFS et GK afin de moduler le métabolisme énergétique du cœur lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion. Le Page et coll. ont montré que le dichloroacétate rétabli l'équilibre des substrats myocardiques utilisés, améliore la fonction diastolique et diminue la glycémie chez des rats diabétiques de type 2. Leurs résultats suggèrent que la modulation de la pyruvate déshydrogénase pourrait être une nouvelle thérapie pour le traitement et/ou la prévention de la cardiomyopathie diabétique [393].

Enfin, récemment, les inhibiteurs des SGLT2 ont montré un grand intérêt dans le cadre des complications CV associées au diabète de type 2, puisque leur utilisation a été associée à une forte diminution de la mortalité CV [214]. Cependant, les mécanismes impliqués dans la réduction de la mortalité CV restent encore à être déterminés.

## **CONCLUSION GENERALE**

Au cours de ma thèse, nous avons mis en lumière les complications cardiovasculaires associées au prédiabète et au diabète de type 2 dans le sexe féminin, à l'aide de deux modèles animaux complémentaires. Nous avons montré que des altérations cardiaques précoces existent dans une population de rates prédiabétiques, et que celles-ci conduisent à une forte sensibilité du myocarde aux lésions d'ischémie-reperfusion. Dans le cadre d'un diabète de type 2 avéré, nous avons également montré une forte sensibilité myocardique aux lésions d'ischémie-reperfusion et nous avons montré que le Resvératrol permettait une cardioprotection par l'augmentation des composés riches en énergie et de l'expression des protéines impliquées dans la voie du NO. Dans une troisième étude nous avons montré une sensibilité myocardique aux lésions d'ischémie-reperfusion similaire entre les mâles et les femelles HFS, bien que nous ayons montré des différences de réponse physiologique face au régime HFS. De manière intéressante, nos premiers résultats comparant les mâles et les femelles dans le diabète de type 2 sont en accord avec les données de la littérature selon lesquels les femmes diabétiques de type 2 présentent un risque cardiovasculaire plus élevé que les hommes diabétiques de type 2. Nous avons montré que les dysfonctions endothéliale et mitochondriale semblent jouer un rôle important dans les complications cardiovasculaires associées au prédiabète et au diabète de type 2 dans le sexe féminin. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse indiquent que ces voies devront être d'avantage explorées ensuite chez les femelles et les mâles afin de mieux comprendre ce dimorphisme sexuel. Les futures études pré-cliniques et cliniques devraient également prendre en compte les deux sexes afin de permettre des approches thérapeutiques spécifiques.

## Références Bibliographiques

1. Cho, N.H., et al., *IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045*. Diabetes Res Clin Pract, 2018. **138**: p. 271-281.
2. Organisation Mondiale de la Santé, *Rapport mondial sur le diabète*, 2016. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254648/9789242565256-fre.pdf;jsessionid=7B60C98433820B9FD5566CA8546E22B3?sequence=1>
3. Mandereau-Bruno, L. and Fosse-Eodorh, S., *Prévalence du diabète traité pharmacologiquement (tous types) en France en 2015. Disparités territoriales et socio-économiques*. Bull Epidémiol Hebd, 2017. (27-28): p. 586-91.
4. Olokoba, A.B., et al., *Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends*. Oman Med J, 2012. **27**(4): p. 269-73.
5. Cox, M.E., and Edelman, D., *Tests for Screening and Diagnosis of Type 2 Diabetes*. Clinical Diabetes, 2009. **27**(4): p. 132-138.
6. Atkinson, M.A., et al., *Type 1 diabetes*. Lancet, 2014. **383**(9911): p. 69-82.
7. Chen, L., et al., *The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives*. Nat Rev Endocrinol, 2011. **8**(4): p. 228-36.
8. Lascar, N., et al., *Type 2 diabetes in adolescents and young adults*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2018. **6**(1): p. 69-80.
9. Brunton, S., *Pathophysiology of Type 2 Diabetes: The Evolution of Our Understanding*. J Fam Pract, 2016. **65**(4 Suppl).
10. Murphy, R., *Monogenic diabetes and pregnancy*. Obstet Med, 2015. **8**(3): p. 114-20.
11. American Diabetes Association, *Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018*. Diabetes Care, 2018. **41**(Suppl 1): p. S13-S27.
12. Bergman, M., *Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus*. Endocrine, 2013. **43**(3): p. 504-13.
13. American Diabetes Association, *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2014. **37 Suppl 1**: p. S81-90.
14. Bansal, N., *Prediabetes diagnosis and treatment: A review*. World J Diabetes, 2015. **6**(2): p. 296-303.
15. Fosse-Eodorh, S., *Epidémiologie du diabète: que disent les dernières données françaises?* 2018.
16. Centers for Disease Control and Prevention, *National Diabetes Statistics Report, 2017*. <https://www.cdc.gov/diabetes/pdfs/data/statistics/national-diabetes-statistics-report.pdf>
17. Tabak, A.G., et al., *Prediabetes: a high-risk state for diabetes development*. Lancet, 2012. **379**(9833): p. 2279-90.
18. Howells, L., et al., *Clinical impact of lifestyle interventions for the prevention of diabetes: an overview of systematic reviews*. BMJ OPEN, 2016. **6**(12): p. e013806.
19. Rabasa-Lhoret, R., *Pancréas, métabolisme intermédiaire et diabète*, 2017. <https://slideplayer.fr/slide/453889/>.
20. Kahn, S.E., et al., *Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future*. Lancet, 2014. **383**(9922): p. 1068-83.
21. Tuomilehto, J., et al., *Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance*. N Engl J Med, 2001. **344**(18): p. 1343-50.
22. Chiasson, J.L. et al., *Prevention of type 2 diabetes: insulin resistance and beta-cell function*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 3**: p. S34-8.
23. Murea, M., et al., *Genetic and environmental factors associated with type 2 diabetes and diabetic vascular complications*. Rev Diabet Stud, 2012. **9**(1): p. 6-22.
24. Daousi, C., et al., *Prevalence of obesity in type 2 diabetes in secondary care: association with cardiovascular risk factors*. Postgrad Med J, 2006. **82**(966): p. 280-4.

25. Golay, A. and J. Ybarra, *Link between obesity and type 2 diabetes*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2005. **19**(4): p. 649-63.
26. Kahn, B.B. and J.S. Flier, *Obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 473-81.
27. Eckel, R.H., et al., *The metabolic syndrome*. Lancet (London, England), 2010. **375**(9710): p. 181-183.
28. Standl, E., *Aetiology and consequences of the metabolic syndrome*. European Heart Journal Supplements, 2005. **7**(suppl\_D): p. D10-D13.
29. Alberti, K., et al., *Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity*. Circulation, 2008. **120**: p. 1640-1645.
30. Wilson, P.W., et al., *Clustering of metabolic factors and coronary heart disease*. Archives of Internal Medicine, 1999. **159**(10): p. 1104-1109.
31. Organisation Mondiale de la Santé, *Maladies cardiovasculaires*. [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/about\\_cvd/fr/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/fr/)
32. Kannel, W.B., *Metabolic risk factors for coronary heart disease in women: perspective from the Framingham Study*. Am Heart J, 1987. **114**(2): p. 413-9.
33. Taegtmeier, et al., *Adaptation and Maladaptation of the Heart in Diabetes: Part I: General Concepts*. Circulation, 2002. **105**(14): p. 1727-1733.
34. Boudina, S. and E.D. Abel, *Diabetic cardiomyopathy, causes and effects*. Rev Endocr Metab Disord, 2010. **11**(1): p. 31-9.
35. Kannel, W. and D. McGee, *Diabetes and Cardiovascular Disease: The Framingham Study*. JAMA, 1979. **241**(19): p. 2035-2038.
36. Huang, D., et al., *Macrovascular Complications in Patients with Diabetes and Prediabetes*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 7839101.
37. Hu, G., et al., *Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women*. - PubMed - NCBI. Archives of Internal Medicine, 2004. **164**(10): p. 1066-76.
38. Ford, E., *Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence*. Diabetes Care, 2005. **28**(7): p. 1769-78.
39. Mente, A., et al., *Metabolic syndrome and risk of acute myocardial infarction a case-control study of 26,903 subjects from 52 countries*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(21): p. 2390-8.
40. Bhupathiraju, S.N. and F.B. Hu, *Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications*. Circ Res, 2016. **118**(11): p. 1723-35.
41. Després, J.-P., et al., *Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2008. **28**(6): p. 1039-1049.
42. Lim, S. and J.B. Meigs, *Ectopic fat and cardiometabolic and vascular risk*. Int J Cardiol, 2013. **169**(3): p. 166-76.
43. Tchernof, A. and J.P. Despres, *Pathophysiology of human visceral obesity: an update*. Physiol Rev, 2013. **93**(1): p. 359-404.
44. Despres, J.P., *Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update*. Circulation, 2012. **126**(10): p. 1301-13.
45. Engin, A.B., *What Is Lipotoxicity?* Adv Exp Med Biol, 2017. **960**: p. 197-220.
46. Abdesselam, I., *Dépôts de graisse ectopique: étude de leur développement et de leur modulation*. Thèse de doctorat en science, sous la direction de Monique Bernard et Anne Dutour, Marseille, CRMBM-NORT, 2016.
47. Silaghi, A., et al., *Epicardial adipose tissue extent: relationship with age, body fat distribution, and coronaropathy*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(11): p. 2424-30.



48. Rijzewijk, L.J., et al., *Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(22): p. 1793-9.
49. Iozzo, P., et al., *Contribution of glucose tolerance and gender to cardiac adiposity*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(11): p. 4472-82.
50. Duncan, B.B., et al., *Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study*. Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1799-805.
51. Shoelson, S.E., et al., *Inflammation and insulin resistance*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1793-801.
52. Lee, J., et al., *Interaction of IL-6 and TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction in type 2 diabetic mouse hearts*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0187189.
53. Nelson, R.H., *Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease*. Prim Care, 2013. **40**(1): p. 195-211.
54. Dhananjayan, R., et al., *Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus*. Indian J Clin Biochem, 2016. **31**(4): p. 372-9.
55. Wang, W., et al., *Oxidized low-density lipoprotein inhibits nitric oxide-mediated coronary arteriolar dilation by up-regulating endothelial arginase I*. Microcirculation, 2011. **18**(1): p. 36-45.
56. van Bilsen, M., et al., *Hypertension is a conditional factor for the development of cardiac hypertrophy in type 2 diabetic mice*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e85078.
57. Rosenson, R.S., et al., *Does microvascular disease predict macrovascular events in type 2 diabetes?* Atherosclerosis, 2011. **218**(1): p. 13-8.
58. Medscape, *Complications microvasculaires du diabète*, 2012. <https://francais.medscape.com/features/diaporama/3399127>
59. Khalil, H., *Diabetes microvascular complications-A clinical update*. Diabetes Metab Syndr, 2017. **11 Suppl 1**: p. S133-s139.
60. Rahman, M., et al., *Cardiovascular outcomes in high-risk hypertensive patients stratified by baseline glomerular filtration rate*. Ann Intern Med, 2006. **144**(3): p. 172-80.
61. Hanis, C.L., et al., *Mortality of Mexican Americans with NIDDM. Retinopathy and other predictors in Starr County, Texas*. Diabetes Care, 1993. **16**(1): p. 82-9.
62. Maser, R.E., et al., *The association between cardiovascular autonomic neuropathy and mortality in individuals with diabetes: a meta-analysis*. Diabetes Care, 2003. **26**(6): p. 1895-901.
63. Ho, H., et al., *Retinopathy Signs Improved Prediction and Reclassification of Cardiovascular Disease Risk in Diabetes: A prospective cohort study*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 41492.
64. Tziomalos, K. and V.G. Athyros, *Diabetic Nephropathy: New Risk Factors and Improvements in Diagnosis*. Rev Diabet Stud, 2015. **12**(1-2): p. 110-8.
65. Brownrigg, J.R., et al., *Peripheral neuropathy and the risk of cardiovascular events in type 2 diabetes mellitus*. Heart, 2014. **100**(23): p. 1837-43.
66. Anderson, J.L. and Morrow, D.A. *Acute Myocardial Infarction*. N Engl J Med, 2017. **376**(21): p. 2053-2064.
67. Lejay, A., et al., *Ischemia reperfusion injury, ischemic conditioning and diabetes mellitus*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **91**: p. 11-22.
68. Opie, L.H., *Myocardial ischemia--metabolic pathways and implications of increased glycolysis*. Cardiovasc Drugs Ther, 1990. **4 Suppl 4**: p. 777-90.
69. Stanley, W.C., *Myocardial energy metabolism during ischemia and the mechanisms of metabolic therapies*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2004. **9 Suppl 1**: p. S31-45.
70. Cour, M. and L. Argaud, *Ischémie-reperfusion et protection cellulaire*. Réanimation, 2010. **19**(2): p. 185-190.
71. Yellon, D.M. and Hausenloy, D.J., *Mechanisms of disease: Myocardial reperfusion injury*. NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, 2007. **357**(11): p. 1121-1135.

72. Yang, C.F., *Clinical manifestations and basic mechanisms of myocardial ischemia/reperfusion injury*. *Ci Ji Yi Xue Za Zhi*, 2018. **30**(4): p. 209-215.
73. Rubler, S., et al., *New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis*. *Am J Cardiol*, 1972. **30**(6): p. 595-602.
74. Kannel, W.B., et al., *Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study*. *Am J Cardiol*, 1974. **34**(1): p. 29-34.
75. Nichols, G.A., et al., *The incidence of congestive heart failure in type 2 diabetes: an update*. *Diabetes Care*, 2004. **27**(8): p. 1879-84.
76. Bell, D.S., *Diabetic cardiomyopathy*. *Diabetes Care*, 2003. **26**(10): p. 2949-51.
77. Iribarren, C., et al., *Glycemic control and heart failure among adult patients with diabetes*. *Circulation*, 2001. **103**(22): p. 2668-73.
78. Stratton, I.M., et al., *Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study*. *Bmj*, 2000. **321**(7258): p. 405-12.
79. Rutter, M.K., et al., *Impact of glucose intolerance and insulin resistance on cardiac structure and function: sex-related differences in the Framingham Heart Study*. *Circulation*, 2003. **107**(3): p. 448-54.
80. Boyer, J.K., et al., *Prevalence of ventricular diastolic dysfunction in asymptomatic, normotensive patients with diabetes mellitus*. *Am J Cardiol*, 2004. **93**(7): p. 870-5.
81. Shivalkar, B., et al., *Flow mediated dilatation and cardiac function in type 1 diabetes mellitus*. *Am J Cardiol*, 2006. **97**(1): p. 77-82.
82. Radovits, T., et al., *Comparative investigation of the left ventricular pressure-volume relationship in rat models of type 1 and type 2 diabetes mellitus*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **297**(1): p. H125-33.
83. Bostick, B., et al., *Dipeptidyl peptidase inhibition prevents diastolic dysfunction and reduces myocardial fibrosis in a mouse model of Western diet induced obesity*. *Metabolism*, 2014. **63**(8): p. 1000-11.
84. Mytas, D.Z., et al., *Diabetic myocardial disease: pathophysiology, early diagnosis and therapeutic options*. *J Diabetes Complications*, 2009. **23**(4): p. 273-82.
85. Wang, J., et al., *Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy*. *Rev Diabet Stud*, 2006. **3**(3): p. 108-17.
86. Fang, Z.Y., et al., *Screening for heart disease in diabetic subjects*. *Am Heart J*, 2005. **149**(2): p. 349-54.
87. Aragno, M., et al., *Oxidative stress-dependent impairment of cardiac-specific transcription factors in experimental diabetes*. *Endocrinology*, 2006. **147**(12): p. 5967-74.
88. Regan, T.J., et al., *Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus*. *J Clin Invest*, 1977. **60**(4): p. 884-99.
89. Anderson, E.J., et al., *Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **54**(20): p. 1891-8.
90. Boudina, S., et al., *Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins*. *Diabetes*, 2007. **56**(10): p. 2457-66.
91. Westermann, D., et al., *Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism*. *Diabetes*, 2007. **56**(3): p. 641-6.
92. Monji, A., et al., *Glucagon-like peptide-1 receptor activation reverses cardiac remodeling via normalizing cardiac steatosis and oxidative stress in type 2 diabetes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013. **305**(3): p. H295-304.
93. Lee, T.W., et al., *PPARs modulate cardiac metabolism and mitochondrial function in diabetes*. *J Biomed Sci*, 2017. **24**(1): p. 5.

94. Buchanan, J., et al., *Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity*. *Endocrinology*, 2005. **146**(12): p. 5341-9.
95. Peterson, L.R., et al., *Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women*. *Circulation*, 2004. **109**(18): p. 2191-6.
96. Wright, J.J., et al., *Mechanisms for increased myocardial fatty acid utilization following short-term high-fat feeding*. *Cardiovasc Res*, 2009. **82**(2): p. 351-60.
97. Ghosh, N. and R. Katare, *Molecular mechanism of diabetic cardiomyopathy and modulation of microRNA function by synthetic oligonucleotides*. *Cardiovasc Diabetol*, 2018. **17**(1): p. 43.
98. Guo, R. and S. Nair, *Role of microRNA in diabetic cardiomyopathy: From mechanism to intervention*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017. **1863**(8): p. 2070-2077.
99. Moore, A., et al., *Rapid onset of cardiomyopathy in STZ-induced female diabetic mice involves the downregulation of pro-survival Pim-1*. *Cardiovasc Diabetol*, 2014. **13**: p. 68.
100. Lopaschuk, G.D., *Metabolic changes in the acutely ischemic heart*. *Heart Metab*, 2016. **70**: p. 32-35.
101. Idris-Khodja, N., et al., *Endothelin-1 Overexpression Exaggerates Diabetes-Induced Endothelial Dysfunction by Altering Oxidative Stress*. *Am J Hypertens*, 2016. **29**(11): p. 1245-1251.
102. Siragusa, M. and I. Fleming, *The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction*. *Pflugers Arch*, 2016. **468**(7): p. 1125-37.
103. Leon, B.M. and Maddox, T.M., *Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research*. *World J Diabetes*, 2015. **6**(13): p. 1246-58.
104. van Sloten, T.T., et al., *Endothelial dysfunction plays a key role in increasing cardiovascular risk in type 2 diabetes: the Hoorn study*. *Hypertension*, 2014. **64**(6): p. 1299-305.
105. Baron, A.D., *Insulin resistance and vascular function*. *J Diabetes Complications*, 2002. **16**(1): p. 92-102.
106. Wasserman, D.H., et al., *The Vasculature in Prediabetes*. *Circ Res*, 2018. **122**(8): p. 1135-1150.
107. Tziomalos, K., et al., *Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: prevalence, pathogenesis and management*. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*, 2010. **20**(2): p. 140-146.
108. Madhu, S.V., *Endothelial dysfunction and diabetes*. *J Assoc Physicians India*, 2010. **58**: p. 475-6.
109. Tabit, C.E., et al., *Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2010. **11**(1): p. 61-74.
110. Meigs, J.B., et al., *Hemostatic markers of endothelial dysfunction and risk of incident type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study*. *Diabetes*, 2006. **55**(2): p. 530-7.
111. Desrois, M., et al., *Reduced up-regulation of the nitric oxide pathway and impaired endothelial and smooth muscle functions in the female type 2 diabetic goto-kakizaki rat heart*. *Nutrition & Metabolism*, 2017. **14**: p. 6.
112. Alameddine, A., et al., *The cardiovascular effects of salidroside in the Goto-Kakizaki diabetic rat model*. *J Physiol Pharmacol*, 2015. **66**(2): p. 249-57.
113. Tessari, P., et al., *Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with type 2 diabetes and nephropathy*. *Diabetes*, 2010. **59**(9): p. 2152-9.
114. Zhang, R., et al., *Sex differences in mesenteric endothelial function of streptozotocin-induced diabetic rats: a shift in the relative importance of EDRFs*. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 2012. **303**(10): p. H1183-1198.

115. Desrois, M., et al., *Upregulation of eNOS and unchanged energy metabolism in increased susceptibility of the aging type 2 diabetic GK rat heart to ischemic injury*. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, 2010. **299**(5): p. H1679-1686.
116. Heiss, E.H. and V.M. Dirsch, *Regulation of eNOS enzyme activity by posttranslational modification*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(22): p. 3503-13.
117. Kobayashi, T., et al., *Impairment of PI3-K/Akt pathway underlies attenuated endothelial function in aorta of type 2 diabetic mouse model*. Hypertension, 2004. **44**(6): p. 956-62.
118. Naoum, J.J., et al., *Aortic eNOS expression and phosphorylation in Apo-E knockout mice: differing effects of rapamycin and simvastatin*. Surgery, 2004. **136**(2): p. 323-8.
119. Wang, J.Z., *A novel glucose-Pin1-eNOS-NO signaling axis links diabetes mellitus with cardiovascular diseases*. Int J Cardiol, 2018. **271**: p. 262.
120. Costantino, S., et al., *Pin1 inhibitor Juglone prevents diabetic vascular dysfunction*. Int J Cardiol, 2016. **203**: p. 702-7.
121. Liu, X., et al., *Inhibition of Pin1 alleviates myocardial fibrosis and dysfunction in STZ-induced diabetic mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **479**(1): p. 109-15.
122. Zhang, J., et al., *Proinflammatory cytokines downregulate gene expression and activity of constitutive nitric oxide synthase in porcine pulmonary artery endothelial cells*. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1997. **96**(1): p. 71-87.
123. Martens, F.M., et al., *TNF-alpha induces endothelial dysfunction in diabetic adults, an effect reversible by the PPAR-gamma agonist pioglitazone*. Eur Heart J, 2006. **27**(13): p. 1605-9.
124. Lu, Y.M., et al., *Phenylephrine-induced cardiomyocyte injury is triggered by superoxide generation through uncoupled endothelial nitric-oxide synthase and ameliorated by 3-[2-[4-(3-chloro-2-methylphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-5,6-dimethoxyindazole (DY-9836), a novel calmodulin antagonist*. Mol Pharmacol, 2009. **75**(1): p. 101-12.
125. Gibb, A.A. and B.G. Hill, *Metabolic Coordination of Physiological and Pathological Cardiac Remodeling*. Circ Res, 2018. **123**(1): p. 107-128.
126. Bugger, H. and E.D. Abel, *Mitochondria in the diabetic heart*. Cardiovasc Res, 2010. **88**(2): p. 229-40.
127. Saks, V.A., et al., *On the regulation of cellular energetics in health and disease*. Mol Cell Biochem, 1996. **160-161**: p. 195-208.
128. Stanley, W.C., et al., *Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart*. Cardiovasc Res, 1997. **34**(1): p. 25-33.
129. Cole, M.A., et al., *A high fat diet increases mitochondrial fatty acid oxidation and uncoupling to decrease efficiency in rat heart*. Basic Research in Cardiology, 2011. **106**(3): p. 447-457.
130. Scheuermann-Freestone, M., et al., *Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes*. Circulation, 2003. **107**(24): p. 3040-6.
131. Galloway, C.A. and Y. Yoon, *Mitochondrial dynamics in diabetic cardiomyopathy*. Antioxid Redox Signal, 2015. **22**(17): p. 1545-62.
132. Beer, M., et al., *Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with (31)P-SLOOP magnetic resonance spectroscopy*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(7): p. 1267-74.
133. Levelt, E., et al., *Relationship Between Left Ventricular Structural and Metabolic Remodeling in Type 2 Diabetes*. Diabetes, 2016. **65**(1): p. 44-52.
134. Dabkowski, E.R., et al., *Mitochondrial dysfunction in the type 2 diabetic heart is associated with alterations in spatially distinct mitochondrial proteomes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(2): p. H529-40.
135. Itoh, T., et al., *Cytoprotective regulation of the mitochondrial permeability transition pore is impaired in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat hearts*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **53**(6): p. 870-9.

136. Cole, M.A., et al., *On the pivotal role of PPARalpha in adaptation of the heart to hypoxia and why fat in the diet increases hypoxic injury*. *Faseb j*, 2016. **30**(8): p. 2684-97.
137. Rovira-Llopis, S., et al., *Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications*. *Redox Biol*, 2017. **11**: p. 637-645.
138. Ventura-Clapier, R., et al., *Mitochondria: a central target for sex differences in pathologies*. *Clin Sci (Lond)*, 2017. **131**(9): p. 803-822.
139. Liang, H. and W.F. Ward, *PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism*. *Adv Physiol Educ*, 2006. **30**(4): p. 145-51.
140. Boudina, S., et al., *Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity*. *Circulation*, 2005. **112**(17): p. 2686-95.
141. Duncan, J.G., et al., *Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/PGC-1alpha gene regulatory pathway*. *Circulation*, 2007. **115**(7): p. 909-17.
142. Bhatti, J.S., et al., *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017. **1863**(5): p. 1066-1077.
143. Jay, D., et al., *Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **40**(2): p. 183-92.
144. Sverdlov, A.L., et al., *High fat, high sucrose diet causes cardiac mitochondrial dysfunction due in part to oxidative post-translational modification of mitochondrial complex II*. *J Mol Cell Cardiol*, 2015. **78**: p. 165-73.
145. Broughton, D.E., Brannigan, R.E. and Omurtag, K.R. *Sex and gender: you should know the difference*. *Fertil Steril*, 2017. **107**(6): p. 1294-1295.
146. Manzo-Silberman, S., *[ST segment elevation myocardial infarction in women]*. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*, 2016. **65**(6): p. 385-389.
147. Mehta, L.S., et al., *Acute Myocardial Infarction in Women: A Scientific Statement From the American Heart Association*. *Circulation*, 2016. **133**(9): p. 916-47.
148. Anand, S.S., et al., *Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study*. *Eur Heart J*, 2008. **29**(7): p. 932-40.
149. Dantas, A.P., Fortes, Z.B. and de Carvalho, M.H. *Vascular disease in diabetic women: Why do they miss the female protection?* *Exp Diabetes Res*, 2012. **2012**: p. 570598.
150. Murphy, E., *Estrogen signaling and cardiovascular disease*. *Circ Res*, 2011. **109**(6): p. 687-96.
151. Manzo-Silberman, S., et al., *Influence of gender on delays and early mortality in ST-segment elevation myocardial infarction: Insight from the first French Metaregistry, 2005-2012 patient-level pooled analysis*. *Int J Cardiol*, 2018. **262**: p. 1-8.
152. Reichelt M.E., et al., *Sex, sex steroids, and diabetic cardiomyopathy: making the case for experimental focus*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013 **305**(6): p. H779-92.
153. Koro, C.E., et al., *Cardiovascular disease risk among subjects with impaired fasting glucose in the United States: Results from NHANES 1999–2004*, 2008. **2**(4): 239-244.
154. Levitzky, Y., et al., *Impact of impaired fasting glucose on cardiovascular disease: the Framingham Heart Study*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **51**(3): p. 264-270.
155. Bugiardini, R., et al., *Delayed Care and Mortality Among Women and Men With Myocardial Infarction*. *J Am Heart Assoc*, 2017. **6**(8).
156. Lyons, M.R., et al., *Impact of sex on the heart's metabolic and functional responses to diabetic therapies*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013. **305**(11): p. H1584-91.
157. McGill, J.B., et al., *Effect of gender on treatment outcomes in type 2 diabetes mellitus*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2013. **102**(3): p. 167-74.
158. Regensteiner, J.G., et al., *Sex Differences in the Cardiovascular Consequences of Diabetes Mellitus: A Scientific Statement From the American Heart Association*. *Circulation*, 2015. **132**(25): p. 2424-47.

159. *54(th) EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes : Berlin, Germany, 1 - 5 October 2018*. Diabetologia, 2018. **61**(Suppl 1): p. 1-620.
160. Morselli, E., et al., *Sex and Gender: Critical Variables in Pre-Clinical and Clinical Medical Research*. Cell Metab, 2016. **24**(2): p. 203-9.
161. Kautzky-Willer, et al., *Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus*. Endocr Rev, 2016. **37**(3): p. 278-316.
162. Parks, R.J. and Howlett, S.E. *Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling*. Pflugers Arch, 2013. **465**(5): p. 747-63.
163. Howlett, S.E., *Age-associated changes in excitation-contraction coupling are more prominent in ventricular myocytes from male rats than in myocytes from female rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(2): p. H659-70.
164. Kriska, A.M., et al., *Physical activity in individuals at risk for diabetes: Diabetes Prevention Program*. Med Sci Sports Exerc, 2006. **38**(5): p. 826-32.
165. Ladabaum, U., et al., *Obesity, abdominal obesity, physical activity, and caloric intake in US adults: 1988 to 2010*. Am J Med, 2014. **127**(8): p. 717-727.e12.
166. Hare-Bruun, H., et al., *Glycemic index and glycemic load in relation to changes in body weight, body fat distribution, and body composition in adult Danes*. Am J Clin Nutr, 2006. **84**(4): p. 871-9; quiz 952-3.
167. Eshak, E.S., et al., *Soft drink, 100% fruit juice, and vegetable juice intakes and risk of diabetes mellitus*. Clin Nutr, 2013. **32**(2): p. 300-8.
168. Willi, C., et al., *Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis*. Jama, 2007. **298**(22): p. 2654-64.
169. Thomas, D., *[Cardiovascular risk of smoking by gender]*. Presse Med, 2017. **46**(7-8 Pt 1): p. 681-687.
170. Power, M.L. and J. Schulkin, *Sex differences in fat storage, fat metabolism, and the health risks from obesity: possible evolutionary origins*. Br J Nutr, 2008. **99**(5): p. 931-40.
171. Stubbins, R.E., et al., *Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance*. Eur J Nutr, 2012. **51**(7): p. 861-70.
172. Davis, K.E., et al., *The sexually dimorphic role of adipose and adipocyte estrogen receptors in modulating adipose tissue expansion, inflammation, and fibrosis*. Mol Metab, 2013. **2**(3): p. 227-42.
173. Blüher, M.M.D., *Importance of estrogen receptors in adipose tissue function*. Molecular Metabolism, 2013. **2**(3): p. 130-132.
174. Bugger, H. and E.D. Abel, *Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy*. Diabetologia, 2014. **57**(4): p. 660-71.
175. Listenberger, L.L., et al., *Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14890-5.
176. Blenck, C.L., et al., *The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease*. Circ Res, 2016. **118**(8): p. 1294-312.
177. Kjeldsen, S.E., *Hypertension and cardiovascular risk: General aspects*. Pharmacological Research, 2017. **129**: p. 95-99.
178. Santos, M. and A.M. Shah, *Alterations in cardiac structure and function in hypertension*. Curr Hypertens Rep, 2014. **16**(5): p. 428.
179. Krumholz, H.M., et al., *Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension*. Am J Cardiol, 1993. **72**(3): p. 310-3.
180. Ryden, L., et al., *Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD)*. Eur Heart J, 2007. **28**(1): p. 88-136.
181. Flanagan, D.E., et al., *Gender differences in the insulin-like growth factor axis response to a glucose load*. Acta Physiol (Oxf), 2006. **187**(3): p. 371-8.

182. Levitzky, Y.S., et al., *Impact of impaired fasting glucose on cardiovascular disease: the Framingham Heart Study*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(3): p. 264-70.
183. Faerch, K., et al., *GLP-1 Response to Oral Glucose Is Reduced in Prediabetes, Screen-Detected Type 2 Diabetes, and Obesity and Influenced by Sex: The ADDITION-PRO Study*. Diabetes, 2015. **64**(7): p. 2513-25.
184. Ventura-Clapier, R., et al., *Sex in basic research: concepts in the cardiovascular field*. Cardiovasc Res, 2017. **113**(7): p. 711-724.
185. Cid, M.C., et al., *Estrogens and the vascular endothelium*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **966**: p. 143-57.
186. Yang, Y., et al., *Postischemic application of estrogen ameliorates myocardial damage in an in vivo mouse model*. J Surg Res, 2018. **231**: p. 366-372.
187. Lagranha, C.J., et al., *Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females*. Circ Res, 2010. **106**(11): p. 1681-91.
188. Donahue, R., *Sex differences in endothelial function markers before conversion to pre-diabetes: does the clock start ticking earlier among women? The Western New-York experience*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2011. **21**: p. 504-511.
189. Donahue, R.P., et al., *Impaired fasting glucose and recurrent cardiovascular disease among survivors of a first acute myocardial infarction: evidence of a sex difference? The Western New York experience*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2011. **21**(7): p. 504-11.
190. Steinberg, H.O., et al., *Type II diabetes abrogates sex differences in endothelial function in premenopausal women*. Circulation, 2000. **101**(17): p. 2040-2046.
191. Wannamethee, S.G., et al., *Do women exhibit greater differences in established and novel risk factors between diabetes and non-diabetes than men? The British Regional Heart Study and British Women's Heart Health Study*. Diabetologia, 2012. **55**(1): p. 80-7.
192. Hunter, I., et al., *Cardiovascular function in male and female JCR:LA-cp rats: effect of high-fat/high-sucrose diet*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017. **312**(4): p. H742-h751.
193. Desrois, M., et al., *Gender differences in hypertrophy, insulin resistance and ischemic injury in the aging type 2 diabetic rat heart*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(2): p. 547-55.
194. Goel, A., et al., *Sexual dimorphism in rabbit aortic endothelial function under acute hyperglycemic conditions and gender-specific responses to acute 17beta-estradiol*. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, 2008. **294**(6): p. H2411-2420.
195. Murphy, E., et al., *Sex Differences in Metabolic Cardiomyopathy*. Cardiovasc Res, 2017.
196. Toedebusch, R., et al., *Diabetic Cardiomyopathy: Impact of Biological Sex on Disease Development and Molecular Signatures*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 453.
197. Kiencke, S., et al., *Pre-clinical diabetic cardiomyopathy: prevalence, screening, and outcome*. Eur J Heart Fail, 2010. **12**(9): p. 951-7.
198. Dworatzek, E., et al., *Effects of aging on cardiac extracellular matrix in men and women*. Proteomics Clin Appl, 2016. **10**(1): p. 84-91.
199. Rosenkranz-Weiss, P., et al., *Gender-specific differences in expression of mRNAs for functional and structural proteins in rat ventricular myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 1994. **26**(2): p. 261-70.
200. Li, Z., et al., *Gender differences in fibrosis remodeling in patients with long-standing persistent atrial fibrillation*. Oncotarget, 2017. **8**(32): p. 53714-53729.
201. Schuster, I., et al., *Cardiomyocyte-specific overexpression of oestrogen receptor beta improves survival and cardiac function after myocardial infarction in female and male mice*. Clin Sci (Lond), 2016. **130**(5): p. 365-76.
202. Skavdahl, M., et al., *Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(2): p. H469-76.

203. Apaijai, N., et al., *Estrogen deprivation aggravates cardiac hypertrophy in nonobese Type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats*. Biosci Rep, 2017. **37**(5).
204. Djouadi, F., et al., *A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator- activated receptor alpha- deficient mice*. J Clin Invest, 1998. **102**(6): p. 1083-91.
205. Madrazo, J.A. and D.P. Kelly, *The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **44**(6): p. 968-75.
206. Bayeva, M., et al., *Taking diabetes to heart--deregulation of myocardial lipid metabolism in diabetic cardiomyopathy*. J Am Heart Assoc, 2013. **2**(6): p. e000433.
207. Gupte, A.A., et al., *Estrogen: an emerging regulator of insulin action and mitochondrial function*. J Diabetes Res, 2015. **2015**: p. 916585.
208. Banting, F.G., et al., *Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus*. Can Med Assoc J, 1922. **12**(3): p. 141-6.
209. Thrasher, J., *Pharmacologic Management of Type 2 Diabetes Mellitus: Available Therapies*. Am J Med, 2017. **130**(6s): p. S4-s17.
210. Verma, S. and M.E. Hussain, *Obesity and diabetes: An update*. Diabetes Metab Syndr, 2017. **11**(1): p. 73-79.
211. Stull, A.J., *Lifestyle Approaches and Glucose Intolerance*. Am J Lifestyle Med, 2016. **10**(6): p. 406-416.
212. Einarson, T.R., et al., *Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017*. Cardiovasc Diabetol, 2018. **17**(1): p. 83.
213. Aline Roth, P.W. and F.R. Jornayvaz, *[Cardiovascular safety of antidiabetics]*. Rev Med Suisse, 2016. **12**(521): p. 1084, 1086-8.
214. Zinman, B., et al., *Rationale, design, and baseline characteristics of a randomized, placebo-controlled cardiovascular outcome trial of empagliflozin (EMPA-REG OUTCOME)*. Cardiovasc Diabetol, 2014. **13**: p. 102.
215. Cefalu, W.T., et al., *Cardiovascular Outcomes Trials in Type 2 Diabetes: Where Do We Go From Here? Reflections From a Diabetes Care Editors' Expert Forum*. Diabetes Care, 2018. **41**(1): p. 14-31.
216. McKennon, S.A., *Non-Pharmaceutical Intervention Options For Type 2 Diabetes: Diets And Dietary Supplements (Botanicals, Antioxidants, and Minerals)*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000, MDText.com, Inc.: South Dartmouth (MA).
217. Alwhaibi, M. and U. Sambamoorthi, *Sex Differences in the Use of Complementary and Alternative Medicine among Adults with Multiple Chronic Conditions*. Evid Based Complement Alternat Med, 2016. **2016**: p. 2067095.
218. Widmer, R.J., et al., *The Mediterranean diet, its components, and cardiovascular disease*. Am J Med, 2015. **128**(3): p. 229-38.
219. Guasch-Ferre, M., et al., *Dietary Polyphenols, Mediterranean Diet, Prediabetes, and Type 2 Diabetes: A Narrative Review of the Evidence*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 6723931.
220. Rasines-Perea, Z. and P.L. Teissedre, *Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes*. Molecules, 2017. **22**(1).
221. Noad, R.L., et al., *Beneficial effect of a polyphenol-rich diet on cardiovascular risk: a randomised control trial*. Heart, 2016. **102**(17): p. 1371-9.
222. *Les différentes classes thérapeutiques utilisées dans le traitement du diabète de type 2*. <https://www.federationdesdiabetiques.org/information/traitement-diabete/medicaments-type-2>.
223. Renaud, S. and M. de Lorgeril, *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. Lancet, 1992. **339**(8808): p. 1523-6.
224. Langcake, P., et al., *Identification of pterostilbene as a phytoalexin from Vitis vinifera leaves*. Phytochemistry, 1979. **18**(6): p. 1025-1027.



225. Frankel, E.N., et al., *Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol*. *Lancet*, 1993. **341**(8852): p. 1103-4.
226. Weiskirchen, S. and R. Weiskirchen, *Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy?* *Adv Nutr*, 2016. **7**(4): p. 706-18.
227. Latruffe, N., *Le resvératrol de la vigne; de nouvelles pistes de valorisation*. *Biofutur*, 2006.
228. Vaithinathan, S., et al., *Resveratrol Emerges As a Miracle Cardioprotective Phytochemical Polyphenol and Nutraceutical*. 2013.
229. Walle, T., et al., *High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans*. *Drug Metab Dispos*, 2004. **32**(12): p. 1377-82.
230. Walle, T., *Bioavailability of resveratrol*. *Ann N Y Acad Sci*, 2011. **1215**: p. 9-15.
231. Vitrac, X., et al., *Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration*. *Life Sci*, 2003. **72**(20): p. 2219-33.
232. Amiot, M.J., et al., *Optimization of trans-Resveratrol bioavailability for human therapy*. *Biochimie*, 2013. **95**(6): p. 1233-8.
233. Amri, A., et al., *Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations?* *J Control Release*, 2012. **158**(2): p. 182-93.
234. de Vries, K., M. Strydom, and V. Steenkamp, *Bioavailability of resveratrol: Possibilities for enhancement*. *Journal of Herbal Medicine*, 2018. **11**: p. 71-77.
235. Britton, R.G., et al., *Direct molecular targets of resveratrol: identifying key interactions to unlock complex mechanisms*. *Ann N Y Acad Sci*, 2015. **1348**(1): p. 124-33.
236. Kim, H.S., et al., *SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(1): p. 41-52.
237. D'Onofrio, N., et al., *SIRT1 and SIRT6 Signaling Pathways in Cardiovascular Disease Protection*. *Antioxid Redox Signal*, 2018. **28**(8): p. 711-732.
238. Bordone, L., et al., *Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells*. *PLoS Biol*, 2006. **4**(2): p. e31.
239. Lee, J.H., et al., *Overexpression of SIRT1 protects pancreatic beta-cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB signaling pathway*. *Diabetes*, 2009. **58**(2): p. 344-51.
240. Picard, F., et al., *Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma*. *Nature*, 2004. **429**(6993): p. 771-6.
241. Cheng, H.L., et al., *Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(19): p. 10794-9.
242. Ota, H., et al., *Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **43**(5): p. 571-579.
243. Hung, L.M., et al., *Resveratrol protects myocardial ischemia-reperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent mechanisms*. *Free Radic Biol Med*, 2004. **36**(6): p. 774-81.
244. Gillum, M.P., et al., *Sirt1 regulates adipose tissue inflammation*. *Diabetes*, 2011. **60**(12): p. 3235-45.
245. Planavila, A., et al., *Sirt1 acts in association with PPARalpha to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation*. *Cardiovasc Res*, 2011. **90**(2): p. 276-84.
246. Yoshizaki, T., et al., *SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(5): p. 1363-74.
247. Matsushima, S. and J. Sadoshima, *The role of sirtuins in cardiac disease*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015. **309**(9): p. H1375-89.
248. Hsu, C.P., et al., *Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion*. *Circulation*, 2010. **122**(21): p. 2170-82.
249. Bugger, H., C.N. Witt, and C. Bode, *Mitochondrial sirtuins in the heart*. *Heart Fail Rev*, 2016. **21**(5): p. 519-28.

250. Ahn, B.H., et al., *A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(38): p. 14447-52.
251. Koentges, C., et al., *SIRT3 in Cardiac Physiology and Disease*. Front Cardiovasc Med, 2016. **3**: p. 38.
252. Chen, T., et al., *Activation of SIRT3 by resveratrol ameliorates cardiac fibrosis and improves cardiac function via the TGF-beta/Smad3 pathway*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015. **308**(5): p. H424-34.
253. Lu, Y., et al., *SIRT3 in cardiovascular diseases: Emerging roles and therapeutic implications*. Int J Cardiol, 2016. **220**: p. 700-5.
254. Koentges, C., et al., *SIRT3 deficiency impairs mitochondrial and contractile function in the heart*. Basic Res Cardiol, 2015. **110**(4): p. 36.
255. Zeng, H., et al., *High-fat diet induces cardiac remodelling and dysfunction: assessment of the role played by SIRT3 loss*. J Cell Mol Med, 2015. **19**(8): p. 1847-56.
256. Qiu, X., et al., *Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation*. Cell Metab, 2010. **12**(6): p. 662-7.
257. Sundaresan, N.R., et al., *Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(9): p. 2758-71.
258. Tao, R., et al., *Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress*. Mol Cell, 2010. **40**(6): p. 893-904.
259. Parodi-Rullan, R.M., et al., *High Sensitivity of SIRT3 Deficient Hearts to Ischemia-Reperfusion Is Associated with Mitochondrial Abnormalities*. Front Pharmacol, 2017. **8**: p. 275.
260. Lin, J.F., et al., *Resveratrol reduces infarct size and improves ventricular function after myocardial ischemia in rats*. Life Sci, 2008. **83**(9-10): p. 313-7.
261. Meng, Z., et al., *Resveratrol attenuated estrogen-deficient-induced cardiac dysfunction: role of AMPK, SIRT1, and mitochondrial function*. Am J Transl Res, 2016. **8**(6): p. 2641-9.
262. Csiszar, A., et al., *Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(1): p. H13-20.
263. Bo, S., et al., *Six months of resveratrol supplementation has no measurable effect in type 2 diabetic patients. A randomized, double blind, placebo-controlled trial*. Pharmacol Res, 2016. **111**: p. 896-905.
264. Ding, S., et al., *Resveratrol reduces the inflammatory response in adipose tissue and improves adipose insulin signaling in high-fat diet-fed mice*. PeerJ, 2018. **6**: p. e5173.
265. Rocha, K.K., et al., *Resveratrol toxicity: effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets*. Food Chem Toxicol, 2009. **47**(6): p. 1362-7.
266. Dudley, J.I., et al., *Does White Wine Qualify for French Paradox? Comparison of the Cardioprotective Effects of Red and White Wines and Their Constituents: Resveratrol, Tyrosol, and Hydroxytyrosol (Retraction of vol 56, pg 9362, 2008)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(10): p. 2767-2767.
267. Hu, Y., et al., *The controversial links among calorie restriction, SIRT1, and resveratrol*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(2): p. 250-6.
268. Pacholec, M., et al., *SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 8340-51.
269. Beher, D., et al., *Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity*. Chem Biol Drug Des, 2009. **74**(6): p. 619-24.
270. Li, J.Y., et al., *Resveratrol rescues hyperglycemia-induced endothelial dysfunction via activation of Akt*. Acta Pharmacol Sin, 2017. **38**(2): p. 182-191.
271. Frombaum, M., et al., *Piceatannol is more effective than resveratrol in restoring endothelial cell dimethylarginine dimethylaminohydrolase expression and activity after high-glucose oxidative stress*. Free Radic Res, 2011. **45**(3): p. 293-302.

272. Sun, C., et al., *SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B*. Cell Metab, 2007. **6**(4): p. 307-19.
273. Um, J.H., et al., *AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol*. Diabetes, 2010. **59**(3): p. 554-63.
274. Dao, T.M., et al., *Resveratrol increases glucose induced GLP-1 secretion in mice: a mechanism which contributes to the glycemic control*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20700.
275. Rehman, K., et al., *Resveratrol regulates hyperglycemia-induced modulations in experimental diabetic animal model*. Biomed Pharmacother, 2018. **102**: p. 140-146.
276. Lee, Y.E., et al., *Chronic resveratrol treatment protects pancreatic islets against oxidative stress in db/db mice*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50412.
277. Yang, L., et al., *Resveratrol attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through up-regulation of vascular endothelial growth factor B*. Free Radic Biol Med, 2016. **101**: p. 1-9.
278. Gao, Y., et al., *Resveratrol Ameliorates Diabetes-Induced Cardiac Dysfunction Through AT1R-ERK/p38 MAPK Signaling Pathway*. Cardiovasc Toxicol, 2016. **16**(2): p. 130-7.
279. Mohammadshahi, et al., *Chronic resveratrol administration improves diabetic cardiomyopathy in part by reducing oxidative stress*. Cardiol J, 2014. **21**(1): p. 39-46.
280. Sulaiman, M., et al., *Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(3): p. H833-43.
281. Ma, S., et al., *SIRT1 Activation by Resveratrol Alleviates Cardiac Dysfunction via Mitochondrial Regulation in Diabetic Cardiomyopathy Mice*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 4602715.
282. Yan, R., et al., *Chronic resveratrol treatment improves cardiac function in a rat model of diabetic cardiomyopathy via attenuation of mitochondrial injury and myocardial apoptosis*. Int J Clin Exp Med, 2016. **9**(11): p. 21156-21167.
283. Rimbaud, S., et al., *Resveratrol improves survival, hemodynamics and energetics in a rat model of hypertension leading to heart failure*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26391.
284. Xia, N., et al., *Resveratrol and endothelial nitric oxide*. Molecules, 2014. **19**(10): p. 16102-21.
285. Ungvari, Z., et al., *Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(5): p. H2417-24.
286. Li, H. and U. Forstermann, *Pharmacological prevention of eNOS uncoupling*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(22): p. 3595-606.
287. Cao, Z. and Y. Li, *Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury*. Eur J Pharmacol, 2004. **489**(1-2): p. 39-48.
288. Li, Y., et al., *Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress*. Pharmacol Res, 2006. **53**(1): p. 6-15.
289. Sung, M.M., et al., *Resveratrol treatment of mice with pressure-overload-induced heart failure improves diastolic function and cardiac energy metabolism*. Circ Heart Fail, 2015. **8**(1): p. 128-37.
290. Kong, W., et al., *Resveratrol supplementation restores high-fat diet-induced insulin secretion dysfunction by increasing mitochondrial function in islet*. Exp Biol Med (Maywood), 2015. **240**(2): p. 220-9.
291. Wong, Y.T., et al., *Elevation of oxidative-damage biomarkers during aging in F2 hybrid mice: protection by chronic oral intake of resveratrol*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(6): p. 799-809.
292. Forstermann, U., *Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease*. Pflugers Arch, 2010. **459**(6): p. 923-39.

293. Xia, N., et al., *Resveratrol reverses endothelial nitric-oxide synthase uncoupling in apolipoprotein E knockout mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **335**(1): p. 149-54.
294. Li, H. and U. Forstermann, *Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(2): p. 161-7.
295. Dolinsky, V.W., et al., *Resveratrol prevents hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats and mice*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(10): p. 1723-33.
296. Zhang, H., et al., *Resveratrol improves endothelial function: role of TNF{alpha} and vascular oxidative stress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(8): p. 1164-71.
297. Zou, J.G., et al., *Effect of red wine and wine polyphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits*. Int J Mol Med, 2003. **11**(3): p. 317-20.
298. Silan, C., *The effects of chronic resveratrol treatment on vascular responsiveness of streptozotocin-induced diabetic rats*. Biol Pharm Bull, 2008. **31**(5): p. 897-902.
299. Xu, Q., et al., *Resveratrol prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **388**(2): p. 389-94.
300. Huang, J.P., et al., *Resveratrol Mitigates High-Fat Diet-Induced Vascular Dysfunction by Activating the Akt/eNOS/NO and Sirt1/ER Pathway*. J Cardiovasc Pharmacol, 2018. **72**(5): p. 231-241.
301. Bhatt, S.R., et al., *Resveratrol prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling and attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats*. Eur J Pharmacol, 2011. **667**(1-3): p. 258-64.
302. Ding, M., et al., *SIRT1 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via activating eNOS in diabetic rats*. Cardiovasc Diabetol, 2015. **14**: p. 143.
303. Cheang, W.S., et al., *Resveratrol ameliorates endothelial dysfunction in diabetic and obese mice through sirtuin 1 and peroxisome proliferator-activated receptor delta*. Pharmacol Res, 2019. **139**: p. 384-394.
304. Fang, W.J., et al., *Resveratrol alleviates diabetic cardiomyopathy in rats by improving mitochondrial function through PGC-1alpha deacetylation*. Acta Pharmacol Sin, 2018. **39**(1): p. 59-73.
305. Ardic, G., et al., *Cardioprotective Mechanism of Resveratrol: Mitochondrial Permeability Transition Pore*. FASEB, 2013. **27**(1).
306. Desquiret-Dumas, V., et al., *Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells*. J Biol Chem, 2013. **288**(51): p. 36662-75.
307. Addabbo, F., et al., *The Krebs cycle and mitochondrial mass are early victims of endothelial dysfunction: proteomic approach*. Am J Pathol, 2009. **174**(1): p. 34-43.
308. Kulkarni, S.S. and C. Canto, *The molecular targets of resveratrol*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(6): p. 1114-23.
309. Sharma, R., et al., *Resveratrol regulates body weight in healthy and ovariectomized rats*. Nutr Metab (Lond), 2017. **14**: p. 30.
310. Khalil, R.A., *Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension*. Hypertension, 2005. **46**(2): p. 249-54.
311. Mizutani, K., et al., *Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2000. **46**(2): p. 78-83.
312. Jiang, H., et al., *Changes in cardiovascular function based on adrenalin and norepinephrine metabolism in ovariectomized rats*. Exp Gerontol, 2017. **91**: p. 15-24.
313. Bloch, F., et al., *The Nuclear Induction Experiment*. Physical Review, 1946. **70**(7-8): p. 474-485.
314. Purcell, E.M., et al., *Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid*. Physical Review, 1946. **69**(1-2): p. 37-38.

315. Nagel, E., *Cardiovascular Magnetic Resonance in Diabetic Patients: The Method of Choice?* *Circ Cardiovasc Imaging*, 2016. **9**(4): p. e004699.
316. Philouze, C., et al., *Dobutamine Stress Echocardiography Unmasks Early Left Ventricular Dysfunction in Asymptomatic Patients with Uncomplicated Type 2 Diabetes: A Comprehensive Two-Dimensional Speckle-Tracking Imaging Study.* *J Am Soc Echocardiogr*, 2018. **31**(5): p. 587-597.
317. Shah, R.V., et al., *Role of cardiac MRI in diabetes.* *Curr Cardiol Rep*, 2014. **16**(2): p. 449.
318. Schelbert, E.B., et al., *Prevalence and prognosis of unrecognized myocardial infarction determined by cardiac magnetic resonance in older adults.* *Jama*, 2012. **308**(9): p. 890-6.
319. Mewton, N., et al., *Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance.* *J Am Coll Cardiol*, 2011. **57**(8): p. 891-903.
320. Shah, D.J., et al., *Evaluation of ischemic heart disease.* *Heart Fail Clin*, 2009. **5**(3): p. 315-32.
321. Haffner, S.M., et al., *Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction.* *N Engl J Med*, 1998. **339**(4): p. 229-34.
322. Liu, X., et al., *Left ventricular subclinical myocardial dysfunction in uncomplicated type 2 diabetes mellitus is associated with impaired myocardial perfusion: a contrast-enhanced cardiovascular magnetic resonance study.* *Cardiovasc Diabetol*, 2018. **17**(1): p. 139.
323. Levelt, E., et al., *Adenosine stress CMR T1-mapping detects early microvascular dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus without obstructive coronary artery disease.* *J Cardiovasc Magn Reson*, 2017. **19**(1): p. 81.
324. Iltis, I., et al., *Defective myocardial blood flow and altered function of the left ventricle in type 2 diabetic rats: a noninvasive in vivo study using perfusion and cine magnetic resonance imaging.* *Investigative Radiology*, 2005. **40**(1): p. 19-26.
325. Iltis, I., et al., *Noninvasive characterization of myocardial blood flow in diabetic, hypertensive, and diabetic-hypertensive rats using spin-labeling MRI.* *Microcirculation*, 2005. **12**(8): p. 607-14.
326. Mather, A.N., et al., *Relationship of dysglycemia to acute myocardial infarct size and cardiovascular outcome as determined by cardiovascular magnetic resonance.* *J Cardiovasc Magn Reson*, 2010. **12**: p. 61.
327. Holloway, C., et al., *MR spectroscopy in heart failure.* *Front Biosci (Schol Ed)*, 2011. **3**: p. 331-40.
328. Anzawa, R., et al., *Intracellular sodium increase and susceptibility to ischaemia in hearts from type 2 diabetic db/db mice.* *Diabetologia*, 2006. **49**(3): p. 598-606.
329. Velagaleti, R.S., et al., *Relations of insulin resistance and glycemic abnormalities to cardiovascular magnetic resonance measures of cardiac structure and function: the Framingham Heart Study.* *Circ Cardiovasc Imaging*, 2010. **3**(3): p. 257-63.
330. Heckbert, S.R., et al., *Traditional cardiovascular risk factors in relation to left ventricular mass, volume, and systolic function by cardiac magnetic resonance imaging: the Multiethnic Study of Atherosclerosis.* *J Am Coll Cardiol*, 2006. **48**(11): p. 2285-92.
331. Widya, R.L., et al., *Right ventricular involvement in diabetic cardiomyopathy.* *Diabetes Care*, 2013. **36**(2): p. 457-62.
332. Qian, C., et al., *Diastolic dysfunction in spontaneous type 2 diabetes rhesus monkeys: a study using echocardiography and magnetic resonance imaging.* *BMC Cardiovasc Disord*, 2015. **15**: p. 59.
333. Abdesselam, I., et al., *Time course of cardiometabolic alterations in a high fat high sucrose diet mice model and improvement after GLP-1 analog treatment using multimodal cardiovascular magnetic resonance.* *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance: Official Journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance*, 2015. **17**: p. 95.
334. Ban, C.R. and S.M. Twigg, *Fibrosis in diabetes complications: pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers.* *Vasc Health Risk Manag*, 2008. **4**(3): p. 575-96.

335. Ellims, A.H., et al., *A comprehensive evaluation of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy with cardiac magnetic resonance imaging: linking genotype with fibrotic phenotype*. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2014. **15**(10): p. 1108-16.
336. Bun, S.S., et al., *Value of in vivo T2 measurement for myocardial fibrosis assessment in diabetic mice at 11.75 T*. Invest Radiol, 2012. **47**(5): p. 319-23.
337. Shang, Y., et al., *Assessment of Diabetic Cardiomyopathy by Cardiovascular Magnetic Resonance T1 Mapping: Correlation with Left-Ventricular Diastolic Dysfunction and Diabetic Duration*. J Diabetes Res, 2017. **2017**: p. 9584278.
338. Jellis, C., et al., *Association of imaging markers of myocardial fibrosis with metabolic and functional disturbances in early diabetic cardiomyopathy*. Circ Cardiovasc Imaging, 2011. **4**(6): p. 693-702.
339. Gaborit, B., et al., *Role of Epicardial Adipose Tissue in Health and Disease: A Matter of Fat?* Compr Physiol, 2017. **7**(3): p. 1051-1082.
340. Ansaldo, A.M., et al., *Epicardial adipose tissue and cardiovascular diseases*. Int J Cardiol, 2018.
341. De Larochelière, E., et al., *Visceral/epicardial adiposity in nonobese and apparently healthy young adults: association with the cardiometabolic profile*. Atherosclerosis, 2014. **234**(1): p. 23-9.
342. Gaborit, B., et al., *Epicardial fat volume is associated with coronary microvascular response in healthy subjects: a pilot study*. Obesity (Silver Spring), 2012. **20**(6): p. 1200-5.
343. Gaborit, B., et al., *Assessment of epicardial fat volume and myocardial triglyceride content in severely obese subjects: relationship to metabolic profile, cardiac function and visceral fat*. International Journal of Obesity (2005), 2012. **36**(3): p. 422-430.
344. Gaborit, B., et al., *Effects of bariatric surgery on cardiac ectopic fat: lesser decrease in epicardial fat compared to visceral fat loss and no change in myocardial triglyceride content*. J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(15): p. 1381-9.
345. Hong, B.S., et al., *Ectopic Fat Deposition on Insulin Sensitivity: Correlation of Hepatocellular Lipid Content and M Value*. J Diabetes Res, 2016. **2016**: p. 3684831.
346. Al-Mrabeh, A., et al., *Quantification of intrapancreatic fat in type 2 diabetes by MRI*. PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0174660.
347. Rijzewijk, L.J., et al., *Effects of hepatic triglyceride content on myocardial metabolism in type 2 diabetes*. J Am Coll Cardiol, 2010. **56**(3): p. 225-33.
348. Bidar, A.W., et al., *In vivo imaging of lipid storage and regression in diet-induced obesity during nutrition manipulation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **303**(11): p. E1287-95.
349. Abdesselam, I., et al., *Time Course of Change in Ectopic Fat Stores After Bariatric Surgery*. J Am Coll Cardiol, 2016. **67**(1): p. 117-9.
350. Gabr, R.E., et al., *Cardiac work is related to creatine kinase energy supply in human heart failure: a cardiovascular magnetic resonance spectroscopy study*. J Cardiovasc Magn Reson, 2018. **20**(1): p. 81.
351. Hamman, B.L., et al., *Inhibition of the creatine kinase reaction decreases the contractile reserve of isolated rat hearts*. Am J Physiol, 1995. **269**(3 Pt 2): p. H1030-6.
352. Neubauer, S., et al., *<sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy in dilated cardiomyopathy and coronary artery disease. Altered cardiac high-energy phosphate metabolism in heart failure*. Circulation, 1992. **86**(6): p. 1810-8.
353. Brooks, W.M., et al., *Relation between the phosphocreatine to ATP ratio determined by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy and left ventricular function in underperfused guinea-pig heart*. J Mol Cell Cardiol, 1986. **18**(2): p. 149-55.
354. Wong, S.K., et al., *Animal models of metabolic syndrome: a review*. Nutrition & Metabolism, 2016. **13**: p. 65.
355. Panchal, S.K. and L. Brown, *Rodent models for metabolic syndrome research*. Journal of Biomedicine & Biotechnology, 2011. **2011**: p. 351982.

356. Poudyal, H., et al., *Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats*. The Journal of Nutrition, 2010. **140**(5): p. 946-953.
357. Alam, M.A., et al., *Chronic l-arginine treatment improves metabolic, cardiovascular and liver complications in diet-induced obesity in rats*. Food & Function, 2013. **4**(1): p. 83-91.
358. Iyer, A. and L. Brown, *Fermented wheat germ extract (avemar) in the treatment of cardiac remodeling and metabolic symptoms in rats*. Evid Based Complement Alternat Med, 2011. **2011**: p. 508957.
359. Panchal, S.K., et al., *High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats*. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2011. **57**(5): p. 611-624.
360. Poudyal, H., et al., *Chronic high-carbohydrate, high-fat feeding in rats induces reversible metabolic, cardiovascular, and liver changes*. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 2012. **302**(12): p. E1472-1482.
361. Goto, Y., et al., *Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding*. Tohoku J Exp Med, 1976. **119**(1): p. 85-90.
362. Portha, B., *[Transmitted beta-cell dysfunction as a cause for type 2-diabetes]*. Med Sci (Paris), 2003. **19**(8-9): p. 847-53.
363. Portha, B., et al., *The GK rat: a prototype for the study of non-overweight type 2 diabetes*. Methods Mol Biol, 2012. **933**: p. 125-59.
364. Akash, M.S., et al., *Goto-Kakizaki rats: its suitability as non-obese diabetic animal model for spontaneous type 2 diabetes mellitus*. Curr Diabetes Rev, 2013. **9**(5): p. 387-96.
365. Gauguier, D., et al., *Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat*. Nat Genet, 1996. **12**(1): p. 38-43.
366. Portha, B., *Programmed disorders of beta-cell development and function as one cause for type 2 diabetes? The GK rat paradigm*. Diabetes Metab Res Rev, 2005. **21**(6): p. 495-504.
367. Kober, F., et al., *Cine-MRI assessment of cardiac function in mice anesthetized with ketamine/xylazine and isoflurane*. MAGMA 2004. **17**(3-6): p. 157-161.
368. Kober, F., et al., *High-resolution myocardial perfusion mapping in small animals in vivo by spin-labeling gradient-echo imaging*. Magnetic Resonance in Medicine, 2004. **51**(1): p. 62-67.
369. Jorstig, S., et al., *Right ventricular ejection fraction measurements using two-dimensional transthoracic echocardiography by applying an ellipsoid model*. Cardiovasc Ultrasound, 2017. **15**(1): p. 4.
370. Oliver, M.F., *Fatty acids and the risk of death during acute myocardial ischaemia*. Clin Sci (Lond), 2015. **128**(6): p. 349-55.
371. Kost, G.J., *pH standardization for phosphorus-31 magnetic resonance heart spectroscopy at different temperatures*. Magn Reson Med, 1990. **14**(3): p. 496-506.
372. Czernska, M., et al., *Today's oxidative stress markers*. Med Pr, 2015. **66**(3): p. 393-405.
373. Lazzarino, G., et al., *A method for preparing freeze-clamped tissue samples for metabolite analyses*. Anal Biochem, 1989. **181**(2): p. 239-41.
374. Fourny N, et al., *Impaired energy metabolism, cardiac and endothelial function in the female type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat heart following ischemia-reperfusion injury*. Diabetologia, 2016. **59** (Supplement 1).
375. Anagnostis, P., et al., *Cardiovascular risk in women with type 2 diabetes mellitus and prediabetes: is it indeed higher than men?* Eur J Endocrinol, 2014. **171**(6): p. R245-55.
376. Chen, L., et al., *Effect of lifestyle intervention in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis*. Metabolism, 2015. **64**(2): p. 338-47.
377. Abdurrachim, *Intermittent fasting delays the progression of cardiomyopathy in a pre-diabetic obese rat model* Diabetologia, 2018.
378. Amengual-Cladera, E., et al., *Sex differences in the effect of high-fat diet feeding on rat white adipose tissue mitochondrial function and insulin sensitivity*. Metabolism, 2012. **61**(8): p. 1108-17.

379. Kovacevic, S., et al., *Fructose-enriched diet induces inflammation and reduces antioxidative defense in visceral adipose tissue of young female rats*. Eur J Nutr, 2017. **56**(1): p. 151-160.
380. Chen, D., et al., *A high-fat diet impairs mitochondrial biogenesis, mitochondrial dynamics, and the respiratory chain complex in rat myocardial tissues*. J Cell Biochem, 2018. **119**(11): p. 9602.
381. Joshi, M.S., et al., *Role of mitochondrial dysfunction in hyperglycaemia-induced coronary microvascular dysfunction: Protective role of resveratrol*. Diab Vasc Dis Res, 2015. **12**(3): p. 208-16.
382. Xia, N., et al., *Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(12): p. 1633-1646.
383. Liu, H., et al., *Gender differences in rat plasma proteome in response to high-fat diet*. Proteomics, 2012. **12**(2): p. 269-83.
384. Marineli, R.D.S., et al., *Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (Salvia hispanica L.) in diet-induced obese rats*. Food Res Int, 2015. **76**(Pt 3): p. 666-674.
385. Rodrigues, L., et al., *Dietary restriction improves systemic and muscular oxidative stress in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats*. J Physiol Biochem, 2011. **67**(4): p. 613-9.
386. Lee, Y.H., et al., *Association of non-alcoholic steatohepatitis with subclinical myocardial dysfunction in non-cirrhotic patients*. J Hepatol, 2017.
387. Glien, M., et al. *Characterization of female ZDF rats as an animal model of insulin resistance and the insulin-sensitizing properties of various PPAR-agonists*. ADA, 2004.
388. Kim, J.H., et al., *Type 2 diabetes mouse model TallyHo carries an obesity gene on chromosome 6 that exaggerates dietary obesity*. Physiol Genomics, 2005. **22**(2): p. 171-81.
389. Ueda, H., et al., *The NSY mouse: a new animal model of spontaneous NIDDM with moderate obesity*. Diabetologia, 1995. **38**(5): p. 503-8.
390. Kuwabara, W.M.T., et al., *Comparison of Goto-Kakizaki rats and high fat diet-induced obese rats: Are they reliable models to study Type 2 Diabetes mellitus?* PLoS One, 2017. **12**(12): p. e0189622.
391. Sidell, R.J., et al., *Thiazolidinedione treatment normalizes insulin resistance and ischemic injury in the Zucker Fatty rat heart*. Diabetes, 2002. **51**(4): p. 1110-7.
392. Li, L., et al., *Tetrahydrobiopterin deficiency and nitric oxide synthase uncoupling contribute to atherosclerosis induced by disturbed flow*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(7): p. 1547-54.
393. Le Page, L.M., et al., *Increasing Pyruvate Dehydrogenase Flux as a Treatment for Diabetic Cardiomyopathy: A Combined <sup>13</sup>C Hyperpolarized Magnetic Resonance and Echocardiography Study*. Diabetes, 2015. **64**(8): p. 2735-43.



## ANNEXES

### Liste des anticorps utilisés

- caspase-3 rabbit mAb, ref 8G10, Cell signaling Technology
- Purified Mouse anti-eNOS/NOS type III, ref 610297 BD Biosciences
- Purified Mouse anti-eNOS (PS1177), ref 612393 BD Biosciences
- Purified Mouse anti-iNOS/NOS Type II, ref 610328, BD Biosciences
- Akt antibody, Rabbit polyclonal, ref 9272, Cell Signaling Technology
- Phospho-Akt (Ser473), Rabbit polyclonal, ref 9271, Cell Signaling Technology
- SIRT1 (D1D7), Rabbit mAb, ref 9475, Cell Signaling Technology
- SIRT3 (C73E3), Rabbit mAb, ref 2627, Cell Signaling Technology
- Anticorps Glutathione (D8), ref sc-52399, Santa Cruz Biotechnology
- $\beta$ Actine (C4), Mouse monoclonal, ref sc-47778, Santa Cruz Biotechnology
- Anticorps GAPDH (D-6), ref sc-, Santa Cruz Biotechnology

### Tampons de lyse pour l'extraction des protéines

- Tampon de lyse (caspase-3) : Pour 10 mL = 1 mL de NaCl + 0,5 mL de Tris-HCl + 100  $\mu$ L de Triton x100 dilué au dixième + 5  $\mu$ L de DTT + 50  $\mu$ L de phosphatase inhibitor cocktail 2 (P5726) + 50  $\mu$ L de protéase inhibitor cocktail (P8340).
- Tampon SB = 3,3 mL de tampon SB 3 X (10 mL d'eau, 0,3 g de SDS, 1,5 mL de Tris et 3 mL de glycérol) + 50  $\mu$ L d'anti-protéases + 100  $\mu$ L d'anti-phosphatase + 10 mL d'eau distillée.
- Tampon HENS = 100mM HEPES; pH 7,8; 1mM EDTA ; 0,1 mM Neocuproïne et 1% de SDS
- Tampon de lyse RIPA complet = 10  $\mu$ L de PMSF + 10  $\mu$ L de sodium orthovanadate + 20  $\mu$ L de protéase inhibitor cocktail + 1 mL de tampon de lyse (RIPA Lysis Buffer System, ref sc-24948, Santa Cruz Biotechnology).
- Tampon d'homogénéisation pour dosage de la CK et de la LDH = 100mL de tampon phosphate (14,11 g de  $K_2HPO_4$  et 2,586 g de  $KH_2PO_4$  pour 1 L d'eau), 38 mg d'EGTA et 200  $\mu$ L de 2-Mercaptoéthanol à 0,5 M]

<b>Protéine</b>	<b>Poids moléculaire (kDa)</b>
Caspase-3	32
eNOS/P-eNOS	140
Dimère de eNOS	280
iNOS	130
Akt/ P-Akt	60
SIRT1	130
SIRT3	28
Actine	42
GAPDH	36

*Tableau indiquant les poids moléculaires des protéines étudiées*

Composition des tampons utilisés

<b>Tampon d'électrophorèse</b>	<b>1 Litre</b>
Tris Base (250 mM)	30,28 g
SDS (1 %)	10 g
Glycine (192 mM)	144,13 g
Eau	QSP

Eau	QSP
-----	-----

<b>TBS-T</b>	<b>2 Litres</b>
TBS 10X	200 mL
Tween 20 (1‰)	2 mL
Eau	QSP

<b>Tampon de Transfert (Transfert en milieu semi-sec)</b>	<b>1 Litre</b>
Tris Base (48 mM)	5,81 g
SDS (0,0375 %)	0,375 g
Glycine (39 mM)	2,93 g
Méthanol	200 mL
Eau	QSP

<b>Dye Buffer</b>	<b>50 mL</b>
Tris Base (187,5 mM)	1,136 g
SDS (6 %)	3 g
Glycérol (40 %)	20 mL
Eau	QSP

<b>Tampon de Transfert (Transfert en milieu liquide)</b>	<b>1 Litre</b>
Tris Base (25 mM)	3,03 g
Glycine (19,2 mM)	14,4 g
Ethanol	200 mL
Eau	QSP

<b>Laemmli Buffer</b>	
Dye Buffer (78,4 %)	392 µL
DTT (21,6 %)	108,2 µL

<b>TBS 10X</b>	<b>1 Litre</b>
NaCl (9 %)	90 g
Tris Base (100 mM)	12,11 g

## RESUME

La littérature a mis en évidence un risque cardiovasculaire plus élevé chez les femmes diabétiques de type 2 par rapport aux hommes diabétiques de type 2. Cependant, peu d'études s'intéressent au sexe féminin dans le cadre du développement du prédiabète et du diabète de type 2. L'objectif de ce doctorat était i) d'étudier les altérations cardiovasculaires induites par le prédiabète et le diabète de type 2 dans le sexe féminin ; ii) de proposer une approche thérapeutique par le Resvératrol (RSV) afin d'améliorer la tolérance myocardique à une séquence d'ischémie-reperfusion chez des rates diabétiques de type 2 ; et iii) d'étudier l'effet du sexe sur les modifications physiologiques induites par le développement d'un prédiabète et sur la tolérance myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles : le rat prédiabétique induit par un régime riche en graisse et en sucre (HFS), et le rat Goto-Kakizaki (GK), spontanément diabétique de type 2. Nous avons réalisé des expériences d'imagerie, de spectroscopie par résonance magnétique *in vivo* et *ex vivo* et des analyses biochimiques sur le myocarde. Nous avons mis en évidence le développement d'altérations cardiaques précoces chez les femelles HFS, avec une augmentation de la perfusion et un épaississement myocardiques. Les femelles HFS présentent également une forte sensibilité myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion, caractérisée par une altération de la fonction cardiaque et du métabolisme énergétique, impliquant un stress oxydant exacerbé. Le traitement des femelles GK par le RSV a induit une cardioprotection en augmentant les composés riches en énergie et les protéines impliquées dans la voie du monoxyde d'azote lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion. Enfin, nous n'avons pas montré de dimorphisme sexuel dans la tolérance myocardique à un épisode d'ischémie-reperfusion lors d'un prédiabète, bien que le régime HFS ait induit des modifications physiologiques différentes chez les mâles et les femelles. En conclusion, nous avons montré que les dysfonctions endothéliale et mitochondriale jouent un rôle important dans les complications cardiovasculaires associées au diabète de type 2 dans le sexe féminin.

**Mots clés :** prédiabète, diabète de type 2, femmes, ischémie-reperfusion, Resvératrol, IRM, SRM, cœur, métabolisme énergétique, fonction endothéliale, stress oxydant.

## ABSTRACT

The literature has shown a higher cardiovascular risk in type 2 diabetic women compared with type 2 diabetic men. However, few studies have focused on the female sex in the development of prediabetes and type 2 diabetes. The objective of this PhD was i) to study cardiovascular alterations induced by prediabetes and type 2 diabetes in female; ii) to propose a therapeutic approach by Resveratrol (RSV) to improve myocardial tolerance to ischemia-reperfusion in type 2 diabetic female rats; and iii) to study the effect of sex on the prediabetes-induced physiological modifications and on the myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury. In this purpose, we used two models: the prediabetic HFS rat, induced by a high-fat high-sucrose diet, and the spontaneously type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat (GK). We performed *in vivo* and *ex vivo* cardiovascular magnetic resonance imaging and spectroscopy experiments and biochemical analyses. We highlighted the development of early cardiac alterations in female HFS, with increased perfusion and myocardial thickening. HFS females also had a high myocardial sensitivity to ischemia-reperfusion, characterized by impaired cardiac function and energy metabolism, involving exacerbated oxidative stress. RSV treatment of female GK induced cardioprotection by increasing the high-energy compounds and the proteins involved in the nitric oxide pathway, during ischemia-reperfusion injury. Finally, there was no sexual dimorphism in myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in prediabetes, although the HFS diet induced different physiological changes in males and females. In conclusion, we have shown that endothelial and mitochondrial dysfunctions play an important role in cardiovascular complications associated to type 2 diabetes in the female sex.

**Key words:** prediabetes, type 2 diabetes, women, female, ischemia-reperfusion, Resveratrol, MRI, MRS, heart, energy metabolism, endothelial function, oxidative stress.