



Dimorphisme sexuel dans la réponse myocardique à une surcharge de volume: observations chez le rat ayant une régurgitation de la valve aortique

Mémoire

Elisabeth Walsh-Wilkinson

Maîtrise en médecine moléculaire - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

Dimorphisme sexuel dans la réponse myocardique à une surcharge de volume : observations chez le rat ayant une régurgitation de la valve aortique

Mémoire

Élisabeth Walsh-Wilkinson

Sous la direction de :

Jacques Couët, directeur de recherche

Marie Arsenault, codirectrice de recherche

Résumé

L'incidence des maladies cardiovasculaires diffère entre les hommes et les femmes. Les symptômes, l'évolution de la maladie, la réponse aux traitements et même la prise en charge sont différents selon le sexe. L'hypertrophie cardiaque (HC) est la réponse du cœur à une surcharge hémodynamique maintenue et significative. L'HC peut être de type concentrique (épaississement des parois) ou de type excentrique (dilatation de la chambre). Les mécanismes impliqués dans le dimorphisme sexuel de l'HC sont toujours mal compris. Notre équipe s'intéresse à un modèle de régurgitation de la valve aortique (RA) chez le rat. Nous avons déjà montré que les femelles RA ont un remodelage plus concentrique, une meilleure densité capillaire et un profil génique de la fonction mitochondriale et du métabolisme énergétique plus près de la normale que les mâles.

Nous nous sommes d'abord intéressés à l'implication des hormones sexuelles dans ce dimorphisme sexuel. Les analyses échocardiographiques et tissulaires montrent que la déficience en androgènes chez les mâles RA réduit la réponse hypertrophique, améliore la fonction cardiaque et tend à améliorer la survie. La perte des estrogènes n'est pas associée à d'importants changements chez les femelles RA. Nous avons ensuite étudié l'effet du valsartan, un traitement ciblant le système rénine angiotensine (RAAS), une voie hormonale fortement activée en HC. La réduction de l'activité du RAAS empêche le remodelage concentrique hypertrophique féminin dans les premières semaines de RA, alors qu'elle a peu d'effet chez les mâles RA. Finalement, nous nous sommes intéressés à l'évolution morphologique et fonctionnelle du cœur chez les rats RA. L'analyse échocardiographique montre que le ventricule gauche des femelles RA perd rapidement de la fonction contractile, de la capacité de déformation en circonférentiel et modifie sa forme elliptique normale, comparativement aux mâles. Les résultats présentés dans ce mémoire améliorent notre compréhension des différences sexuelles en HC.

Abstract

The incidence of cardiovascular disease differs between men and women. Symptoms, disease's evolution, response to treatment and even care are different depending on the sex. Cardiac hypertrophy (HC) is the heart's response to sustained and significant hemodynamic overload. HC can be concentric (thickening of the walls) or eccentric (dilation of the chamber). Mechanisms involved in the sexual dimorphism of HC are still poorly understood. Our team is interested in a model of severe aortic valve regurgitation (RA) in rats. We have already shown that women's heart has a more concentric remodeling, a better capillary density and a gene profile of mitochondrial function and energy metabolism closer to normal, compared to males.

We were first interested in the involvement of sex hormones in this sexual dimorphism. Echocardiographic data and tissue analyze show that androgen deficiency in RA males reduces hypertrophic response, improves cardiac function and tends to improve survival. Estrogen loss is not associated with significant hypertrophic changes in RA females. We then studied the effect of valsartan, a treatment targeting the renin angiotensin system (RAAS), a highly activated hormonal pathway in HC. Inhibition of RAAS activity prevents concentric hypertrophy in female's heart in the early weeks of RA, whereas it has little effect in RA males. Finally, we were interested in the morphological and functional evolution of the heart in RA rats. Echocardiographic analysis shows that RA females' left ventricle rapidly loses contractile function, circumferential deformation capacity, and changes its normal elliptical shape, compared to males. The results presented here improve our understanding of sexual differences in HC.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations, sigles, acronymes	xiv
Remerciements	xvi
Avant-propos	xvii
Introduction	1
Anatomie et physiologie cardiaque.....	1
Contractilité cardiaque	2
Métabolisme énergétique du cœur	5
Dimorphisme sexuel dans la physiologie cardiaque	6
Les estrogènes	7
Les androgènes	11
Hypertrophie cardiaque.....	13
Les causes de l'hypertrophie cardiaque	14
La régurgitation aortique.....	17
L'évolution vers l'insuffisance cardiaque.....	18
Adaptations du cœur en hypertrophie cardiaque	18
Modifications morphologiques	19
Métabolisme énergétique	20
Système adrénnergique	20
Système rénine-angiotensine-aldostérone	21
Les peptides natriurétiques	21
Traitements de l'hypertrophie cardiaque	22

Dimorphisme sexuel dans l'hypertrophie cardiaque.....	24
Les estrogènes	27
Les androgènes	29
Le modèle d'hypertrophie cardiaque étudié	30
Échocardiographie conventionnelle.....	32
Échocardiographie 4D	34
Échocardiographie par <i>speckle stacking</i>	34
Architecture du ventricule gauche et étude de la capacité de déformation	35
Utilité en hypertrophie cardiaque	38
Différences sexuelles.....	40
Problématique à l'étude	40
Hypothèses et objectifs de recherche	43
Chapitre 1. Testosterone deficiency reduces cardiac hypertrophy in a rat model of severe volume overload	45
1.1 Page titre	45
1.2 Résumé.....	46
1.3 Abstract.....	47
1.4 Introduction.....	48
1.5 Methods.....	49
1.5.1 Animals	49
1.5.2 Echocardiography.....	49
1.5.3 Gene expression analysis by RT-PCR	50
1.5.4 Enzymatic activity.....	51
1.5.5 Immunoblotting.....	51
1.5.6 Histology	52
1.5.7 Statistical analysis	52

1.6 Results.....	52
1.6.1 Cardiac hypertrophy	52
1.6.2 Echocardiographic data	53
1.6.3 Markers of hypertrophy and extracellular matrix remodeling	53
1.6.4 LV energy metabolism and markers	54
1.6.5 Cell signaling.....	55
1.7 Discussion	56
1.8 Conflict of Interest	60
1.9 References.....	60
1.10 Tables	66
1.11 Figure legends	67
1.12 Figures.....	69
1.13 Supplemental tables and figures	76
Chapitre 2. Effects of the loss of estrogen on the heart's hypertrophic response to chronic left ventricle volume overload in rats.	81
2.1 Page titre	81
2.2 Résumé.....	82
2.3 Abstract.....	83
2.4 Introduction.....	84
2.5 Methods.....	85
2.5.1 Animals	85
2.5.2 Echocardiography.....	86
2.5.3 Gene expression analysis by quantitative RT-PCR.....	86
2.5.4 Statistical analysis	86
2.6 Results.....	87

2.6.1 Effects of ovariectomy on the hypertrophic response to chronic volume overload	87
2.6.2 Effects of E2 treatment on cardiac hypertrophy in AR Ovx females.....	88
2.6.3 LV gene expression modulation by estrogens.....	88
2.7 Discussion	89
2.8 Conclusion	94
2.9 Références	94
2.10 Tables	99
2.11 Figure legends	102
2.12 Figures.....	103
 Chapitre 3. Sex differences in the response to angiotensin II receptor blockade in a rat model of eccentric cardiac hypertrophy	108
3.1 Page titre	108
3.2 Résumé.....	109
3.3 Abstract.....	110
3.4 Introduction.....	111
3.5 Methods.....	113
3.5.1 Animals	113
3.5.2 Echocardiography.....	113
3.5.3 Gene Expression Analysis by quantitative RT-PCR.....	113
3.5.4 Statistical analysis	114
3.6 Results.....	114
3.6.1 Animal characteristics	114
3.6.2 Echocardiography data.....	115
3.6.3 Markers of LV hypertrophy and extracellular matrix remodeling	116
3.7 Discussion	116

3.8 References.....	121
3.9 Tables	125
3.10 Figure legends.....	127
3.11 Figures.....	128
Chapitre 4. Sex differences in the evolution of left ventricle remodeling in rats with severe volume overload.	133
4.1 Page titre	133
4.2 Résumé.....	134
4.3 Abstract.....	136
4.4 Introduction.....	137
4.5 Methods.....	139
4.5.1 Animals	139
4.5.2 Echocardiography.....	139
4.5.3 Statistical analysis	141
4.6 Results.....	141
4.6.1 Animal characteristics	141
4.6.2 Echocardiography data.....	141
4.7 Discussion	143
4.8 Conclusion	148
4.9 Abbreviations	148
4.10 Declarations	148
4.11 References.....	149
4.12 Tables	153
4.13 Figure legends	154
4.14 Figures.....	157
Conclusion	162

Discussion	162
Limites	170
Perspectives.....	173
Conclusion et retombées	176
Bibliographie	178

Liste des tableaux

Tableau 1. Résumé des effets des estrogènes et des androgènes au niveau du cœur	13
Table 1.1 Animal characteristics at the end of the protocol	66
Table 1.2 Echocardiographic and hemodynamic parameters at the end of the protocol.....	66
Table 1.S1. Name and abbreviation of all primers used for gene expression analysis by quantitative RT-PCR.	76
Table 2.1. Name and symbol of all primer pairs used for gene expression analysis by quantitative RT- PCR.	99
Table 2.2. Characteristics of the animals at the end of the protocol.....	100
Table 2.3. Echocardiographic parameters of sham-operated animals at the end of the protocol.	100
Table 2.4. Animal characteristics of Ovx animals treated with 17beta-estradiol (E2) at the end of the protocol.	101
Table 2.5. Echocardiographic parameters of Ovx animals treated with 17beta-estradiol (E2) at the end of the protocol.	101
Table 3.1 Name and symbol of all primer pairs used for gene expression analysis by quantitative RT-PCR.	125
Table 3.2 Characteristics of male sham-operated and AR animals at the end of the protocol.	126
Table 3.3 Characteristics of females AR animals at the end of the protocol.	126
Table 4.1. Characteristics of sham-operated and AR animals at the end of the protocol...153	153
Table 4.2. Echocardiographic parameters (short-axis view, M-mode images) of male and females animals at the end of the protocol.	153
Table 4.3. Echocardiographic parameters (short-axis view, M-mode images) of male and female Wistar rats at baseline (10-11 weeks of age).	154

Liste des figures

Figure 1. Coupe montrant l'anatomie du cœur,.....	1
Figure 2. Représentation de l'organisation d'un sarcomère.	3
Figure 3. Schéma représentant la transformation de la testostérone, de l'androstènedione, de l'estradiol et de l'estrone.	8
Figure 4. Remodelage hypertrophique du ventricule gauche en réponse à une surcharge hémodynamique.....	15
Figure 5. L'ajout de sarcomères en parallèle et en série.	15
Figure 6. Schéma représentant l'orientation des fibres cardiaques du ventricule gauche... ...	35
Figure 7. Traçage à l'échocardiographie transthoracique d'une vue en long-axe chez le rat pour l'étude de la déformation du ventricule gauche par le logiciel VevoStrain,.....	37
Figure 8. Analyse par <i>strain</i> à l'échocardiographie par <i>speckle tracking</i> au Vevo 3100. Vue en long-axe du ventricule gauche.	38
Figure 1.1 Survival of animals with aortic regurgitation during the protocol, mid left ventricle histological short-axis sections and variations of heart weight and LV weight	69
Figure 1.2 Echocardiographic parameters on LV diastolic diameter, systolic function and compliance.....	70
Figure 1.3 Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy and extracellular matrix remodeling markers	71
Figure 1.4 mRNA levels of genes encoding for proteins related to fatty acid uptake and oxidation, for proteins relevant to glucose metabolism, for transcription factors related to fatty acid metabolism and mitochondrial function and biogenesis	72
Figure 1.5 LV myocardial activity levels of enzymes implicated in myocardial energy metabolism.....	73
Figure 1.6 LV myocardial oxidative stress.....	74
Figure 1.7 Evaluation by Western Blot of LV protein contents of Akt and Gsk3	75
Figure 1.S1. Comparison of SOcx with S with real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy (A) extracellular matrix remodeling (B) markers.	78
Figure 1.S2. Comparison of SOcx with S with real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for glucose uptake and glycolysis (A), fatty acid oxidation (B) and transcription factor (C) markers.	79

Figure 1.S3. Comparison of SOcx with S with real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for mitochondrial function markers.....	79
Figure 1.S4. LV protein contents of S6, Fak and Pkd. Representative blots for each signaling molecules (A). Graphs B to G represent densitometric measurement after normalization. Phosphorylated S6 on serines 240 and 244 (B), total S6 (C), phosphorylated Fak (D), total Fak (E), phosphorylated Pkd (F) and total Pkd (G).....	80
Figure 2.1. Ovariectomy does not modulate the hypertrophic response triggered by AR.	103
Figure 2.2. Ovariectomy (Ovx) slows normal heart growth in Wistar female rats and E2 treatment partially reverses this effect.....	104
Figure 2.3. Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy markers (A, B and C), extracellular matrix genes (D and E) and transcription factors implicated in the control of myocardial energetics (F and G).....	105
Figure 2.4. Genes implicated in energetics (panels A and B) and reactive oxygen species metabolism (C) are not modulated by the loss of estrogens in ShamOvx and AROvx rats.	106
Figure 2.5. Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy markers in Sham Ovx and AR Ovx rats receiving (orange) or not (blue) 17beta-estradiol (E2) replacement	107
Figure 3.1 Effects of a 9-week treatment with valsartan on cardiac hypertrophy development caused by severe volume overload from AR.....	128
Figure 3.2 Effects of a 9-week treatment with valsartan on LV hypertrophy development caused by AR on echocardiographic parameters.....	129
Figure 3.3 AR caused a general degradation of diastolic parameters that was improved by valsartan treatment in females but not in males.	130
Figure 3.4 Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for several hypertrophy markers in AR animals relative to sham controls.....	131
Figure 3.5 Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for several extracellular matrix markers in AR animals relative to sham controls.	132
Figure 4.1. Left ventricular dimensions increases more strongly in female AR rats than in males compared to sham-operated animals.....	157
Figure 4.2. Left ventricular volumes increase more strongly in female AR rats than in males compared to sham-operated animals.	158
Figure 4.3. Comparison of various echo methods to estimate ejection fraction and LV mass.	159

Figure 4.4. Evidence of a sex dimorphism in the LV geometry of the dilated AR left ventricle.	160
Figure 4.5. Evolution of global LV strain rates in male and female sham and AR rats.....	161
Figure 8. Les modèles de souris <i>Four Core Genotype</i> et XY* pour étudier l'effet du sexe chromosomique.	175

Liste des abréviations, sigles, acronymes

- µPET : Microtomodensitométrie de flux
- AHA : American Heart Association
- AngII : Angiotensine II
- Anp : Facteur natriurétique de l'oreillette
- AR : Récepteur aux androgènes
- AT1R : Récepteur à l'angiotensine II de type 1
- AT2R : Récepteur à l'angiotensine II de type 2
- ATP : Adénosine triphosphate
- Bnp : facteur natriurétique du cerveau
- CaMKII : Kinase II Ca₂₊/calmoduline dépendante
- DHT : Dihydrotestostérone
- E1 : Estrone
- E2 : 17β-estradiol
- E3 : Estriol
- ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine
- ELITE : *Early versus Late Intervention Trial with Estradiol*
- EPN : Endopeptidase neutre
- ER : Récepteur aux estrogènes
- EST : Échocardiographie par speckle tracking
- FÉ : Fraction d'éjection
- GLS : Global longitudinal strain
- GPER : Récepteur membranaire aux estrogènes couplé aux protéines G
- GRK : Récepteur kinase couplé aux protéines G
- Gs : Protéine G stimulante
- GSK3 : Glycogène synthase kinase 3
- HC : Hypertrophie cardiaque
- HERS : *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study*
- I/R : Ischémie/reperfusion
- IP3 : Inositol triphosphosphate

IRSC : Instituts de recherche en santé du Canada
KEEPs : *Kronos Early Estrogen Prevention Study*
LCZ696 : Entresto
Lox : Lysyl oxydase
MEC : Matrice extracellulaire
MHC : Chaînes lourdes de myosine
MMP : Métalloprotéinase
mTORC1 : Cible de la rapamycine
NF κ B : Facteur nucléaire kappa B
NFAT : Facteur nucléaire des lymphocytes T
NO : Oxyde nitrique
NOS : Oxyde nitrique synthase
NPR A/B : Récepteur des peptides natriurétiques A/B
Ocx : Orchidectomie
OD : Oreillette droite
OG : Oreillette gauche
Ovx : Ovariectomie
PCR : Réaction en chaîne par polymérase
PGC1 α : Co-activateur 1 alpha de PPAR alpha
PKA : Protéines kinase A
PPAR α : Récepteur alpha activé par les proliférateurs de peroxysomes
RA : Régurgitation aortique
RAAS: Renin angiotensin aldosterone system
ROS : Espèce réactive oxygénée
SERCA : Réticulum sarcoplasmique Ca₂₊-ATPase
TAC : Constriction de l'aorte transversale
TAVR: Transcatheter aortic valve replacement
VD : Ventricule droit
VG : Ventricule gauche
VTI : Velocity time integral
WHI : Women's Health Initiative

Remerciements

En premier lieu, j’aimerais remercier mon directeur de recherche Jacques Couët et ma co-directrice Marie Arsenault pour la confiance, l’immense générosité et le soutien dans ce projet. Merci de m’avoir permis de développer une si grande variété de compétences en recherche. Je suis choyée de faire partie de leur équipe. Merci pour les nombreuses opportunités, la grande liberté dans mon travail, l’authenticité et l’enthousiasme.

Un grand merci à mes amies Marie-Claude Drolet et Élise Roussel, professionnelles de recherche dans le laboratoire. Elles ont eu un impact très important sur ma vie personnelle et professionnelle. Élise, merci pour le support dans les expériences en laboratoire, pour l’expertise et pour l’initiation à la musique classique et au cross-fit du ppmc. Marie-Claude, merci pour les heures passées à l’échocardiographie et aux chirurgies, pour la transmission de la passion du travail avec les animaux et pour ces nombreux dîners. Leur écoute et leurs conseils ont permis la réalisation de ces projets.

Un merci particulier à ma collègue et amie Catherine avec qui j’ai partagé mes idées, mes inquiétudes et ma passion pour le sport. Les meilleures idées ont souvent émergé de nos conversations.

Je tiens à remercier mes amis et Simon qui m’ont grandement encouragée dans la réalisation de ce mémoire. Votre curiosité m’a aidée à mettre mes idées en place. Merci d’avoir eu les bons mots pour me soutenir et de toujours me divertir avec les activités les plus stimulantes.

Finalement, ce mémoire n’aurait pu être complété sans l’amour et le support infini de mes parents. Ce travail est aussi le vôtre, merci d’avoir été présents pour la plus grande réalisation de mon parcours académique.

Avant-propos

Ce mémoire contient quatre articles scientifiques présentant l'ensemble de mes travaux réalisés en collaboration avec les membres de mon équipe de recherche pour améliorer la compréhension du dimorphisme sexuel dans l'hypertrophie cardiaque développée dans un modèle de surcharge de volume chez le rat. Le premier article montre l'effet de la perte des androgènes sur la réponse hypertrophique du cœur en réponse à la régurgitation sévère de la valve aortique (RA) chez les rats mâles. Le second article inséré au chapitre 2 s'intéresse à la perte des estrogènes sur les adaptations hypertrophiques chez les rates femelles RA. Le troisième article présenté au chapitre 3 montre la réponse du cœur des mâles et des femelles à l'inhibition du récepteur I de l'angiotensine II dans notre modèle de rat RA. Finalement, le quatrième article présente les différences sexuelles dans l'évolution du remodelage hypertrophique du ventricule gauche en réponse à une importante surcharge volumique chez les rats des deux sexes.

Le premier article *Testosterone deficiency reduces cardiac hypertrophy in a rat model of severe volume overload*, (Chapitre 1) a été publié dans le journal *Physiological Reports* le 13 avril 2019. Je suis deuxième auteure. Jacques Couët et Marie Arsenault ont conçu le projet et ont écrit le manuscrit. Marie-Claude Drolet et Jonathan Beaudoin ont réalisé les chirurgies et les échocardiographies sur les animaux, Élise Roussel a réalisé les Western Blot. Nicolas Melançon et Émile Fortier ont analysé une partie de l'expression génique, Geneviève Harpin a réalisé la coloration des coupes histologiques. Catherine Beaumont a participé à l'analyse de l'expression génique, à l'analyse de l'activité enzymatique, à l'analyse des données échocardiographiques, à la création de figures et à la rédaction du manuscrit. J'ai participé à l'analyse de l'expression génique, réalisé l'analyse du stress oxydatif et participé à l'analyse des données échocardiographiques.

Le second article *Effects of the loss of estrogen on the heart's hypertrophic response to chronic left ventricle volume overload in rats* (Chapitre 2) a été publié dans le journal *PeerJ* le 21 octobre 2019. Je suis première auteure. Jacques Couët a conçu le projet, a analysé les résultats, a préparé les figures et les tableaux et a écrit le manuscrit. Marie Arsenault a conçu le projet et a écrit le manuscrit. Jonathan Beaudoin a participé aux chirurgies chez les

animaux et à l'écriture du manuscrit. Ève-Marie Roy et Charlie Le Houillier ont participé aux analyses de l'expression génique. Marie-Claude Drolet a réalisé les chirurgies et les échocardiographies chez les animaux. Catherine Beaumont a participé à l'analyse de l'expression génique, à l'analyse échocardiographique et à la préparation des figures. J'ai participé aux chirurgies chez les animaux, à l'analyse de l'expression génique, à l'analyse échocardiographique et à la préparation des figures.

Le troisième article *Sex differences in the response to angiotensin II blockade in a rat model of eccentric cardiac hypertrophy* (Chapitre 3) a été publié dans le journal PeerJ le 5 août 2019. Je suis première auteure. Jacques Couët a conçu le projet, a analysé les résultats, a préparé les figures et les tableaux et a écrit le manuscrit. Marie Arsenault a conçu le projet, a participé à la préparation des figures et des tableaux et a participé à l'écriture du manuscrit. Charlie Le Houillier et Ève-Marie Roy ont participé aux analyses de l'expression génique. Marie-Claude Drolet a réalisé les chirurgies chez les animaux. J'ai participé aux chirurgies chez les animaux, réalisé et analysé les échocardiographies, réalisé l'analyse de l'expression génique, participé à la préparation des figures et des tableaux et participé à l'écriture et à la révision du manuscrit.

Le quatrième article *Sex differences in the evolution of left ventricle remodeling in rats with severe volume overload* (Chapitre 4), est en cours de révision dans le journal BCM Cardiovascular Disorders (Soumis le 25 octobre 2019). Je suis première auteure. Jacques Couët a conçu le projet, a analysé les résultats, a préparé les figures et les tableaux et a écrit le manuscrit. Marie Arsenault a participé à l'écriture du manuscrit. Marie-Claude Drolet a réalisé les chirurgies chez les animaux. J'ai participé aux chirurgies chez les animaux, réalisé et analysé les échocardiographies, préparé les figures et des tableaux et participé à l'écriture et à la révision du manuscrit.

Introduction

Anatomie et physiologie cardiaque

Le cœur est un organe musculaire composé de quatre cavités cardiaques principales : l'oreillette droite (OD), le ventricule droit (VD), l'oreillette gauche (OG) et le ventricule gauche (VG). Son rôle est de fournir l'organisme en sang oxygéné. Le sang veineux de la circulation systémique circule à partir des veines caves supérieures et inférieures vers l'OD, puis la valve tricuspide permet le passage du sang vers le VD. Ce dernier se contracte et éjecte le sang dans les artères pulmonaires. Le sang rejoint ainsi les poumons où il est oxygéné. Le sang revient vers l'OG par les veines pulmonaires, puis l'ouverture de la valve mitrale permet le remplissage du VG, qu'on appelle la diastole. Lors de la systole, le VG se contracte, la valve aortique s'ouvre et le sang est éjecté dans l'aorte et vers la circulation systémique (Figure 1).

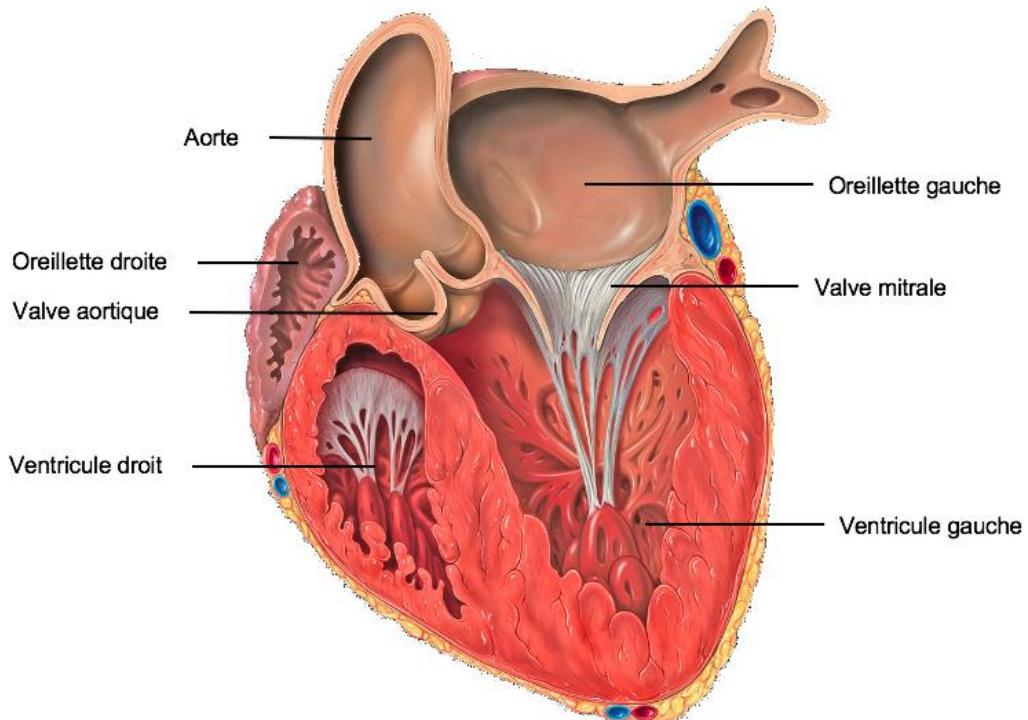


Figure 1. Coupe montrant l'anatomie du cœur,

Adaptée Cœur sur Wikipedia, par Patrick J. Lynch, medical illustrator, sous licence Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1490533de>

L'ouverture des valves cardiaques se fait lorsque la pression de la cavité dans laquelle le sang se trouve devient supérieure à la pression de l'autre côté de la valve. Dans le VG, la précharge représente la force d'étirement nécessaire à la réception du volume sanguin diastolique provenant de l'oreillette gauche. La postcharge est la pression nécessaire lors de la contraction du VG pour provoquer l'ouverture de la valve aortique et le passage du sang vers l'aorte¹. Le VG a une forme conique et ses parois sont plus épaisses que celles du VD, conséquence d'une pression sanguine qui y est plus élevée. Les cellules cardiaques formant la majorité de la masse du myocarde sont les cardiomyocytes, des cellules contractiles capables de s'adapter aux variations de contractilité et de compliance en réponse aux modifications hémodynamiques cardiaques.

Contractilité cardiaque

Les cardiomyocytes sont essentiellement composés de myofibres permettant la contraction, de nombreuses mitochondries pouvant fournir les grands besoins en énergie, et d'un noyau central. Les myofibres s'étendent sur la longueur de la cellule et sont formées de plusieurs unités contractiles : les sarcomères. Le sarcomère est constitué de fibres minces et de fibres épaisses composées respectivement d'actine et de myosine, qui donnent l'allure striée aux cellules cardiaques. Les fibres épaisses, situées dans la partie centrale du sarcomère, sont formées de têtes de myosine qui ont la capacité d'interagir avec les protéines d'actine des fibres minces, situées aux extrémités du sarcomère. Au repos, les fibres sont parallèles et étirées. Lors de la diastole, elles s'étirent davantage puis se chevauchent et s'approchent pour permettre le raccourcissement des sarcomères et la contraction du muscle cardiaque lors de la systole (Figure 2). Selon le mécanisme de Frank-Starling, plus les fibres sont étirées, plus la contraction est forte². Un plus grand volume de sang qui entre dans une cavité cardiaque lors de la diastole force l'étirement des fibres cardiaques et permet une contraction plus forte pour éjecter le surplus de volume sanguin. Par contre, lorsque les sarcomères sont trop étirés, l'interaction des fibres est inadéquate et la force de contraction est réduite.

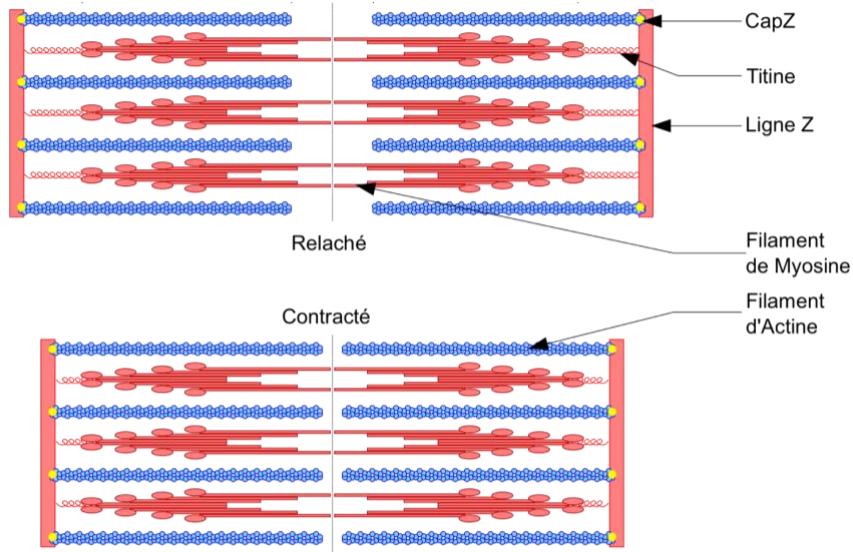


Figure 2. Représentation de l'organisation d'un sarcomère.

Adaptée de Sarcomere sur Wikipédia sous licence Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=46167508> (consulté le 31 juillet 2019)

Le contrôle du rythme cardiaque selon les besoins de l'organisme en oxygène se fait par le nœud sinusal, situé à la paroi supérieure de l'OD. La contraction cardiaque est initiée par le potentiel d'action produit par le nœud sinusal qui se propage pour stimuler les cellules du myocarde. C'est la dépolarisation qui déclenche l'ouverture rapide des canaux calciques de type L dépendants du voltage membranaire³. Depuis l'espace extracellulaire, le calcium entre dans le cytosol de façon passive, activant le phénomène de libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique⁴. L'activation des canaux calciques du réticulum sarcoplasmique permet la libération des ions Ca^{2+} vers le cytosol³. Les ions Ca^{2+} lient la troponine, libérant le site de fixation de l'actine des fibres minces, permettant l'interaction de cette dernière avec les têtes de myosine et ainsi la contraction cardiaque⁵. Les canaux calciques se ferment et le calcium est finalement capturé par la pompe du réticulum sarcoplasmique Ca^{2+} -ATPase (SERCA), ce qui cause une importante baisse de la concentration en calcium cytosolique et permet la relaxation cardiaque.

La contraction nécessite une grande quantité d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), ce qui requiert un nombre important de mitochondries pour sa production. Lors de la dépolarisation myocardique, les molécules d'ADP fixées à la myosine sont libérées, permettant l'interaction des têtes de myosine avec l'actine, l'ATP se fixe à la

myosine, permettant la séparation de l'actine. L'ATP est finalement hydrolysée en ADP + phosphate et ce cycle peut être répété tant que les têtes de myosine doivent avancer sur les fibres d'actine pour raccourcir les sarcomères.

Lors d'un exercice physique par exemple, la demande contractile est augmentée. Le système nerveux sympathique est activé pour favoriser l'augmentation de la fréquence et de la contractilité cardiaque. La norépinephrine et l'épinéphrine sont les deux catécholamines du système adrénnergique jouant un rôle au niveau du cœur. Elles sont relâchées par les neurones adrénériques et agissent par la liaison d'un récepteur adrénnergique¹. Les récepteurs adrénériques se divisent en deux grandes classes, les récepteurs α et β , qui se subdivisent en sous-classes : α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , β_3 , définies selon leurs agonistes, leurs antagonistes et leurs effets⁶⁻⁸. La norépinephrine active plus fortement les récepteurs α comparativement aux récepteurs β et l'épinéphrine agit sur les deux types de récepteurs¹. Les récepteurs α se trouvent principalement au niveau des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins. Les récepteurs α_1 activent la vasoconstriction, alors que les récepteurs α_2 favorisent la vasodilatation¹. Les récepteurs β se trouvent principalement dans les cardiomyocytes. Les récepteurs β_1 sont la forme prédominante au cœur, leur activation favorise l'augmentation de la force contractile et de la fréquence cardiaque⁹. Les récepteurs β_2 activent la vasodilatation alors que les récepteurs β_3 sont en faible concentration dans les cardiomyocytes, ils se trouvent principalement dans le tissu adipeux et sont impliqués dans la régulation de la thermogénèse¹. À la surface cellulaire des cardiomyocytes, l'activation des récepteurs β active les protéines G stimulantes (Gs) et permet la conversion de l'ATP en AMPc⁹. La protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase II Ca²⁺/calmoduline-dépendante (CaMKII) sont alors activées, provoquant l'ouverture des canaux calciques. La concentration intracellulaire de Ca²⁺ est augmentée, ce qui permet une plus forte contraction et l'éjection d'un plus grand volume sanguin¹. Les mitochondries s'adaptent à l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ en augmentant leur production énergétique. La norépinephrine a aussi la capacité d'accélérer la dépolarisation dans les cellules du nœud sinusal et ainsi d'accélérer la fréquence cardiaque¹. Par l'activité de PKA et de CaMKII, la norépinephrine peut aussi inactiver le phospholamban, une protéine inhibitrice de SERCA, ce qui accélère la recapture du Ca²⁺ et améliore la relaxation cardiaque⁹.

Métabolisme énergétique du cœur

Les nombreuses mitochondries du cardiomyocyte constituent environ 36% du volume cellulaire³. Par la respiration cellulaire, elles permettent de générer une grande quantité d'ATP, une molécule à haut potentiel énergétique. Pour ce faire, la cellule a besoin d'oxygène et de nutriments, transportés dans le sang par les artères coronaires du cœur. Dans le cardiomyocyte, les nutriments utilisés pour former l'ATP sont majoritairement les acides gras (environ 60%) et le glucose (environ 35%)¹. En condition normale, le cœur s'adapte en fonction du substrat disponible, mais la β-oxydation des acides gras est plus efficace pour produire de l'ATP en comparaison avec la glycolyse, bien qu'elle nécessite plus de trois fois la quantité d'oxygène¹⁰.

La translocase des acides gras (*Fat/Cd36*) est responsable de l'entrée de près de 50% des acides gras dans le cardiomyocyte puisqu'elle permet l'entrée des acides gras à longue chaîne. La délétion de la protéine CD36 réduit de 40 à 60% de la β-oxydation des acides gras chez la souris¹¹. Une fois entrés dans la cellule, les acides gras à longue chaîne sont transformés en acyl-CoA par l'enzyme fatty-acyl-CoA synthase. L'enzyme carnitine palmitoyltransférase 1 (*Cpt1*) permet la fusion de l'acyl-CoA sur une carnitine. L'acylcarnitine est ensuite transférée à la mitochondrie où la carnitine palmitoyltransférase 2 (*Cpt2*) reforme l'acyl-CoA¹⁰. La β-oxydation peut ainsi débuter et l'acyl-CoA est dégradée par l'acyl-CoA déshydrogénase (*Acadvl*), l'énoyl-CoA hydratase (*EchS1*), la 3-hydroxyacyl-CoA (*Hadh*) et l'acétyl-CoA C-acyltransférase (*Acaa2*)¹². L'oxydation se continue jusqu'à ce que la chaîne soit de deux carbones et forme un acétyl-CoA. Chaque cycle d'oxydation raccourcit l'acyl-CoA de deux atomes de carbone, libère un acétyl-CoA, une molécule de FADH₂ et une molécule de NADH¹². L'acétyl-CoA entre ensuite dans le cycle de Krebs où il y a formation de deux molécules de CO₂, trois molécules de NADH, une molécule de FADH₂ et une molécule de GTP¹. L'essentiel de l'ATP est ensuite obtenu par l'oxydation des molécules comme le NADH et le FADH₂ dans la chaîne de transport des électrons, composée de quatre complexes transporteurs d'électrons dans la membrane mitochondriale¹. Le passage des électrons génère un gradient à travers la membrane et la faible concentration d'ions H⁺ dans la matrice mitochondriale active les pompes à protons, ce qui fournit l'énergie nécessaire à la phosphorylation de l'ADP en ATP.

La glycolyse est amorcée par le transport du glucose dans la cellule via GLUT1 ou GLUT4. Ce dernier est grandement sensible à l'action de l'insuline pour sa translocation à la membrane sarcoplasmique. Dans la cellule, le glucose est phosphorylé par l'enzyme hexokinase (*Hk*) et métabolisé par une série d'enzymes. Il en résulte deux molécules de pyruvate, deux molécules de NADH et deux molécules d'ATP₁. Le pyruvate est ensuite métabolisé par la pyruvate déshydrogénase (*Pdh*), ce qui forme l'acétyl-CoA. Cette molécule entre ensuite dans le cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons pour produire l'énergie ATP.

En plus de l'activité du système nerveux sympathique, l'augmentation de la demande énergétique active la translocation des transporteurs des acides gras (*Fat/Cd36*) et des transporteurs du glucose (*Glut1* et *Glut4*) à la membrane¹³. Leur concentration élevée aux membranes favorise l'entrée des substrats dans la cellule et leur transformation. Le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysome alpha (PPAR α ; *Ppar α*) agit comme principal facteur de transcription pour plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme énergétique^{14–16}. L'inactivation de PPAR α ou de son co-activateur (PGC1 α ; *Pgc1 α*) chez la souris réduit considérablement la production d'ATP et affecte la capacité contractile^{16–18}. Lorsque la demande énergétique est élevée, PPAR α est un facteur clé pour le maintien d'une bonne contraction cardiaque de par son rôle dans la production de plusieurs protéines impliquées dans la production d'énergie.

Dimorphisme sexuel dans la physiologie cardiaque

Avant la puberté, le nombre et la taille des cardiomyocytes sont comparables chez les hommes et les femmes¹⁹. Après la puberté, les hommes augmentent la masse de leur cœur proportionnellement à leur masse corporelle. Ce gain de masse est de 15 à 30% plus important que chez les femmes¹⁹. Puisque les cardiomyocytes ont un faible potentiel prolifératif, il semble que les cardiomyocytes masculins augmentent leur taille¹⁹. Avec l'arrivée des estrogènes à la puberté, les femmes ont une repolarisation plus longue, indiquée par un intervalle QT plus long à l'électrocardiogramme²⁰. Certaines études suggèrent que les femmes ont ainsi une meilleure fonction diastolique et une meilleure relaxation

cardiaque^{19,21}. Les cardiomyocytes féminins utiliseraient davantage les acides gras pour produire l'énergie ATP^{22,23}, ce qui veut dire que leur cœur consommerait plus d'oxygène comparativement à celui des hommes. D'autres études montrent que le vieillissement est associé à une perte de capacité contractile plus importante chez les hommes. Cela serait causé par l'augmentation du taux d'apoptose des cardiomyocytes chez les hommes âgés^{19,21,24,25}. En plus de ces différences sexuelles physiologiques, le genre et les facteurs sociaux et environnementaux ont aussi des effets sur la santé cardiovasculaire.

La différence sexuelle biologique commence au moment de la conception au niveau des chromosomes XX ou XY. Le chromosome X est présent chez les deux sexes, mais une copie de chacun des gènes présents sur ce chromosome est désactivée chez les femelles. Certains gènes semblent échapper à l'inactivation du deuxième chromosome X chez celles-ci²⁶. Une expression doublée de certains gènes pourrait être une cause potentielle du dimorphisme sexuel observé au niveau du cœur. Chez les mâles, une importante différenciation sexuelle se fait par le gène *Sry* lié au chromosome Y, principale cause de la descente des testicules²⁷. La différenciation des testicules établit la différence des niveaux des principales hormones sexuelles stéroïdiennes comme la testostérone, l'estriadiol et la progestérone. Ces hormones jouent des rôles permanents ou temporaires²⁸ et plusieurs études chez l'humain et l'animal ont montré des effets métaboliques et fonctionnels de ces hormones au niveau du cœur. Les androgènes, comme la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT) sont les hormones sexuelles dites mâles. Les estrogènes, comme le 17 β -estradiol sont les hormones dites femelles. Ces hormones stéroïdiennes sont présentes chez les deux sexes, mais leur concentration circulante est grandement différente. Ces hormones peuvent agir au niveau du cœur, puisqu'on y retrouve les récepteurs aux estrogènes (ER) et les récepteurs aux androgènes (AR)²⁹.

Les estrogènes

Les estrogènes sont les principales hormones sexuelles féminines. Ils sont essentiellement produits par les ovaires, mais sont aussi produits au niveau des os, des seins, du tissu adipeux et du cerveau³⁰. Les estrogènes sont obtenus à partir de la testostérone chez les deux sexes par l'action de l'aromatase³¹ (Figure 3). Les estrogènes agissent via deux

récepteurs nucléaires : ER α et ER β présents dans les cardiomyocytes²⁹. Ces récepteurs participent à la régulation de l'expression génique de diverses voies de signalisation³². Certaines études ont montré une implication dans les voies anti-apoptotiques³²⁻³⁴, anti-inflammatoires³⁵, angiogéniques³⁶⁻³⁸ et vasodilatrices³⁹, suggérant un effet bénéfique sur le cœur féminin. Le récepteur membranaire aux estrogènes couplé aux protéines G (GPER) a plus récemment été identifié comme récepteur aux estrogènes⁴⁰. Son activation par les estrogènes contribue à la vasodilatation⁴¹ et à la survie cellulaire⁴⁰. Ces trois récepteurs sont présents chez les deux sexes dans les cardiomyocytes des rongeurs et des humains²⁹. Les estrogènes naturellement en circulation sont l'estrone (E1), le 17 β -estradiol (E2) et l'estriol (E3). L'E2 est l'isoforme le plus puissant. Il est sécrété de façon pulsatile à travers le cycle ovarien^{42,43}. Avant la ménopause, les femmes ont 10 à 20 fois les taux d'estrogènes des hommes⁴⁴, alors qu'après la ménopause, les deux sexes auraient des taux semblables d'estrogène^{19,42}.

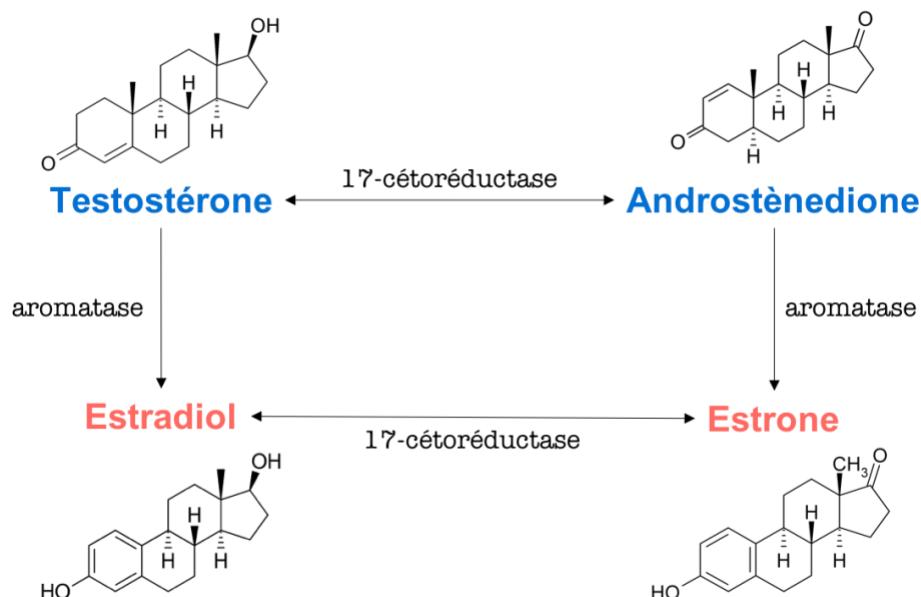


Figure 3. Schéma représentant la transformation de la testostérone, de l'androstènedione, de l'estradiol et de l'estrone.

Figure par É. Walsh-Wilkinson (2019) non publiée

Puisque la prévalence des maladies cardiovasculaires de toutes causes est plus faible chez les femmes préménopausées comparativement aux hommes et aux femmes ménopausées⁴⁵, les estrogènes sont souvent vus comme protecteurs. Plusieurs études se sont

intéressées à l'implication de ces hormones stéroïdiennes au niveau du cœur dans différents modèles. L'effet anti-apoptotique de l'E2 a d'abord été montré par Pelzer et al.⁴⁶ en culture cellulaire, suggérant un effet inhibiteur de l'E2 sur la transcription du facteur nucléaire kappa B (NFκB)^{46,47}. La voie de survie cellulaire Akt a aussi été montrée comme plus active chez les femmes et les femelles, par une accumulation nucléaire de Akt plus importante que celle des hommes⁴⁸. L'E2 activerait la phosphorylation et la translocation au noyau de Akt, réduisant ainsi la mort cellulaire⁴⁸⁻⁵⁰. Liou et al. montrent que l'ovariectomie (ovx) chez la souris, soit l'ablation des ovaires et l'arrêt de la production des estrogènes, active les voies signalétiques de mort cellulaire extrinsèque (par le ligand Fas) et intrinsèque (par l'activité mitochondriale)⁵¹. La voie apoptotique mitochondriale implique l'oligomérisation des protéines Bax et Bad, la libération du cytochrome C dans le cytosol et l'activation des caspases 3 et 9³³. L'absence des estrogènes chez des souris ovx augmente l'expression de ces protéines pro-apoptotiques et le traitement à l'E2 réduit leur expression⁵².

L'estradiol aurait aussi un effet angiogénique et vasodilatateur. Par l'activité de ses récepteurs ER α et ER β , l'E2 stimule la transcription des gènes *Hif-1* et *Vegf* dans le noyau, activant l'angiogenèse par la migration des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins à travers le myocarde³⁸. Les femmes ont aussi une plus grande production d'oxyde nitrique synthase (NOS)²², une enzyme catalysant la synthèse d'oxyde nitrique (NO) au profit des espèces réactives oxygénées (ROS)⁵³. Le NO est un important vasodilatateur permettant de réduire la résistance vasculaire et d'augmenter la disponibilité en oxygène^{54,55}. L'E2 serait responsable de l'expression élevée de iNOS et de eNOS dans les cardiomyocytes^{56,57} et l'ovx chez le rongeur aurait pour effet de réduire la synthèse de NO^{58,59}.

Les estrogènes sont aussi reconnus pour influencer le métabolisme énergétique, favorisant l'utilisation des acides gras au profit du glucose^{60,61}. L'ovariectomie chez la souris réduit l'expression de PPAR α et PGC1 α , deux importants facteurs de transcription régulant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la β -oxydation des acides gras⁶².

Considérant l'incidence des maladies cardiovasculaires plus faible chez les femmes prémenopausées et l'augmentation de celle-ci avec la perte des estrogènes, plusieurs ont

étudié la thérapie de remplacement hormonal chez les femmes ménopausées. Bien que certaines études suggèrent une réduction de l'incidence des maladies cardiovasculaires, d'autres montrent un risque cardiaque augmenté par la thérapie de remplacement. La grande étude *Estrogen plus Progestin trial of the Women's Health Initiative* (WHI) est la première étude randomisée contrôlée par un groupe placebo. Elle étudie le remplacement hormonal chez 16 608 femmes en post-ménopause depuis plusieurs années, âgées de 50 à 79 ans⁶³. La principale conclusion de l'étude est que la thérapie de remplacement est associée à l'augmentation du risque cardiovasculaire⁶³. D'ailleurs, l'étude a été arrêtée après 5,2 ans de suivi, car le risque devenait supérieur aux bénéfices. La seule thérapie hormonale étudiée était un traitement d'estrogènes équins conjugués combinés à de l'acétate de médroxyprogesterone⁶³. La molécule de Prémarine (estrogènes conjugués) utilisée n'est pas identique aux estrogènes féminins, puisqu'elle provient de l'urine de jument enceinte. L'étude d'autres types d'estrogènes aurait été pertinente dans cette étude. Bien que les hormones naturelles soient aussi fabriquées en laboratoire, leur structure est identique aux hormones produites naturellement par les ovaires, ce qui rend leur utilisation plus acceptable. Cette étude s'intéressait au traitement des complications liées à la ménopause, ce qui veut dire que la présence de facteurs de risque de maladie cardiovasculaire ou autres ont probablement biaisé les conclusions tirées. L'étude *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* (HERS) s'intéresse à un groupe de femmes dont la moyenne d'âge était de 67 ans. Après un suivi de 6,8 années, la thérapie hormonale n'a montré aucun effet significatif sur le risque cardiovasculaire⁶⁴. Les auteurs de l'étude suggèrent de ne pas prescrire la thérapie de remplacement hormonal chez les femmes ménopausées. Ces deux études ont aussi mené à l'hypothèse de l'influence du temps d'initiation de la thérapie de remplacement (*timing hypothesis*) sur le risque cardiovasculaire. Selon les études, le risque cardiaque est augmenté lorsque la thérapie est débutée tard après la ménopause^{63,65}. Récemment, l'hypothèse du temps d'initiation a été abordée dans les études *Kronos Early Estrogen Prevention Study* (KEEPS)⁶⁶ et *Early versus Late Intervention Trial with Estradiol* (ELITE)⁶⁷. Les résultats de KEEPS montrent que pour bénéficier des avantages de la thérapie de remplacement, le traitement doit être débuté tôt après le début de la ménopause⁶⁶. Les auteurs de l'étude ELITE montrent que la thérapie de remplacement est associée à une réduction des cas d'athérosclérose lorsque la thérapie est débutée à l'intérieur des 6 ans

suivant le début de la ménopause, mais pas lorsqu'elle est initiée plus de 10 ans après⁶⁷. Il est à noter que toutes ces études ont porté leur attention sur la maladie coronarienne et l'athérosclérose. Les autres causes non ischémiques de maladies cardiovasculaires n'ont pas été étudiées explicitement.

Les androgènes

Les androgènes sont les hormones sexuelles dites masculines. Ils comprennent la testostérone et la DHT, le métabolite actif de la testostérone. La testostérone est convertie en DHT par l'enzyme 5α-réductase. La DHT a la capacité de lier le récepteur nucléaire aux androgènes de 2 à 5 fois plus fortement que la testostérone et peut induire près de 10 fois plus efficacement la transcription de plusieurs gènes^{68,69}. Les androgènes sont aussi présents en faible concentration chez les femmes. Chez les rongeurs mâles, les androgènes sont synthétisés par les testicules alors que chez l'humain, la synthèse peut aussi avoir lieu de façon périphérique au niveau des glandes surrénales⁷⁰. Les androgènes agissent via le récepteur aux androgènes exprimé dans les cardiomycocytes⁷¹. Son action peut être nucléaire pour réguler l'expression de facteurs de transcription ou membranaire et non-génomique pour activer une variété de voies de signalisation⁷². L'effet anabolisant des androgènes favorise l'augmentation de la masse cardiaque, la synthèse de fibres musculaires et donc le développement de l'hypertrophie cardiaque (HC). Selon plusieurs, la testostérone activerait les voies de signalisation pro-hypertrophiques comme ERK1/2 (kinases régulées par un signal extracellulaire) et PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase/Serine/thréonine kinase)⁷³⁻⁷⁵. Selon les observations de Duran et al. sur les cardiomycocytes en culture, la croissance cellulaire induite par la testostérone impliquerait aussi l'activation de la calcineurine, le recrutement du facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT) et l'inhibition de la glycogène kinase synthase 3 (GSK3), un inhibiteur de NFAT⁷⁴. Une autre voie de signalisation activée par la testostérone serait celle de la cible de la rapamycine (mTORC1), un important régulateur de la croissance cellulaire^{75,76}. En plus d'un effet hypertrophique, la testostérone joue un rôle au niveau de l'organisation de la matrice extracellulaire (MEC). L'administration chronique de testostérone pour 8 semaines chez des rats mâles augmente la rigidité du myocarde par une plus grande activité de la lysyl oxydase (Lox), l'enzyme responsable de l'organisation croisée des fibres de collagène de la MEC⁷⁷. L'étude de Wilson

et al.⁷⁸ suggère aussi un effet de la testostérone sur le métabolisme énergétique. L'ajout de testostérone dans le milieu de culture des cardiomycocytes montre une augmentation de l'entrée du glucose dans la cellule par le transporteur GLUT4⁷⁸. Ainsi, la testostérone participerait aussi au dimorphisme sexuel observé au niveau métabolique en favorisant l'entrée de glucose, contrairement aux estrogènes qui favorisent l'oxydation des acides gras.

Ces mécanismes activés par les androgènes laissent penser que la présence de ces derniers est néfaste pour le cœur, mais des bénéfices de ceux-ci doivent être soulignés. En effet, la testostérone favorise la libération de Ca₂₊ dans les cardiomycocytes par l'activation de la phospholipase C et de l'inositol triphosphate (IP3), augmentant la capacité contractile^{79,80}. La présence de testostérone serait bénéfique dans une certaine mesure, améliorant la force contractile et la tolérance au stress mécanique. Il est possible que la DHT, ayant la capacité d'activer plus efficacement les activités signalétiques, soit plus délétère que la testostérone. Certaines études suggèrent que la conversion de la testostérone en DHT exagère la réponse hypertrophique et que l'inhibition de la 5α-réductase serait bénéfique pour limiter le remodelage cardiaque en condition pathologique⁸¹.

Chez les hommes, les niveaux de testostérone commencent à baisser après 40 ans et la mortalité cardiovasculaire augmente avec l'âge⁸². À présent, aucune étude clinique n'a prouvé que la thérapie de remplacement par la testostérone était associée à l'augmentation du risque cardiovasculaire⁸³. Un regroupement international d'experts a publié en 2016 dans le *Mayo clinic proceedings* que le risque cardiovasculaire n'était pas augmenté par la thérapie de remplacement de la testostérone et que les résultats montraient une forte tendance vers un certain bénéfice d'une concentration élevée de testostérone chez les hommes âgés⁸⁴.

Malgré une association entre les niveaux d'hormones sexuelles et le risque cardiovasculaire, il n'est pas clair si la meilleure intervention thérapeutique est de modifier les taux d'hormones stéroïdiennes, ou du moins leur action, chez les deux sexes. Il est important de poursuivre la recherche pour mieux comprendre les mécanismes activés par ces hormones dans une variété de situations pathologiques chez les hommes comme chez les femmes.

Tableau 1. Résumé des effets des estrogènes et des androgènes au niveau du cœur

Estrogènes	Androgènes
Survie cellulaire	Effet anabolisant (croissance cellulaire)
Anti-inflammatoire	Possiblement pro-athérogènes
Angiogenèse	Réorganisation de la MEC (Remodelage cardiaque)
Vasodilatation	Entrée de Ca ²⁺ dans le myocarde
Utilisation des acides gras au profit du glucose (cardiomyocytes)	Entrée du glucose au profit des acides gras (cardiomyocytes)

Hypertrophie cardiaque

Le cœur a la capacité de s'adapter rapidement à des variations hémodynamiques qui surviennent sur une courte période de temps. Lorsque l'augmentation de la pré ou de la postcharge est maintenue, le cœur compense par l'hypertrophie cardiaque. L'HC est l'élargissement ou l'épaississement du cœur en réponse à une surcharge pour normaliser le stress induit sur les parois. L'HC se traduit par l'augmentation de la taille des cardiomyocytes et donc par un gain de masse du cœur. L'HC peut être la conséquence d'un stress de nature physiologique, comme l'entraînement ou la grossesse, ou d'origine pathologique, comme à la suite d'un infarctus du myocarde ou d'une dysfonction valvulaire. L'hypertrophie physiologique est caractérisée par l'augmentation de 10 à 20% du poids du cœur⁸⁵. La croissance des cardiomyocytes se fait de façon proportionnelle, soit dans le sens de la longueur et de la largeur⁸⁵. La fonction contractile est conservée ou augmentée, le cœur augmente sa production énergétique, l'angiogenèse est suffisante pour compenser la croissance cellulaire et il n'y a pas de fibrose ou de mort cellulaire⁸⁵. L'HC physiologique et ses adaptations restent réversibles et ne progressent pas vers l'insuffisance cardiaque. En HC pathologique, des changements ont aussi lieu au niveau de la matrice extracellulaire, des vaisseaux sanguins et du métabolisme énergétique. Les fibroblastes participent au remodelage en augmentant la synthèse de protéines de la matrice, ce qui peut mener à des phénomènes délétères comme la rigidification du myocarde. Le processus angiogénique est activé pour compenser le gain de masse du cœur, mais il peut être insuffisant et l'apport en

oxygène des cardiomyocytes hypertrophiés est alors limité. Pour diminuer sa consommation en oxygène, le cœur tend à augmenter son utilisation de glucose pour produire son énergie, au profit des acides gras⁸⁶⁻⁸⁸. L'HC pathologique et ses adaptations morphologiques, cellulaires et moléculaires sont souvent irréversible et le cœur progressera vers l'insuffisance cardiaque.

Les causes de l'hypertrophie cardiaque

Deux formes de surcharge hémodynamique peuvent être à l'origine de l'HC : la surcharge de pression et la surcharge de volume. La surcharge de pression est l'augmentation de la post-charge, soit lorsque le cœur doit augmenter la pression nécessaire pour éjecter le sang d'une cavité. L'hypertrophie induite est de type concentrique pour générer une plus grande force de contraction (Figure 4): les parois s'épaissent par l'ajout de sarcomères en parallèle, soit dans le sens de la largeur (Figure 5) et le diamètre interne de la cavité cardiaque est réduit. Selon la loi de Laplace, le stress pariétal est proportionnel à la pression interne et au rayon d'une cavité, et inversement proportionnel à l'épaisseur des parois⁸⁹. C'est une loi importante dans l'adaptation hypertrophique, car le cœur cherche à réduire la tension sur ses parois. En épaisissant ses parois, le cœur génère une plus grande force contractile, compense l'augmentation de la pression et diminue le stress pariétal. La surcharge de volume est l'augmentation de la précharge, soit l'augmentation du volume de sang arrivant dans une cavité cardiaque. Pour réduire le stress pariétal, la cavité s'hypertrophie de façon excentrique (Figure 4). Elle se dilate en ajoutant des sarcomères en série (Figure 5), soit au bout d'un sarcomère. Ces ajouts augmentent la vitesse de raccourcissement des sarcomères, augmentant ainsi la force produite par le muscle cardiaque accueillant un plus grand volume sanguin.

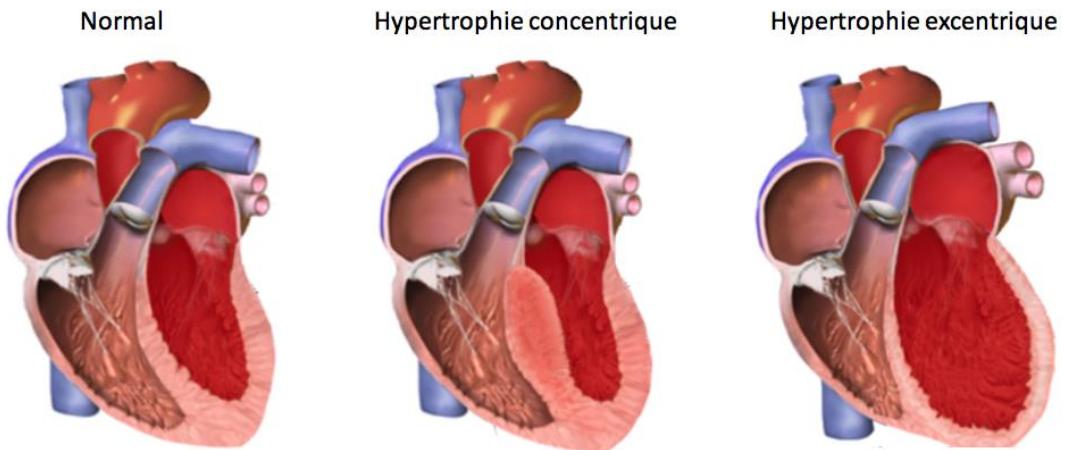


Figure 4. Remodelage hypertrophique du ventricule gauche en réponse à une surcharge hémodynamique.

Adaptée de Cardiomyopathy sur Wikipedia par Npatchett sous licence Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=39235258>

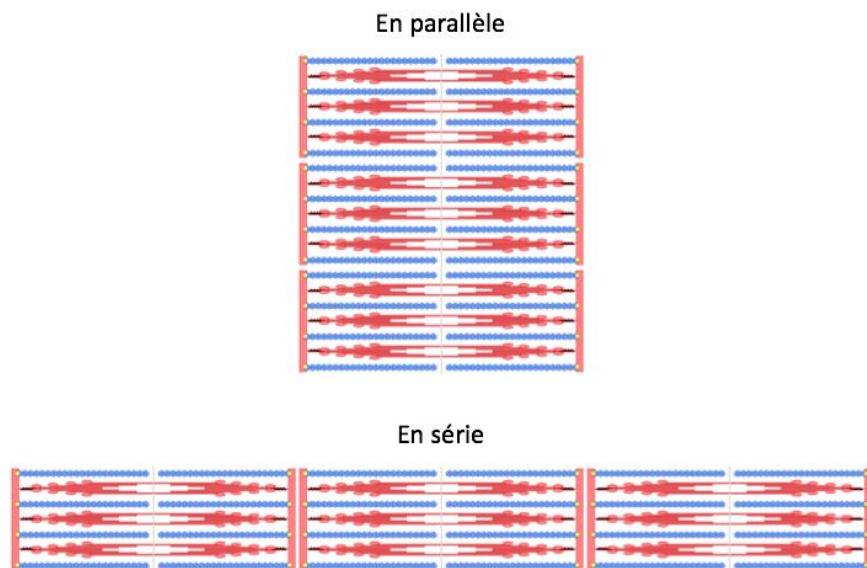


Figure 5. L'ajout de sarcomères en parallèle et en série.

Adaptée de Sarcomeres sur Wikipedia par David Richfield, 2014 sous licence Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported, <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sarcomere.svg#filelinks>

L’ischémie causée par l’infarctus du myocarde peut être à l’origine de l’HC pathologique. La perte de l’apport sanguin oxygéné au muscle cardiaque cause la nécrose des cardiomyocytes et une difficulté du cœur à contracter correctement. Pour compenser la perte cellulaire, le cœur s’hypertrophie⁸⁵. Les cardiomyopathies hypertrophiques et dilatées

causées par des anomalies génétiques peuvent elles aussi entraîner un remodelage cardiaque et l'hypertrophie peut être de type concentrique ou excentrique. L'hypertension artérielle est la forme de surcharge de pression menant à l'HC avec la prévalence la plus élevée⁴⁵. L'hypertrophie est généralement concentrique, puisque le ventricule doit augmenter sa force contractile pour compenser la résistance causée par un réseau artériel moins *compliant*.

Les dysfonctions des valves cardiaques causées par la fuite ou l'ouverture incomplète de ces dernières peuvent favoriser l'HC. Par exemple, la sténose de la valve aortique est caractérisée par l'épaississement et la rigidification de la valve aortique, causant un rétrécissement de l'ouverture de la valve. La postcharge est augmentée, les cardiomyocytes augmentent leur taille principalement par l'ajout de sarcomères en parallèle et le VG s'épaissit pour réduire le stress pariétal et améliorer la force contractile. L'activation des fibroblastes stimule la réorganisation de la MEC participant aussi à l'épaississement des parois et à la rigidification du VG. Ce type de remodelage peut mener à la réduction du diamètre de la chambre, favorisant l'augmentation de l'épaisseur relative des parois (épaisseur des parois par rapport au diamètre de la chambre). Le remodelage hypertrophique concentrique en réponse à la sténose aortique serait lié à une importante altération de la fonction diastolique, à l'augmentation du risque cardiovasculaire et à la mortalité, comparativement au maintien d'une géométrie normal du VG ou au remodelage excentrique⁹⁰. La régurgitation de la valve aortique (RA) est la dysfonction valvulaire dont il sera plus particulièrement question dans ce mémoire. Il s'agit de la fuite de la valve aortique causant un retour de sang anormal de l'aorte vers le VG lors de la diastole. En réponse à l'augmentation de la précharge, le VG se dilate pour accueillir un plus grand volume sanguin. Les cardiomyocytes augmentent leur taille par l'ajout de sarcomères en série et la chambre du VG s'agrandit pour réduire le stress pariétal. L'épaisseur du VG peut être réduit, ce qui accentue la réduction de l'épaisseur relative des parois. Ces mécanismes hypertrophiques, qu'ils soient concentriques ou excentriques, ne sont possiblement pas totalement compensatoires. Ils seraient plutôt maladaptifs lorsque maintenu dans le temps, favorisant les dysfonctions ventriculaires.

La régurgitation aortique

La RA ou l'insuffisance aortique est une maladie valvulaire plutôt rare dans les pays occidentaux où son développement peut être favorisé par la présence d'un syndrome métabolique comme le diabète ou la dyslipidémie, par des facteurs génétiques comme la bicuspidie de la valve, par la dilatation de la racine aortique, ou par la dégénérescence de la valve liée à l'âge⁹¹. Selon l'étude Framingham⁹², l'incidence et la sévérité de la régurgitation aortique augmentent avec l'âge^{45,91}. La RA modérée à sévère touche 2% de la population âgée de 75 ans et plus⁴⁵. Selon les études CARDIA, ARIC et CHS, après ajustement pour l'âge et le sexe, la prévalence de la RA est de 0,5%⁹³. L'incidence de la RA est plus élevée chez les hommes, qui reçoivent d'ailleurs leur diagnostic plus tôt que les femmes^{45,92}. La bicuspidie de la valve aortique, soit le fait d'avoir deux feuillets de la valve aortique, plutôt que trois, mène souvent à la sténose aortique⁴⁵. La mauvaise fermeture de la valve peut aussi causer la RA seule ou en combinaison avec la sténose, augmentant le risque de complications cardiaques. Le risque de développer une RA liée à la bicuspidie de la valve aortique est plus élevé chez les hommes (52%) que chez les femmes (35%)⁴⁵. La prévalence de la RA est plus élevée dans les pays en voie de développement où l'accès aux soins de santé est limité. Son développement est souvent lié à des complications inflammatoires de rhumatisme articulaire aigu^{94,95}. Une fibrose s'installe au niveau des feuillets de la valve aortique, les empêchant de bien refermer lors de la diastole. Une mauvaise prise en charge par antibiotique ou l'absence de traitement peut causer d'importantes complications cardiaques. Une autre cause de la RA est la fuite paravalvulaire pouvant survenir après le remplacement valvulaire par chirurgie. Les patients avec une sténose sévère de la valve aortique font partie de la population sujette au remplacement valvulaire chirurgical. Selon Pibarot et al., l'incidence du développement d'une RA modérée à sévère après la chirurgie par *transcatheter aortic valve replacement* (Remplacement transcathéter de la valve aortique; TAVR) peut atteindre 24%⁹⁶. Le TAVR est une technique chirurgicale peu invasive permettant la réparation d'une valve sans retirer celle-ci. Cette technique permet le remplacement valvulaire chez des patients dont le risque chirurgical est élevé et sa pratique gagne rapidement en popularité. Le remplacement de la valve aortique est souvent nécessaire pour les patients avec sténose aortique. Le développement d'une RA après un remplacement valvulaire est donc associé à une importante mortalité, considérant qu'une fuite aortique, qu'elle soit petite ou grande, peut

avoir d'importantes conséquences fonctionnelles chez les patients ayant déjà un VG épaissit, plus rigide et/ou dont le diamètre est réduit⁹⁶. Aucun traitement pharmacologique n'a été prouvé efficace pour réduire la RA ou empêcher l'HC causée par celle-ci, le remplacement valvulaire par chirurgie étant le seul traitement actuellement disponible⁹⁷. Bien que la chirurgie valvulaire se soit grandement améliorée au cours des dernières années, il reste essentiel de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement et l'évolution de l'insuffisance aortique chez les deux sexes pour identifier de nouvelles avenues thérapeutiques et améliorer la prise en charge du patient.

L'évolution vers l'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque (IC) est la perte de la capacité du cœur à pomper le sang. Son origine peut être multiple, mais l'HC pathologique est parmi les facteurs de risque les plus importants de la progression du cœur vers l'IC⁹⁸. L'incidence de l'IC est de 2,1% chez la population de plus de 65 ans⁹⁹. La mortalité est de 42,3% après 5 ans et aucun traitement curatif n'existe¹⁰⁰. L'IC diastolique survient lorsque le ventricule perd de sa *compliance*, qu'il devient plus rigide et qu'il perd sa capacité à bien se remplir. Lorsque c'est la contractilité du ventricule qui est réduite, le volume sanguin éjecté à chaque contraction cardiaque est réduit et l'IC est systolique. Lorsque la perte de fonction touche le ventricule gauche, le sang peut refluer vers l'oreillette gauche, puis vers les veines pulmonaires, augmentant ainsi les pressions pulmonaires et pouvant causer l'IC du côté droit¹. Lorsque la perte de fonction touche le ventricule droit, le sang retourne dans les veines de la circulation systémique¹. En insuffisance aortique par exemple, le VG se dilate, les fibres cardiaques sont étirées et le ventricule peut perdre de sa capacité à accueillir le sang ou les contractions peuvent perdre de leur efficacité. Lorsque les mécanismes compensatoires ne sont plus suffisants pour contrer le stress hémodynamique, le cœur hypertrophié évolue vers l'insuffisance cardiaque.

Adaptations du cœur en hypertrophie cardiaque

L'HC pathologique est un processus complexe impliquant une variété de modifications morphologiques, signalétiques, transcriptionnelles, métaboliques et fonctionnelles dans les cardiomyocytes hypertrophiés¹⁰¹. La réaction du cœur au stress

pathologique semble bénéfique en premier lieu, mais avec le temps, ces adaptations ne sont plus suffisantes pour compenser la surcharge, les fonctions systolique et diastolique se détériorent, les symptômes apparaissent et le cœur progresse vers l'IC. À ce moment, la dysfonction du myocarde est irréversible et le rétablissement après le traitement chirurgical devient plus difficile⁹⁸. Les principaux processus activés en réponse à la RA seront abordés pour résumer ce qui est connu de la physiopathologie hypertrophique.

Modifications morphologiques

En surcharge de volume, il y a recrutement de sarcomères en série pour permettre l'augmentation du volume cellulaire des cardiomyocytes et du volume du VG¹⁰². Ces changements de forme et de taille de la chambre permettent souvent un maintien de la fraction d'éjection et les patients peuvent rester asymptomatiques pendant longtemps. La voie de signalisation mTORC1 est en partie responsable de l'hypertrophie et son inhibition réduit le gain de masse induit par l'hypertrophie pathologique chez le rongeur^{73,103}. Avec les changements morphologiques, un processus angiogénique doit prendre place pour permettre le maintien de l'oxygénéation des cardiomyocytes hypertrophiés. VEGF, eNOS et HIF-1 sont des molécules angiogéniques essentielles au maintien de la densité capillaire du myocarde^{85,104–106}. En hypertrophie physiologique, le réseau capillaire grossit proportionnellement à la croissance cellulaire¹⁰⁴. En hypertrophie pathologique, la croissance du réseau est insuffisante, ce qui peut mener à l'hypoxie, à un mauvais apport en nutriments et donc à la réduction de la production énergétique¹⁰⁴. Dans un modèle de surcharge de volume chez le rat, la densité capillaire est significativement réduite^{107,108}. D'importants changements ont aussi lieu au niveau de la matrice extracellulaire pour s'adapter à l'augmentation de taille des cardiomyocytes. Les fibroblastes activent la synthèse de composantes comme le collagène et la fibronectine^{109–111}. Cette synthèse peut être excessive, ce qui a pour effet de rigidifier le ventricule. En HC pathologique, on observe aussi une transition dans les chaînes lourdes de myosine (MHC) dans les sarcomères. En condition physiologique chez le rongeur, la forme α -MHC est prédominante puisqu'elle permet une hydrolyse rapide de l'ATP et une contraction cardiaque efficace, comparativement à la forme β qui hydrolyse plus lentement les molécules d'ATP, réduit la force contractile, mais réduit aussi la consommation énergétique^{81,112}. Chez l'humain, c'est la forme β -MHC qui est la plus

abondante, puisque la fréquence cardiaque est moins élevée. En HC pathologique, il y a une augmentation du ratio β -MHC/ α -MHC^{81,87}, participant à la réduction de la capacité contractile, mais aussi à la réduction de la consommation d'énergie. L'hypertrophie pathologique peut aussi être associée à la mort cellulaire. La perte des cardiomyocytes est remplacée par les fibres de collagène et cette accumulation est associée à la rigidification du myocarde et à la perte de capacité contractile et de relaxation du cœur.

Métabolisme énergétique

La réduction de l'apport en oxygène aux cardiomyocytes force le cœur au transfert de l'utilisation des acides gras comme substrat énergétique préférentiel vers l'utilisation du glucose¹¹³. En effet, la glycolyse consomme moins d'oxygène que la β -oxydation et le cœur peut arriver à générer suffisamment d'énergie pour conserver une bonne fonction contractile¹¹⁴. Une partie de ce changement est médiée par HIF-1, un facteur de transcription activé lorsque la demande en oxygène est supérieure à l'offre. HIF-1 favorise la production de facteurs angiogéniques, régule le métabolisme du glucose et inhibe la synthèse de PPAR α , un facteur régulant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras¹¹³. Dans le modèle de régurgitation aortique chez le rat, l'expression des facteurs de transcription clés du métabolisme énergétique comme PPAR α et PGC1 α est fortement réduite, ce qui peut affecter l'activité de nombreuses enzymes impliquées dans la β -oxydation des acides gras¹⁰⁷. Le métabolisme myocardique est anormal chez les rats mâles après seulement deux semaines de régurgitation aortique¹⁰⁷.

Système adrénnergique

La surcharge induite par la RA active le système nerveux sympathique pour favoriser le maintien de l'activité cardiaque. Le système adrénnergique participe à l'augmentation de la fréquence et de la contraction cardiaque. Les catécholamines, via leurs récepteurs β à la surface cellulaire, activent l'entrée de calcium intracellulaire, permettant une plus forte contraction et accélérant la fréquence cardiaque⁹. Via l'AMPc, l'activation de la protéine PKA et l'activation de SERCA, les catécholamines peuvent aussi améliorer la relaxation cardiaque⁹. En condition pathologique, le système adrénnergique devient rapidement dommageable lorsqu'il est maintenu activé dans le temps. L'activité du récepteur kinase

couplé aux protéines (GRK) est augmentée, favorisant la désensibilisation et la réduction du nombre de récepteurs β -adrénergiques à la surface membranaire, causant la dysfonction des cardiomycocytes et accélérant la progression du cœur vers l'IC⁹. Le cœur peut aussi souffrir de toxicité aux catécholamines. Dans les modèles animaux, la stimulation chronique des catécholamines induit un excès de calcium, des niveaux élevés d'AMPc et un important stress oxydatif par la génération de ROS¹¹⁵. Ces altérations favorisent la mort cellulaire, la fibrose et la dysfonction ventriculaire¹¹⁶. La toxicité aux catécholamines mène ainsi à des modifications morphologiques néfastes, aggravant la réponse hypertrophique pathologique.

Système rénine-angiotensine-aldostérone

En parallèle au système adrénnergique, le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS) exerce aussi une activité neurohormonale caractéristique de l'HC. Il régule la balance en sodium et la pression sanguine¹¹⁷. En IC, la perfusion des reins est diminuée, ce qui active la libération de rénine par le système nerveux sympathique. L'angiotensinogène formée au foie est davantage transformée en angiotensine I par la rénine et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) génère rapidement l'angiotensine II (AngII). L'AngII favorise la libération d'aldostérone par les glandes surrénales, augmentant la réabsorption de sodium par les reins¹¹⁷. De plus, l'AngII, par l'activité de son récepteur de type 1 (AT1R) est impliquée dans le développement de l'HC. Elle favorise la vasoconstriction par l'endothéline-I, le remodelage cardiaque via les métalloprotéinases de la matrice (MMP) et la croissance des cardiomycocytes¹¹⁷⁻¹¹⁹. Le récepteur à l'angiotensine II de type II (AT2R) n'est pas impliqué dans le développement de l'HC, puisqu'il favorise plutôt la vasodilatation¹²⁰. Les taux élevés d'AngII en HC pathologique induisent un important stress oxydatif au niveau des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins. L'AngII favorise la libération de ROS par l'activité oxydase de NADPH et NADH¹²¹. Ce stress oxydatif favorise la dysfonction endothéliale, la croissance cellulaire et les processus inflammatoires¹¹⁷.

Les peptides natriurétiques

Les peptides natriurétiques forment le principal mécanisme de régulation du RAAS. Les principaux peptides sont le facteur natriurétique de l'oreillette (Anp) et le facteur

natriurétique du cerveau (Bnp), produits respectivement par l'oreillette et le VG en réponse au stress d'étirement des parois. Les peptides natriurétiques activent les récepteurs A et B (NPR A/B) ¹²². Une fois activés, ceux-ci catalysent la production de GMPc à partir du GTP, activant une variété de cascades signalétiques. Les peptides natriurétiques ont la capacité de favoriser la vasodilatation via la production de GMPc et d'inhiber le RAAS¹²². En insuffisance cardiaque, une résistance au mécanisme des peptides peut se développer et le RAAS se trouve ainsi suractivé¹¹⁸. C'est la durée de l'insuffisance cardiaque et non pas sa sévérité qui est associée au développement de la désensibilisation aux peptides¹²³. Lorsque le cœur développe la résistance aux peptides natriurétiques, la concentration de peptides et la quantité de récepteurs restent élevés, la capacité des récepteurs à lier un peptide est toujours bonne, mais la concentration de GMPc est réduite et la cascade de réponses normalement induite par le GMPc est diminuée¹²⁴. Cette résistance semble être favorisée par la désensibilisation des récepteurs par la déphosphorylation de leur domaine kinase, empêchant la conversion du GTP en GMPc¹²⁵. D'autres études montrent que la concentration élevée de Bnp chez les patients IC est principalement composée de proBNP, la forme inactive. Une fois produit, le Bnp ne serait pas correctement transformé dans sa forme active^{126,127}. D'autres évidences suggèrent une augmentation de l'expression de PDE5, une phosphodiesterase capable de dégrader le GMPc, pour expliquer la désensibilisation aux peptides natriurétiques^{124,128,129}.

Traitements de l'hypertrophie cardiaque

Bien que la chirurgie soit le seul traitement curatif de la RA, il semble possible de réduire l'HC du VG par des agents pharmacologiques ciblant le système neurohormonal. Ces médicaments peuvent cibler les récepteurs β -adrénergiques, le RAAS ou les peptides natriurétiques.

Les β -bloqueurs sont utilisés en clinique pour inhiber les effets des catécholamines en liant les récepteurs adrénnergiques $\beta 1$ tout en augmentant leur densité¹³⁰. Le carvedilol et le métoprolol réduisent les symptômes, améliorent la fonction ventriculaire gauche¹³¹⁻¹³³ et réduisent la mortalité cardiovasculaire chez les patients avec insuffisance cardiaque¹³⁴⁻¹³⁶. Les β -bloqueurs sont efficaces dans un modèle de RA chez le rat en réduisant l'hypertrophie,

la fibrose et le remodelage de la matrice extracellulaire^{137–139}. Chez le rat RA, 6 mois de traitement au métoprolol réduisent l'hypertrophie cardiaque de 49%¹³⁷, ce qui suggère une forte implication du système adrénnergique dans le développement de l'hypertrophie en réponse à la RA.

La reconnaissance du système neurohormonal RAAS dans le développement de l'HC a mené au développement de médicaments ciblant les composants clés comme l'ECA et le AT1R. L'inhibition de l'activité du RAAS réduit la pression sanguine et l'hypertrophie cardiaque¹¹⁷. L'effet bénéfique sur le cœur est plus important que ce qu'on observe avec un traitement β -adrénnergique^{140,141}. Les inhibiteurs de l'ECA comme le captopril réduisent la synthèse de l'AngII. Chez le rat, le captopril réduit l'hypertrophie induite par la surcharge de volume causée par la régurgitation sévère de la valve aortique et permet le maintien d'une meilleure fonction ventriculaire gauche¹⁴². Certaines études ont montré que les inhibiteurs de l'ECA étaient moins efficaces puisqu'un niveau significatif d'AngII demeurait malgré un traitement à long terme^{143–145}. Il semble que la chymase, une enzyme sérine protéase capable de transformer l'angiotensine I en AngII dans le myocarde, soit responsable de ce maintien des niveaux d'AngII malgré la présence d'un inhibiteur de l'ECA¹⁴⁶. Des études ont même montré que la chymase avait une capacité de formation de l'AngII semblable à celle de l'ACE¹⁴⁷. Les agents antagonistes du AT1R comme le valsartan, le losartan et l'olmesartan empêchent aussi une partie de l'effet de l'AngII sans toutefois diminuer ses niveaux circulants. Les inhibiteurs du AT1R empêchent la cascade signalétique de l'AngII¹⁴⁸ et sont très bien tolérés chez l'humain¹¹⁷. Ils réduisent les cas d'hospitalisation et la mortalité cardiaque chez l'humain de façon semblable aux inhibiteurs de l'ECA^{148–150}. Chez le rat RA, 6 mois de traitement au losartan sont efficaces pour ralentir le remodelage et la perte de fonction ventriculaire gauche de façon semblable au captopril¹⁵¹.

Une nouvelle approche thérapeutique pour limiter l'HC est la combinaison du valsartan, un antagoniste du AT1R, et du sacubitril, un inhibiteur de l'endopeptidase neutre (EPN). L'inhibition de l'EPN réduit la dégradation des peptides natriurétiques, donnant un bénéfice supplémentaire à l'effet antagoniste du AT1R^{152,153}. L'EPN agit aussi sur d'autres peptides, comme la substance P et la bradykinine¹⁵⁴ qui sont des peptides vasoactifs

favorisant la vasodilatation en relâchant le NO¹⁵⁵. L'entresto (LCZ696) est le médicament combinant le sacubitril et le valsartan. Il réduit considérablement la mortalité et améliore la condition des patients avec IC^{152,154}. Le sacubitril/valsartan est utilisé en clinique pour le traitement de l'IC depuis la grande étude PARADIGM¹⁵². L'étude a d'ailleurs été arrêtée plus tôt, car le bénéfice était très grand chez les patients traités au LCZ696 comparativement au groupe contrôle. Par contre, les effets à long terme de l'utilisation de ce médicament n'ont toujours pas été montrés. Dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez le rat, le traitement au sacubitril/valsartan montre un important bénéfice au niveau de la fonction vasculaire¹⁵⁶. En effet, le plus grand avantage de l'ajout du sacubitril au traitement du valsartan semble être la forte concentration de NO myocardique et vasculaire, protégeant le myocarde et améliorant la fonction ventriculaire gauche¹⁵⁶.

L'activation des mécanismes moléculaires de l'hypertrophie cardiaque physiologique pourrait être bénéfique pour le traitement de l'insuffisance cardiaque. Dans certaines études chez les rongeurs, l'entraînement physique prévient la progression de l'HC pathologique et améliore quelques anomalies moléculaires et fonctionnelles¹⁵⁷. L'effet bénéfique de l'exercice physique aérobie pourrait être lié à l'activation de l'activité PI3K impliquée dans la survie et la croissance cellulaire physiologique¹⁵⁷. L'exercice renverse la surexpression des gènes associés à l'hypertrophie pathologique. Dans un modèle de cardiomyopathie dilatée chez la souris, le bénéfice est le même, sinon plus grand qu'un traitement à l'inhibiteur de l'ACE ou à l'inhibiteur du système β-adrénergiques¹⁵⁷. Notre équipe a aussi montré un bénéfice de l'exercice aérobie chez le rat RA. L'hypertrophie physiologique limite le développement de l'hypertrophie pathologique, améliore la fonction diastolique du VG, réduit la fibrose, augmente l'expression des récepteurs β-adrénergiques et améliore la survie des rats RA^{88,158,159}.

Dimorphisme sexuel dans l'hypertrophie cardiaque

Selon le rapport de l'*American Heart Association* (AHA) de 2019, la prévalence des maladies cardiovasculaires est plus importante chez les hommes de 20 à 39 ans comparativement aux femmes du même âge (29,8% vs. 17,2%, respectivement)⁴⁵. C'est à l'âge de 60 ans, soit après la ménopause, que la prévalence des femmes rejoint celle des

hommes, touchant près de 78% de la population âgée⁴⁵. Après la ménopause, le risque cardiaque est fortement augmenté chez les femmes et la mortalité est élevée^{19,160}. La première cause d'IC chez les hommes est l'ischémie, alors que c'est l'hypertension artérielle chez les femmes²⁸. Les hommes développent souvent une dysfonction systolique associée à un remodelage plus excentrique (IC avec fraction d'éjection réduite) et l'hypertension chez les femmes est associée à la dysfonction diastolique et à une hypertrophie concentrique (IC avec fraction d'éjection préservée)^{161,162}. En effet, les hommes représentent environ les trois quarts des patients atteints d'IC avec fraction d'éjection réduite, alors que les femmes forment la moitié des patients atteints d'IC avec une fraction d'éjection préservée^{163,164}. Le développement de l'IC chez la femme est souvent moins symptomatique¹⁶⁵ et les facteurs de risques ne sont pas les mêmes et n'ont pas la même incidence entre les deux sexes⁴⁵. Par exemple, la cigarette, le diabète et l'obésité sont associés à une prévalence de maladies cardiovasculaires plus élevée chez les femmes¹⁶⁶, puisque les mécanismes physiopathologiques impliqués sont différents¹⁶⁷.

Le remodelage ventriculaire en réponse à une maladie valvulaire peut être influencé par les différences sexuelles présentes au niveau du système RAAS, de l'activité de l'oxyde nitrique ou de l'activité de la norépinephrine. Une autre possibilité moins étudiée est que le myocarde soit influencé par un motif sexuel lors de la formation fœtale, modulant l'adaptation du cœur au cours de la vie adulte¹⁶⁸. Certaines études montrent aussi que l'hypertrophie cardiaque apparaît plus tard dans la vie des femmes, mais qu'une fois établie, c'est un facteur de risque pour l'IC plus important comparativement aux hommes¹⁶⁹. Les symptômes, l'évolution de la maladie et la réponse aux traitements sont souvent différents pour les deux sexes et des études montrent que la prise en charge est aussi différente²³. Les interventions du côté de la prévention sont moins fréquentes auprès femmes et les traitements sont souvent moins agressifs. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le dimorphisme sexuel en hypertrophie cardiaque permettra une plus grande prévention et une meilleure prise en charge des patients des deux sexes.

Les femmes sont prédisposées à développer de l'hypertrophie cardiaque physiologique lors de la grossesse, ce qui peut être un avantage. En effet, la grossesse est une

forme de surcharge de volume sur le cœur et ce dernier s'adapte en s'hypertrophiant tout en préservant un bon apport en oxygène au myocarde¹⁷⁰. Les voies signalétiques activées sont protectrices et réversibles, puisque l'hypertrophie est rapidement renversée après l'accouchement¹⁷¹. Entre autres, le RAAS est activé pour maintenir la fréquence cardiaque dès 6 semaines de grossesse¹⁷². L'entraînement aérobie induit aussi une forme d'hypertrophie physiologique et l'hypertrophie cardiaque développée est généralement plus importante chez les femmes et les femelles¹⁷³. Il est ainsi possible que le cœur féminin soit mieux adapté à une surcharge hémodynamique, qu'elle soit pathologique ou physiologique.

Cette hypothèse est loin d'être confirmée, puisque la majorité des études s'intéressant aux maladies cardiovasculaires s'appuie sur des observations faites principalement, sinon essentiellement chez des individus de sexe masculin¹⁷⁴. Les conclusions tirées de ces études ne s'appliquent possiblement pas en totalité au sexe féminin et beaucoup de travail est à faire pour compenser ce manque d'information chez les deux sexes. L'omission ou la sous-représentation du sexe féminin dans les études en recherche cardiovasculaire retarde notre compréhension du dimorphisme sexuel au niveau du diagnostic, des mécanismes adaptatifs et des thérapies. Par exemple, les patients étudiés dans la grande étude clinique PARADIGM s'intéressant à l'efficacité du sacubitril/valsartan étaient des hommes à 78%¹⁵². Les conclusions tirées de cette étude sont possiblement différentes pour les femmes et d'autres études devront être réalisées pour comprendre les mécanismes activés par ce nouveau médicament chez les deux sexes. Les décisions cliniques pour la prise en charge des patientes resteront déficientes tant que le sexe féminin sera sous-représenté en recherche cardiovasculaire.

Chez les patients atteints de sténose sévère de la valve aortique, le remodelage ventriculaire est plus important chez les hommes, avec plus de fibrose et un moins bon pronostic que chez les femmes¹⁷⁵. En effet, l'étude CURRENT montre une meilleure survie à 5 ans chez les femmes avec sténose aortique¹⁷⁶. Les modèles animaux de surcharge de pression montrent également un important dimorphisme sexuel avec une évolution plus rapide vers l'IC chez les mâles. Une étude du modèle de constriction de l'aorte transversale (TAC) chez la souris montre que les mâles développent plus de fibrose et d'apoptose

comparativement aux femelles¹⁷⁷. De plus, la TAC induit une hypertrophie plus concentrique chez les femelles, alors que le VG des mâles évolue vers une forme dilatée (hypertrophie excentrique) et une perte de fonction plus rapide¹⁷⁸. L'expression génique associée au remodelage de la matrice extracellulaire, à la fonction mitochondriale et au métabolisme énergétique est affectée de façon plus importante chez les mâles comparativement aux femelles^{31,178–180}. On observe un dimorphisme semblable dans les modèles animaux de surcharge de volume. Huit semaines de fistule aorto-cave chez le rat montrent une survie 10 fois plus grande chez les femelles¹⁸¹. Elles développent une hypertrophie plus concentrique, alors que les mâles montrent un plus grand diamètre ventriculaire gauche^{181,182}. Après 16 semaines de fistule aorto-cave, l'expression des protéines pro-apoptotiques comme Bax, caspase 3 et caspase 9 est significativement plus importante chez les mâles, suggérant une perte cellulaire et fonctionnelle du VG. Dans le modèle de régurgitation de la valve aortique, les femelles développent aussi une hypertrophie moins excentrique^{183,184}. Ces différences sexuelles en hypertrophie pathologique pourraient s'expliquer par l'implication des hormones stéroïdiennes sexuelles.

Les estrogènes

Comme mentionné plus haut, l'incidence des maladies cardiovasculaires augmente chez les femmes après la ménopause. D'ailleurs, les femmes ayant la ménopause à un jeune âge ont un risque cardiovasculaire plus élevé¹⁸⁵. Les études ont montré que les estrogènes jouent un rôle dans plusieurs voies de signalisation impliquées dans le développement de l'HC comme celles de la survie cellulaire, de la croissance cellulaire et du métabolisme énergétique. L'implication des estrogènes a été étudiée dans différents modèles, particulièrement chez les animaux ovariectomisés pour comprendre leur rôle dans les différences sexuelles de la réponse à l'HC pathologique.

Le développement de l'IC peut être lié à l'augmentation de la mort cellulaire. Le rôle bénéfique des estrogènes pour la survie cellulaire a été montré dans différents modèles d'IC. En situation ischémique comme dans un modèle animal d'ischémie/reperfusion (I/R), la réduction de l'apport en oxygène cause la mort cellulaire et la réduction de la capacité contractile. L'E2 aurait un effet protecteur sur le cœur ischémique, puisque l'ovariectomie

chez les femelles I/R induit un dommage ischémique plus important¹⁸⁶. Les femelles produisent moins de ROS que les mâles en situation ischémique, suggérant un rôle protecteur des estrogènes contre le stress oxydatif¹⁸⁶. Les mêmes observations ont été réalisées dans un modèle d'infarctus du myocarde non reperfusé, montrant l'implication de l'E2 dans l'activation de la voie de survie cellulaire PI3K/Akt. Le remplacement hormonal à l'E2 chez les souris ovx réduit la taille de l'infarctus par la réduction de l'apoptose via l'activité des protéines PI3K et Akt⁵⁰.

Le remodelage hypertrophique implique l'activation de protéines de la MEC, responsables de la fibrose. L'augmentation de la synthèse des fibres de collagène par les fibroblastes mène à la rigidité du myocarde, associée à l'altération de la contractilité et de la relaxation cardiaque. Le traitement à l'E2 chez les souris mâles et femelles TAC réduit l'expression de gènes profibrotiques comme les collagènes I et III, TGF β , MMP2 et MMP9¹⁸⁷. La fibrose augmente aussi la distance de diffusion de l'oxygène et affecte l'angiogenèse. Dans le même modèle de surcharge de pression, le traitement à l'E2 active l'angiogenèse en réduisant le stress oxydatif. La densité capillaire chez les souris TAC est significativement augmentée par le traitement à l'E2¹⁸⁸.

Les femelles développent une hypertrophie plus concentrique que les mâles, elles conservent une bonne fonction cardiaque et elles ont un plus haut taux de survie⁸⁹. Après 21 semaines de fistule aorto-cave, les rates femelles ovx développent une importante dilatation ventriculaire comparativement aux femelles intactes, montrant un effet de l'estrogène sur le remodelage hypertrophique¹⁸⁹.

Certaines études se sont intéressées à l'implication des récepteurs nucléaires ER α et ER β . L'inactivation des gènes codants pour ces récepteurs dans les modèles animaux permet de comprendre le rôle que jouent spécifiquement ER α et ER β . Des études ont montré un rôle plus important pour le récepteur ER β dans la régulation du remodelage hypertrophique. Dans le modèle TAC, l'inactivation du récepteur ER α n'a pas d'incidence sur l'hypertrophie ventriculaire, alors que l'inactivation du récepteur ER β réduit significativement le gain de masse du cœur après 2 semaines¹⁹⁰, 4 semaines¹⁹¹ et 9 semaines de surcharge de pression¹⁷⁷.

Dans un modèle de souris femelles ovx avec une hypertrophie induite par l'AngII, le remplacement hormonal par l'E2 réduit le développement de l'HC₁₉₂ et l'inactivation de l'isoforme β du récepteur aux estrogènes empêche l'effet anti-hypertrophique de l'E2₁₉₂.

Les androgènes

Les estrogènes ont davantage été étudiés pour comprendre le dimorphisme sexuel cardiaque et l'implication des androgènes dans les maladies cardiovasculaires a reçu moins d'attention. La testostérone et la DHT sont généralement associées au développement de l'hypertrophie cardiaque, à l'augmentation de la pression sanguine et à la fibrose¹⁹³. L'effet anabolisant des androgènes favorise la croissance cellulaire, ce qui peut participer au développement de l'hypertrophie myocardique. L'étude de Marsh et al. suggère que cet effet est médié par l'interaction directe avec les récepteurs aux androgènes⁶⁸, puisque l'inhibition de ceux-ci empêche l'effet hypertrophique des androgènes. L'expression de gènes hypertrophiques comme *Myh6* et *TGF- β 1* est régulée par l'activité des AR^{81,194}. En condition de surcharge de pression chez la souris, la testostérone aurait pour effet d'augmenter le ratio β -MHC/ α -MHC, associé à la dysfonction systolique. En effet, Montalvo et al. ont montré que l'orchidectomie (ocx; ablation des testicules) chez la souris TAC empêche la transition des chaînes lourdes de myosine¹⁹⁴. Dans le même modèle, l'ocx réduit l'expression de *TGF- β* et de ses gènes cibles, réduisant la dilatation, la fibrose et la dysfonction ventriculaire¹⁹⁴. Plusieurs évidences suggèrent aussi une interaction entre la testostérone et la dysfonction cardiovasculaire liée au RAAS. En effet, les mâles montrent un remodelage hypertrophique plus important en réponse à l'AngII, comparativement aux femelles, et présentent des taux plus élevés du AT1R et de l'ACE¹⁹⁵⁻¹⁹⁹. De façon générale, les androgènes semblent avoir un effet délétère sur la progression de l'HC vers l'IC.

L'abus de stéroïdes androgéniques anaboliques par les athlètes augmente le risque cardiovasculaire²⁰⁰ et favorise le développement de l'HC et de dysfonctions cardiaques^{201,202}. Par contre, les patients atteints du cancer de la prostate sous traitement anti-androgénique ont aussi un risque élevé de développer des maladies cardiovasculaires^{203,204}. Ces observations suggèrent que la régulation des taux de testostérone serait plutôt à privilégier. En effet, la testostérone peut favoriser, dans une certaine mesure, la force musculaire et la tolérance à

l'effort en IC⁷⁶. Dans une méta-analyse incluant 7 études et 11 831 patients, Araujo et al. concluent que malgré une certaine disparité dans les études, la mortalité cardiovasculaire est associée au faible taux de testostérone chez les hommes dont la moyenne d'âge est de 61 ans²⁰⁵. Ruige et al. suggèrent même qu'un taux élevé de testostérone chez les hommes de plus de 70 ans est associé à un risque cardiovasculaire réduit²⁰⁶.

Selon Zwadlo et al., l'HC pathologique est associée à des niveaux élevés de DHT chez la souris et chez l'homme⁷⁶. Le traitement au finastéride, un inhibiteur de la 5α-réductase, chez la souris TAC mâle et femelle réduit la mortalité, l'hypertrophie, la dilatation ventriculaire et la dysfonction systolique et diastolique⁷⁶. Le finastéride réduit l'activation de la molécule signalétique prohypertrophique Akt et de ses gènes cibles⁷⁶. Dans un modèle d'I/R, l'administration de DHT augmente le dommage ischémique chez les rats mâles intacts et ocx²⁰⁷. L'administration de testostérone n'a pas d'effet chez les rats mâles avec gonades, mais réduit le dommage ischémique chez les mâles ocx²⁰⁷. Ces résultats suggèrent que la balance des androgènes et de l'enzyme 5α-réductase joue un rôle important dans la protection du myocarde. De hauts taux de DHT seraient néfastes pour le cœur, mais des faibles taux de testostérone le seraient aussi.

Malgré l'important effet anabolique de la testostérone et du DHT, il n'est pas clair si leur effet sur le cœur en IC est bénéfique ou néfaste. L'âge semble avoir un impact sur leur rôle et il serait pertinent d'étudier davantage de modèles animaux âgés. Selon les conditions, des taux trop élevés et trop faibles semblent augmenter le risque cardiaque, suggérant que les niveaux d'androgène devraient être balancés.

Le modèle d'hypertrophie cardiaque étudié

Mon projet de maîtrise s'intéresse au dimorphisme sexuel observé dans l'hypertrophie cardiaque induite par une surcharge de volume au ventricule gauche. Le modèle étudié est la régurgitation sévère de la valve aortique chez le rat Wistar. Notre équipe de recherche a développé une grande expertise, puisqu'elle utilise ce modèle depuis plusieurs années dans le laboratoire^{208,107,184}. Le rat est le modèle animal privilégié dans ce contexte, considérant son faible coût d'acquisition et d'hébergement et la grande disponibilité

d'amorces (Réaction en chaîne par polymérase; PCR) et d'anticorps spécifiques à cette espèce. De plus, le rat est de plus grande taille que de la souris, facilitant la chirurgie de la valve aortique.

La surcharge de volume sur le VG est induite par la perforation rétrograde de la valve aortique. Sous guidage échocardiographique, un cathéter est inséré depuis la carotide droite vers la valve aortique. Un ou plusieurs feuillets de la valve sont perforés, le cathéter est retiré et la carotide est ligaturée. La fuite de sang induite dans le VG peut être visualisée à l'échocardiographie avant le retrait complet du cathéter. On s'assure que la régurgitation de sang est de plus de 60% pour que le rat développe une importante hypertrophie du VG avec un haut taux de survie à long terme (6 mois). Le développement des anomalies ventriculaires est rapide, comparativement à chez l'humain, et la progression vers l'IC est lente. La chirurgie fantôme *sham* pour les animaux contrôles consiste en la ligature de la carotide droite. Ainsi, les rats subissent le même stress de l'anesthésie et de la chirurgie.

Notre équipe a montré que les rates femelles RA développent plus d'HC et moins de changements transcriptionnels myocardiques que les mâles RA¹⁸⁴. Après 6 mois de RA, les dimensions internes du VG sont proportionnellement semblables entre les sexes, mais les femelles ont des parois de VG plus épaisses. Ainsi, les femelles développent un remodelage moins excentrique et conservent une morphologie plus normale (épaisseur relative des parois). Il en résulte aussi que le gain de masse relatif du VG chez la femelle RA est plus important que chez les mâles¹⁸⁴. Selon la loi de Laplace, cette adaptation réduit le stress sur les parois du VG et permet possiblement le maintien d'une meilleure fonction systolique chez les femelles. Sachant que l'HC est connue comme un facteur pronostic défavorable à la progression du cœur vers l'IC²⁰⁹, il est important de mieux comprendre les mécanismes impliqués chez les deux sexes. Les résultats montrent aussi une plus forte réduction de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la β-oxydation des acides gras et le métabolisme mitochondrial chez les mâles RA, comparativement aux femelles¹⁸⁴.

Nous avons observé par le passé que l'HC chez le rat mâle RA s'accompagne d'une baisse de la densité des capillaires dans le myocarde¹⁰⁸. Cette réduction dans l'accessibilité à

l’oxygène et aux nutriments réduit la performance ventriculaire, augmente la susceptibilité au développement de la fibrose myocardique et affecte le métabolisme énergétique des cardiomyocytes¹⁰⁸. Malgré la plus grande hypertrophie, la densité capillaire est moins affectée par la RA chez les femelles¹⁸⁴, suggérant une meilleure réponse angiogénique et une accessibilité à l’oxygène facilitant l’utilisation des acides gras pour produire l’énergie ATP. Cette observation montre un nouvel aspect du dimorphisme sexuel en hypertrophie cardiaque. Les femelles ont possiblement une meilleure capacité d’activer les processus adaptatifs comme l’angiogenèse en réponse au développement de l’HC.

En réponse à la régurgitation aortique, les femelles développent de l’hypertrophie excentrique semblable aux mâles, mais elles conservent une épaisseur relative des parois plus normale, un bon accès à l’oxygène et une forte utilisation des acides gras pour produire leur énergie. Ces adaptations sont semblables à celles observées en réponse à la surcharge physiologique (grossesse), ce qui pourrait permettre une progression plus lente vers l’IC et expliquer le meilleur taux de survie des femelles en surcharge de volume^{89,182}.

Notre équipe a aussi montré que l’inhibition de l’activité neurohormonale (adrénergique et/ou RAAS) par le métaprolol et le captoril réduit l’hypertrophie et améliore la survie chez les mâles après 6 mois de RA^{87,139}. Dent et al. montre que les rates avec une fistule aorto-cave maintiennent une plus grande activité β -adrénergique que les mâles²¹⁰. L’expression protéique des récepteurs β_1 et β_2 est significativement réduite chez les mâles, alors qu’elle est augmentée chez les femelles avec la fistule aorto-cave. Dans une autre étude, Dent et al. suggèrent que l’activité du RAAS serait également différente chez les deux sexes en réponse à la surcharge de volume²¹¹. Ces observations suggèrent que les traitements n’ont possiblement pas la même efficacité chez les deux sexes.

Échocardiographie conventionnelle

L’échocardiographie est la méthode de choix en HC pour évaluer la morphologie et la fonction cardiaque autant chez le patient que chez le rongeur. Elle est précise, non invasive et peu coûteuse. À partir d’une image en deux dimensions, on peut mesurer le diamètre des

cavités cardiaques et l'épaisseur des parois en fin de systole et de diastole. Avec ces mesures, on peut obtenir les volumes systoliques et diastoliques selon l'équation :

$$Volume (\mu L) = \left(\frac{7,0}{2,4 + LVID} \right) \times LVID^3$$

Où :

LVID est le diamètre interne du VG

La fraction d'éjection (FÉ) est une mesure utilisée en clinique pour évaluer la fonction systolique : c'est le ratio entre le volume systolique et diastolique du VG.

$$FÉ = \left(\frac{Vol; d - Vol; s}{Vol; d} \right) \times 100$$

Où :

Vol; d est le volume diastolique du VG

Vol; s est le volume systolique du VG

Lorsque la contractilité du VG est affectée, le ratio des volumes est réduit. Pour évaluer la fonction systolique, on peut aussi utiliser le volume d'éjection (stroke volume). Il peut être calculé à partir de la grandeur de la chambre de chasse du VG (diamètre de l'anneau aortique; LVOT diamètre) et de la vitesse du flot sanguin aortique (VTI) mesurée en échocardiographie Doppler :

$$SV = LVOT \text{ area} \times VTI$$

Où

$$LVOT \text{ area est} = \frac{\pi (LVOT \text{ diamètre})^2}{4}$$

VTI est la vitesse du flot sanguin aortique

Pour évaluer la fonction diastolique, le flot mitral permettant le remplissage du VG peut être mesuré. La diastole se divise en deux phases, soit le remplissage passif et le remplissage actif du VG. Il est possible de distinguer les deux phases par l'onde E

(remplissage passif) et l'onde A (contraction active de l'OG) du flot mitral. Un ratio E/A supérieur à 1 est normal. Lorsque la *compliance* du VG est affectée, l'onde E est réduite et l'OG compense en augmentant sa contraction (onde A) pour compléter le remplissage du VG. La pente de l'onde E est une autre mesure pouvant évaluer la compliance du VG, une pente abrupte signifiant une entrée rapide de sang dans un VG rigide. Dans le modèle de RA, les ondes E et A sont augmentées et la pente de l'onde E est plus abrupte. Puisque le VG est dilaté, la capacité d'étirement de ce dernier est réduite et la fonction diastolique est affectée.

L'échocardiographie Doppler permet aussi d'évaluer le flot régurgitant de la valve aortique et un suivi peut être fait chez le patient pour étudier l'évolution de la maladie.

Échocardiographie 4D

L'échocardiographie 4D est une image en trois dimensions en mode EKV (ECG-based Kilohertz Visualization) d'un cycle cardiaque complet. C'est une reconstruction d'images à différentes positions d'un moteur 3D de haute résolution. On obtient ainsi un cycle cardiaque complet pour chaque position du moteur 3D, créant une vidéo 4D. Ce type d'échocardiographie permet l'analyse géométrique du cœur et une meilleure estimation des volumes systoliques et diastoliques.

Échocardiographie par *speckle stacking*

L'échocardiographie par *speckle tracking* (EST) est une méthode rendue récemment disponible en recherche chez l'animal de petite taille. C'est l'analyse du déplacement dans l'espace et le temps des *speckles* générés par l'interaction entre la sonde échocardiographique et les structures cardiaques. Bien que la FÉ soit une bonne mesure de la fonction systolique, la capacité contractile est généralement affectée bien avant la réduction de la FÉ. En effet, l'augmentation du volume du VG par la RA maintien d'une FÉ plutôt normale et l'EST permet la détection précoce de la dysfonction ventriculaire gauche avant l'apparition des symptômes et la réduction de la FÉ chez les patients RA_{212,213}.

Actuellement, il est recommandé de référer les patients asymptomatiques en chirurgie pour remplacement valvulaire lorsque la FÉ du VG est $\leq 50\%$ ou lorsque le diamètre en fin de systole est de plus de 50mm⁹⁷. L'échocardiographie par *speckle tracking* pourrait éventuellement être utilisée en clinique afin de détecter la dysfonction systolique plus précocement. Une détection rapide d'une dysfonction cardiaque avant l'apparition des symptômes peut permettre un meilleur rétablissement après la chirurgie valvulaire, considérant que certains dommages irréversibles ne sont pas encore installés.

Architecture du ventricule gauche et étude de la capacité de déformation

Le myocarde est un assemblage de fibres orientées en longitudinal (de la base vers l'apex) et en circonférentiel, organisées en couches interne, moyenne et externe, soit l'endocarde, le myocarde et l'épicarde. Les fibres prennent une orientation oblique à l'endocarde, une orientation circonférentielle dans le myocarde et retournent vers une orientation oblique à l'épicarde, dans la direction opposée aux fibres internes (Figure 6)²¹⁴⁻²¹⁶.

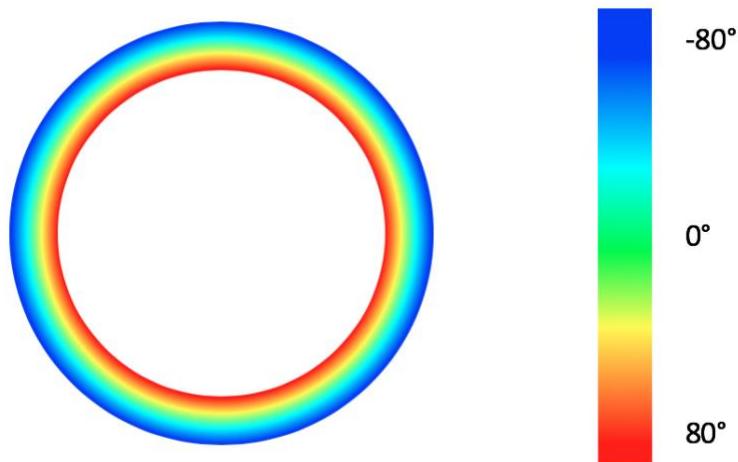


Figure 6. Schéma représentant l'orientation des fibres cardiaques du ventricule gauche.

Figure par Walsh-Wilkinson, É (2019) non publiée

Ainsi, la contraction du VG se fait dans trois directions : longitudinale (de la base vers l'apex), radiale (du centre vers l'extérieur) et circonférentielle. Le *strain* multidirectionnel est une mesure sensible obtenue à partir de l'EST qui permet d'évaluer la déformation du VG dans les trois axes à travers le cycle cardiaque. Le *strain* est exprimé par le pourcentage de changement entre la longueur d'un segment du myocarde relativement à sa longueur initiale. L'équation utilisée pour calculer le strain est :

$$Strain = \frac{\Delta L}{L_0} = \frac{L - L_0}{L_0}$$

Où :

ΔL est le changement dans la longueur

L_0 est la longueur initiale

C'est le *strain* maximal qui est généralement utilisé, soit le changement de la longueur en fin de systole par rapport à la longueur en fin de diastole. Une valeur négative représente un raccourcissement ou un amincissement des fibres, alors qu'une valeur positive signifie qu'il y a élongation ou épaissement des fibres²¹⁷. La valeur de *strain* maximal longitudinal est négative, car les fibres du VG se raccourcissent lors de la systole et la valeur de *strain* maximal en radial est positive, car les parois du VG s'épaissent en systole. En circonférentiel, une rotation dans le sens horaire en vue échocardiographique court-axe lors de la systole donne une valeur positive, alors qu'une rotation dans le sens antihoraire est de valeur négative. Le *strain* longitudinal se mesure uniquement à partir d'une vue en long-axe du VG, le *strain* en radial peut être obtenu à partir d'une vue long-axe ou court-axe, et le *strain* circonférentiel est mesuré à partir d'une vue court-axe seulement. Il est aussi possible de mesurer la torsion du VG, soit la différence entre la valeur de *strain* circonférentiel d'une tranche de la base et d'une tranche de l'apex du VG.

L'acquisition des images se fait à l'échocardiographie conventionnelle 2D avec un appareil spécifique pour l'analyse par *speckle tracking*. Hors ligne, à l'aide du logiciel adéquat, trois battements consécutifs sont choisis en prenant garde d'éviter le moment de la respiration de l'animal, puis l'endocarde et l'épicarde sont tracés. Le traçage doit se faire

depuis la base de l'aorte, près du septum, vers la base de l'oreillette gauche sur la paroi libre (Figure 7). Le suivi des points est complété par le logiciel à travers le cycle cardiaque. Il est ensuite possible de visualiser le suivi et d'ajuster le traçage manuellement. Le logiciel divise le VG en six segments et donne une valeur de *strain* pour chacun de ceux-ci (Figure 8). Cette fonction rend l'étude d'autant plus précise en permettant l'analyse régionale du VG. En plus de la déformation du myocarde, on peut évaluer la synchronie de la contraction ventriculaire à partir du *speckle tracking*. La variation de temps que prend chaque segment pour compléter sa déformation maximale est un indicateur de la synchronie de la contraction du VG.

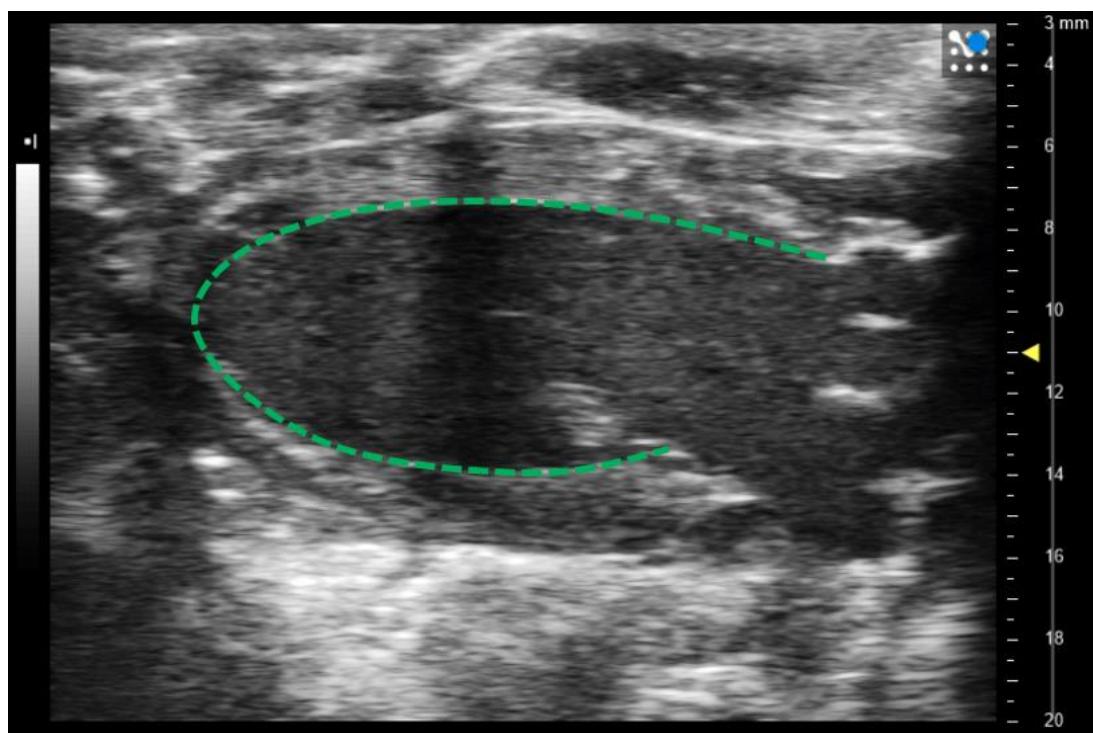


Figure 7. Traçage à l'échocardiographie transthoracique d'une vue en long-axe chez le rat pour l'étude de la déformation du ventricule gauche par le logiciel VevoStrain,

Figure par Walsh-Wilkinson, É (2019) non publiée

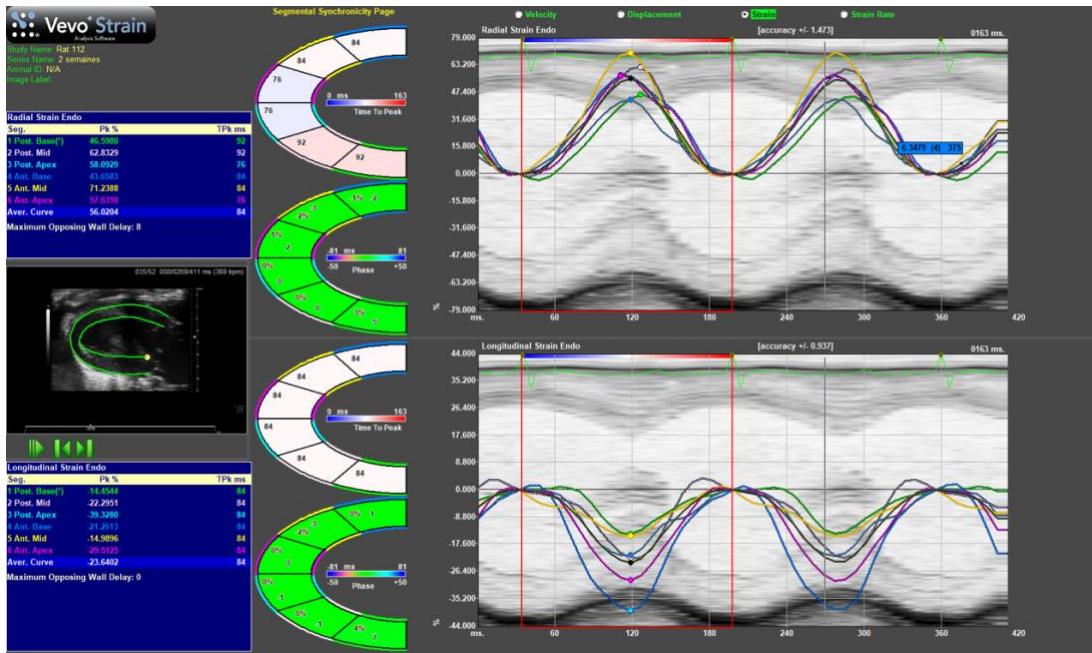


Figure 8. Analyse par strain à l'échocardiographie par speckle tracking au Vevo 3100. Vue en long-axe du ventricule gauche.

Figure par Walsh-Wilkinson, É (2019) non publiée

Il existe une grande variabilité dans les mesures obtenues avec les différents appareils d'échocardiographie et avec les logiciels vendus par les fournisseurs²¹⁸. Pour un même traçage, les valeurs de *strain* varient d'un appareil à l'autre, ce qui explique pourquoi il n'existe pas de valeur référence pour l'instant²¹⁸. La mesure de *strain* est dépendante d'une bonne qualité d'images et d'un bon placement de la région d'intérêt sur le myocarde lors du traçage. Bien que la méthode montre une très faible variabilité intra- et inter-utilisateur, il est recommandé que les manipulations soient effectuées par un seul et même utilisateur formé.

Utilité en hypertrophie cardiaque

Étant une maladie généralement asymptomatique, la RA est souvent identifiée tardivement et le développement de nouvelles méthodes diagnostique est nécessaire. Des défauts au niveau de la fonction ventriculaire gauche peuvent survenir bien avant la réduction de la fraction d'éjection ou l'apparition de symptômes²¹⁹. L'imagerie par *speckle tracking* est donc une méthode sensible qui permet d'évaluer la capacité contractile du myocarde et d'identifier les dysfonctions ventriculaires de façon précoce à l'échocardiographie conventionnelle chez les patients RA^{213,220–228}, mais aussi chez les patients souffrant d'autres

maladies valvulaires comme la sténose aortique^{229,230}. Des études ont également montré des avantages à l'EST chez les patients ayant subi un infarctus du myocarde^{231,232}, les patients diabétiques²³³, et même chez une population âgée²³⁴. Le *strain* longitudinal global (GLS) est le marqueur le plus sensible et le plus utilisé pour étudier la fonction systolique dans plusieurs modèles animaux. La variabilité des données intra- et inter-utilisateur du *strain* en radial et en circonférentiel rend leur utilisation en clinique moins intéressante, comparativement au *strain* en longitudinal²³⁵.

Selon les récentes études de Alashi et al., un GLS réduit est associé à la mortalité chez les patients avec une RA sévère, asymptomatique et ayant subi une procédure chirurgicale de la valve aortique^{236,237}. Verseckaite et al., montrent que la réduction du GLS précède la réduction de la fraction d'éjection chez les patients RA asymptomatiques²²⁸. Ces études suggèrent que le GLS peut être utilisé en clinique pour optimiser la décision du remplacement valvulaire aortique chez les patients RA asymptomatiques. Selon Enache et al., un VG dilaté est associé à la réduction de sa capacité de rotation et de torsion²²³. La forme dilatée du VG influencerait la capacité contractile des fibres orientées de façon circonférentielle en plus de celles orientées en longitudinal²³⁸. La valeur de *strain* en circonférentiel serait ainsi une valeur ajoutée à l'analyse de la déformation du VG dans les modèles de surcharge de volume. Cette hypothèse est appuyée par Ewe et al., qui montrent que la réduction des valeurs de *strain* en longitudinal et en circonférentiel chez les patients asymptomatiques avec une RA modérée à sévère permet d'identifier ceux nécessitant une chirurgie de la valve aortique²³⁹.

Plusieurs études réalisées chez les patients avec une surcharge de pression au VG comme la sténose aortique montrent que la réduction du GLS est proportionnelle à la sévérité de la sténose aortique et à la mortalité^{229,230,240} et que cette mesure devrait être utilisée en clinique pour identifier les dysfonctions ventriculaires gauche de façon précoce^{229,241}. Certaines études ont été réalisées chez l'animal de petite taille pour valider l'utilisation de l'EST²⁴², mais très peu chez le rat et aucune étude n'a été réalisée à notre connaissance dans un modèle animal de RA.

Différences sexuelles

L'étude des mécanismes physiologiques de base des deux sexes en échocardiographie par *speckle tracking* est une avenue prometteuse pour comprendre le dimorphisme sexuel dans les maladies cardiovasculaires. En effet, les différences liées au sexe dans la structure et la fonction myocardique peuvent modifier la réponse du cœur à un stress hémodynamique. Les femmes ont des VG plus petits et certains rapportent qu'elles ont une FÉ plus élevée et de plus grandes valeurs de *strain* en longitudinal et en circonférentiel que les hommes²⁴³⁻²⁴⁷. Selon l'étude réalisée par Williams et al. chez des jeunes de 23 ans en santé, les femmes auraient un VG de forme plus elliptique que les hommes²⁴⁸. Pour une même longueur de VG, le diamètre intraventriculaire est plus grand chez les hommes, résultant en une forme plus arrondie. Un diamètre intraventriculaire gauche plus grand réduit la capacité de torsion chez les femmes seulement, suggérant un lien entre la morphologie cardiaque et la fonction ventriculaire féminine²⁴⁸. Toujours selon l'étude de Williams et al., c'est le système adrénnergique qui aurait un effet sur la capacité de torsion chez les hommes, puisqu'une altération de l'activité β -adrénnergique réduit significativement la torsion du VG chez ceux-ci²⁴⁸.

Problématique à l'étude

Bien que les valvulopathies soient moins fréquentes, elles sont tout de même responsables d'un nombre important d'admissions à l'hôpital. L'incidence et la sévérité de la RA augmentent avec l'âge^{45,91} et il se fait peu de recherche sur la régurgitation de la valve aortique. La prévalence de la RA est encore plus importante dans les pays en voie de développement et dans les populations autochtones des pays occidentaux, où l'accès aux soins de santé est limité, car l'insuffisance valvulaire fait souvent suite à des infections à streptocoque mal ou non traitées²⁴⁹. La bicuspidie de la valve aortique est une autre cause du développement de la RA, pouvant survenir en combinaison à la sténose de la valve aortique. Sachant que la régurgitation aortique est une complication du TAVR dont l'incidence peut atteindre 24%⁹⁶ et que cette procédure est de plus en plus courante en clinique, la compréhension des mécanismes impliqués dans cette maladie valvulaire est d'autant plus préoccupante. Compte tenu de la faible prévalence et de l'évolution lente et souvent

asymptomatique de la RA, les études cliniques chez l'humain sont plus difficiles à mener à terme. Le modèle de RA chez le rat développé dans le laboratoire depuis plus de 17 ans est fiable, reproductible et mime de près la maladie chez l'humain²⁰⁸. Les études chez l'humain concernant l'insuffisance aortique s'intéressent généralement à des sujets dont moins de 20% sont des femmes. Il est difficile de comprendre les différents mécanismes impliqués chez les deux sexes lorsque le sexe féminin est autant sous représenté. Les études chez les animaux des deux sexes permettent d'améliorer notre compréhension du développement de cette maladie. La sous-représentation des femmes dans les études cliniques s'intéressant à la RA s'explique par une prévalence plus faible chez les femmes avant la ménopause. Cette prévalence plus faible pourrait être expliquée par une étiologie différente selon le sexe, par une tendance à poser un diagnostic de maladies cardiovasculaires plus tardivement chez les femmes, par le développement d'une maladie moins sévère ou moins symptomatique chez la femme, ou le développement de mécanismes compensatoires plus adéquats à la RA. Pour répondre à ces questions, il est essentiel d'intégrer les deux sexes dans les études. Ce mémoire s'intéresse aux différences sexuelles dans le développement de la RA chez le rat, ce qui nous permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués chez les deux sexes pour une même maladie. Finalement, notre modèle peut permettre de comparer de façon générale l'impact du sexe biologique dans une régurgitation valvulaire. L'insuffisance mitrale, plus prévalente que l'insuffisance aortique est une cause de surcharge de volume du ventricule gauche et les informations obtenues par notre modèle peuvent être intéressantes pour cette pathologie.

Les études ne cessent de montrer les importantes différences sexuelles au niveau du cœur et du développement des maladies cardiovasculaires^{28,174}. Les hormones sexuelles jouent un rôle central dans ce dimorphisme et le rat est un modèle animal nous permettant d'étudier l'effet de la présence ou de l'absence de ces hormones sur le cœur. En effet, l'ablation des gonades chez le rat empêche la production des hormones sexuelles. L'ovariectomie et l'orchidectomie sont des chirurgies simples, décrites dans la littérature et bien tolérées chez l'animal de petite taille. Les hormones sexuelles influencent le développement physiologique du cœur et la réponse hypertrophique^{82,250-252}. Plusieurs observations ont été faites quant aux effets des hormones stéroïdiennes sexuelles, mais les

mécanismes impliqués sont toujours mal compris. Les estrogènes sont considérés comme protecteurs du cœur, mais plusieurs études remettent en cause cette idée, puisque le remplacement hormonal ne serait pas bénéfique en toutes conditions chez les femmes²⁵³. Les androgènes ont reçu moins d'attention en recherche cardiovasculaire. Ils ont d'abord été considérés comme néfastes pour le cœur, mais plusieurs études montrent que leur effet ne serait pas totalement délétère et qu'ils pourraient être bénéfiques dans certaines conditions^{76,205}. Dans notre projet, la déficience en estrogène chez les femelles et la déficience en testostérone chez les mâles permettra de comprendre leur implication dans l'adaptation hypertrophique en réponse à une surcharge de volume sur le ventricule gauche.

Considérant que plusieurs études cliniques sont réalisées principalement chez les hommes, les conclusions tirées de ces résultats ne s'appliquent possiblement pas en entiereté au sexe féminin. La grande étude randomisée de l'effet du valsartan en insuffisance cardiaque s'intéresse à un groupe de patients composé à 80% d'hommes¹⁴⁸. Puisque l'évolution des maladies cardiovasculaires est différente pour les femmes, les traitements comme le valsartan risquent d'avoir un effet différent sur le cœur féminin. Notre étude des rats mâles et femelles traités au valsartan permettra de mieux comprendre l'implication du RAAS dans le développement de l'hypertrophie cardiaque chez les deux sexes. L'inclusion des deux sexes dans les études améliorera significativement la compréhension des mécanismes spécifiques aux sexes et éventuellement la prise en charge des patients.

L'échocardiographie est la méthode de choix pour étudier et diagnostiquer les maladies cardiovasculaires. C'est une technique en constante évolution et l'EST est une nouvelle méthode potentiellement prometteuse pour diagnostiquer et référer plus tôt en chirurgie les patients atteints de maladies valvulaires^{221,226,254}. L'EST a été rendue disponible chez l'animal de petite taille avec une fréquence cardiaque supérieure à 300 battements par minutes. Notre centre de recherche a récemment acquis un appareil *Vevo* permettant l'analyse par *speckle tracking*. Ce nouvel outil nous permet de détecter les défauts de contractilité cardiaque de façon plus précise comparativement à ce qu'on pouvait obtenir à l'échocardiographie conventionnelle. En 2014, une étude des cœurs de rats mâles après 6 mois de RA par microtomodensitométrie de flux (uPET) a montré une avidité accrue du VG

pour le glucose comme substrat énergétique préférentiel⁸⁸. Ce changement était principalement concentré au niveau de la paroi latérale et à mi-chemin entre l'apex et le haut du VG. Cela suppose que c'est dans cette région que la tension sur les parois serait à son maximum et que la réponse hypertrophique y serait exacerbée. L'EST permet de déterminer si la capacité contractile est homogène à travers le myocarde. Peu d'études utilisant l'EST ont été réalisées sur le VG chez le rongeur. Ainsi, l'évolution de l'hypertrophie cardiaque dans un modèle de RA chez le rat mâle et femelle n'a jamais été étudiée de façon longitudinale par EST.

Hypothèses et objectifs de recherche

Ayant récemment montré que les rats mâles et femelles avec une régurgitation aortique développaient des adaptations morphologiques, fonctionnelles et moléculaires différentes, nous voulons maintenant étudier l'effet des hormones sexuelles sur ce dimorphisme cardiaque. Les femelles développent une hypertrophie plus concentrique et maintiennent un profil transcriptionnel près de la normale. Elles conservent une bonne oxygénation myocardique et une utilisation normale des acides gras pour produire l'essentiel de leur énergie¹⁸⁴. Le premier objectif de ce travail est de comprendre l'effet de la perte des androgènes chez les mâles et l'effet de la perte des estrogènes chez les femelles sur l'hypertrophie cardiaque développée en réponse à la régurgitation sévère de la valve aortique. Pour ce faire, nous étudions des rats mâles orchidectomisés, ne produisant plus d'androgènes et les comparons à des rats mâles intacts. Les adaptations hypertrophiques sont mesurées par les modifications au niveau de la masse cardiaque, des mesures échocardiographiques, du profil transcriptionnel et du profil protéique. Puisque les androgènes ont un important effet anabolique⁷⁶, mon hypothèse est que la déficience en androgènes chez le rat RA mâle réduira la réponse hypertrophique en réponse à la RA. Je crois que les mécanismes activés seront mieux adaptés et que le profil transcriptionnel et protéique sera semblable à ce qu'on peut observer chez les femelles. Selon Zwadlo et al., la perte de la DHT chez le rat avec surcharge de pression réduit la mortalité, l'hypertrophie, la dilatation ventriculaire et améliore les fonctions cardiaque⁷⁶. La perte des estrogènes chez les femelles augmentera possiblement la réponse hypertrophique et affectera le profil métabolique des rats RA, car selon Brower et al., la perte des estrogènes favorise la dilatation du VG dans un modèle de surcharge de

volume par fistule aorto-cave¹⁸⁹. Les estrogènes auraient donc un effet anti-hypertrophique sur le cœur favorable au remodelage cardiaque en réponse à la surcharge de volume. Le remplacement hormonal chez les rates RA ovx réduira possiblement l'hypertrophie et permettra au cœur féminin de retrouver un profil morphologique et métabolique semblable aux femelles intactes. Selon Pedram et al., le remplacement hormonal à l'E2 chez les souris femelles réduit l'hypertrophie induite par l'angiotensine II¹⁹².

Le second objectif de ce projet est d'évaluer la réponse hypertrophique cardiaque à court terme (8 semaines) en réponse à la RA chez les rats mâles et femelles traités et non traités au valsartan, un bloqueur du récepteur à l'angiotensine II. Il est connu que le RAAS est suractivé au niveau du myocarde en réponse à une surcharge de volume et nous avons précédemment montré que l'inhibition de ce système réduit l'hypertrophie et améliore les fonctions cardiaques et la survie des rats mâles RA^{87,142,151}. Nous n'avons jamais étudié ce type de traitement chez les femelles RA. De plus, nous n'avons jamais étudié les effets de l'inhibition du RAAS pendant les tout premiers moments du développement de l'HC. Puisque le remodelage hypertrophique est différent pour les deux sexes, l'implication du RAAS n'est possiblement pas le même chez les femelles, suggérant que l'effet du traitement au valsartan sera différent.

Finalement, nous voulons savoir si la réponse hypertrophique et la déformation du VG à travers le cycle cardiaque sont homogènes dans le myocarde chez les deux sexes. Puisque le métabolisme énergétique chez le rat RA est hétérogène avec une avidité accrue au niveau de la paroi libre du VG⁸⁸, la capacité contractile de cette paroi pourrait être davantage affectée par la RA. La déformation du myocarde sera potentiellement différente et asynchrone à travers le VG. De plus, le remodelage hypertrophique sera possiblement plus important dans cette région du VG. Puisque les femelles RA montrent moins de modifications transcriptionnelles¹⁸⁴, la réponse du VG à la RA pourrait être moins sévère et plus homogène à travers le myocarde féminin.

Chapitre 1. Testosterone deficiency reduces cardiac hypertrophy in a rat model of severe volume overload

1.1 Page titre

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

Short title: Androgens in cardiac hypertrophy.

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

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

Corresponding author: Jacques Couet PhD

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

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

Email: jacques.couet@med.ulaval.ca

1.2 Résumé

Nous avons montré que l'hypertrophie cardiaque (HC) en réponse à une surcharge de volume induite par la régurgitation de la valve aortique (RA) se développait différemment selon le sexe. Le but de l'étude était d'étudier l'effet des androgènes chez les mâles dans le développement de l'HC. Nous avons étudié des rats Wistar mâles avec et sans leurs gonades (Ocx), avec la chirurgie fantôme sham ou avec RA sévère pour 26 semaines. La perte des androgènes par l'orchidectomie réduit la croissance de l'animal. L'hypertrophie induite par la RA est plus importante chez les animaux intacts que chez les Ocx (60% vs. 40%; P=0.019) comparé à leur groupe sham respectif. La dilatation du ventricule gauche (VG), montrée par le diamètre du VG en fin de diastole, est plus importante avec une augmentation du diamètre de 37%, comparativement à 17% chez les animaux AROcx (P < 0.0001). La fonction systolique est aussi davantage réduite chez les animaux intacts comparativement aux AROcx (26% vs. 15%; P=0.029). Les changements dans l'expression génique sont plus importants chez les animaux intacts, particulièrement pour les gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire et dans le métabolisme énergétique. Le ratio de l'activité de l'enzyme hydroxyacyl-Coenzyme A déshydrogénase sur l'activité de l'hexokinase, un indice de l'utilisation préférentielle du substrat énergétique du VG, est réduit chez les AR et normal chez les AROcx. Cela suggère une plus grande utilisation du glucose chez les animaux AR intacts, alors que les AROcx maintiennent leur utilisation des acides gras comme substrat énergétique préférentiel. Finalement, le contenu protéique de Jnk2, un indicateur de la voie du stress mécanique, était plus abondant chez les animaux RA en présence d'androgènes. Bref, la déficience en testostérone chez le rat RA résulte en une réduction de l'HC et un maintien du profil transcriptionnel.

1.3 Abstract

The aim of the study was to characterize if the development of cardiac hypertrophy (CH) caused by severe left ventricle (LV) volume overload (VO) from chronic aortic valve regurgitation (AR) in male rats was influenced by androgens. We studied Wistar rats with/without orchectomy (Ocx) either sham-operated (S) or with severe AR for 26 weeks. Loss of testosterone induced by Ocx decreased general body growth. Cardiac hypertrophy resulting from AR was relatively more important in intact (non-Ocx) animals than in Ocx ones compared to their respective S group (60% vs. 40%; P = 0.019). The intact AR group had more LV dilation, end-diastolic LV diameter being increased by 37% over S group and by 17% in AROcx rats (P < 0.0001). Fractional shortening (an index of systolic function) decreased only by 15% in AROcx compared to 26% for intact AR animals (P = 0.029). Changes in LV gene expression resulting from CH were more marked in intact rats than in AROcx animals, especially for genes linked to extracellular matrix remodeling and energy metabolism. The ratio of hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase activity over hexokinase activity, an index of the shift of myocardial substrate use toward glucose from the preferred fatty acids, was significantly decreased in the AR group but not in AROcx. Finally, pJnk2 LV protein content was more abundant in AR than in AROcx rats, indicating decreased activation of this stress pathway in the absence of androgens. In summary, testosterone deficiency in rats with severe LV VO resulted in less CH and a normalization of the LV gene expression profile.

1.4 Introduction

Cardiovascular diseases are among the leading causes of mortality in both men and women (Roth et al. 2017). Men are usually affected earlier in life and progression is often faster than for women (Leinwand 2003). On the other hand, women usually suffer from heart diseases later in life, usually after menopause (Roger et al. 2012). Cardiac hypertrophy (CH), an independent cause of morbidity and mortality from heart diseases also displays a sex dimorphism in both patients and in pre-clinical models (Blenck et al. 2016).

CH develops in response to a recurrent or chronic significant hemodynamic stress. A pathological stimulus will lead to maladaptive CH and eventually if left untreated, to heart failure (HF). Significant pressure overload (e.g., hypertension, aortic valve stenosis) or volume overload (e.g., aortic or mitral valve regurgitation) will induce left ventricle (LV) remodeling characterized by changes in wall thickness, chamber diameter, extracellular matrix organization, gene transcription, cell signaling, and energy metabolism (Grossman et al. 1975; Witt et al. 2008; Champetier et al. 2009; Lopaschuk et al. 2010).

We recently observed that in a rat model of chronic LV volume overload (VO) caused by severe aortic valve regurgitation (AR), females developed as much if not more CH than males. However, male showed more LV dilation but lost more contractile function than females (Beaumont et al. 2017). In another rat VO model (aorto-caval fistula), a faster progression toward HF was observed in males and resulted in poorer survival (Gardner et al. 2002; Dent et al. 2010). At the cellular and molecular levels, we also observed that male AR rat showed an important downregulation of many LV fatty acid oxidation (FAO) genes and an upregulation of glucose metabolism genes, whereas this energy metabolism switch characteristic of pathological CH did not happen in females (Beaumont et al. 2017). Sex steroids have a potent effect on differentiation and may explain a large part of the sex dimorphism observed in CH (Mahmoodzadeh et al. 2012).

Estrogens have been widely studied in the field of cardiovascular research, especially because of the lower incidence of cardiovascular diseases in premenopausal women compared to men (Blenck et al. 2016). Effects of androgens on heart physiology are less well understood. It is not clear if androgens are protective or deleterious for the cardiovascular system. Studies have shown that low testosterone levels predispose men to a higher risk of cardiovascular disease. On the other hand, testosterone can increase functional capacity and cardiac output in men with chronic HF (Pugh et al. 2003; Malkin et

al. 2006). Loss of testosterone has recently been shown to increase development of diastolic dysfunction in aging male mice (Ayaz et al. 2019). Nevertheless, some studies associated testosterone replacement therapy with a higher risk of cardiac events (Xu et al. 2013). Cardiomyocytes treated with androgens (testosterone and/or dihydrotestosterone) show a hypertrophic response (Marsh et al. 1998) in agreement with their well-known anabolic effect on muscle hypertrophy (Basualto-Alarcon et al. 2013). The androgens effects on the development of pathological CH are thus still up for debate.

Here, we wanted to study if androgens would influence the development of eccentric left ventricle hypertrophy in the rat AR model. Considering that androgens are only produced by testes in rats (van Weerden et al. 1992), we studied the hearts of intact and orchiectomized animals (Ocx) with or without VO induced by AR. Our results suggest that androgens do influence cardiac remodeling in this VO model and have an impact on the heart response to this hemodynamic stress.

1.5 Methods

1.5.1 Animals

Forty-four male Wistar rats (275–300 g) (Charles River, Saint-Constant, QC, Canada) were studied. Twenty-two of which were purchased after Ocx at age 8 weeks. Experimental groups were as followed: Sham-operated (S; n = 9), Ocx sham-operated (SOcx; n = 10), AR; (n = 13) and Ocx AR (AROcx; n = 12). AR was induced 2 weeks later at age 10 weeks as previously described by perforation of one or two aortic valve leaflets using a catheter via the right carotid and under echocardiographic guidance (Arsenault et al. 2002; Plante et al. 2003). Sham-operated animals only had ligation of their right carotid. The protocol was approved by the Universite Laval's Animal Protection Committee and followed the recommendations of the Canadian Council on Laboratory Animal Care.

1.5.2 Echocardiography

An echocardiographic exam was performed 2 weeks after surgery to confirm AR severity and at the end of the protocol 26 weeks later as previously described (Plante et al. 2006; Lachance et al. 2009b; Arsenault et al. 2013). At the end of the protocol, the heart and the lungs were harvested and weighed. Heart chambers were dissected, weighted, and the LV

was then quickly frozen in liquid nitrogen and kept at 80°C until further use. A piece of LV was kept in formalin and fixed in paraffin for histologic analysis.

1.5.3 Gene expression analysis by RT-PCR

LV gene expression was quantified for six animals per group by quantitative RT-PCR as described elsewhere (Plante et al. 2008; Champetier et al. 2009). Briefly, LV RNA samples were diluted to 500 ng/IL. One-microliter of RNA (500 ng) was converted to cDNA using the QuantiTect® Reverse Transcription kit (Qiagen), a procedure which included a genomic DNA elimination step. The cDNA obtained was further diluted 11-fold with water prior to amplification (final concentration corresponding to 4.54 ng/IL of initial RNA). Five-microliter of diluted cDNA were amplified in duplicate by Q-PCR in a Rotor-GeneTM thermal cycler (Corbett Life Science. Sydney, Australia), using optimized specific primer pairs (Table S1) and SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio Rad, Hercules, CA). Each run included one tube with water only (no template control) and a series of three 10-fold dilutions of a representative cDNA sample to check efficiency of the amplification reactions. In the case of intron-less genes, minus-RT control reactions were made on ten randomly chosen samples to ensure that genomic DNA did not yield significant amplification. The quantification of gene expression was based on the 2DDCt method. Mean Ct values of duplicates for each gene of interest were subtracted from the mean Ct value (DCt) of the control “housekeeping” gene cyclophilin A. The difference in the mean DCts between groups of rats (DDCt) allows the calculation of relative levels of induction/repression of genes of interest. The non-preoptimized primers were for the 2,4-dienoyl-CoA reductase 1 gene (Decr1; 50-CAT TCC GTA TCT ACC CCA TTC AG-30 and 50-GCT ATC ACT ACG ATC TAT GCT GAG-30; 120 pb transcript), enoyl-CoA hydratase, short chain 1 (EchS1; 50-GCT TTC AGG GTG TCT TGA TTT G-30 and 50-GAG CTA TGC ACT GCA GAT AGT-30; 95 pb transcript), natriuretic peptide precursor type A (Nppa; 50-GCA GAT TTG GCT GTT ATC TTC G-30 and 50 -GGT AGG ATT GAC AGG ATT GGA-30 ; 79 pb transcript), natriuretic peptide precursor type B (Nppb; 50-GTC TCC CTA AAA CAA CCT CAG C-30 and 50-CGA AAT TCC AAG ATG GCA CAT AG-30; 108 pb transcript), and Cyclophilin A (Ppia; 50-GCA GAC AAA GTT CCA AAG ACA G-30 and 50-CCA TTA TGG CGT GTG AAG TC-30; 140 pb transcript).

1.5.4 Enzymatic activity

Enzymatic activities (V_{max}) for hexokinase (HK), hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase (HADH), succinate dehydrogenase (SDH), citrate synthase (CS), and creatine kinase (CK) were determined as previously described (Bouchard-Thomassin et al. 2011; Dhahri et al. 2014).

For the beta-hydroxybutyrate dehydrogenase (BDH) enzyme assay, LV tissue was homogenized with 40 volumes of an extracting solution. The extracting solution was as follows: triethanolamine (50 mmol/L; pH 7.5), EDTA (1 mmol/L), MgCl₂ (2 mmol/L), and b-mercaptoethanol (30 mmol/L). The homogenate was then sonicated. NADH formation was monitored by UV spectroscopy at 340 nm as an indication of BDH activity. The samples were tested in duplicates.

1.5.5 Immunoblotting

Protein content was estimated by Western blotting as described previously (Belanger et al. 2003; Plante et al. 2004). Antibodies were diluted 1:1000 in a TSB-T solution with 5% bovine serum albumin (BSA). Phospho-ERK1/2, phospho-JNK1/2, phospho-p38, and phospho-GSK3 were all obtained from Cell Signaling Technologies (Danvers MA) whereas ERK1/2 antibody was from Millipore, (Etobikoke, ON, Canada) and p38 from Santa Cruz Biologicals, (Santa Cruz CA). GSK3 (Santa Cruz Biologicals) and phospho-FAK (Cell Signaling Technologies) were diluted 1:500 in TSB-T solution with 5% BSA. Antibodies diluted in a TBS-T solution with 5% milk were phospho-Akt Thr308 (1:500, Cell Signaling Technologies), Akt (1:1000, Cell Signaling Technologies), JNK2 (1:1000, Santa Cruz), PTEN (1:1000, Cell Signaling Technologies), and FAK (1:1000, Santa Cruz). Antibodies diluted in TBS-T only were phospho-Akt Ser473 (1:2000, Cell Signaling Technologies), phospho-S6 (1:2000, Cell Signaling Technologies), S6 (1:2000, Cell Signaling Technologies), phospho-PKD (1:1000, Cell Signaling Technologies), and PKD (1:500, Abcam, Toronto, ON, Canada). All antibodies were from rabbits, except for JNK2 and Akt, which were from mice. The appropriate second antibody was diluted 1:2000 in TBS-T with 5% milk. Western Lightning Plus ECL (Perkin-Elmer, Woodbridge, ON, Canada) and Clarity Max ECL (Bio-Rad) were used for membrane revelation with the Gel Doc system and Image Lab software (Bio-Rad). For normalization, the “Total lane method” was used and adjustments were made according to pre-blocking membrane exposure and to a standard pool.

1.5.6 Histology

Picosirius red staining was done in order to measure mid-LV sections size and fibrosis content ($n = 6/\text{group}$). LV pieces fixed in paraffin were cut and deparaffinized. Tissue sections were then rehydrated and then colored for 1 h in 0.1% Sirius red diluted in saturated picric acid. Sections were then washed in 1% acetic acid, dehydrated three times in 100% ethanol for 5 min and finally washed in xylene. A picture of each mid-LV section was acquired with a Zeiss optical microscope and Zen software (Germany) with a size of 280 equal area tiles.

1.5.7 Statistical analysis

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

1.6 Results

Eight out of 13 AR rats were alive at the end of protocol. All animals in the other groups survived the duration of the protocol. Difference in survival between AR and AROcx groups was close to statistical significance ($P = 0.052$) (Fig. 1A). Ocx animals had a significantly lower body weight than intact animals ($P < 0.0001$). There were no significant changes in lungs weight (a marker of heart failure) between the S and the AR and between the SOcx and the AROcx groups (Table 1).

1.6.1 Cardiac hypertrophy

LV volume overload from AR caused a significant gain in cardiac mass for both intact and Ocx animals ($P < 0.0001$) (Fig. 1C). This gain was larger for the AR group compared to AROcx (60% vs. 40%, respectively; $P = 0.019$). AR severity was similar between the groups (Table 2). Hypertrophy from AR was more important in the LV compared to the RV and the LV gain of mass compared to respective S group was more important in intact AR animals than in AROcx (LV: 66%, RV: 45% for AR compared to LV: 45%, RV: 32% for AROcx, respectively) (Table 1 and Fig. 1D). The important LV hypertrophic response in AR animals

was also apparent on a left mid-ventricular section. The AROcx LV tended to be similar to S animals (Fig. 1B). We did not record significant changes in the content of interstitial myocardial fibrosis between the groups (not illustrated).

1.6.2 Echocardiographic data

LV dilation was significantly greater in AR than in AROcx rats as illustrated by the end-diastolic (EDD) dimensions (Fig. 2A and Table 2). Inter-ventricular septal wall thickness (SW) increased in AR compared to sham animals, but this increase was significantly greater in intact rats ($P < 0.0001$) (Table 2). A larger decrease in LV fractional shortening (FS) was observed in intact AR animals compared to AROcx (26% vs. 15%, respectively) (Fig. 2B). As expected, LV stroke volume (SV) was significantly increased in AR and AROcx males. Again, there was a tendency toward a more important SV increase in intact AR than in AROcx male rats ($P = 0.056$) (Fig. 2C). Heart rates were similar between the groups (Table 2).

We measured diastolic flow parameters through the mitral valve. E wave, representing LV rapid filling, was significantly higher in AR animals (Fig. 2D). Likewise, the slope of the E wave was significantly steeper for AR rats. Again, these changes were more important for AR rats than for AROcx (Fig. 2E). The A wave was reduced in Ocx compared to intact rats (Fig. 2F). There was no significant difference in the E/A ratio between the groups (not shown).

1.6.3 Markers of hypertrophy and extracellular matrix remodeling

AR caused an increase in LV Anp gene expression, this being significantly stronger in intact animals (Fig. 3A and B). Bnp expression was similarly increased in both AR groups. Trpc6 expression was only increased in the intact AR group. As expected, Myh6 gene expression was reduced with AR whereas Myh7 expression tended to increase. Klf15, a transcription factor inhibiting the expression of pro-hypertrophic genes (Leenders et al. 2012), was only downregulated in intact AR animals. Orchiectomy, itself, had a little influence on basal LV mRNA levels of the genes described above (Fig. S1).

We then analyzed gene expression of several extracellular matrix (ECM) remodeling markers. In intact AR animals, Col1a1, Mmp2, Timp1, Ctgf, and Lox1 mRNA levels were significantly increased compared to sham-operated rats (Fig. 3C). Gene expression for most

of those genes in AROcx animals was similar to S controls. There was a tendency for most of these genes to have a lower expression in the LV of Ocx animals, this being significant for Col1a1 and Col3a1 (Fig. S1).

1.6.4 LV energy metabolism and markers

A metabolic transition from fatty acid to glucose substrate use is a feature of pathological CH (Sambandam et al. 2002). Globally, mRNA levels of genes encoding fatty acid transporter (FAT) and enzymes implicated in fatty acid oxidation (FAO) were significantly lowered in AR animals, whereas only a few of these FAO genes were significantly downregulated in AROcx (Fig. 4A). There was no significant difference between the two sham groups (Fig. S2).

AR and Ocx (Fig. 4B) also influenced glucose metabolism and especially glycolysis. Glut1 gene was significantly more expressed in the AR group whereas, Glut4, was significantly less expressed in AR animals and stayed at basal levels in AROcx. Hk1 gene expression was significantly increased in AR animals. However, Pfk and Eno3 mRNA levels, two other glycolytic enzymes, were significantly reduced in the AR group. Pfk was also reduced in the AROcx. There was no significant difference in Pdha1 or Pdk4 gene expression.

We then measured gene expression for Erra, Errc, Rxrc, and Ppara, transcription factors and cofactors involved in the regulation in myocardial energy metabolism. Erra and Rxrc gene expression was decreased with AR, but Errc and Ppara were only downregulated in intact AR rats (Fig. 4C). Rxrc had a lower basal level in Ocx animals (Fig. S2), but the decrease in the AR group was still more important than in AROcx.

Metabolic changes are often accompanied by modifications in the expression of mitochondrial biogenesis and function genes (Fig. 4D). There was a downregulation of several of those genes in the AR group, except for mitofusin genes (Mfn1 and Mfn2) that only tended to be reduced compared to sham rats. This downregulation was also present in the AROcx animals when compared to their respective controls. However, no significant difference was observed for the AROcx group for Gabpa and Nduf4 genes. Nduf4 encodes for a subunit of the first complex of the respiratory chain. Cox5b1, which encodes for a subunit of cytochrome c (the fourth complex of the respiratory chain), was significantly more expressed in SOcx rats compared to S (Fig. S3).

The enzymatic activity of the hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase (HADH), an enzyme implicated in the oxidation of medium chain fatty acid, was not significantly different between the groups although it tended to be lowered in the AR group (Fig. 5A).

The hexokinase (HK) enzymatic activity determination was performed to measure myocardial glucose use capacity. HK activity was increased in both AR groups (Fig. 5B). Moreover, the HADH/HK activities ratio was significantly reduced in AR animals (Fig. 5C).

Nevertheless, the activity levels of other enzymes relevant for energy metabolism were not changed by either Ocx or AR. Creatine kinase (CK) activity was not different between the groups, except for AR, which tended to decrease it (Fig. 5D). AR or testosterone deficiency did not influence citrate synthase (CS) activity (Fig. 5E). Likewise, there was no significant change in succinate dehydrogenase (SDH) activity, an enzyme of both the citric acid cycle and the second complex of the respiratory chain (Fig. 5F). We then studied β -hydroxybutyrate dehydrogenase (BDH) activity in order to measure ketone bodies use in the hypertrophied myocardium. AR reduced BDH activity in intact animals only. Ocx also decreased BDH activity in both sham and AR rats (Fig. 5G).

1.6.5 Cell signaling

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathways are implicated in cell growth, cardiac myocytes hypertrophy, and response to stress (Heineke and Molkentin 2006). Phospho-Erk1/2 content decreased in AR groups, this more markedly in Ocx animals, whereas total Erk1/2 significantly increased (Fig. 6A–C). Phospho-p38 contents were mostly stable between groups. There was an increase in total p38 content in the LV of Ocx rats, (Fig. 6A, D and E). Phospho-Jnk2 levels increased in AR groups. This increase was more important in the intact animals. There was no significant difference between the Ocx groups. Finally, total Jnk2 was reduced in Ocx groups (Fig. 6A, F and G).

Protein kinase B (Akt) is implicated in both hypertrophic and survival signaling pathways (Heineke and Molkentin 2006). Phospho-Akt (S473) levels were significantly increased in AR groups and most clearly in Ocx rats (Fig. 7A–C). AR also increased levels of the phosphorylated and inactive form of Gsk3 (Fig. 7A, D and E).

S6, a ribosomal protein downstream of Akt and the mTORC1 (mTOR complex 1) and implicated in the regulation of protein synthesis and cell growth, was then analyzed.

Phospho-S6 was decreased by Ocx, but total form levels were constant between the groups (Fig. S4A–C). Loss of androgens significantly also decreased phosphorylated and total focal adhesion kinase (Fak) contents whereas AR had no effect (Fig. S4A, D and E). Finally, protein kinase D (Pkd) phosphorylated form was also decreased by Ocx, but did not change with AR. Total Pkd increased with the loss of androgens (Fig. S4A, F and G).

1.7 Discussion

Our results suggest that androgens are important drivers of pathological cardiac hypertrophy development caused by severe left ventricle overload from chronic aortic regurgitation. Testosterone deficiency in AR rats resulted in reduced cardiac hypertrophy, less LV dilation, better function and a strong tendency for better survival of the animals. Changes in LV expression for an important number of genes associated with pathological myocardial remodeling were less marked in AROcx animals than in intact AR. In fact, the LV gene expression pattern we observed in AROcx rats had similarities with the one we reported recently in a study comparing AR females to males (Beaumont et al. 2017). Surprisingly, AR females had a stronger hypertrophic response to LV VO from AR than males, the opposite we observed with AROcx males. This suggests that LV hypertrophy and the LV transcriptional response may not be completely linked together and that other factors are implicated.

Orchiectomy reduced general growth of animals, which may be explained by the loss of androgens and their anabolic effects (Kloner et al. 2016). In parallel, normal cardiac growth was also reduced in Ocx animals. Loss of androgens was associated with a decrease in the basal activation levels of several signaling molecules such as S6 kinase, FAK, and PKD (PKCI). Physiological heart growth and maladaptive hypertrophy development share and have distinctive signaling pathways. Activation of the Akt/mTOR pathway is associated with pathological CH (even in AR) although normal cardiac growth also relies upon this pathway (Ha et al. 2005; Kemi et al. 2008; Maillet et al. 2013; Volkers et al. 2013; Drolet et al. 2015). We tried, in this study, to better identify the contribution of androgens to pathological CH. This is why comparisons of AR and AROcx groups were mostly made versus their respective sham-operated counterparts. Obviously, we cannot totally exclude that inhibition of normal cardiac growth by androgen removal may have also reduced the extent of the hypertrophic response to a similar volume overload at the start of the protocol in Ocx rats. This reduced hypertrophic response is accompanied by an attenuated LV gene expression response to

AR. Moreover, Ocx had only little effects on basal LV gene expression in sham animals suggesting that changes in AR animals were related to the response to the overload and not to castration.

Even if VO severity was similar between both AR groups, stress and hypertrophic markers measured in this study pointed out that non-Ocx animals' myocardium was more responsive to the hemodynamic stress than those deprived of androgens. For instance, LV pJnk content was increased in both AR groups but this was more important in intact animals. Jnk can be activated by stress stimuli and its differential activation could explain in part differences in the cardiac response to overload between AR and AROcx rats (Sabapathy et al. 2004).

Hypertrophic markers gene expression results showed that the myocardium of AR animals responded to the increased LV wall stress, as expected. Interestingly, some of those genes had lower mRNA levels in the LV of AROcx rats (Anp and Trpc6). This suggests that androgens may be implicated in the myocardial response to mechanical wall stress. Interestingly, FAK (focal adhesion kinase), a mediator of integrin activation, is strongly downregulated in Ocx myocardium regardless of the presence or not of a hemodynamic stress.

The effects of testosterone deficiency did not seem to involve Akt, Gsk3, or p38 signaling. All AR animals (Ocx or not) had higher levels of pAkt and thus seemed to have enhanced Akt activity, as the pGsk3 content was similarly increased. Androgens action can be mediated by delayed genomic effect (classic androgen receptor) and a rapid non-genomic effect via G-coupled receptors such as GPCR6A or ZIP9. Testosterone has been shown to be pro-hypertrophic in cultured neonatal rat cardiac myocytes (Marsh et al. 1998; Vicencio et al. 2006; Altamirano et al. 2009) mostly, but not only, via genomic or DNA-binding effects. It is believed that testosterone leads probably via Akt to the phosphorylation and inhibition of Gsk3, which is considered an anti-hypertrophic factor in cardiac cells (Duran et al. 2016; Lucas-Herald et al. 2017). Our observation seems to be somewhat in contradiction with previous reports of the implication of this pathway to explain hypertrophic actions of androgens. We observed activation of Akt in AR rats and increased phosphorylation of Gsk3, but loss of testosterone had no effects on these parameters. The study of the mechanisms implicated in testosterone hypertrophic effects was mostly studied in cultured cardiac myocytes and not in living models of hypertrophy. Testosterone has also been shown to cause a raise in cytosolic calcium levels leading to the activation of calcineurin and

NFAT, which are implicated in maladaptive hypertrophy development (Duran et al. 2016). The increased pJnk content we observed in the intact AR group could antagonize calcineurin effects through phosphorylation of NFAT. However, Jnk is not able to totally block calcineurin hypertrophic effects, which maintains the balance toward hypertrophic stimulation (Liang et al. 2003). In addition, testosterone stimulation of cardiomyocytes can result in S6 phosphorylation, which mediate cardiac growth and/or hypertrophy (Altamirano et al. 2009).

As we had previously reported in this rat model of LV volume overload, many genes related to myocardial energy metabolism were modulated (Arsenault et al. 2013; Roussel et al. 2015; Beaumont et al. 2017). As observed for females compared to intact AR males, AROcx rats displayed less modulation of those genes (Beaumont et al. 2017). This was also true for several genes implicated in the mitochondrial function. The expected shift toward glucose utilization from fatty acids by the myocardium was observed in intact AR rats where hexokinase activity was enhanced and a decrease in HADH/HK ratio was recorded. There was no change in activities of other energy metabolism enzymes studied (i.e., citrate synthase, succinate dehydrogenase and creatine kinase) suggesting that only some of these enzymes are influenced by either AR or hormonal status at this stage of the disease. Moreover, ketone body metabolism also seems impaired by Ocx and AR. Conversely, ketone body use usually increases in heart hypertrophy (pressure overload models) and HF (Aubert et al. 2016). Pathological remodeling of the heart frequently involves downregulation of fatty acids use as energy substrates in order to decrease oxygen consumption (Sambandam et al. 2002; Roussel et al. 2015). Here, we show that hormonal status of AR males influences their myocardial metabolic profile. In addition, estrogens are not the only mediator of sexual dimorphism in the metabolic profile induced by heart hypertrophy, as it has been proposed (Peterson et al. 2007). Androgen deprivation by Ocx can reduce metabolic changes. Our results suggest that AROcx animals may have a relatively preserved myocardial energy metabolism, which could help to respond to the higher energy demands from hypertrophy by preserving fatty acids use. This also suggests that androgens may contribute to the myocardial energy switch usually observed during pathological hypertrophy. The role of androgens on heart energy metabolism has not received a lot of attention in the past. However, testosterone has been shown to increase glucose use by cardiac myocytes in culture by increasing Glut-4-mediated glucose entry (Wilson et al. 2013).

There is no clear evidence of androgens effects on the hypertrophic heart and on HF in the literature. HF male patients often display hypoandrogenism. Androgens therapy in HF patients sometimes helps maintaining functional capacity, but these benefits are probably mediated via the peripheral effects of androgens on skeletal muscle, without directly improving heart function (Toma et al. 2012). In addition, different types of androgens may not have the same impact on the heart. Testosterone stimulates the coronary vasodilatation (Webb et al. 1999), whereas dihydrotestosterone (DHT, the product of testosterone transformation by the 5 α -reductase) impairs heart function and adaptation to stress by enhancing fibrosis (Montalvo et al. 2012). Moreover, even if both testosterone and DHT induce hypertrophy in cardiomyocytes, only DHT increases Anp levels (Marsh et al. 1998). In fact, 5 α -reductase activity (responsible for conversion of testosterone to DHT) and DHT levels are increased in the hypertrophic heart, which could enhance DHT negative effects (Thum and Borlak 2002; Zwadlo and Borlak 2012).

One limitation of our study is that we did not study the effect of androgen replacement therapy on Ocx animals. It is not clear if we could have reproduced physiological androgen levels in our animals over a long period of 6 months as well as the natural balance between testosterone and DHT. Also, these levels would have to be monitored to avoid supra-physiological levels of androgens, which are known to be deleterious (Pirompol et al. 2016). Another limitation is that rats were orchiectomized at a relatively young age (8 weeks), which may have influenced the heart response to the hemodynamic stress. Male rats continue to grow and gain weight until late in their first year of life (Plante et al. 2008; Lachance et al. 2009a). Experiments in older rats (>12 months of age) could have been informative and should be performed in the future. Unlike the situation encountered for most human patients, AR was induced acutely in the animals enacting a probably more intense response of the heart than the one experienced in patients.

In conclusion, we showed that androgens reduce the hypertrophic response of the heart caused by severe and chronic volume overload from aortic valve regurgitation. Androgens deficiency seems to reduce the level of response of the myocardium to an increased mechanical stress probably resulting in less alterations in LV gene expression, extracellular matrix remodeling, and maintained normal energetics. This has similarities with the situation we observed in AR females (Beaumont et al. 2017). Unlike AR females though, Ocx males have reduced hypertrophy suggesting that other factors probably related to biological sex and/or estrogens have to be taken into consideration to explain this sexual dimorphism.

Estrogens have received more attention in the study of pre-clinical models of cardiac hypertrophy. Here, we show that androgens have also a major effect in mediating sexual dimorphism in the heart especially in the response to an overload.

1.8 Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to declare.

1.9 References

- Altamirano, F., C. Oyarce, P. Silva, M. Toyos, C. Wilson, S. Lavandero, et al. 2009. Testosterone induces cardiomyocyte hypertrophy through mammalian target of rapamycin complex 1 pathway. *J. Endocrinol.* 202:299–307.
- Arsenault, M., E. Plante, M. C. Drolet, and J. Couet. 2002. Experimental aortic regurgitation in rats under echocardiographic guidance. *J. Heart Valve Dis.* 11:128–134.
- Arsenault, M., A. Zendaoui, E. Roussel, M. C. Drolet, W. Dhahri, A. Grenier, et al. 2013. Angiotensin II-converting enzyme inhibition improves survival, ventricular remodeling, and myocardial energetics in experimental aortic regurgitation. *Circ. Heart Fail.* 6:1021–1028.
- Aubert, G., O. J. Martin, J. L. Horton, L. Lai, R. B. Vega, T. C. Leone, et al. 2016. The failing heart relies on ketone bodies as a fuel. *Circulation* 133:698–705.
- Ayaz, O., S. Banga, S. Heinze-Milne, R. A. Rose, W. G. Pyle, and S. E. Howlett. 2019. Long-term testosterone deficiency modifies myofilament and calcium-handling proteins and promotes diastolic dysfunction in the aging mouse heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 316: H768–H780.
- Basualto-Alarcon, C., G. Jorquera, F. Altamirano, E. Jaimovich, and M. Estrada. 2013. Testosterone signals through mTOR and androgen receptor to induce muscle hypertrophy. *Med. Sci. Sports Exerc.* 45:1712–1720.
- Beaumont, C., E. Walsh-Wilkinson, M. C. Drolet, E. Roussel, M. Arsenault, and J. Couet. 2017. Female rats with severe left ventricle volume overload exhibit more cardiac hypertrophy but fewer myocardial transcriptional changes than males. *Sci. Rep.* 7:729.
- Belanger, M. M., E. Roussel, and J. Couet. 2003. Up-regulation of caveolin expression by cytotoxic agents in drug-sensitive cancer cells. *Anticancer Drugs* 14:281–287.

Blenck, C. L., P. A. Harvey, J. F. Reckelhoff, and L. A. Leinwand. 2016. The importance of biological sex and estrogen in rodent models of cardiovascular health and disease. *Circ. Res.* 118:1294–1312.

Bouchard-Thomassin, A. A., D. Lachance, M. C. Drolet, J. Couet, and M. Arsenault. 2011. A high-fructose diet worsens eccentric left ventricular hypertrophy in experimental volume overload. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300: H125–H134.

Champetier, S., A. Bojmehrani, J. Beaudoin, D. Lachance, E. Plante, E. Roussel, et al. 2009. Gene profiling of left ventricle eccentric hypertrophy in aortic regurgitation in rats: rationale for targeting the beta-adrenergic and renin- angiotensin systems. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296:H669–H677.

Dent, M. R., P. S. Tappia, and N. S. Dhalla. 2010. Gender differences in cardiac dysfunction and remodeling due to volume overload. *J. Card. Fail.* 16:439–449.

Dhahri, W., M. C. Drolet, E. Roussel, J. Couet, and M. Arsenault. 2014. Chronic high-fat diet-induced obesity decreased survival and increased hypertrophy of rats with experimental eccentric hypertrophy from chronic aortic regurgitation. *BMC Cardiovasc. Disord.* 14:123.

Drolet, M. C., V. Desbiens-Brassard, E. Roussel, V. Tu, J. Couet, and M. Arsenault. 2015. Blockade of the acute activation of mTOR complex 1 decreases hypertrophy development in rats with severe aortic valve regurgitation. *Springerplus* 4:435.

Duran, J., C. Oyarce, M. Pavez, D. Valladares, C. Basualto- Alarcon, D. Lagos, et al. 2016. GSK-3beta/NFAT signaling is involved in testosterone-induced cardiac myocyte hypertrophy. *PLoS ONE* 11:e0168255.

Gardner, J. D., G. L. Brower, and J. S. Janicki. 2002. Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload. *J. Card. Fail.* 8:101–107.

Grossman, W., D. Jones, and L. P. McLaurin. 1975. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J. Clin. Invest.* 56:56–64.

Ha, T., Y. Li, X. Gao, J. R. McMullen, T. Shioi, S. Izumo,

et al. 2005. Attenuation of cardiac hypertrophy by inhibiting both mTOR and NFkappaB activation in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 39:1570–1580.

Heineke, J., and J. D. Molkentin. 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:589–600.

- Kemi, O. J., M. Ceci, U. Wisloff, S. Grimaldi, P. Gallo, G. L. Smith, et al. 2008. Activation or inactivation of cardiac Akt/ mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J. Cell. Physiol.* 214:316–321.
- Kloner, R. A., C. Carson, A. Dobs, S. Kopecky, and E. R. Mohler. 2016. Testosterone and cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 67:545–557.
- Lachance, D., S. Champetier, E. Plante, A. A. Bouchard- Thomassin, E. Roussel, J. Couet, et al. 2009a. Effects of exercise in volume overload: insights from a model of aortic regurgitation. *Med. Sci. Sports Exerc.* 41:1230–1238.
- Lachance, D., E. Plante, A. A. Bouchard-Thomassin, S. Champetier, E. Roussel, M. C. Drolet, et al. 2009b. Moderate exercise training improves survival and ventricular remodeling in an animal model of left ventricular volume overload. *Circ. Heart Fail.* 2:437–445.
- Leenders, J. J., W. J. Wijnen, I. van der Made, M. Hiller, M. Swinnen, T. Vandendriessche, et al. 2012. Repression of cardiac hypertrophy by KLF15: underlying mechanisms and therapeutic implications. *PLoS ONE* 7:e36754.
- Leinwand, L. A. 2003. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J. Clin. Invest.* 112:302–307.
- Liang, Q., O. F. Bueno, B. J. Wilkins, C. Y. Kuan, Y. Xia, and J. D. Molkentin. 2003. c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling. *EMBO J.* 22:5079–5089.
- Lopaschuk, G. D., J. R. Ussher, C. D. Folmes, J. S. Jaswal, and W. C. Stanley. 2010. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol. Rev.* 90:207–258.
- Lucas-Herald, A. K., R. Alves-Lopes, A. C. Montezano, S. F. Ahmed, and R. M. Touyz. 2017. Genomic and non-genomic effects of androgens in the cardiovascular system: clinical implications. *Clin. Sci. (Lond.)* 131:1405–1418.
- Mahmoodzadeh, S., D. Fliegner, and E. Dworatzek. 2012. Sex differences in animal models for cardiovascular diseases and the role of estrogen. *Handb. Exp. Pharmacol.* 214:23–48.
- Maillet, M., J. H. van Berlo, and J. D. Molkentin. 2013. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14:38– 48.
- Malkin, C. J., P. J. Pugh, J. N. West, E. J. van Beek, T. H. Jones, and K. S. Channer. 2006. Testosterone therapy in men with moderate severity heart failure: a double-blind randomized placebo controlled trial. *Eur. Heart J.* 27:57–64.

Marsh, J. D., M. H. Lehmann, R. H. Ritchie, J. K. Gwathmey, G. E. Green, and R. J. Schiebinger. 1998. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 98:256–261.

Montalvo, C., A. V. Villar, D. Merino, R. García, M. Ares, M. Llano, et al. 2012. Androgens contribute to sex differences in myocardial remodeling under pressure overload by a mechanism involving TGF- β . *PLoS ONE* 7:e35635.

Peterson, L. R., P. F. Soto, P. Herrero, K. B. Schechtman, C. Dence, and R. J. Gropler. 2007. Sex differences in myocardial oxygen and glucose metabolism. *J. Nucl. Cardiol.* 14:573–581.

Pirompol, P., V. Teekabut, W. Weerachatyanukul, T. Bupha- Intr, and J. Wattanapermpool. 2016. Supra-physiological dose of testosterone induces pathological cardiac hypertrophy. *J. Endocrinol.* 229:13–23.

Plante, E., J. Couet, M. Gaudreau, M. P. Dumas, M. C. Drolet, and M. Arsenault. 2003. Left ventricular response to sustained volume overload from chronic aortic valve regurgitation in rats. *J. Card. Fail.* 9:128–140.

Plante, E., D. Lachance, M. Gaudreau, M. C. Drolet, E. Roussel, M. Arsenault, et al. 2004. Effectiveness of beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation. *Circulation* 110:1477–1483.

Plante, E., D. Lachance, E. Roussel, M. C. Drolet, M. Arsenault, and J. Couet. 2006. Impact of anesthesia on echocardiographic evaluation of systolic and diastolic function in rats. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 19:1520–1525.

Plante, E., D. Lachance, S. Champetier, M. C. Drolet, E. Roussel, M. Arsenault, et al. 2008. Benefits of long-term beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294:H1888–H1895.

Pugh, P. J., T. H. Jones, and K. S. Channer. 2003. Acute haemodynamic effects of testosterone in men with chronic heart failure. *Eur. Heart J.* 24:909–915.

Roger, V. L., A. S. Go, D. M. Lloyd-Jones, E. J. Benjamin, J. D. Berry, W. B. Borden, et al.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. 2012. Heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 125:e2–e220.

Roth, G. A., C. Johnson, A. Abajobir, F. Abd-Allah, S. F. Abera, G. Abyu, et al. 2017. Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70:1–25.

Roussel, E., M. C. Drolet, E. Walsh-Wilkinson, W. Dhahri, D. Lachance, S. Gascon, et al. 2015. Transcriptional changes associated with long-term left ventricle volume overload in rats: impact on enzymes related to myocardial energy metabolism. *Biomed. Res. Int.* 2015:949624.

Sabapathy, K., K. Hochedlinger, S. Y. Nam, A. Bauer, M. Karin, and E. F. Wagner. 2004. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol. Cell* 15:713–725.

Sambandam, N., G. D. Lopaschuk, R. W. Brownsey, and M. F. Allard. 2002. Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail. Rev.* 7:161–173.

Thum, T., and J. Borlak. 2002. Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *FASEB J.* 16:1537–1549.

Toma, M., F. A. McAlister, E. E. Coglianese, V. Vidi, S. Vasaiwala, J. A. Bakal, et al. 2012. Testosterone supplementation in heart failure: a meta-analysis. *Circ. Heart Fail.* 5:315–321.

Vicencio, J. M., C. Ibarra, M. Estrada, M. Chiong, D. Soto, V. Parra, et al. 2006. Testosterone induces an intracellular calcium increase by a nongenomic mechanism in cultured rat cardiac myocytes. *Endocrinology* 147:1386–1395.

Volkers, M., H. Toko, S. Doroudgar, S. Din, P. Quijada, A. Y. Joyo, et al. 2013. Pathological hypertrophy amelioration by PRAS40-mediated inhibition of mTORC1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110:12661–12666.

Webb, C. M., J. G. McNeill, C. S. Hayward, D. de Zeigler, and P. Collins. 1999. Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation* 100:1690–1696.

van Weerden, W. M., H. G. Bierings, G. J. van Steenbrugge, F. H. de Jong, and F. H. Schroeder. 1992. Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci.* 50:857–861.

Wilson, C., A. Contreras-Ferrat, N. Venegas, C. Osorio- Fuentealba, M. Pavez, K. Montoya, et al. 2013. Testosterone increases GLUT4-dependent glucose uptake in cardiomyocytes. *J. Cell. Physiol.* 228:2399–2407.

Witt, H., C. Schubert, J. Jaekel, D. Fliegner, A. Penkalla, K. Tiemann, et al. 2008. Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice. *J. Mol. Med. (Berl)* 86:1013–1024.

Xu, L., G. Freeman, B. J. Cowling, and C. M. Schooling. 2013. Testosterone therapy and cardiovascular events among men: a systematic review and meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. *BMC Med.* 11:108.

Zwadlo, C., and J. Borlak. 2012. Dihydrotestosterone—a culprit in left ventricular hypertrophy. *Int. J. Cardiol.* 155:452–456.

1.10 Tables

Table 1.1 Animal characteristics at the end of the protocol

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

S, sham control group; SOcx, sham orchectomized group; AR, aortic regurgitation control group; AROcx, AR orchectomized group; LV, left ventricle; RV, right ventricle. Values are expressed as the mean ± SEM. Group comparisons were made with Two-way ANOVA and Holm-Sidak post-test. ¶ P < 0.05 versus the respective sham group and † P < 0.05 versus the respective intact (non-Ocx) group.

Table 1.2 Echocardiographic and hemodynamic parameters at the end of the protocol

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

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

1.11 Figure legends

Figure 1.1 : Survival of animals with AR during the protocol (A), mid LV histological short-axis sections (B). Variation of heart weight (C) and LV weight (D) after tissue harvesting ($n = 8\text{--}10/\text{gr}$). For (C) and (D), the measured parameters of animals with AR were reported on those of their respective sham group to obtain the % of variation. For (A), P-value from Kaplan-Meier Log-rank test. For C and D, Student's t-test.

Figure 1.2 : Echocardiographic parameters on LV diastolic diameter, systolic function and compliance evaluated at the end of the protocol ($n = 9\text{--}12/\text{gr}$). Variations of end-diastolic diameter (A), of fractional shortening (FS) (B) and of stroke volume (C). Evaluation of the E wave (D), E-wave slope (E) and A wave (F). For A–C, P-value above the graph is from Student's t-test. (D–F) Statistics in the boxes next to each graph are from two-way ANOVA and Holm-Sidak post-test. P-value of orchectomy (O), disease (D) and interaction (OxD), * $P < 0.05$ versus their respective sham group and + $P < 0.05$ between the indicated groups.

Figure 1.3 : Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy (A, B) and extracellular matrix remodeling (C) markers. The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean \pm SEM ($n = 5\text{--}6/\text{gr}$). Messenger RNA levels of the S group were normalized to 1 and are represented by the dotted line. The blue column represents the AR animals while orange columns represent AROcx animals. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$ versus their respective sham group and + $P < 0.05$ or ++ $P < 0.01$ between the indicated groups.

Figure 1.4 : Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for proteins related to fatty acid uptake and oxidation (A), for proteins relevant to glucose metabolism (B) for transcription factors related to fatty acid metabolism (C) and mitochondrial function and biogenesis (D). The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean \pm SEM ($n = 5\text{--}6/\text{gr}$). Messenger RNA levels of the S group were normalized to 1 and are represented by the dotted line. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$ versus their respective sham group and + $P < 0.05$ or ++ $P < 0.01$ between the indicated groups.

Figure 1.5 : LV myocardial activity levels of enzymes implicated in β -oxidation (HADH) and glycolysis (hexokinase). Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase (HADH) (A), hexokinase (B), the HADH/hexokinase ratio (C) creatine kinase (CK) (D), citrate synthase

(CS) (E), succinate dehydrogenase (SDH) (F) and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase (BDH) (G). The results are reported as the mean \pm SEM ($n = 8/\text{gr.}$). Probability values in the boxes are from a two-way ANOVA and symbols, from Holm-Sidak multiple comparisons post-test. * $P < 0.05$ versus their respective sham group and + $P < 0.05$ between the indicated groups.

Figure 1.6 : LV protein contents of Erk1/2, p38 and Jnk. Representative blots for each signaling molecules (A). Graphs B to G represent densitometric measurements after normalization. Phosphorylated Erk1/2 (B), total Erk1/2 (C), phosphorylated p38 (D), total p38 (E), phosphorylated Jnk2 (F), and total Jnk (G). The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean \pm SEM ($n = 6/\text{gr.}$). P-values in the boxes are from a two-way ANOVA and symbols, from Holm-Sidak multiple comparisons post-test. * $P < 0.05$ versus their respective sham group and + $P < 0.05$ between the indicated groups.

Figure 1.7 : LV protein content of Akt and Gsk3. Representative blots for each signaling molecules (A). Graphs B to E represent densitometric measurement after normalization. Phosphorylated Akt on serine 473 (B), total Akt (C), phosphorylated Gsk3 (D), total Gsk3 (E). The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean \pm SEM ($n = 6/\text{gr.}$). Probability values in the boxes are from a two-way ANOVA and symbols, from Holm-Sidak multiple comparisons post-test. * $P < 0.05$ versus their respective sham group and + $P < 0.05$ between the indicated groups.

1.12 Figures

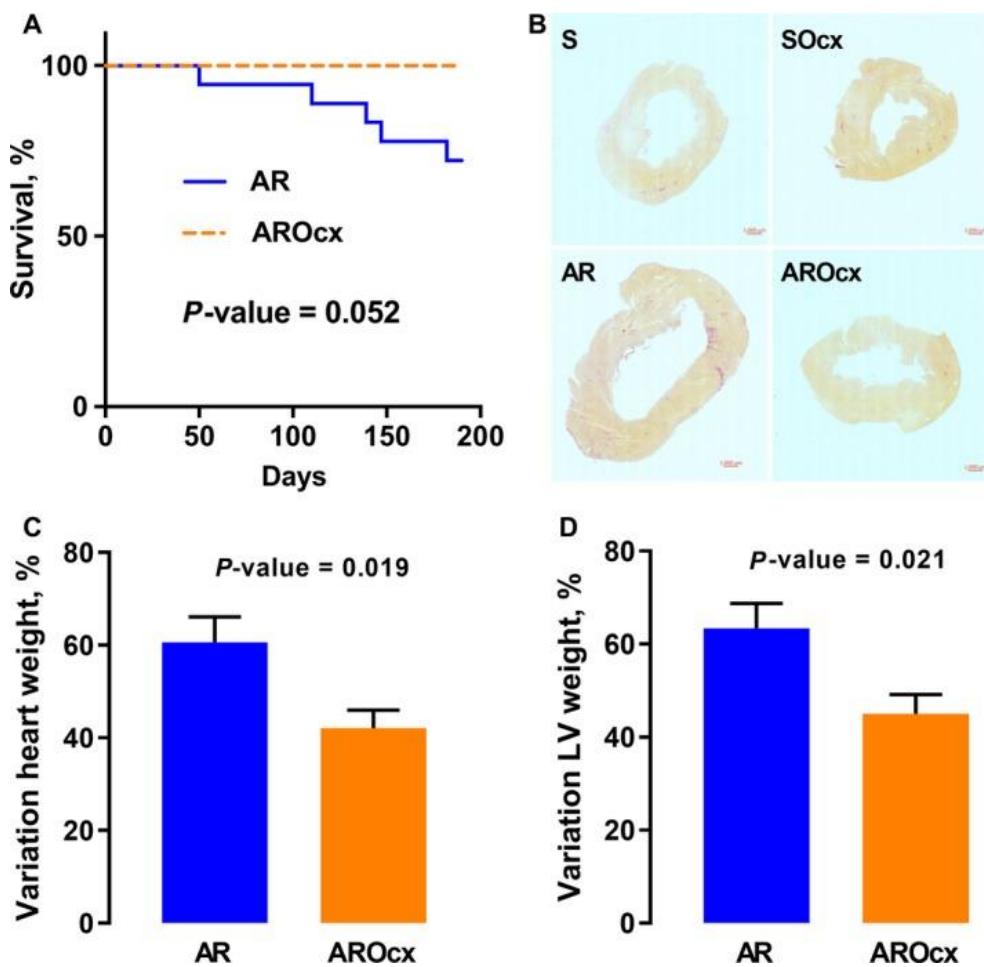


Figure 1.1 Survival of animals with aortic regurgitation during the protocol, mid left ventricle histological short-axis sections and variations of heart weight and LV weight

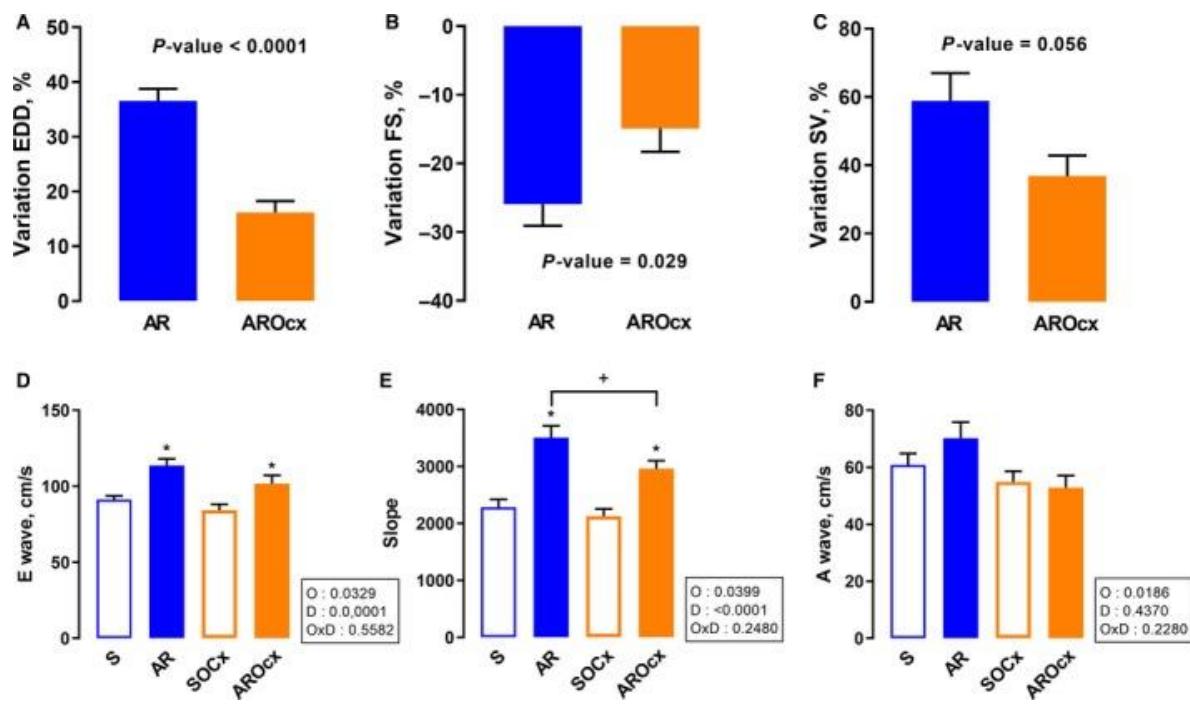


Figure 1.2 Echocardiographic parameters on LV diastolic diameter, systolic function and compliance

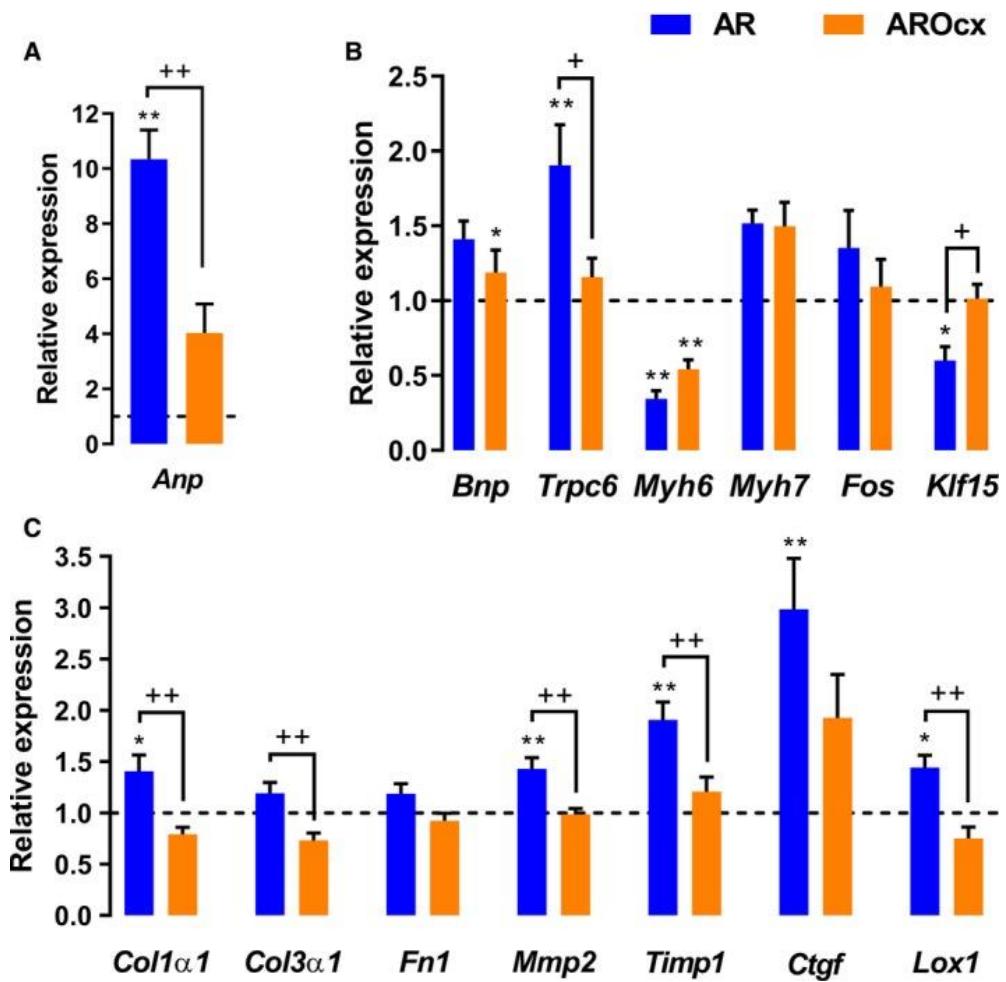


Figure 1.3 Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy and extracellular matrix remodeling markers

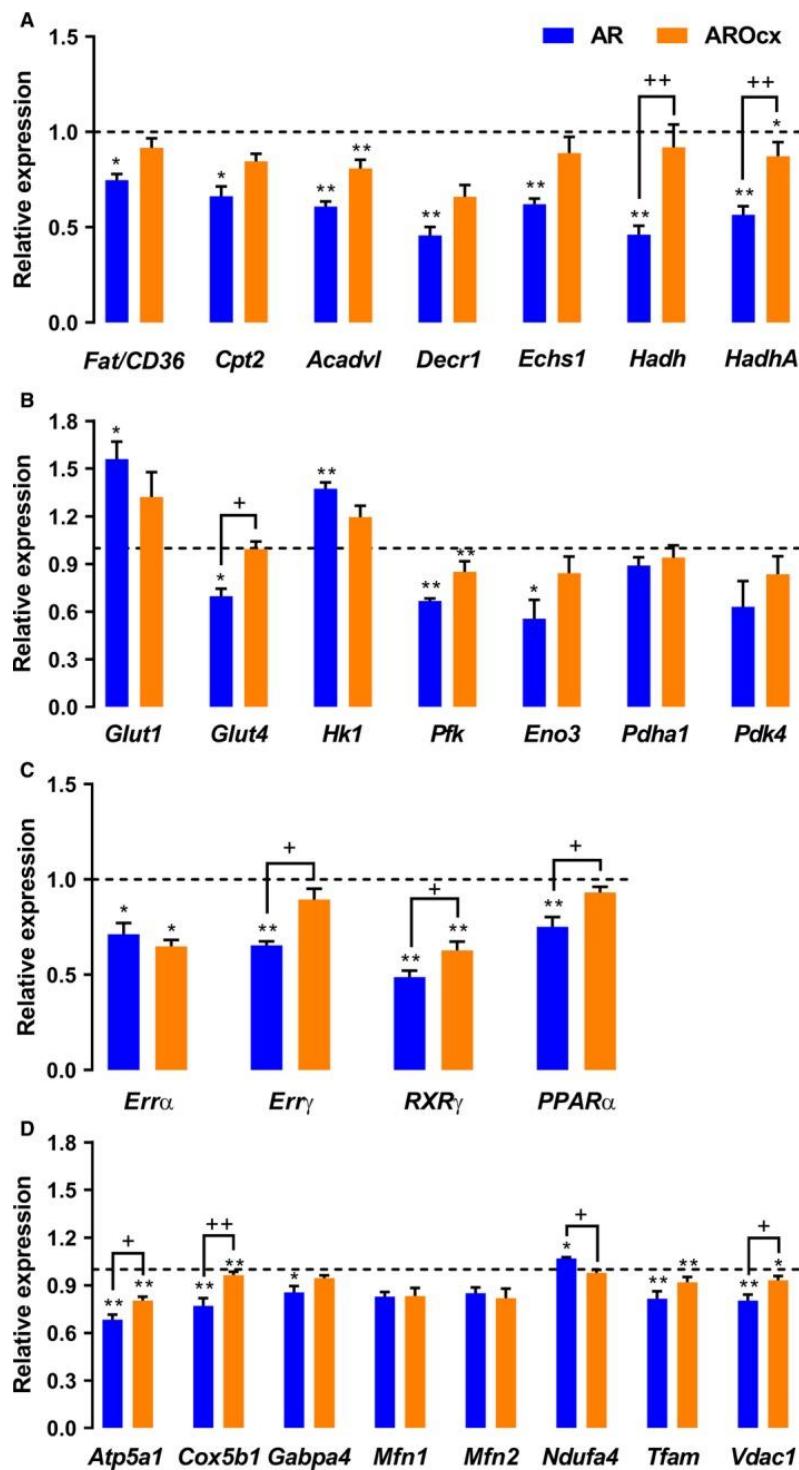


Figure 1.4 mRNA levels of genes encoding for proteins related to fatty acid uptake and oxidation, for proteins relevant to glucose metabolism, for transcription factors related to fatty acid metabolism and mitochondrial function and biogenesis

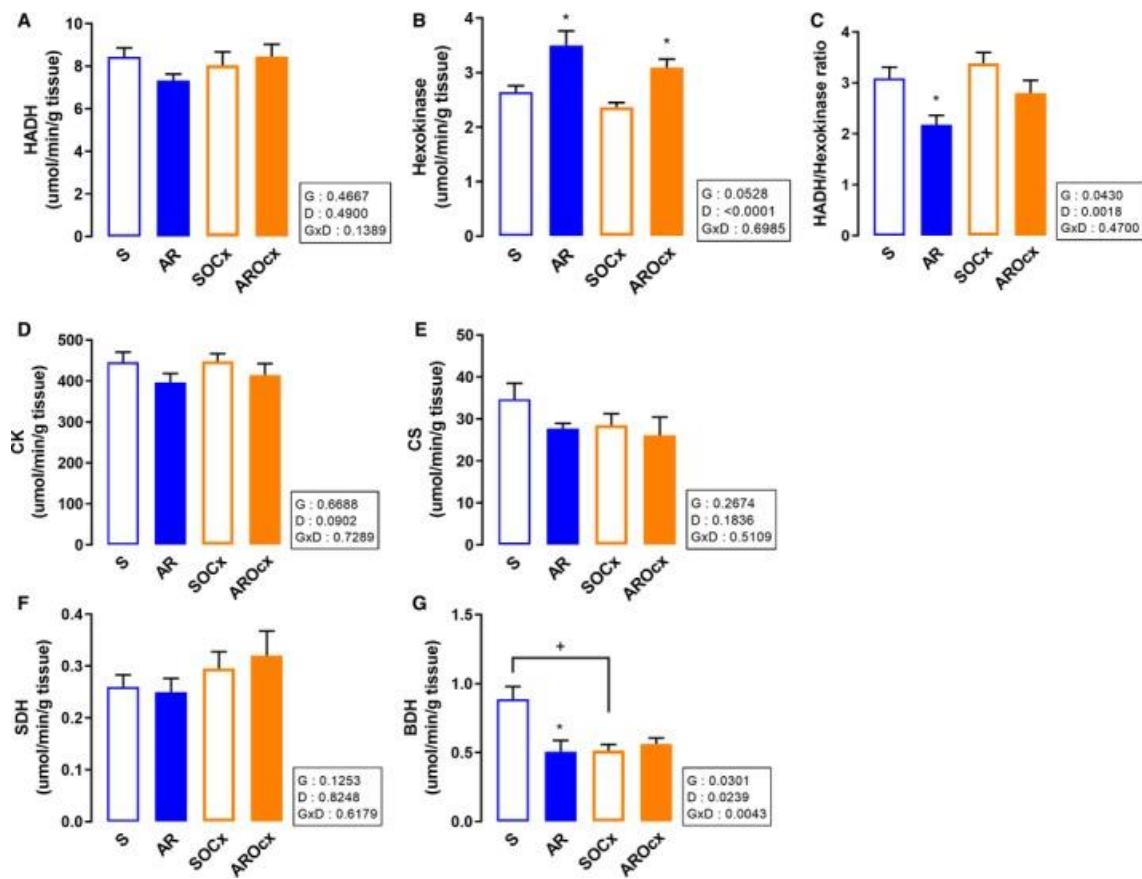


Figure 1.5 LV myocardial activity levels of enzymes implicated in myocardial energy metabolism

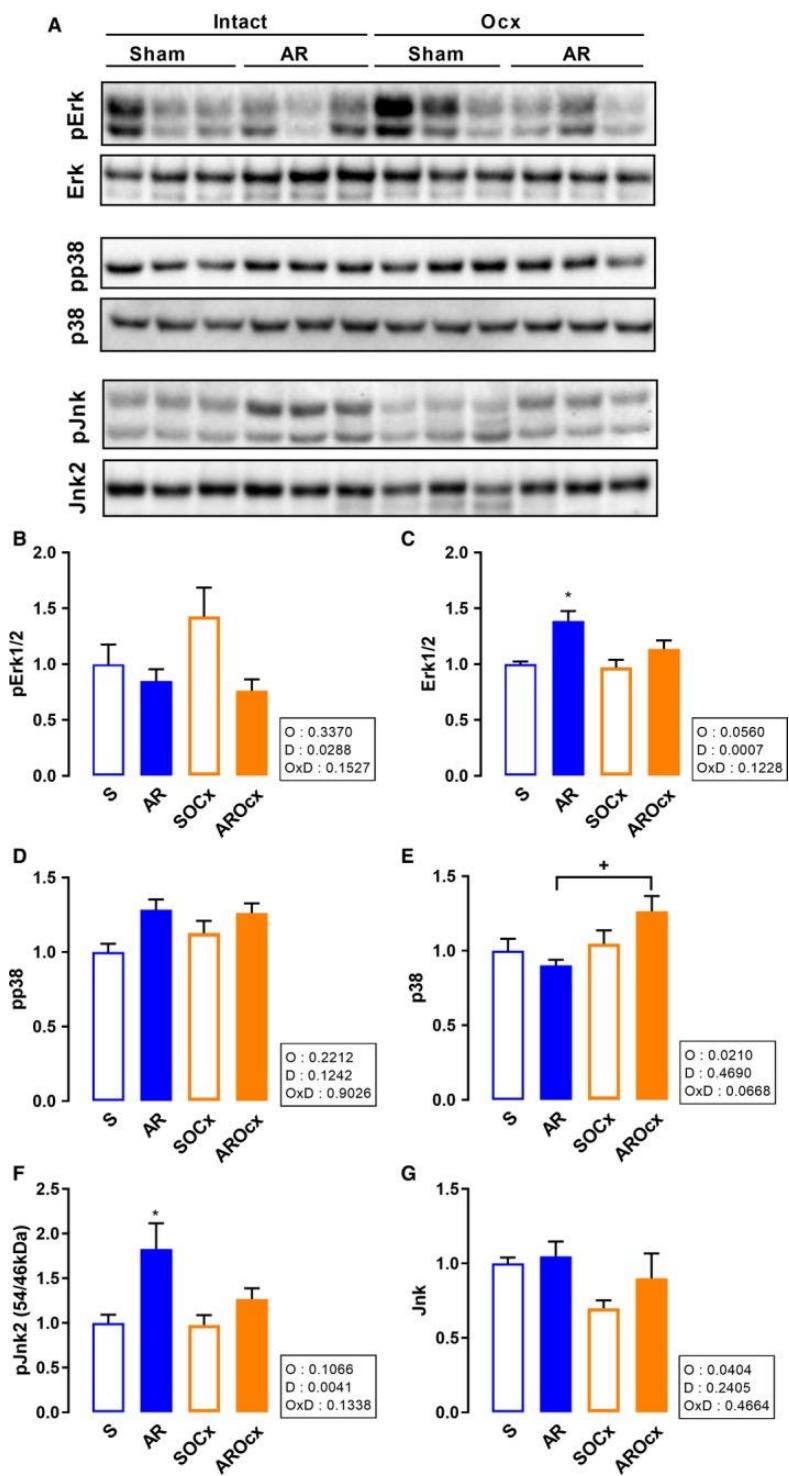


Figure 1.6 LV myocardial oxidative stress

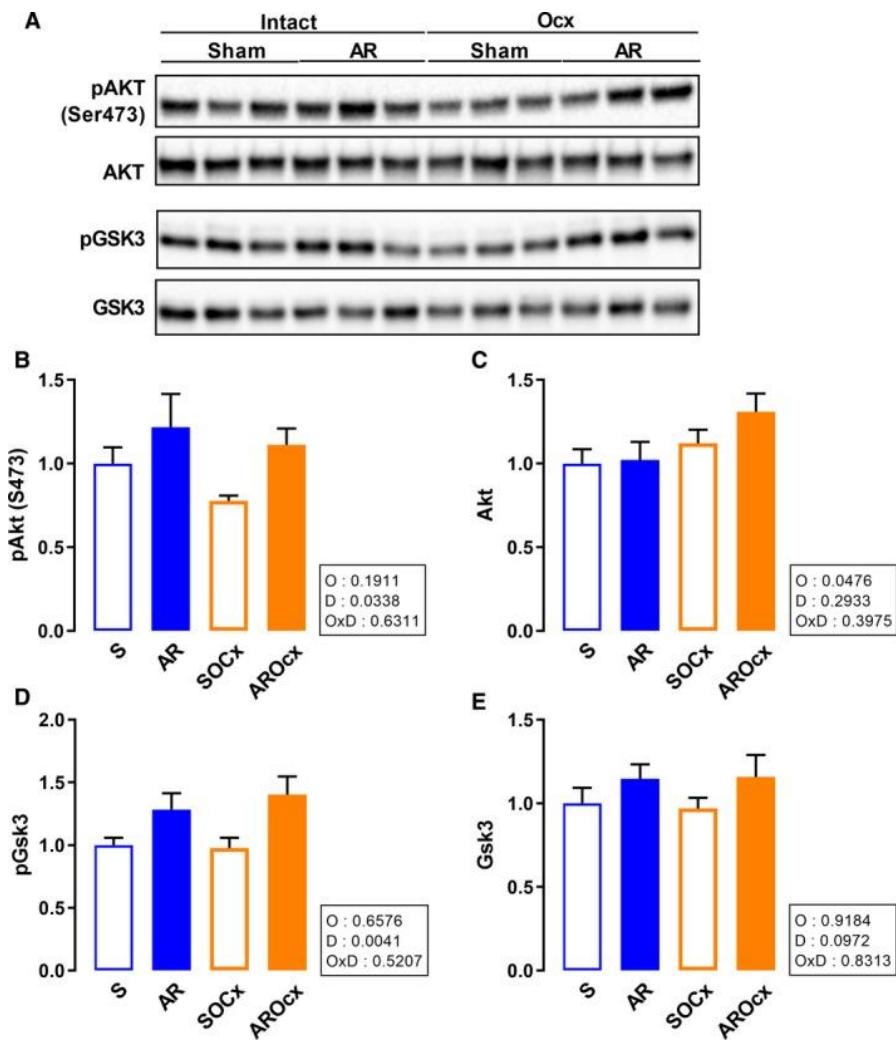


Figure 1.7 Evaluation by Western Blot of LV protein contents of Akt and Gsk3

1.13 Supplemental tables and figures

Table 1.S1. Name and abbreviation of all primers used for gene expression analysis by quantitative RT-PCR.

The table also includes catalogue numbers (from IDT or Qiagen) and the amplicon of the primers

mRNA	Symbol	Cat. No.	Amplicon (pb)
acetyl-CoA acyltransferase 2	<i>Acaa2</i>	Rn.PT.58.5300756	111
acyl-CoA dehydrogenase, very long chain	<i>Acadvl</i>	Rn.PT.58.13279450	147
acetyl CoA acetyltransferase 1	<i>Acat</i>	Rn.PT.58.18447027	102
ANT-1 solute carrier family 25, member 4	<i>Ant1, Slc25a4</i>	Rn.PT.58.36556272	103
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	<i>Atp5a1</i>	Rn.PT.58.6992257	100
CD36/ fatty acid translocase	<i>Fat/CD36</i>	Rn.PT.58.13645667	122
procollagen-1 alpha-1	<i>Colla1</i>	Rn.PT.58.7562513	134
procollagen-3 alpha-1	<i>Col3a1</i>	Rn.PT.58.11138874	100
cytochrome c oxidase subunit 5B	<i>Cox5b1</i>	Rn.PT.58.8467954	138
carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle	<i>Cpt1b</i>	Rn.PT.58.9348596	105
carnitine palmitoyltransferase 2	<i>Cpt2</i>	Rn.PT.58.5579430	107
carnitine O-acetyltransferase	<i>Crat</i>	Rn.PT.58.36282119	97
connective tissue growth factor	<i>Ctgf</i>	QT00182021	102
2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	<i>Decr1</i>	Rn.PT.58.44352482	120
enoyl CoA hydratase 1, peroxisomal	<i>Ech1</i>	Rn.PT.58.33832465	99
enoyl CoA hydratase, short chain 1, mitochondrial	<i>Echs1</i>	Rn.PT.58.44352482	95
enoyl CoA delta isomerase 1	<i>Eci</i>	Rn.PT.58.37662439	119
enolase 3, beta	<i>Eno3</i>	Rn.PT.58.37792224	103
estrogen related receptor, alpha	<i>Erra</i>	Rn.PT.58.5170310	111
estrogen related receptor, gamma	<i>Erry</i>	Rn.PT.58.8028733	141
osteosarcoma viral oncogene homolog	<i>Fos</i>	QT01576330	73
Fibronectin 1	<i>Fn1</i>	Rn.PT.58.18226984	114
GA binding protein transcription factor, alpha	<i>Gapba4</i>	Rn.PT.58.12555216	137

solute carrier family 2 member 1	<i>Glut1</i> , <i>Slc2a1</i>	QT00178024	85
solute carrier family 2 member 4	<i>Glut4</i> , <i>Slc2a4</i>	Rn.PT.58.34939400	115
hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	<i>Hadh</i>	Rn.PT.58.17867024	135
hydroxyacyl-CoA dehydrogenase alpha	<i>Hadha</i>	Rn.PT.58.46222281	138
hydroxyacyl-CoA dehydrogenase beta	<i>Hadhb</i>	Rn.PT.58.7613498	130
Hexokinase 1	<i>Hk1</i>	Rn.PT.58.8913174	108
Hexokinase 2	<i>Hk2</i>	Rn.PT.58.46137159	110
Krüppel-like factor 15	<i>Klf15</i>	Rn.PT.58.12431283	129
Lysyl oxidase	<i>Lox1</i>	Rn.PT.58.10677971	150
mitofusin 1	<i>Mfn1</i>	Rn.PT.58.44207597	106
mitofusin 2	<i>Mfn2</i>	Rn.PT.58.13375660	124
matrix metalloproteinase-2	<i>Mmp2</i>	Rn.PT.58.44737355	87
myosin, heavy polypeptide 6, cardiac	<i>Myh6</i>	Rn.PT.58.8646063	150
myosin, heavy polypeptide 7, cardiac	<i>Myh7</i>	Rn.PT.58.34623828	125
NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A4	<i>Ndufa4</i>	Rn.PT.58.11318539	139
natriuretic peptide precursor type A	<i>Nppa</i> , <i>Anp</i>	Rn.PT.58.5865224	79
natriuretic peptide precursor type B	<i>Nppb</i> , <i>Bnp</i>	Rn.PT.58.5595685	108
pyruvate dehydrogenase alpha 1	<i>Pdha1</i>	Rn.PT.58.14147312	145
pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	<i>Pdk4</i>	Rn.PT.58.6203434	135
Phosphofructokinase	<i>Pfk</i>	Rn.PT.58.17873275	122
Peroxisome proliferator- activated receptor alpha	<i>Ppara</i>	Rn.PT.58.35488724	134
cyclophilin A	<i>Ppia</i>	Rn.PT.39.22214830	140
retinoid X receptor gamma	<i>Rxry</i>	Rn.PT.58.6519292	103
transcription factor A, mitochondrial	<i>Tfam</i>	Rn.PT.58.13772978	124
Tissue inhibitor of metalloproteinases 1	<i>Timp1</i>	Rn.PT.58.34442920	127
transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6	<i>Trpc6</i>	Rn.PT.58.18089975	94
voltage-dependent anion channel 1	<i>Vdac1</i>	Rn.PT.58.37188705	116

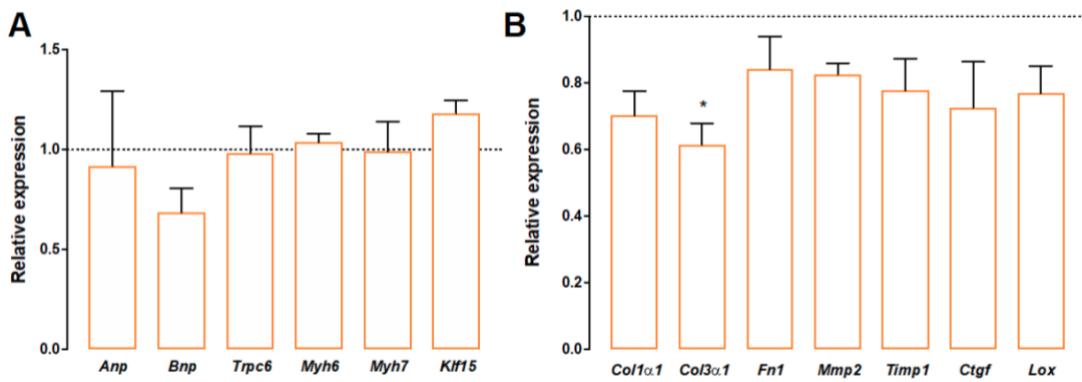


Figure 1.S1. Comparison of SOcx with S with real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy (A) extracellular matrix remodeling (B) markers.

The mRNA levels of the S group were normalized to 1 and are represented by the dotted line. The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean \pm SEM ($n = 6/\text{gr.}$). * $p < 0.05$ vs. the S group.

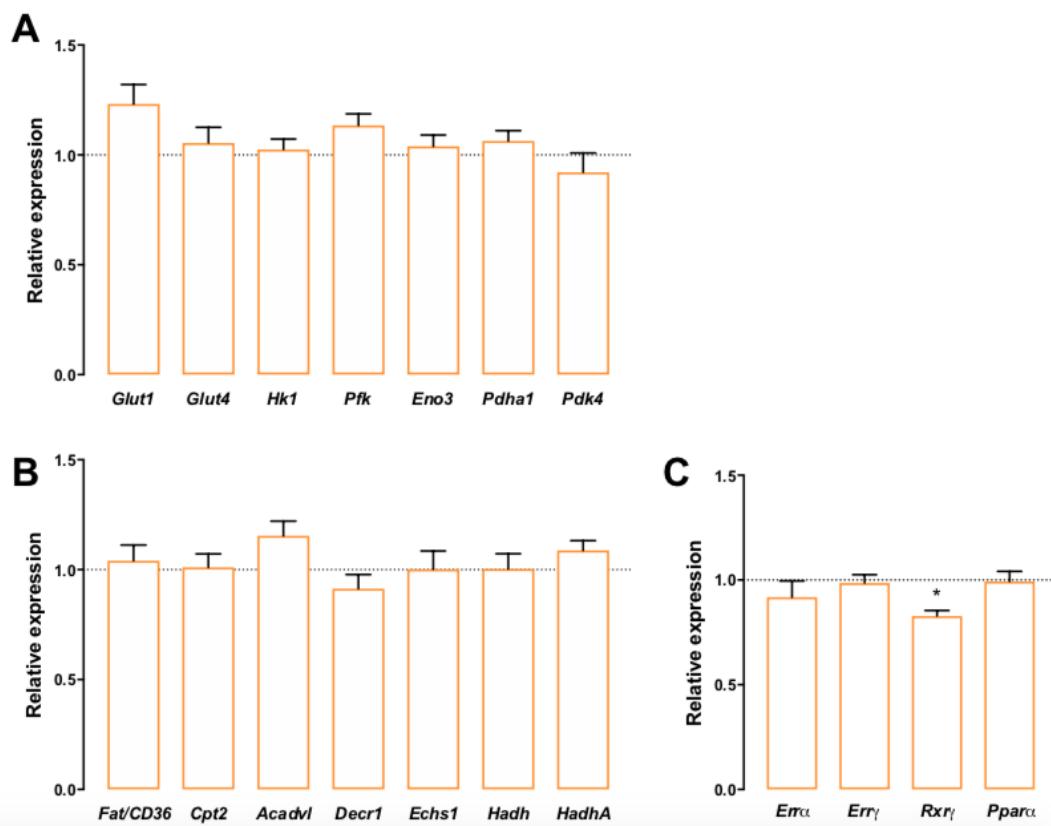


Figure 1.S2. Comparison of SOcx with S with real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for glucose uptake and glycolysis (A), fatty acid oxidation (B) and transcription factor (C) markers.

The mRNA levels of the S group were normalized to 1 and are represented by the dotted line. The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean \pm SEM ($n = 6/\text{gr.}$). * $p < 0.05$ vs. the S group.

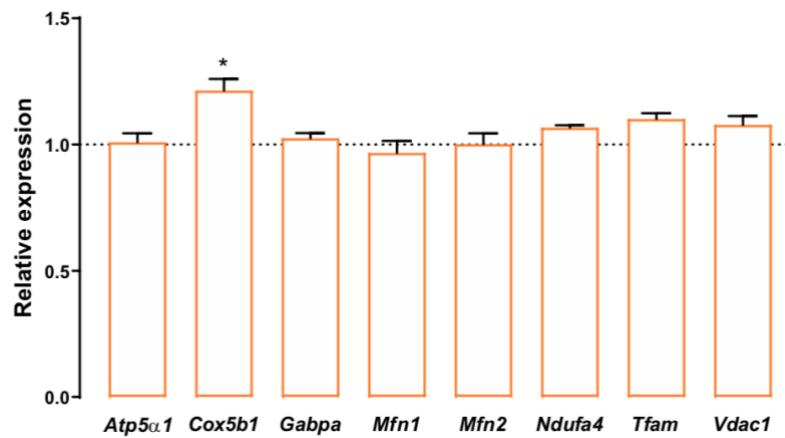


Figure 1.S3. Comparison of SOcx with S with real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for mitochondrial function markers.

The mRNA levels of the S group were normalized to 1 and are represented by the dotted line. The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean \pm SEM ($n=6/\text{gr.}$). * $p < 0.05$ vs. the S group.

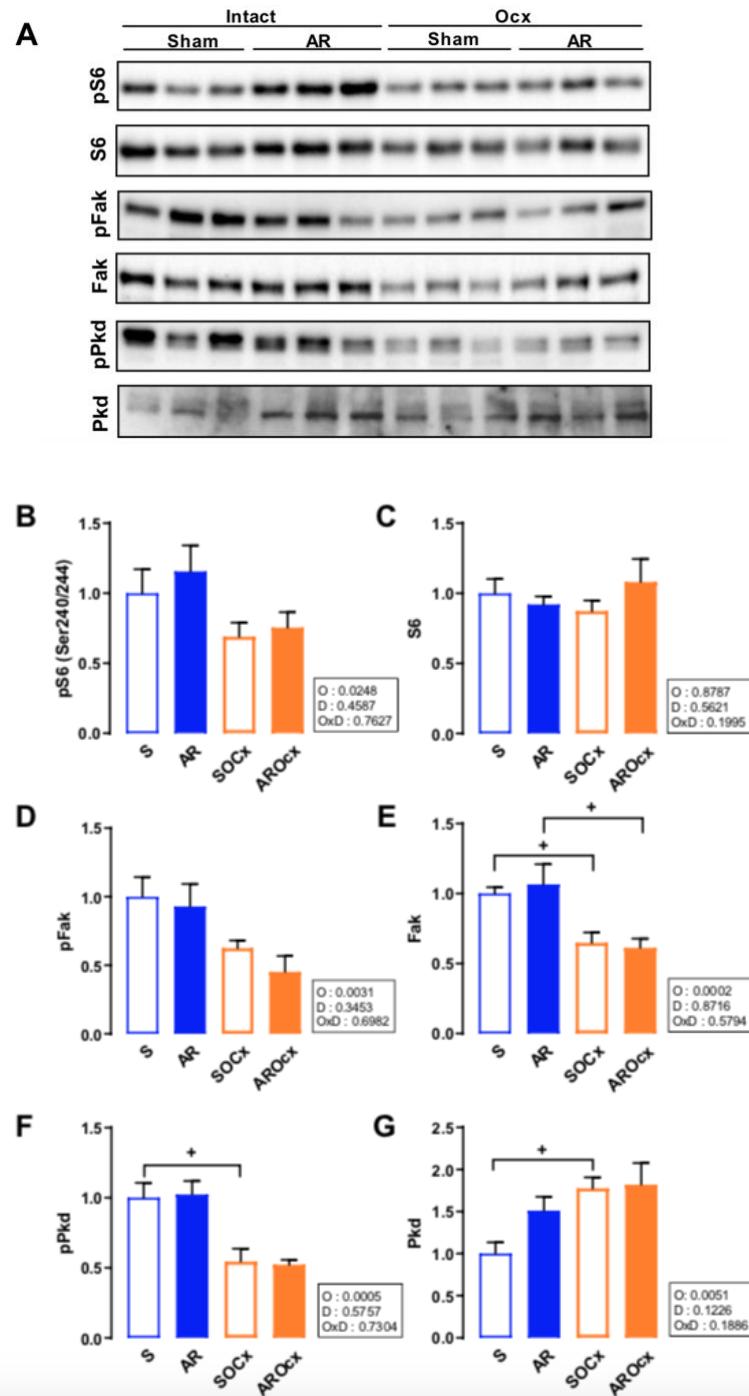


Figure 1.S4. LV protein contents of S6, Fak and Pkd. Representative blots for each signaling molecules (A). Graphs B to G represent densitometric measurement after normalization. Phosphorylated S6 on serines 240 and 244 (B), total S6 (C), phosphorylated Fak (D), total Fak (E), phosphorylated Pkd (F) and total Pkd (G).

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

Chapitre 2. Effects of the loss of estrogen on the heart's hypertrophic response to chronic left ventricle volume overload in rats.

2.1 Page titre

Effects of the loss of estrogen on the heart's hypertrophic response to chronic left ventricle volume overload in rats

Elisabeth Walsh-Wilkinson, Catherine Beaumont, Marie-Claude Drolet, Ève-Marie Roy, Charlie LeHouillier, Jonathan Beaudoin, Marie Arsenault and Jacques Couet

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

Corresponding author: Jacques Couet PhD

Groupe de Recherche en Valvulopathies, Centre de Recherche,
Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec
2725, Chemin Sainte-Foy, Québec, (Québec), Canada, G1V 4G5
Phone: 1-418-656-4760; Fax: 1-418-656-4509

Email: jacques.couet@med.ulaval.ca

2.2 Résumé

La régurgitation aortique (RA) mène à la surcharge de volume chronique du ventricule gauche (VG) pouvant mener à l'insuffisance cardiaque. Peu est connu du rôle des estrogènes dans la réponse à cette condition. Le but de cette étude est de comparer le remodelage du VG chez les rats femelles RA en absence d'estrogènes par l'ovariectomie (Ovx). Dans un premier temps, nous avons étudié le développement hypertrophique dans quatre groupes de rats Wistar femelles : RA ou opération fantôme (sham) et Ovx ou non. L'Ovx réduit la croissance normale du Cœur. Comme attendu, la surcharge de volume (VO) de la RA induit une importante dilatation du VG (42% et 32% d'augmentation du diamètre du VG en fin de diastole pour les groupes non Ovx et Ovx vs. leur groupe sham respectif; $p<0.0001$). Le gain de masse du VG est aussi comparable chez les deux groupes RA (non-Ovx et Ovx). L'augmentation du volume d'éjection systolique ou du débit cardiaque et la réduction de la fonction systolique étaient similaire entre les animaux RA non-Ovx et Ovx comparativement à leur groupe sham respectif. Nous avons ensuite étudié l'effet du traitement au 17beta-estradiol (E2; 0.03 mg/kg/jour) sur les paramètres évalués chez les rats Ovx. L'Ovx réduit le poids de l'utérus de 85% et le traitement à l'E2 rétablit 65% du poids normal utérin. L'E2 aide aussi à normaliser la croissance du cœur. Par contre, le traitement n'a pas influencé la réponse hypertrophique à la RA. Le traitement à l'E2 a même davantage réduit l'hypertrophie du VG chez les animaux RA Ovx (41% par rapport au groupe Sham Ovx+E2). Les fonctions systoliques et diastoliques sont semblables entre le groupe RAOvx+E2 et RAOvx. L'Ovx chez les animaux sham a un effet significatif sur l'expression génique du VG de quelques marqueurs hypertrophiques. L'expression génique du peptide natriurétique de l'oreillette (*Nppa*) est réduite par l'Ovx chez les femelles sham alors que l'expression génique du peptide natriurétique du cerveau (*Nppb*) est augmentée. Les gènes des chaînes lourdes de myosine alpha (*Myh6*) et bêta (*Myh7*) sont aussi fortement modulés par l'Ovx chez les femelles sham. Comme attendu, l'expression des gènes *Nppa* et *Nppb* est augmentée par la RA. L'Ovx augmente davantage l'expression de *Nppa* et réduit l'expression de *Nppb* chez les rats RA. De façon intéressante, l'Ovx chez les animaux RA a peu d'effet sur l'expression génique de *Myh6* et *Myh7*, alors que l'expression est modulée par la RA chez les rats non-Ovx. En bref, la perte des estrogènes par l'Ovx chez les rats RA n'est pas accompagnée par une hypertrophie plus importante ni une perte de fonction cardiaque. La croissance cardiaque normale est réduite par l'Ovx chez les femelles sham, mais l'Ovx a peu d'effet sur la réponse hypertrophique du VG. Par contre, l'Ovx a un

important effet sur l'expression génique de marqueurs hypertrophiques chez les rats femelles RA.

2.3 Abstract

Aortic valve regurgitation (AR) can result in heart failure from chronic overloading of the left ventricle (LV). Little is known of the role of estrogens in the LV responses to this condition. The aim of the study was to compare LV remodeling in female rats with severe AR in absence of estrogens by ovariectomy (Ovx). In a first study, we investigated over 6 months the development of hypertrophy in 4 groups of female Wistar rats: AR or sham-operated (sham) and Ovx or not. Ovx reduced normal heart growth. As expected, volume overload (VO) from AR resulted in significant LV dilation (42% vs. 32% increase LV end-diastolic diameter in intact and Ovx groups vs. their respective sham group; $p<0.0001$). LV weight was also significantly and similarly increased in both AR groups (non-Ovx and Ovx). Increase in stroke volume or cardiac output and loss of systolic function were similar between AR intact and AR Ovx groups compared to sham. We then investigated what were the effects of 17beta-estradiol (E2; 0.03 mg/kg/day) treatment on the parameters studied in Ovx rats. Ovx reduced uterus weight by 85% and E2 treatment restored up to 65% of the normal weight. E2 also helped normalize heart size to normal values. On the other hand, it did not influence the extent of the hypertrophic response to AR. In fact, E2 treatment further reduced LV hypertrophy in AR Ovx rats (41% over Sham Ovx + E2). Systolic and diastolic functions parameters in AR Ovx + E2 were similar to intact AR animals. Ovx in sham rats had a significant effect on the LV gene expression of several hypertrophy markers. Atrial natriuretic peptide (*Nppa*) gene expression was reduced by Ovx in sham-operated females whereas brain natriuretic peptide (*Nppb*) expression was increased. Alpha (*Myh6*) and beta (*Myh7*) myosin heavy chain genes were also significantly modulated by Ovx in sham females. In AR rats, LV expression of both *Nppa* and *Nppb* genes were increased as expected. Ovx further increased it of AR rats for *Nppa* and did the opposite for *Nppb*. Interestingly, AR in Ovx rats had only minimal effects on *Myh6* and *Myh7* genes whereas they were modulated as expected for intact AR animals. In summary, loss of estrogens by Ovx in AR rats was not accompanied by a worsening of hypertrophy or cardiac function. Normal cardiac growth was reduced by Ovx in sham females but not the hypertrophic response to AR. On the other hand, Ovx had important effects on LV gene expression both in sham and AR female rats.

2.4 Introduction

Severe aortic valve regurgitation (AR) is a chronic disease that results in progressive left ventricular (LV) dilatation and eccentric hypertrophy. Although it is not the most frequent valvular disease in the Western world, it is estimated, based on the Framingham study, that 13% of the population suffers from some degree of AR (Singh et al., 1999). Moderate to severe secondary AR also occurs in a significant proportion of patients (5–10%) undergoing transcatheter aortic valve replacement (TAVR) (Leon et al., 2016). In poorer populations worldwide, mitral and/or aortic valve regurgitation is a frequent complication of acute rheumatic fever. Rheumatic valve diseases are still occurring at an alarming rate in low to middle-income countries and in poor communities, elsewhere (Zühlke et al., 2017). Gender differences in cardiac remodeling, hypertrophy and clinical outcome have been identified in various cardiac diseases such as heart failure, hypertension, aortic valve stenosis and experimental models of pressure and volume overload (VO) (Blenck et al., 2016; Maric-Bilkan et al., 2016). The impact of valve regurgitation in women (mitral or aortic) has received little attention. Most clinical trials on chronic AR have focused mainly on male cohorts and gender specific adaptations of the LV in subjects suffering from chronic severe AR have not been investigated (Evangelista et al., 2005; Lin et al., 1994; Greenberg et al., 1988).

In prior studies using a rat model of chronic and severe AR, we showed that females had a hypertrophic response similar or stronger to LV VO than males (Drolet et al., 2006; Beaumont et al., 2017). The main difference was that the LV remodeling taking place in females was characterized by increased wall thickening resulting in a relatively preserved overall LV morphology compared to males (walls to chamber diameter ratio) (Beaumont et al., 2017). Moreover, AR females showed a tendency for better survival than AR males. More recently, we observed that loss of androgens in male rats was associated with reduced cardiac growth and decreased LV hypertrophic response to severe AR. This suggests a role of male sex hormones in the control of both physiological and pathological cardiac growth and hypertrophy (Beaumont et al., 2019).

It is believed that estrogens can provide a protection against cardiac hypertrophy (CH) development and evolution towards heart failure (HF). This has been demonstrated in animal models of pressure overload in female rats (Blenck et al., 2016). In the aorto-caval fistula (ACF) rat VO model, males progress faster toward HF and show poorer survival than females (Dent, Tappia & Dhalla, 2010a). Since sex steroids have a potent effect on

differentiation, they could thus explain a large part of the sex dimorphism observed in cardiac hypertrophy caused by VO (Leinwand, 2003).

In the present study, we tested if LV remodeling and hypertrophy were influenced by estrogens in female rats suffering of chronic and severe AR. The effect of ovariectomy (Ovx) in females was assessed in order to answer this question. We also wanted to evaluate if Ovx was associated with decreased LV function and potentially worse survival in AR rats. In a second protocol, we studied the effects of 17beta-estradiol (E2) supplementation in AR Ovx female rats to investigate if it was associated with a reversal of the effects associated with the loss of estrogens.

2.5 Methods

2.5.1 Animals

Fifty-eight female Wistar rats (225 to 250 g) (Charles River, Saint-Constant, QC, Canada) were studied. Ovx females were purchased at the age of 9 weeks, one week after the procedure. Experimental groups were as followed: Sham-operated (Sham; n = 11), Ovx sham-operated (ShOvx; n = 10), AR; (n = 12) and Ovx AR (AROvx; n = 10). AR was induced at the age of 10 weeks as previously described by perforation of one or two aortic valve leaflets using a catheter via the right carotid and under echocardiographic guidance (Arsenault et al., 2002; Plante et al., 2003). Briefly, the right internal carotid artery was exposed and cannulated. Then, under continuous echocardiographic guidance, an 18-gauge epidural catheter was advanced toward the aortic valve in a retrograde manner. The sonographer guided the position and the advance of the catheter in the aorta while it was pushed through a leaflet of the aortic valve into the LV. Leaflet perforation was repeated if the severity of the regurgitant jet was considered insufficient by echocardiographic criteria. Sham-operated animals only had the ligation of their right carotid. Duration of the protocol was 6 months. Two additional Ovx groups were also studied, namely ShOvx + E2 (n = 6) and AROvx + E2 (n = 8). E2 (17beta-estradiol) was administered using a subcutaneous pellet implanted in the neck of the animal liberating 0.03 mg/kg/day for 3 months (Innovative research of America, Sarasota, FL). After this period, a second pellet was implanted to complete the protocol. The protocol was approved by the Université Laval's Animal Protection Committee and followed the recommendations of the Canadian Council on Laboratory Animal Care.

2.5.2 Echocardiography

An echocardiographic exam (Philips HD11XE using an 12 MHz probe (S12)) was performed under isoflurane anesthesia (2%) two weeks after surgery to confirm AR severity and at the end of the protocol 26 weeks later, as previously described (Arsenault et al., 2013; Arsenault et al., 2002; Plante et al., 2003). The regurgitant fraction was estimated by the ratio of the forward systolic flow time–velocity integral (VTI) to the reversed diastolic flow VTI measured by pulsed Doppler in the thoracic descending aorta. At the end of the protocol, the heart and the lungs were harvested and weighed. Heart chambers were dissected, weighted and the LV was then quickly frozen in liquid nitrogen and kept at -80 C until further use.

2.5.3 Gene expression analysis by quantitative RT-PCR

LV gene expression was quantified for 6 animals per group by quantitative RT-PCR as described elsewhere (Champetier et al., 2009). Pre-optimized primers were from QuantiTect (Qiagen) and IDT (Coralville, Iowa) (Table 1) and SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio Rad, Hercules, CA) was used. We used one pair of non- pre-optimized primers for the enoyl CoA hydratase, short chain 1 gene (Echs1) (5'-GCTTCAGGGTGTCTTGATTG-3' and 5'-GAGCTATGCAGATAGT-3'; 95 bp transcript). We tested three different genes as possible housekeeping gene as control for this study. Cyclophilin A gene was chosen since it had the one most stable expression among the different groups.

2.5.4 Statistical analysis

Results are presented as the mean and the standard error of the mean (SEM). Two-way ANOVA analysis was performed and Holm-Sidak's post-test was used for comparison between the groups (Graph Pad Prism 8.1, San Diego, CA). A Student's t -test was used when only two groups were compared. A p-value lower than 0.05 was considered significant.

2.6 Results

2.6.1 Effects of ovariectomy on the hypertrophic response to chronic volume overload

AR was surgically induced in intact (non-OVX) and Ovx Wistar female rats at the age of 10 weeks. The protocol had a duration of 26 weeks (6 months). All animals survived the duration of the protocol. In Table 2 are summarized the characteristics of the animals at the end of the protocol. Sham Ovx females were smaller and their heart lighter compared to Sham. Indexed heart weight for tibial length was also lower for Sham Ovx compared to Sham. When indexed for body weight, no difference was present. As expected, AR caused important increases in total heart weight as well as for the left ventricle and left atria. This increase was similar for both intact (non-Ovx) and Ovx animals (75% vs. 70%) as illustrated in Fig. 1. In order to confirm that Ovx resulted in a loss of sex hormones, we weighed the uterus, a tissue strongly dependant on estrogens. As expected, uterine weight was markedly decreased (84%) in both Ovx groups (sham and AR).

As for the animal and heart characteristics described above, most echocardiographic parameters were significantly changed by AR (Table 3). AR severity was similar between both AR groups. LV end-diastolic diameter was smaller in AROvx animals compared

to AR group. This was also the case for the stroke volume (SV) and the cardiac output (CO). Ejection fraction (EF; an index of systolic function) was reduced in both AR groups. Interestingly, loss of estrogens also associated with a reduced EF in Sham Ovx animals. The E wave, representing LV passive filling was significantly increased in AR animals compared to AR Ovx ones.

In Fig. 1, we illustrated variations of several parameters mentioned above in AR animals relative to their respective sham-operated group. As expected, AR caused important cardiac hypertrophy in both AR and AROvx animals compared to sham and this increase in heart weight was similar for both groups. A tendency for a greater increase in LV weight and LV end-diastolic diameter (EDD) caused by AR was recorded for the AR group compared to AROvx but this did not reach statistical significance (Fig. 1B–1C). Ejection fraction (EF), LV stroke volume (SV) and cardiac output (CO) were all modified by VO from AR but again, there was no difference from the hormonal status (AR group vs. AROvx) (Figs. 1D–1F).

2.6.2 Effects of E2 treatment on cardiac hypertrophy in AR Ovx females

We then studied the effects of E2 treatment in both Sham Ovx (ShOvx) and AR Ovx (ArOvx) rats. As summarized in Table 4, Ovx rats treated with E2 were still smaller than non-Ovx ones (see Table 2 for comparison). On the other hand, indexed heart weight was normalized suggesting that cardiac growth was not slowed in ShOvx + E2 rats. AR produced heart and LV hypertrophy but relatively less than for sham and Ovx animals (around 40% increase in AROvx + E2 compared to 70% for untreated AROvx; Table 2). Uterine weight was increased by E2 treatment to approximately 65% of those of non-Ovx females.

As illustrated in Fig. 2, E2 treatment partly normalized cardiac growth in Sham Ovx females. Heart and LV weights were also significantly increased in Sham Ovx rats receiving E2 compared to those untreated. Moreover, LV stroke volume (SV) and cardiac output (CO) were completely normalized by E2 treatment in sham females (Table 5 and Figs. 2E and 2F). Systolic function as evaluated by ejection fraction (EF) was unchanged by E2 treatment Fig. 2D.

2.6.3 LV gene expression modulation by estrogens

We then measured LV gene expression for several hypertrophy markers. Atrial natriuretic peptide (*Nppa* or *Anp*) and brain natriuretic (*Nppb* or *Bnp*) mRNA levels were both modulated by the loss of estrogens in Sham Ovx animals (Fig. 3A). *Nppa* levels were reduced by 60% whereas *Nppb* levels remained stable. Ovx modulated myosin heavy chain gene expression in a similar fashion as often observed in cardiac hypertrophy. Myosin heavy chain alpha (*Myh6*) gene expression was reduced by Ovx whereas myosin heavy chain beta (*Myh7*) was increased compared to non-Ovx Sham animals. *Nppa* mRNA levels were strongly increased in AR animals compared to corresponding Sham group; this raise being stronger in the AROvx group (Fig. 3B). We observed the opposite trend for *Nppb* mRNA levels, which were more strongly increased in AR females than in AROvx ones. A similar situation was observed for the expression of myosin heavy chain genes in AR rats. *Myh6* gene expression was reduced *Myh7* increased by AR. Those modulations were less important in the AR Ovx group. Loss of estrogens lead to a decrease in procollagen 1 (*Col1a1*) and procollagen 3 (*Col3*) gene expression in sham-operated rats (Fig. 3C). *Col1a1* and *Col3* mRNA levels remained normal in AR animals (Fig. 3D) but were slightly more elevated in AROvx animals. The same was observed of mRNA levels of lysyl oxidase 1 gene (*Lox*) in AR groups. *CTGF* gene expression levels were unchanged by Ovx and were

significantly increased by AR (Figs. 3C–3D). We then tested the expression of genes encoding transcription factors implicated in the control of myocardial energetics (Fig. 3E). Estrogen-related receptors (alpha and gamma) and retinoic X receptor gamma mRNA levels were measured in the LV of the animals. ERR alpha levels were reduced by Ovx in sham animals but not further by AR. Moreover, mRNA levels of these three transcription factor genes were significantly decreased by AR but loss of estrogens restored these levels to normal (Fig. 3F).

We reported previously that female AR rats unlike males, kept a relatively normal transcriptional profile of many genes related to myocardial energetics (Beaumont et al., 2017). Here, we were interested to see if loss of estrogens would induce perturbation to this. We thus tested a number of genes related to fatty acids beta-oxidation and glycolysis. In addition, we measured LV mRNA levels of various genes associated to reactive oxygen species (ROS) metabolism. As illustrated in Fig. 4, loss of estrogens via Ovx had very little effects on LV expression of various genes implicated in myocardial energetics except for one, *Pdk4* (Figs. 4A and 4B). AR reduced the expression of a number of genes namely *Acadvl*, *Decr1*, *Hadh*, *HadhA*, *Eno3* and *Pdk4*. Loss of estrogens did not further modulate those genes (AROvx rats). Among the genes related to ROS metabolism, we observed that NADPH oxidase 4 (*Nox4*) expression was significantly reduced by Ovx. This was reversed by AR. AR up-regulated *Nox2* in both intact and Ovx females.

We then studied if E2 treatment of Ovx animals helped restore changes observed in natriuretic peptides (*Nppb* or *Bnp*) and myosin heavy chains (*Myh6* and *Myh7*) gene expression. Interestingly, E2 helped normalize *Nppa* and *Myh7* expression in Sham animals (Fig. 5). Decreased *Myh6* gene expression in Sham Ovx females was not normalized by E2, however. E2 treatment had no effect on gene expression levels in AR animals.

2.7 Discussion

In this study, we observed that loss of estrogens by ovariectomy (Ovx) two weeks before AR induction had relatively little effects on the extent of the cardiac response to a LV VO, at least at the macroscopic level. Ovx resulted in slower cardiac growth in Sham female rats during the 6 months that lasted the protocol. This was partly reversed by 17beta-estradiol treatment. On the other hand, LV hypertrophy caused by severe VO from AR was similar in all AR groups, non-Ovx, Ovx and Ovx receiving E2. We had previously shown that LV

remodeling from AR in this model involved similar LV dilation in rats of both sexes but more wall thickening in females. This resulted in AR females in maintained LV relative wall thickness (RWT) although significant hypertrophy was present Beaumont et al. (2017). RWT also remained stable in sham-operated females after Ovx as well as in all AR groups. Our results suggest that loss of estrogens seems to clearly influence more cardiac normal growth than the response to chronic and severe VO in the AR rat model.

The roles of estrogens in pathological cardiac hypertrophy has been studied mostly in pressure overload animal models. It received less attention in VO situations such as in valve regurgitation models or in the aortocaval fistula (ACF) model. ACF is a model of global cardiac VO model. It is less relevant from a clinical standpoint, but it remains the most studied pre-clinical VO model. Female ACF rats were shown to develop less hypertrophy, to evolve more slowly towards heart failure and to display better overall survival than males (Gardner, Brower & Janicki, 2002). This advantage over males was dependant on estrogens as ovariectomy reversed these benefits (Brower, Gardner & Janicki, 2003). Dent and collaborators characterized this ACF model further and showed that 17beta-estradiol could help normalize the effects of ovariectomy (Dent, Tappia & Dhalla, 2010b). Some discrepancies seem to exist between findings described in the present study in AR rats and those reported previously in the ACF model. A few differences have to be highlighted between these models. In the ACF model studies, evolution towards heart failure was documented (at least in males) whereas in the AR model, overt heart failure symptoms are a rare occurrence. In fact, most of the deaths are sudden happening during the active period of the animals during the night (Arsenault et al., 2013; Lachance et al., 2009; Plante et al., 2008). Since ACF is a global form of VO targeting the right heart first, it is likely that than lungs become seriously affected sooner, which leads to heart failure.

More than a decade ago, we had reported that Ovx was not associated with major effects in AR females (Drolet et al., 2006). More recently, we showed that LV dilation caused by AR had similarities between males and female rats, but that the expression profile of many genes involved in myocardial energetics was strongly modulated in males but not in females (Beaumont et al., 2017). This suggested that AR females could probably keep a relatively normal myocardial energy metabolism or at least, a better energy substrate use flexibility even in a situation of pathological hypertrophy. In addition, myocardial capillaries density in AR females was not decreased as in males suggesting better oxygen and nutrients availability for surrounding cardiac myocytes. Removing androgens by orchietomy (Ocx) in

AR males reversed some of these sex differences. As observed in the present study for females, normal cardiac growth in male rats was also dependant on the presence of sex hormones. Unlike for Ovx females, hypertrophic response to severe VO was clearly decreased in Ocx AR males (Beaumont et al., 2019). Here, we observed that estrogens had minimal effects if any, on the LV remodeling taking place after AR induction. LV dilation increase in stroke volume and cardiac output were similar in both non-Ovx and Ovx AR groups. This suggests that the hypertrophic response to a similar and direct LV pathological stress such as with AR required a similar myocardial adaptation to accommodate the additional regurgitating blood to pump. This was not influence by the hormonal status. Moreover, this observation suggests the female sex irrespective of estrogens can provide benefits in this rat model. It is also possible that imprinting of estrogens from the early life of the animals still remains.

The steroid hormone 17beta-estradiol is a key player in many biological processes, such as reproduction, development, metabolism, cell proliferation and differentiation (Deroo & Korach, 2006). Estrogens are implicated in the regulation of many genes and signaling pathways via genomic and non-genomic actions. E2 can bind and mediate its actions via the estrogen receptors (ER) ERalpha and ERbeta, which can then act as transcription factors for specific sets of genes. Membrane-associated receptor such as GPER and ERs, can also be activated by E2, resulting in the modulation of cytoplasmic signalling cascades and ultimately regulations of target genes (Murphy, 2011). Post-natal heart growth occurs via cardiomyocytes hypertrophy since these cells are post-mitotic. Activation of the ERalpha is required for post-natal heart growth in healthy Ovx mice (C57Bl6/J strain) receiving E2 suggesting a central role for this receptor (Kararigas, Nguyen & Jarry, 2014). ERbeta does not seem to be involved in normal heart growth in female mice but is believed to be implicated in the protection of the heart during a pathological stress (Mahmoodzadeh & Dworatzek, 2019). Estrogens can produce effects on the heart of males and females since ERs are present in the myocardium of both sexes. Estrogens as a potential therapy in men with cardiac diseases have received less attention than for women. E2 has been shown to rescue male mice with heart failure from transverse aortic constriction (a pressure overload model) via in part the ERbeta receptor and GPER (Iorga et al., 2016; Iorga et al., 2018). In the ACF model, estrogen therapy in males was able to reduce the hypertrophic response to the volume overload (Gardner et al., 2009). It would be interesting in the future, to investigate

E2 effects in male AR animals in order to know if their effect could be more beneficial than in females.

Pathological cardiac hypertrophy is associated with an important remodelling of the myocardial structure, a consequence of cardiomyocyte size increase and extracellular matrix rearrangement. Neurohormonal factors as well as mechanic stress cause alterations in myocardial gene expression including the reactivation of the fetal gene program (Taegtmeyer, Sen & Vela, 2010). This feature is common to a variety of pathological conditions including ischemia, atrophy, hypoxia, diabetes in addition of hypertrophy. This return to the fetal gene program has long been considered detrimental, whereas others have suggested that it protects the heart against irreversible impairment and cell death. Genes associated with the fetal gene program include atrial and brain natriuretic peptide (*Nppa* and *Nppb*), contractile protein beta-myosin heavy chain (beta-MHC or *Myh7*) and early response genes such as c-myc and c-fos among many others. This reactivation of the fetal gene program in the stressed heart is accompanied with the downregulation of the adult gene program (Rajabi et al., 2007). Here, we observed that Ovx was associated with the modulation of several genes associated with the fetal program in female rats. LV atrial natriuretic peptide (*Nppa*) and contractile protein beta-myosin heavy chain (*Myh6* and *Myh7*) were all significantly modulated by the loss of estrogens. This was also true for other genes often modulated in cardiac hypertrophy such as collagen genes (*Col1a1* and *Col3*), *ERRalpha*, *Pdh4* and *Nox4*. This modulation was not associated directly with an inhibition or a reactivation of the fetal gene program. For instance, *Myh6* and *Myh7* LV genes in ShamOvx rats followed the usual pattern associated with pathological hypertrophy. On the other hand, *Nppa* was downregulated and *Nppb* expression remained unchanged. If *Nppa* and *Myh7* gene expression was normalized by E2, it was not the case for *Myh6*.

We reported previously that genes associated with myocardial energetics were strongly modulated in AR male rats and that a clear sex dimorphism was present when compared to females (Arsenault et al., 2013; Beaumont et al., 2017). Pathological LV hypertrophy is usually associated with a shift towards glucose use and glycolysis instead of the preferred beta-oxidation of fatty acids (FAO). We observed this shift in our model in males and this correlated with down-regulation of many genes involved in FAO (Arsenault et al., 2013; Lachance et al., 2014). Although, several FAO genes were down-regulated mildly in female AR rats compared to normal controls, the overall transcriptional profile remained near normal suggesting that they probably maintained a better energy substrates flexibility than

males (Beaumont et al., 2017). Loss of androgens in males helps normalize this general downregulation of FAO genes (Beaumont et al., 2019). We were thus interested to see if loss of estrogens would impact negatively AR females, which was not case as observed here. This suggest that androgens are probably more implicated in this control of myocardial energetics in pathological hypertrophy. As mentioned, the better angiogenic response during myocardial remodeling in females is probably an important contributing factor to the maintenance of relatively normal energetics.

The results obtained in the present study on female AR rats in conjunction to those we recently reported in males demonstrate that sex hormones are not the sole factors intervening in the LV hypertrophic response (Beaumont et al., 2019). Both androgens and estrogens are important for normal cardiac growth. Loss of estrogens by Ovx slows down cardiac growth and E2 treatment helps reverse this effect. Levels of LV hypertrophy are equivalent between AR males and females. Loss of testosterone reduces the extent of LV hypertrophy in AR rats whereas loss of E2 has relatively little effects. In addition, Ovx in AR rats is not associated with a worse transcriptional profile of genes normally regulated in cardiac hypertrophy. In fact, expression of several hypertrophy markers such as myosin heavy chain genes (*Myh6* and *Myh7*) was in part normalized by Ovx in AR females as well as for mRNA levels of *Nppb*, *Err alpha* and *Err gamma*. Again, loss of androgens seemed to provide some benefits to males on this aspect whereas estrogens are mainly neutral in females (Beaumont et al., 2017; Beaumont et al., 2019). In summary, we did not identify clear negative impact of the loss of estrogens in AR female rats in a chronic setting. Sexual dimorphism in the response to VO seems to rely more on the effects of androgens in males. It is also possible that the influence of sex hormones before gonadectomy is still imprinted later in the life of the animals. Finally, effects of sex chromosomes and the genes they harbor, should not be excluded.

We want to point out several limitations in this study. In the second part of the study where Ovx rats received E2, estimated severity of AR was less severe (66% in AR Ovx + E2 vs. around 80% for AR and AR Ovx groups) and so was the hypertrophy relative to the respective sham group (41% in AR Ovx + E2 vs. around 70–75% for AR and AR Ovx groups). On the other hand, if one considers the indexed heart weight gain between AR Ovx rats receiving or not E2, the hypertrophic response was similar. We did not measure circulating E2 levels and we used uterine weight as a surrogate of estrogen action. The dosage of E2 used reversed about two thirds of the expected uterus weight suggesting that

it was probably a little low or that type of delivery could not reproduce the natural situation. This could explain in part, why cardiac growth was not restored to normal levels. Obviously, continuous release of E2 does not reproduce naturally occurring circadian rhythm of production and release of sex hormones in the body. In addition, E2 treatment alone cannot restore completely other possible hormonal imbalances created by Ovx. They too, may probably contribute to observations made in this study. Finally, Ovx was performed in young animals, which does not translate well to the situation of post-menopausal and older patients.

2.8 Conclusion

In conclusion, we showed that loss of estrogens was not associated with important effects on the hypertrophic response to severe and chronic aortic valve regurgitation in female Wistar rats.

2.9 Références

Arsenault M, Plante E, Drolet M, Couet J. 2002. Experimental aortic regurgitation in rats under echocardiographic guidance. *The Journal of Heart Valve Disease* 11(1):128–134 DOI 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.000045.

Arsenault M, Zendaoui A, Roussel É, Drolet M-C, Dhahri W, Grenier A, Gascon S, Sarrhini O, Rousseau JA, Lecomte R, Couet J. 2013. Angiotensin II-converting enzyme inhibition improves survival, ventricular remodeling, and myocardial energetics in experimental aortic regurgitationclinical perspective. *Circulation: Heart Failure* 6(5):1021–1028.

Beaumont C, Walsh-Wilkinson É., Drolet M-C, Roussel É, Arsenault M, Couet J. 2017. Female rats with severe left ventricle volume overload exhibit more cardiac hypertrophy but fewer myocardial transcriptional changes than males. *Scientific Reports* 7(1):729 DOI 10.1038/s41598-017-00855-9.

Beaumont C, Walsh-Wilkinson É, Drolet M-C, Roussel É, Melancçon N, Fortier É, Harpin G, Beaudoin J, Arsenault M, Couet J. 2019. Testosterone deficiency reduces cardiac hypertrophy in a rat model of severe volume overload. *Physiological Reports* 7(9):e14088 DOI 10.14814/phy2.14088.

Blenck CL, Harvey PA, Reckelhoff JF, Leinwand LA. 2016. The importance of biological sex and estrogen in rodent models of cardiovascular health and disease. *Circulation Research* 118(8):1294–1312 DOI 10.1161/CIRCRESAHA.116.307509.

Brower GL, Gardner JD, Janicki JS. 2003. Gender mediated cardiac protection from adverse ventricular remodeling is abolished by ovariectomy. *Molecular and Cellular Biochemistry* 251(1–2):89–95 DOI 10.1023/A:1025438000942.

Champetier S, Bojmehrani A, Beaudoin J, Lachance D, Plante É, Roussel E, Couet J, Arsenault M. 2009. Gene profiling of left ventricle eccentric hypertrophy in aortic regurgitation in rats: rationale for targeting the β -adrenergic and renin- angiotensin systems. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 296(3):H669–H677 DOI 10.1152/ajpheart.01046.2008.

Dent MR, Tappia PS, Dhalla NS. 2010a. Gender differences in apoptotic signaling in heart failure due to volume overload. *Apoptosis* 15(4):499–510 DOI 10.1007/s10495-009-0441-8.

Dent MR, Tappia PS, Dhalla NS. 2010b. Gender differences in cardiac dysfunction and remodeling due to volume overload. *Journal of Cardiac Failure* 16(5):439–449 DOI 10.1016/j.cardfail.2009.12.017.

Deroo BJ, Korach KS. 2006. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation* 116(3):561–570 DOI 10.1172/JCI27987.

Drolet MC, Lachance D, Plante E, Roussel E, Couet J, Arsenault M. 2006. Gender- related differences in left ventricular remodeling in chronic severe aortic valve regurgitation in rats. *The Journal of Heart Valve Disease* 15(3):345–351.

Evangelista A, Tornos P, Sambola A, Permanyer-Miralda G, Soler-Soler J. 2005. Long- term vasodilator therapy in patients with severe aortic regurgitation. *New England Journal of Medicine* 353(13):1342–1349 DOI 10.1056/NEJMoa050666.

Gardner JD, Brower GL, Janicki JS. 2002. Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload. *Journal of Cardiac Failure* 8(2):101–107 DOI 10.1054/jcaf.2002.32195.

Gardner JD, Murray DB, Voloshenyuk TG, Brower GL, Bradley JM, Janicki JS. 2009. Estrogen attenuates chronic volume overload induced structural and functional remodeling in male rat hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 298(2):H497–H504.

Greenberg B, Massie B, Bristow JD, Cheitlin M, Siemienczuk D, Topic N, Wilson R, Szlachcic J, Thomas D. 1988. Long-term vasodilator therapy of chronic aortic insufficiency. A randomized double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Circulation* 78(1):92–103 DOI 10.1161/01.CIR.78.1.92.

Iorga A, Li J, Sharma S, Umar S, Bopassa JC, Nadadur RD, Centala A, Ren S, Saito, T, Toro L, Wang Y, Stefani E, Eghbali M. 2016. Rescue of pressure overload- induced heart failure by estrogen therapy. *Journal of the American Heart Association* 5(1):e002482.

Iorga A, Umar S, Ruffenach G, Aryan L, Li J, Sharma S, Motayagheni N, Nadadur RD, Bopassa JC, Eghbali M. 2018. Estrogen rescues heart failure through estrogen receptor activation. *Biology of Sex Differences* 9(1):48 DOI 10.1186/s13293-018-0206-6.

Kararigas G, Nguyen BT, Jarry H. 2014. Estrogen modulates cardiac growth through an estrogen receptor α-dependent mechanism in healthy ovariectomized mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 382(2):909–914 DOI 10.1016/j.mce.2013.11.011.

Lachance D, Dahri W, Drolet M-C, Roussel É, Gascon S, Sarrhini O, Rousseau JA, Lecomte R, Arsenault M, Couet J. 2014. Endurance training or beta-blockade can partially block the energy metabolism remodeling taking place in experimental chronic left ventricle volume overload. *BMC Cardiovascular Disorders* 14(1):190 DOI 10.1186/1471-2261-14-190.

Lachance D, Plante E, Bouchard-Thomassin AA, Champetier S, Roussel E, Drolet MC, Arsenault M, Couet J. 2009. Moderate exercise training improves survival and ventricular remodeling in an animal model of left ventricular volume overload. *Circulation: Heart Failure* 2(5):437–445 DOI 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.845487.

Leinwand LA. 2003. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *Journal of Clinical Investigation* 112(3):302–307 DOI 10.1172/JCI19429.

Leon MB, Smith CR, Mack MJ, Makkar RR, Svensson LG, Kodali SK, Thourani VH, Tuzcu EM, Miller DC, Herrmann HCFTPI. 2016. Transcatheter or surgical aortic- valve replacement in intermediate-risk patients. *New England Journal of Medicine* 374(17):1609–1620 DOI 10.1056/NEJMoa1514616.

Lin M, Chiang H-T, Lin S-L, Chang M-S, Chiang BN, Kuo H-W, Cheitlin MD. 1994. Vasodilator therapy in chronic asymptomatic aortic regurgitation: enalapril versus hydralazine therapy. *Journal of the American College of Cardiology* 24(4):1046–1053 DOI 10.1016/0735-1097(94)90868-0.

Mahmoodzadeh S, Dworatzek E. 2019. The role of 17 β -estradiol and estrogen receptors in regulation of Ca $^{2+}$ channels and mitochondrial function in cardiomyocytes. *Frontiers in Endocrinology* 10:310 DOI 10.3389/fendo.2019.00310.

Maric-Bilkan C, Arnold AP, Taylor DA, Dwinell M, Howlett SE, Wenger N, Reckelhoff JF, Sandberg K, Churchill G, Levin E, Lundberg MS. 2016. Report of the national heart, lung, and blood institute working group on sex differences research in cardio- vascular disease: scientific questions and challenges. *Hypertension* 67(5):802–807 DOI 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06967.

Murphy E. 2011. Estrogen signaling and cardiovascular disease. *Circulation Research* 109(6):687–696 DOI 10.1161/CIRCRESAHA.110.236687.

Plante E, Couet J, Gaudreau M, Dumas M-P, Drolet M-C, Arsenault M. 2003. Left ventricular response to sustained volume overload from chronic aortic valve regurgitation in rats. *Journal of Cardiac Failure* 9(2):128–140 DOI 10.1054/jcaf.2003.17.

Plante E, Lachance D, Champetier S, Drolet MC, Roussel E, Arsenault M, Couet J. 2008. Benefits of long-term beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 294(4):H1888–H1895 DOI 10.1152/ajpheart.01286.2007.

Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P, Taegtmeyer H. 2007. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Failure Reviews* 12(3–4):331–343 DOI 10.1007/s10741-007-9034-1.

Singh JP, Evans JC, Levy D, Larson MG, Freed LA, Fuller DL, Lehman B, Benjamin EJ. 1999. Prevalence and clinical determinants of mitral, tricuspid, and aortic regurgitation (the Framingham Heart Study). *The American Journal of Cardiology* 83(6):897–902 DOI 10.1016/S0002-9149(98)01064-9.

Taegtmeyer H, Sen S, Vela D. 2010. Return to the fetal gene program. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1188(1):191–198 DOI 10.1111/j.1749-6632.2009.05100.x.

Zühlke LJ, Beaton A, Engel ME, Hugo-Hamman CT, Karthikeyan G, Katzenellenbogen JM, Ntusi N, Ralph AP, Saxena A, Smeesters PR, Watkins D, Zilla P, Carapetis J. 2017. Group A streptococcus, acute rheumatic fever and rheumatic heart disease: epidemiology and clinical considerations. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine* 19(2):15 DOI 10.1007/s11936-017-0513-y.

2.10 Tables

Table 2.1. Name and symbol of all primer pairs used for gene expression analysis by quantitative RT- PCR.

mRNA	Symbol	Catalog no.	Amplicon (bp)
acyl CoA déshydrogenase, very long chain	<i>Acadvl</i>	Rn.PT.58.13279450	147
carnitine palmitoyltransferase 2	<i>Cpt2</i>	QT00186473	150
connective tissue growth factor	<i>Ctgf</i>	QT00182021	102
cyclophilin A	<i>Ppia</i>	Rn.PT.39a,22214830	140
cytochrome b-245 heavy chain (NOX2)	<i>Nox2</i>	Rn.PT.58.17749203	97
2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	<i>Decr1</i>	Rn.PT.58.44352482	120
enolase 3, beta	<i>Eno3</i>	QT00180138	106
estrogen related receptor, alpha	<i>Errα</i>	Rn.PT.58.5170310	111
estrogen related receptor, gamma	<i>Errγ</i>	Rn.PT.58.8028733	141
CD36/ fatty acid translocase	<i>Fat/CD36</i>	QT01702680	81
Hexokinase 1	<i>Hk1</i>	Rn.PT.58.8913174	108
hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	<i>Hadhd</i>	Rn.PT.58.17867024	135
hydroxyacyl-CoA dehydrogenase alpha	<i>HadhdA</i>	Rn.PT.58.46222281	138
lysyl oxidase	<i>Lox</i>	Rn.PT.58.10677971	150
myosin, heavy polypeptide 6, cardiac	<i>Myh6</i>	Rn.PT.58.8646063	150
myosin, heavy polypeptide 7, cardiac	<i>Myh7</i>	Rn.PT.58.34623828	125
NADPH oxidase 4	<i>Nox4</i>	Rn.PT.58.11992143	107
natriuretic peptide precursor type A	<i>Nppa, Anp</i>	Rn.PT.58.5865224	79
natriuretic peptide precursor type B	<i>Nppb, Bnp</i>	Rn.PT.58.5595685	108
Phosphofructokinase	<i>Pfk</i>	Rn.PT.58.17873275	122
procollagen-1 alpha-1	<i>Col1a1</i>	Rn.PT.58.7562513	134
procollagen-3 alpha-1	<i>Col3a1</i>	Rn.PT.58.11138874	100
pyruvate dehydrogenase alpha 1	<i>Pdha1</i>	QT01830220	93
pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	<i>Pdk4</i>	QT00189287	145
retinoid X receptor gamma	<i>Rxry</i>	Rn.PT.58.6519292	103
solute carrier family 2 member 1	<i>Glut1, Slc2a1</i>	QT00178024	85
solute carrier family 2 member 4	<i>Glut4, Slc2a4</i>	QT00175931	146
superoxide dismutase 1, soluble	<i>SOD1</i>	Rn.PT.58.5432362	138
superoxide dismutase 2, mitochondrial	<i>SOD2</i>	Rn.PT.58.7509049	107
superoxide dismutase 3, extracellular	<i>SOD3</i>	QT00379358	92

The table also includes catalogue numbers (from IDT or Qiagen) and the size of the amplicon.

Table 2.2. Characteristics of the animals at the end of the protocol.

Parameters	Sham (n=11)	AR (n=13)	Sham Ovx (n=10)	AR Ovx (n=10)
Body weight, g	428±15	418±20	368±11§	417±14*
Tibia, mm	51±0.2	53±0.3*	50±0.3§	50±0.2§
Heart, mg	963 ± 20	1,685 ± 31*	765 ± 20§	1304 ± 25*§
Heart/BW, mg/g	2.3 ± 0.1	4.1 ± 0.2*	2.1 ± 0.1	3.2 ± 0.1*§
Heart/TL, mg/mm	18.8 ± 0.3	31.9 ± 0.6*	15.4 ± 0.4§	26.0 ± 0.5*§
Left ventricle, mg	735 ± 17	1354 ± 25*	588 ± 13§	1,015 ± 25*§
Left atria, mg	25±3	47±3*	18±2	32±2*
Lungs, g	1.7±0.1	3.2±0.3*	2.4±0.2	2.2±0.3
Uterus, mg	59±4	59±3	9±1§	9±1§

Notes.

BW: body weight. Values are expressed as the mean ± SEM. Group comparisons were made using two-way ANOVA analysis and Holm-Sidak's pos t -test.

*p < 0.001 vs the respective sham group.

§ p < 0.05 vs non-Ovx group.

Table 2.3. Echocardiographic parameters of sham-operated animals at the end of the protocol.

Parameters	Sham (n=11)	AR (n=13)	Sham Ovx (n=10)	AR Ovx (n=10)
AR severity, %	na	83±4	na	78±2
EDD, mm	7.7±0.1	10.9±0.2	7.4±0.1	9.8±0.2*§
ESD, mm	3.1±0.1	6.5±0.3*	3.6±0.1	6.2±0.3*
SW, mm	1.1 ± 0.02	1.4 ± 0.05*	1.2 ± 0.04	1.4 ± 0.04*
PW, mm	1.2 ± 0.03	1.8 ± 0.08*	1.4 ± 0.07	1.5 ± 0.06*
EF, %	84±2	65±2*	75±2§	61±3*
RWT, unitless	0.28 ± 0.005	0.26 ± 0.011	0.29 ± 0.010	0.27 ± 0.007
SV, ml	0.29 ± 0.01	0.52 ± 0.04*	0.22 ± 0.01§	0.40 ± 0.02*§
HR, bpm	386±13	379±9	348±16	373±11
CO, ml/min	113±3	187±10*	79±7§	148±8*§
E wave, cm/s	95±4	109±4	83±4	86±3§
A wave, cm/s	61±3	57±2	59±7	47±2
E wave slope	2992 ± 199	3379 ± 305	2098 ± 215§	2850 ± 135

Notes.

EDD, end-diastolic diameter; ESD, end-systolic diameter; SW, septum wall thickness; PW, posterior wall thickness; EF, ejection fraction; RWT, relative wall thickness; SV, stroke volume; HR, heart rate; bpm, beats per minute; CO, cardiac output; na, non-applicable.

Values are expressed as the mean ± SEM. Group comparisons were made using two-way ANOVA analysis and Holm-Sidak's post-test.

*p < 0.05 vs. respective sham group. § p < 0.05 vs. non-Ovx group.

Table 2.4. Animal characteristics of Ovx animals treated with 17beta-estradiol (E2) at the end of the protocol.

Parameters	ShOvx + E2 (n=6)	AROvx + E2 (n=8)	p-value
Body weight, g	342 ± 8	320 ± 11	0.096
Tibial length, mm	48 ± 0.3	48 ± 0.3	0.69
Heart, mg	870 ± 26	1,223 ± 39	<0.0001
Heart/BW, mg/g	2.5 ± 0.07	3.9 ± 0.10	<0.0001
Heart/TL, mg/mm	18.0 ± 0.5	25.6 ± 0.7	<0.0001
Left ventricle, mg	650 ± 20	973 ± 24	<0.0001
Left atria, mg	21 ± 1	34 ± 3	<0.0001
Lungs, mg	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	0.89
Uterus, mg	37 ± 2.3	40 ± 3.1	0.55

BW: body weight. Values are expressed as the mean ± SEM. Group comparisons were made using Student's T -test.

Table 2.5. Echocardiographic parameters of Ovx animals treated with 17beta-estradiol (E2) at the end of the protocol.

Parameters	ShOvx + E2 (n=6)	AROvx + E2 (n=8)	p-value
AR severity, %	na	66 ± 2	na
EDD, mm	7.7 ± 0.1	9.7 ± 0.1	<0.0001
ESD, mm	3.9 ± 0.1	5.6 ± 0.3	<0.0001
SW, mm	1.1 ± 0.03	1.3 ± 0.05	0.0019
PW, mm	1.3 ± 0.02	1.4 ± 0.10	<0.0001
EF, %	74±2	67±3	0.073
RWT, unitless	0.27 ± 0.007	0.26 ± 0.010	0.55
SV, ml	0.30 ± 0.01	0.44 ± 0.02	<0.0001
HR, bpm	362±16	351±10	0.56
CO, ml/min	107 ± 5	153 ± 8	0.0005
E wave, cm/s	90±3	111±5	0.0024
A wave, cm/s	55±2	67±6	0.051
E wave slope	2,700 ± 187	3,363 ± 255	0.0033

Notes.

EDD, end-diastolic diameter; ESD, end-systolic diameter; SW, septum wall thickness; PW, posterior wall thickness; EF, ejection fraction; RWT, relative wall thickness; SV, stroke volume; HR, heart rate; bpm, beats per minute; CO, cardiac output; na, non-applicable.

Values are expressed as the mean ± SEM. Group comparisons were made using Student's T -test.

2.11 Figure legends

Figure 2.1. Ovariectomy does not modulate the hypertrophic response triggered by AR. Results are expressed in arbitrary units (mean +/- SEM) relative to their respective sham-operated group (fixed to 1). A: Heart, B: LV, Left ventricular weight, C: EDD, end-diastolic diameter, D: EF, ejection fraction, E: SV, stroke volume and F: CO, cardiac output. Calculated p values (Student's T-test) are indicated for comparison between AR and AROvx groups. ***: p < 0.001 compared to respective sham group (non-Ovx or Ovx).

Figure 2.2. Ovariectomy (Ovx) slows normal heart growth in Wistar female rats and E2 treatment partially reverses this effect. Results are expressed as the ratio of the indicated parameter (mean +/- SEM) compared to the mean of the same parameter for non-Ovx Sham females (set to 1). A: Heart, B: LV, Left ventricular weight, C: EDD, end-diastolic diameter, D: EF, ejection fraction, E: SV, stroke volume and F: CO, cardiac output. Calculated p values (Student's T-test) are indicated for comparison between Sham (Ovx) and Sham (Ovx + E2) groups. *: p < 0.05 and ***: p < 0.001 compared to non-Ovx sham female group.

Figure 2.3. Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy markers (A, B and C), extracellular matrix genes (D and E) and transcription factors implicated in the control of myocardial energetics (F and G). The results are reported as the mean +/- SEM (n=6/gr.) relative to non-Ovx Sham group (Panels A, D and F) or to respective Sham group (non-Ovx (Blue) or Ovx (Orange) (Panels B, C, E and G). Messenger RNA levels of the respective sham group were normalized to 1 and are represented by the dotted line. *: p < 0.05, **: p < 0.01 and ***: p < 0.001 vs. respective sham group. §: p < 0.05 and §§§: p < 0.001 between indicated groups.

Figure 2.4. Genes implicated in energetics (panels A and B) and reactive oxygen species metabolism (C) are not modulated by the loss of estrogens in ShamOvx and AROvx rats. The results are reported as the mean +/- SEM (n=6/gr.) relative to non-Ovx Sham group. Messenger RNA levels of non-Ovx Sham group were normalized to 1 and are represented by the dotted line. *: p < 0.05 and **: p < 0.01 vs. non-Ovx sham group.

Figure 2.5. Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy markers in Sham Ovx and AR Ovx rats receiving (orange) or not (blue) 17beta-estradiol (E2) replacement. A: Nppa, B: Nppb, C: Myh6 and D: Myh7.

The results are reported as the mean +/- SEM (n=6/gr.) relative to non-Ovx Sham group (set to 1; dotted line). *: p < 0.05, **: p < 0.01 and between ***: p < 0.001 indicated groups. §§: p < 0.01 and §§§: p < 0.001 vs. non-ovx Sham group.

2.12 Figures

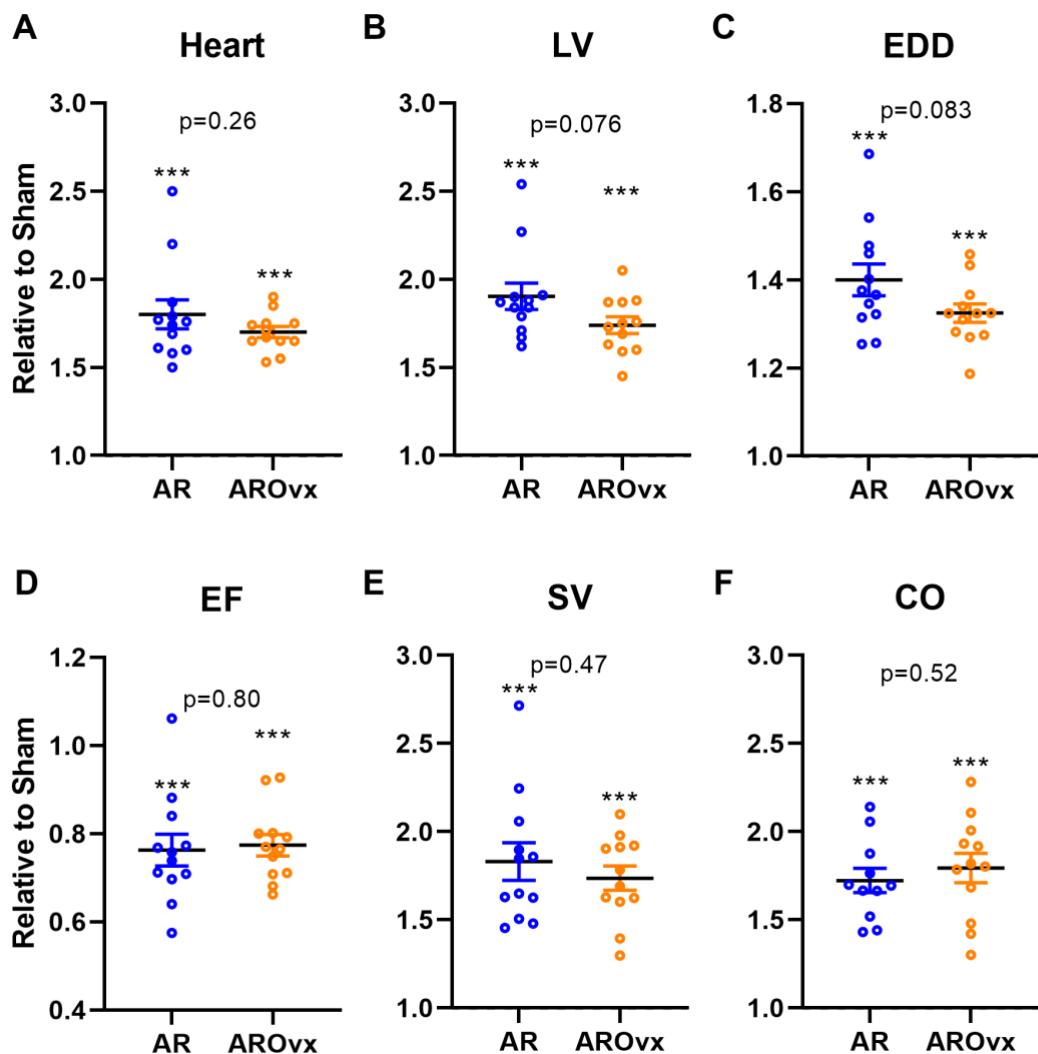


Figure 2.1. Ovariectomy does not modulate the hypertrophic response triggered by AR.

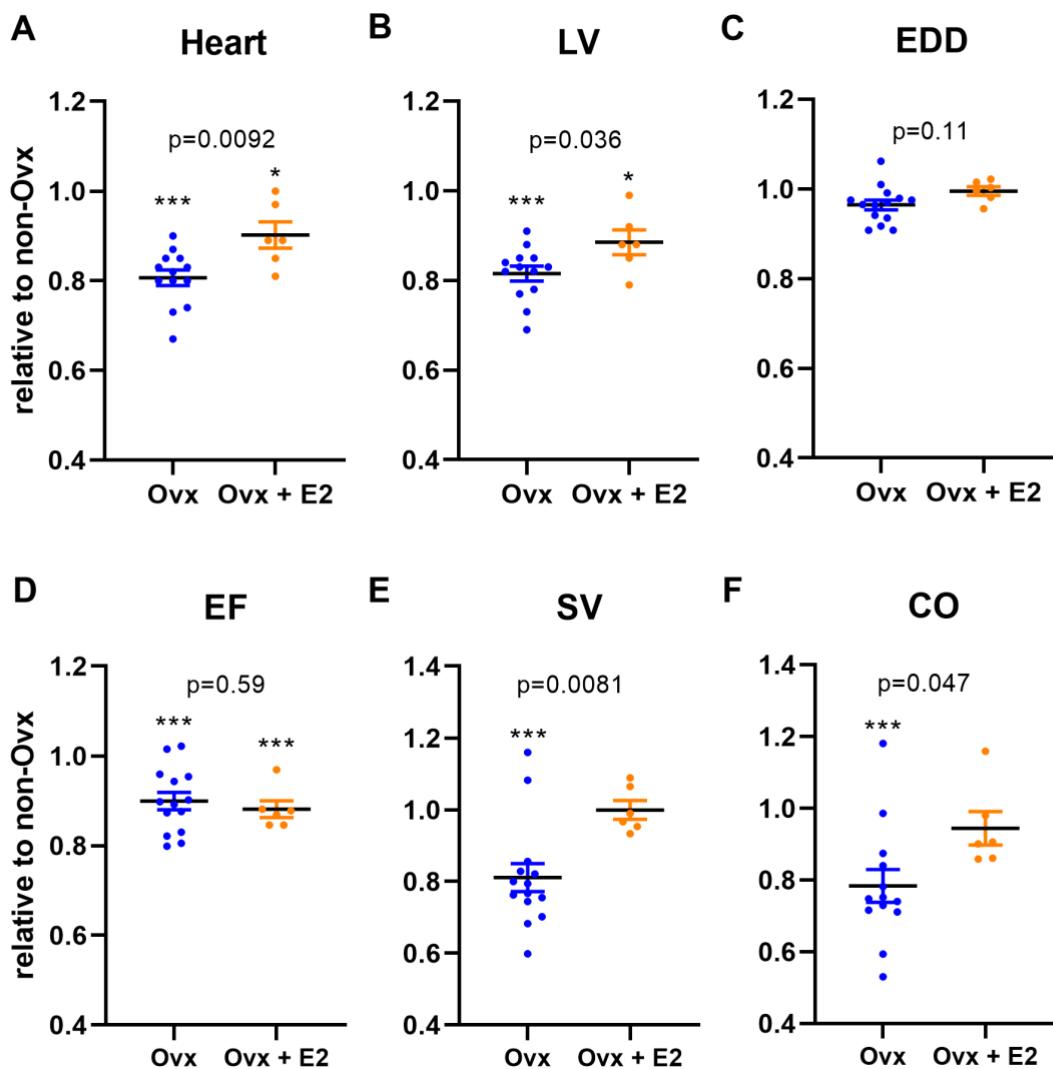


Figure 2.2. Ovariectomy (Ovx) slows normal heart growth in Wistar female rats and E2 treatment partially reverses this effect.

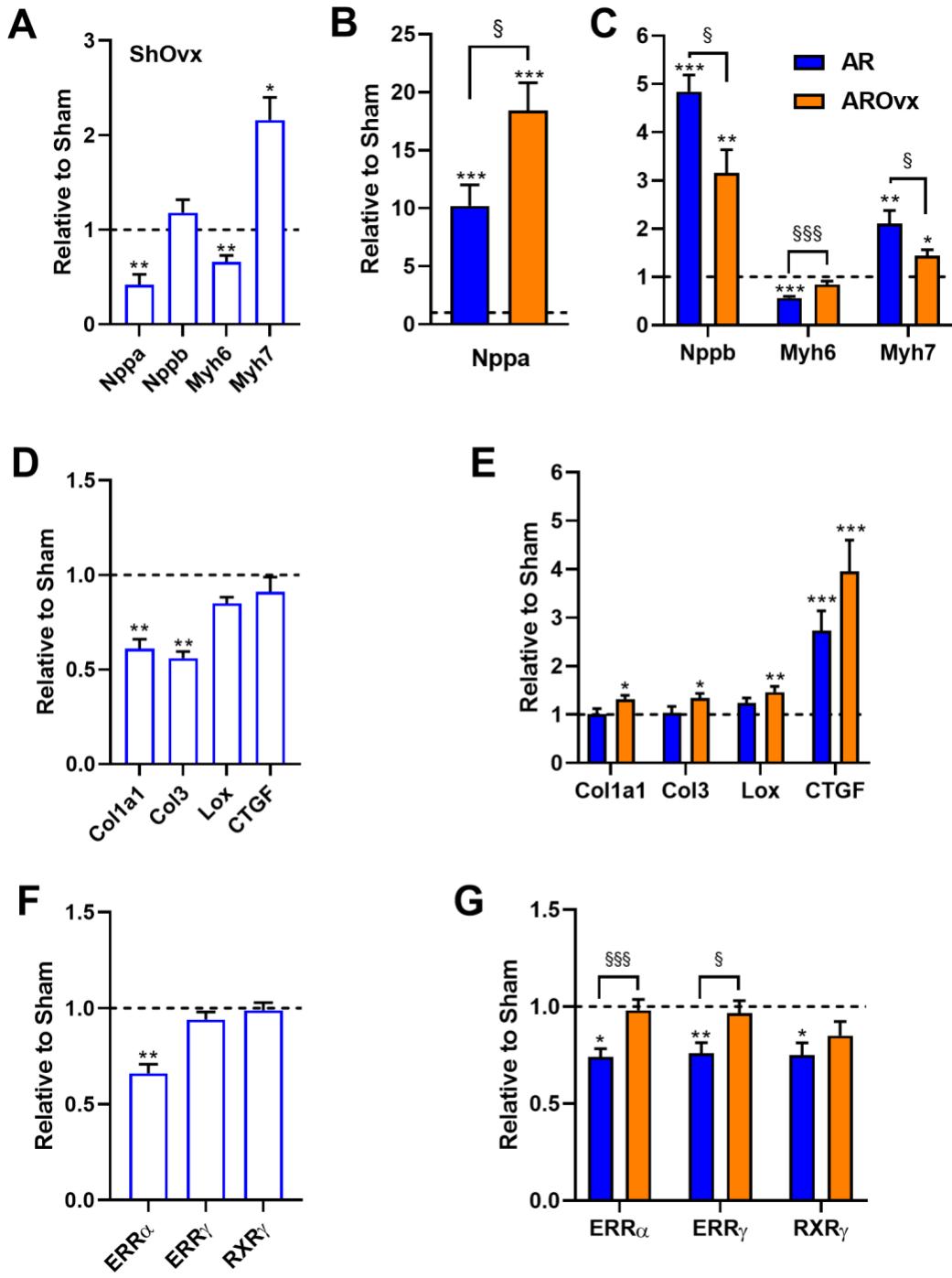


Figure 2.3. Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy markers (A, B and C), extracellular matrix genes (D and E) and transcription factors implicated in the control of myocardial energetics (F and G).

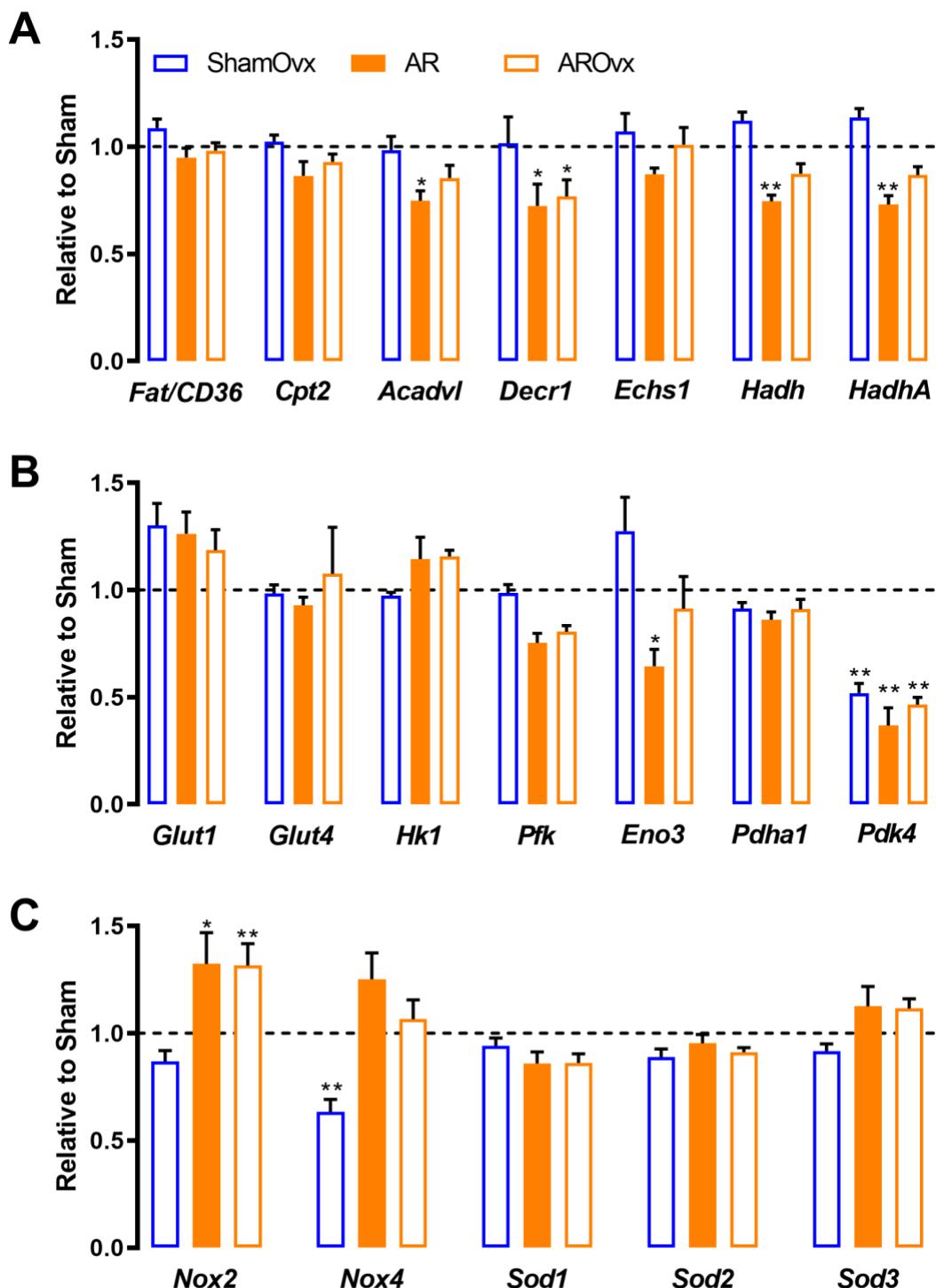


Figure 2.4. Genes implicated in energetics (panels A and B) and reactive oxygen species metabolism (C) are not modulated by the loss of estrogens in ShamOvx and AROvx rats.

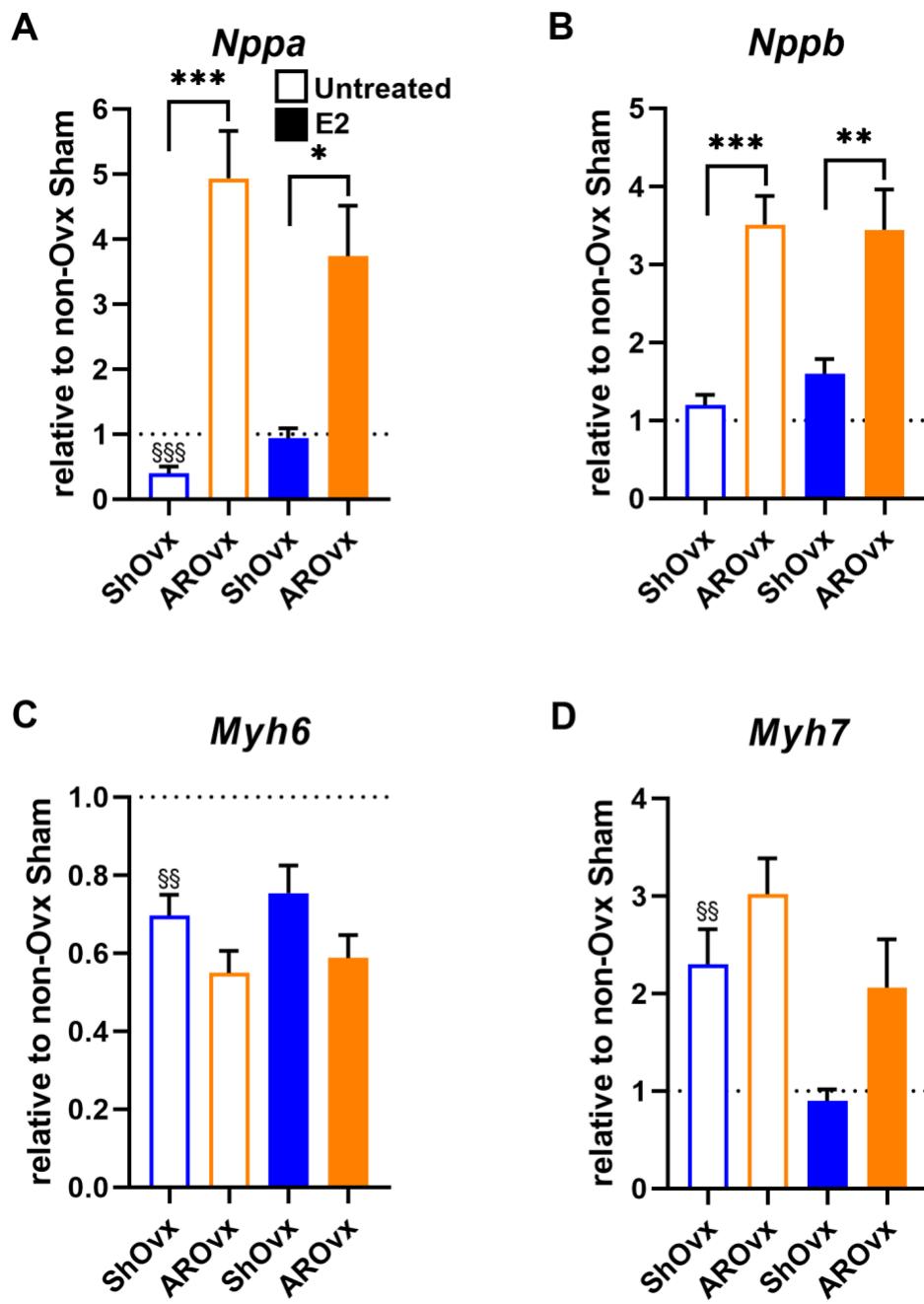


Figure 2.5. Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of LV mRNA levels of genes encoding for hypertrophy markers in Sham Ovx and AR Ovx rats receiving (orange) or not (blue) 17beta-estradiol (E2) replacement.

Chapitre 3. Sex differences in the response to angiotensin II receptor blockade in a rat model of eccentric cardiac hypertrophy

3.1 Page titre

Sex differences in the response to angiotensin II receptor blockade in a rat model of eccentric cardiac hypertrophy

Élisabeth Walsh-Wilkinson, Marie-Claude Drolet, Charlie LeHouillier, Ève-Marie Roy, Marie Arsenault and Jacques Couet

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

Corresponding author: Jacques Couet PhD

Groupe de Recherche en Valvulopathies, Centre de Recherche,
Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec
2725, Chemin Sainte-Foy, Québec, (Québec), Canada, G1V 4G5
Phone: 1-418-656-4760; Fax: 1-418-656-4509

Email: jacques.couet@med.ulaval.ca

3.2 Résumé

Les hommes et les femmes sont affectés différemment par les maladies cardiovasculaires et les mécanismes ne sont toujours pas bien compris. Les symptômes, l'évolution et la réponse au traitement sont souvent spécifiques aux sexes. Ces différences ont été étudiées dans des modèles d'hypertension et d'infarctus du myocarde, mais le modèle de régurgitation de la valve aortique a reçu moins d'attention. Le but de cette étude était de comprendre le développement de l'hypertrophie cardiaque (HC) en réponse à la surcharge de volume induite par la régurgitation de la valve aortique (RA) chez les mâles et les femelles traités ou non au valsartan, un inhibiteur du récepteur à l'angiotensine II. Les rats ont été séparés en huit groupes : mâle ou femelle, RA ou opération sham et traité ou non traité au valsartan (30 mg/kg/jour) pour une durée de 9 semaines à partir d'une semaine avant la chirurgie (sham ou RA).

Comme attendu, la RA résulte en une dilatation du VG montrée par l'augmentation du diamètre du VG en fin de diastole (EDD) de 39% et 40% chez les mâles et les femelles et par un gain de masse du VG de 53% et 64%, respectivement. L'épaisseur relative des parois du VG (ratio de l'épaisseur des parois sur le EDD) est réduite chez les mâles RA, alors qu'elle reste inchangée chez les femelles RA. Le traitement au valsartan ne réduit pas la dilatation du VG chez les animaux, mais il empêche l'épaississement des parois chez les femelles RA. Les fonctions systoliques et diastoliques sont affectées par la RA chez les deux sexes et le traitement au valsartan a amélioré la fonction diastolique chez les femelles RA (réduction de la masse de l'oreillette gauche et de la pente de l'onde E). Le traitement a normalisé l'expression génique des peptides natriurétiques *Anp* et *Bnp* chez les femelles RA, alors que l'expression d'autres gènes hypertrophiques (*Fos*, *Trpc6*, *Klf15*, *Myh6* et *Myh7*) n'a pas été affectée par le valsartan. L'expression des gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire (*Col1a1*, *Col3a1*, *Fn1*, *Mmp2*, *Timp1* et *Lox*) n'a pas varié avec le traitement au valsartan chez les deux sexes. En résumé, le traitement au valsartan chez les rats RA a empêché le développement de la réponse hypertrophique spécifique aux femelles (épaississement des parois). La dilatation du VG n'a pas été affectée par le traitement chez les deux sexes. Cela indique que l'activation du récepteur à l'angiotensine II serait davantage impliquée dans le développement précoce de l'HC induite par la RA chez les femelles, comparativement aux mâles.

3.3 Abstract

Background. Men and women differ in their susceptibility to cardiovascular disease, though the underlying mechanism has remained elusive. Heart disease symptoms, evolution and response to treatment are often sex specific. This has been studied in animal models of hypertension or myocardial infarction in the past but has received less attention in the context of heart valve regurgitation. The aim of the study was to evaluate the development of cardiac hypertrophy (CH) in response to left ventricle (LV) volume overload (VO) caused by chronic aortic valve regurgitation (AR) in male and female rats treated or not with angiotensin II receptor blocker (ARB), valsartan. We studied eight groups of Wistar rats: male or female, AR or sham-operated (sham) and treated or not with valsartan (30 mg/kg/day) for 9 weeks starting one week before AR surgical induction.

Results. As expected, VO from AR resulted for both male and female rats in significant LV dilation (39% vs. 40% end-diastolic LV diameter increase, respectively; $p < 0.0001$) and CH (53% vs. 64% heart weight increase, respectively; $p < 0.0001$) compared to sham. Sex differences were observed in LV wall thickening in response to VO. In untreated AR males, relative LV wall thickness (a ratio of wall thickness to end-diastolic diameter) was reduced compared to sham, whereas this ratio in females remained unchanged. ARB treatment did not prevent LV dilation in both male and female animals but reversed LV wall thickening in females. Systolic and diastolic functions in AR animals were altered similarly for both sexes. ARB treatment did not improve systolic function but helped normalizing diastolic parameters such as left atrial mass and E wave slope in female AR rats. Increased LV gene expression of *Anp* and *Bnp* was normalized by ARB treatment in AR females but not in males. Other hypertrophy gene markers (*Fos*, *Trpc6*, *Klf15*, *Myh6* and *Myh7*) were not modulated by ARB treatment. The same was true for genes related to LV extracellular matrix remodeling (*Col1a1*, *Col3a1*, *Fn1*, *Mmp2*, *Timp1* and *Lox*). In summary, ARB treatment of rats with severe AR blocked the female-specific hypertrophic response characterized by LV chamber wall thickening. LV dilation, on the other hand, was not significantly decreased by ARB treatment. This also indicates that activation of the angiotensin II receptor is probably more involved in the early steps of LV remodeling caused by AR in females than in males.

3.4 Introduction

Heart diseases are among the leading causes of mortality for both men and women (Roth et al., 2017). Cardiac hypertrophy (CH) is an adaptive response to overload (pressure (PO) or volume (VO)) (Swynghedauw, 1999) and is an independent cause of morbidity and mortality from heart diseases. Heart failure (HF) in women occurs as frequently as in men but later in life and less from ischemic causes. Women are more likely to develop heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF), which is associated with diastolic dysfunction (impaired myocardial relaxation during filling) and concentric LV (left ventricle) remodeling (Maric-Bilkan et al., 2016). In preclinical models of pathological CH and/or HF such as in mice with transverse aortic constriction (TAC; LV PO model), males develop concentric LV hypertrophy (LVH) sooner than females. Myocardial remodeling in males then evolves more rapidly towards eccentric LVH and HFrEF than in females (Regitz-Zagrosek et al., 2010). A sexual dimorphism is thus present in the hypertrophic response to an overload in both patients and in pre-clinical models (Blenck et al., 2016). Sexually dimorphic response to PO (hypertension) and effects of treatment has been relatively well-documented. This is not the case for VO.

LV VO occurs when either the aortic or the mitral valve is regurgitating. Causes for regurgitation are multiple but worldwide, they are most frequently complications of acute rheumatic fever. Rheumatic valve diseases causing aortic regurgitation (AR) are still occurring at an alarming rate in the third-world and low/middle-income countries. In the Western world, they are still prevalent in poor, remote, Native American communities and in immigrants from countries where rheumatic fever is still endemic. The estimated burden worldwide of rheumatic valve diseases is estimated to more than 15 million existing cases with 280k new cases each year and 230k deaths (Marijon et al., 2012). Secondary moderate to severe AR also occurs in a small proportion of patients (5–10%) undergoing transcatheter aortic valve replacement (TAVR) (Leon et al., 2016). Since TAVR is now a procedure routinely performed, management of secondary AR is a developing concern.

LV remodeling in response to significant VO from experimental severe AR in male Wistar rats results in important eccentric hypertrophy (dilation) to accommodate the excess regurgitating aortic blood to pump (Arsenault et al., 2002; Plante et al., 2003). We recently observed in a rat model of chronic (6 months) LV VO caused by severe aortic valve regurgitation (AR), that female animals developed as much if not more CH than males

(Beaumont et al., 2017). However, male LVs showed more dilation and worse contractile function than those of females. Interestingly, LV remodeling in AR female rats is characterized by a more important increase in LV wall thickness than in males (Beaumont et al., 2017). In another rat VO model (aorto-caval fistula), a faster progression toward HF was observed in males and resulted in poorer survival (Dent, Tappia & Dhalla, 2010a). At the cellular and molecular levels, we observed that male AR rat LVs showed an important downregulation of many fatty acid oxidation genes and an upregulation of glucose metabolism genes, whereas this characteristic energy metabolism switch did not happen in females (Beaumont et al., 2017). Since sex steroids have a potent effect on differentiation, they could explain a large part of the sex dimorphism as observed in CH (Leinwand, 2003).

Activation of the tissue renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) system is a characteristic feature of the myocardial response to a pathological and chronic stress such as a significant valve regurgitation (VO) or a LV pressure overload such as in hypertension or aortic valve stenosis. We previously showed that blocking the RAAS in male AR rats could reduce development of LV hypertrophy (LVH), improve myocardial function and survival (Plante et al., 2009; Plante et al., 2004a; Arsenault et al., 2013). However, we did not investigate the benefits of inhibiting the RAAS in female AR rats. Here, we wanted to compare the hypertrophic response to treatment targeting the RAAS of animals of both sexes with a severe LV volume overload. We studied the effects of an angiotensin II receptor antagonist, valsartan, on the hypertrophic response to severe LV volume overload from AR in rats of both sexes and over a relatively short duration of two months in order to better differentiate early cardiac remodeling events between males and females with AR. We started treatment one week before AR induction instead as two weeks after as described in the chronic studies above in order to hopefully inhibit early features of LV remodeling under the control of the RAAS in our animals.

Our results suggest that angiotensin receptor blockade (ARB) with valsartan during the development of hypertrophy in female rats with severe AR partly abrogates LV wall thickening leading to a more eccentric remodeling similar to the one observed in males.

3.5 Methods

3.5.1 Animals

Severe AR was induced in males (300–325 g) and females (200–225 g) Wistar rats (9–10 weeks of age) by retrograde puncture one or two aortic valve leaflets under echocardiographic guidance as previously described (Arsenault et al., 2002). Only animals with 50% and more regurgitation were included in the study. The regurgitant fraction was estimated by the ratio of the forward systolic flow time–velocity integral (VTI) to the reversed diastolic flow VTI measured by pulsed Doppler in the thoracic descending aorta. Eleven male and ten female Wistar AR rats received daily valsartan (30 mg/kg/d) mixed in unsalted peanut butter (1:50;w:w). Untreated animals received equivalent amount of peanut butter (5–6 animals/gr.). Treatment was started one week before AR induction. We made sure that peanut butter was consumed by all animals, daily. In addition, 24 sham-operated male and female Wistar rats (Sham or Sh) were used as controls and received treatment following the same regimen as AR rats. The protocol was approved by the Université Laval’s Animal Protection Committee and followed the recommendations of the Canadian Council on Laboratory Animal Care.

3.5.2 Echocardiography

An echocardiographic exam was performed two weeks after surgery to confirm AR severity (estimation of regurgitation and LV dimensions) and at the end of the protocol 8 weeks later as previously described (Arsenault et al., 2013; Arsenault et al., 2002; Plante et al., 2003). LV mass estimated by echocardiography was calculated using the following equation.

$$1.04x((EDD + PW + SW)^3 - EDD^3)$$

EDD, PW, and SW are end-diastolic diameter, posterior wall thickness, and septal wall thickness, respectively. At the end of the protocol, the heart and the lungs were harvested and weighed. Heart chambers were dissected, weighted and the LV was then quickly frozen in liquid nitrogen and kept at –80 C until further use.

3.5.3 Gene Expression Analysis by quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using Trizol reagent as described elsewhere (Champetier et al., 2009). LV RNA samples were diluted to 500 ng/microliter. One microliter RNA (500 ng) was

converted to cDNA using the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen). The cDNA obtained was further diluted 11-fold with water prior to amplification (final concentration corresponding to 4.54 ng/microliter of initial RNA). Five microliter diluted cDNA were amplified in duplicate by quantitative PCR in a Rotor-GeneTM thermal cycler (Corbett Life Science, Sydney, Australia). Pre-optimized primers were from QuantiTect (Qiagen) and IDT (Coralville, Iowa) (Table 1) and SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio Rad, Hercules, CA, USA) was used. Each run included one tube with water only (no template control) and a series of three 10-fold dilutions of a representative cDNA sample to check efficiency of the amplification reactions. We studied 5–6 animals/group. The six animals/group studied from the AR valsartan-treated groups were chosen randomly. Cyclophilin A gene (*Ppia*) was the housekeeping gene.

3.5.4 Statistical analysis

Results are presented as the mean and the standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed on the log of the data. Two-way ANOVA analysis was performed and Holm-Sidak's pos t-test was used for comparison between the groups (GraphPad Prism 8.02; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). A Student's t-test was used when only two groups were compared. A p-value lower than 0.05 was considered significant.

3.6 Results

3.6.1 Animal characteristics

Treatment with the angiotensin receptor blocker (ARB), valsartan, was initiated a week before surgery and lasted up until the end of the protocol 9 weeks later. Surgery itself, had no effects on body weight gain during the protocol. Valsartan treatment had no significant effects on heart total weight in sham-operated animals, males and females (Tables 2 and 3). The only significant difference was for the left atrial weight which was decreased by the ARB treatment in females.

Comparing AR rats to sham ones, every parameter measured with the exception of body weight and tibial length were significantly increased as summarized in Tables 2 and 3. Moreover, heart total and indexed weights were significantly reduced in female animals treated with the ARB (Table 3). Only a trend for a decrease was present in males. This was

also true for the left and right ventricles, which were smaller in female AR rats treated with valsartan. This again, was not observed in AR males. Lungs weight (a marker of overt heart failure) remained stable in the AR groups suggesting that the animals were still in the compensated state of the disease.

In Fig. 1, we illustrated individual variations in heart and heart chambers weights of AR animals relative to the mean of their respective sham-operated group in order to emphasize the extent of changes associated with the disease, the biological sex or the treatment. As expected, AR caused important cardiac hypertrophy in both male and female animals compared to sham. Valsartan had relatively little effects in blocking the development of cardiac hypertrophy in male animals. On the other hand, the hypertrophic response was slowed in female AR animals; this was significant for the left ventricle.

3.6.2 Echocardiography data

As for the animal and heart characteristics described above, most echocardiographic parameters measured were significantly changed by AR (Tables 4 and 5). ARB treatment with valsartan of sham-operated rats had relatively no effects on echocardiographic parameters measured in this study (Table 4). Calculated ejection fraction, although still in the normal range was lower in treated sham males.

In AR animals, the effects of valsartan were observed on the LV wall thickness (intraventricular septal wall (SW) and posterior wall (PW), which were thinner in females compared to untreated AR rats. ARB had no effects in AR males (Table 5). Diastolic LV parameters were significantly altered in AR rats. Valsartan treatment had no effects on these parameters in males but significantly reduced E wave slope in females.

As illustrated in Fig. 2, LV dilation caused by AR was similar in rats of both sexes. However, LV septal and posterior walls thickening was more important in females. This was almost completely blocked by ARB treatment.

As illustrated in Fig. 3, both E wave and A wave were increased by AR in male and female rats. E wave slope, the most reliable marker of changes in diastolic function in our model was also increased (Plante et al., 2003). Valsartan treatment had no effects on these parameters in males but significantly reduced E wave and E wave slope in AR female.

3.6.3 Markers of LV hypertrophy and extracellular matrix remodeling

We measured LV gene expression for several hypertrophy markers in AR animals relative to sham controls. *Anp* and *Bnp* mRNA levels were increased in both male and female AR animals (Fig. 4A). This increase was stronger for *Bnp* expression in females compared to males and was reversed by ARB treatment. Valsartan also reversed the increase in *Anp* expression in AR females. The expression of other hypertrophy markers was only changed in AR males but not in females (Fig. 4B). Valsartan lowered *Fos* expression in both male and female animals but had little effects on the other two genes studied. *Trpc6* was up-regulated and *Klf15*, down-regulated in AR males. As expected, *Myh6* gene expression was reduced, by AR whereas *Myh7* expression increased. Valsartan treatment had no effect on the expression of both Myh genes.

Gene expression of extracellular components were only mildly regulated as illustrated in Fig. 5. *Col1* was significantly increased in female AR rats and this was reversed by ARB treatment. *Itgb1* encodes for beta-1 integrin, a sensor of mechanical stretch expressed on the surface of cardiac myocytes. In all AR groups with the exception of untreated males, *Itgb1* was upregulated. *Timp1* was upregulated in AR males and *Lox* in both males and females. The expression of the latter was reduced in ARB-treated males. *Ctgf* gene expression was increased in all AR groups but females treated with valsartan.

3.7 Discussion

In this study, we observed that angiotensin II receptor blockade using valsartan reduces the LV wall thickening taking place in AR female rats. We had previously shown that LV remodeling from AR in this model involves similar LV dilation in rats of both sexes but an excess of wall thickening in females. This results in somewhat maintained relative wall thickness (RWT), an index of LV remodeling (Beaumont et al., 2017).

The classic view of cardiac remodeling induced by a hemodynamic overload is that pressure overload (hypertension or aortic stenosis; afterload) is associated with initial concentric LV hypertrophy (wall thickening and equal or smaller chamber volume). On the other hand, volume overload (valve regurgitation; preload) induces chamber dilatation with no or little increase in wall thickness or eccentric remodeling (Katz & Rolett, 2016). This is probably more accurate for male animal models than for females as evidenced in the present study. We observed that eccentric LV remodeling took place in AR males resulting in a lower

relative wall thickness ratio. In AR females, LV wall thickening concurrent to its dilation resulted in a maintained relative wall thickness ratio.

We observed that LV dilation was similar and relatively unaffected by angiotensin receptor blockade by valsartan both in males and females. Blood regurgitation from the aorta to the LV during diastole is a relatively stable determinant of the disease and cannot be modulated significantly by ARB. On the other hand, LV wall thickening, more important in female AR rats compared to males, was reversed by ARB leading to similar LV morphology between the sexes. Indexed LV mass estimated by echocardiography showed a similar trend where valsartan treatment partly reversed hypertrophy in females but not in males. The method we used makes the geometrical assumption of an elliptical LV. It is possible that the shape of the dilated LV in female AR rats does not obey this assumption.

Aortocaval fistula (ACF) is a model of global cardiac volume overload where sex differences have been studied with some details in the past in rats. Although this form of VO is less relevant for a clinical standpoint, it remains the most popular pre-clinical VO model in the literature. In 2002, Gardner and collaborators first reported that female rats with ACV developed less cardiac hypertrophy, evolved less towards heart failure and had better survival than males (Gardner, Brower & Janicki, 2002). Ovariectomy removed this advantage over males (Brower, Gardner & Janicki, 2003). A few years later, Dent and collaborators characterized this model further by echocardiography and at the molecular level. Both groups showed that estrogen could reverse the adverse effects of ovariectomy in females (Dent, Tappia & Dhalla, 2010b). In the AR rat model, we did not observe major effects related to the loss of estrogens by ovariectomy in females (Drolet et al., 2006).

Pharmacological interventions for cardiovascular diseases and heart failure are often less prescribed in women. Their absorption, distribution, metabolism and clearance are often different (Humphries et al., 2017). It is not excluded that the differences we observed here may have been related to sex-specific handling of ARB by females compared to males. Unfortunately, sex differences in the response to treatment in pre-clinical models of cardiovascular diseases have received little attention. In the pressure overload SHR (spontaneously hypertensive rats) model of LV hypertrophy, head-to-head comparison of treatment in animals of both sexes have seldom been performed. In 1982, Pfeffer and collaborators showed similar effects between male and female SHR of two anti-hypertensive agents hydralazine and guanethidine on LV hypertrophy (Pfeffer et al., 1982a). Captopril

(ACE inhibitor) has been shown to be effective to block LV hypertrophy in both males and females but was not compared in the same study (Pfeffer et al., 1982b; Pfeffer et al., 1983). More recently, the effects of vasopeptidase inhibitor omapatrilat and the ARB irbesartan in combination with a diuretic were studied in SHR/stroke prone male and female animals (Graham et al., 2004). Both regimens were efficient to lower LV hypertrophy development and this was similar for males and females. Romero and collaborators observed a better response of male SHR to atrial natriuretic treatment than for females although benefits were present for all animals (Romero et al., 2015).

Sex dimorphism in the response to treatment has not been studied before in VO rodent models. The present study design is also different from previous studies we made on male animals using this model (Arsenault et al., 2013; Plante et al., 2004b; Zendaoui et al., 2011; Plante et al., 2009; Plante et al., 2008). Here, we started treatment before the surgical induction of valve regurgitation instead of two weeks after and thus, when cardiac hypertrophy is already present. We choose to initiate treatment before AR induction in order to investigate the early implication of angiotensin II in the LV remodeling caused by severe VO instead of attempting to reproduce a more clinical situation. This study was also relatively short (2 months) instead of being more chronic (6 months and more) concentrating in early events. We consider that at the end of the protocol the animals were still in the compensated phase of the disease although both systolic and diastolic functions indicators were already significantly but not severely, altered. We showed in previous chronic studies that renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) inhibition using either angiotensin converting enzyme inhibitors such as captopril or angiotensin II receptor antagonists such as losartan can reduce the extent in LV hypertrophy, dilation and improve survival in males (Plante et al., 2009; Arsenault et al., 2013). By comparing these studies performed in males to the present one, we noticed that the RAAS implication during the early stages of LV remodeling after AR induction does not seem to be as important as the one of the mTORC signaling pathway we observed in a previous study (Drolet et al., 2015). Rapamycin inhibition of mTOR signaling was able to reduce the extent of LV dilation in AR males, which was not the case here. It is possible that a higher dosage of valsartan may have provide a better inhibition. On the other hand, the dosage of valsartan we used in this study was similar to other studies performed in the past in rats ranging from 10 to 30 mg/kg/daily (Li et al., 2002; Der Sarkissian et al., 2003; Tachikawa et al., 2003; Michel et al., 2016).

The present study also enlightened that development of LV hypertrophy in this model first involves rapid LV dilation to accommodate the increased blood volume during diastole in males. In previous studies in males, we observed either a mild raise in systolic blood pressure or no changes (Plante et al., 2009; Bouchard-Thomassin et al., 2011; Plante et al., 2004a). Then, later in the disease, LV dilation and mass continue to increase, and this can be blocked by inhibiting the RAAS (Plante et al., 2004a; Arsenault et al., 2013). Here, we showed that RAAS activation leads to LV wall thickening early in the disease. This helps maintain an enlarged but relatively normal LV morphology (relative wall thickness). Gain of LV mass is relatively as important as for AR males. In AR males however, our results seem to indicate that the RAAS blockade early in the disease is less consequential than later in the disease. LV hypertrophy development is rapid in our model during the first months and then slows later but still goes on (Plante et al., 2003). We can assume the first phase of LV remodeling is focused on the adaptation to pump the additional regurgitating blood. Then later in the disease, LV dilation continues and this can be blocked by either inhibiting angiotensin converting enzyme with captopril or ARB (Plante et al., 2004b; Arsenault et al., 2013). This inhibition of the RAAS later in the disease provides benefits such as less LV hypertrophy, better myocardial energy metabolism and better survival (Arsenault et al., 2013).

Expression of various LV genes associated with hypertrophy or extracellular matrix remodeling was assessed. In the case of *Anp* and *Bnp* genes, expression was more elevated in AR rats and valsartan normalized their expression but only in females suggesting that LV wall tension may have been improved by treatment. For three other hypertrophy markers, namely *Fos*, *Trpc6* and *Klf15*, gene expression was only altered in untreated AR males but not in females as previously reported (Beaumont et al., 2017). Interestingly, *fos* expression was lowered by ARB both in males and females. As for genes related to extracellular matrix components and metabolism, very few differences between the sexes or by treatment were registered. Volume overload is not associated with important myocardial fibrosis at least in the early steps of the disease (Ryan et al., 2007). This is also true in the AR rat model where collagen total myocardial content, at least in males, is still normal up to 9 months (Lachance et al., 2009).

It is not clear if the effects of angiotensin receptor blockade we observed in AR females provide benefits in the context of a LV VO. On one side, valsartan recreates in AR females an eccentric LV morphology similar to males, which tend to have a worse outcome than

untreated AR females after 6 months (Beaumont et al., 2017). On the other hand, it is probably that valsartan treatment may provide benefits as illustrated by several observations (Beaumont et al., 2019). First, diastolic function seemed to be improved by ARB as evidenced by less left atrial hypertrophy and better echocardiographic diastolic parameters. Valsartan helped reduced natriuretic peptides gene expression in females as well as collagen 1 and Ctgf. In males, benefits of valsartan were only observed for the decrease of Fox and Lox gene expression and an increase for Itgb1. Beta-1 integrin is one subunit of the dimeric fibronectin surface receptor. Its signaling promotes cardiac hypertrophy but also cardiac myocytes survival via Erk and Akt signaling pathways (Brancaccio et al., 2006).

We chose to not directly address the influence of sex hormones by castration or ovariectomy in this study. This would have added a level of complexity. We recently observed that loss of testosterone reduced LV hypertrophy in AR males and helped normalize the myocardial transcriptional profile suggesting an important role for this sex hormone in the response of the heart to a pathological stress Beaumont et al., (2019). Additional studies are needed to better understand sex differences in the response to treatment in both pressure overload and volume overload pre-clinical models of LV hypertrophy. It is not clear how we can translate the observations made here and future ones to the human situation. On the other hand, our state of knowledge about heart diseases in women and how to treat them is still lagging (Regitz-Zagrosek et al., 2010; Blenck et al., 2016). We need even more basic knowledge to address this gap. We want to point out several limitations in this study. One is the relatively short duration of the protocol and as mentioned, the fact that we did not study the effects of sex hormones on the response to treatment. Aortic regurgitation is a relative rare disease in the Western world and is more prevalent in poorer countries (Zühlke et al., 2017). Since this disease is still lacking proven pharmaceutical options that could delay valve replacement if available for the patient, we consider that an effort on this is important.

In conclusion, we showed that female AR rats have a stronger early response to treatment with an angiotensin receptor antagonist, valsartan than males. This response is mainly concentrated on a female-specific feature of the LV remodeling in response to volume overload, LV wall thickening.

3.8 References

- Arsenault M, Plante E, Drolet M, Couet J. 2002. Experimental aortic regurgitation in rats under echocardiographic guidance. *The Journal of Heart Valve Disease* 11(1):128-134
- Arsenault M, Zendaoui A, Roussel É, Drolet M-C, Dhahri W, Grenier A, Gascon S, Sarrhini O, Rousseau JA, Lecomte R. 2013. Angiotensin II—converting enzyme inhibition improves survival, ventricular remodeling, and myocardial energetics in experimental aortic regurgitationclinical perspective. *Circulation: Heart Failure* 6(5):1021-1028
- Beaumont C, Walsh-Wilkinson É, Drolet M-C, Roussel É, Arsenault M, Couet J. 2017. Female rats with severe left ventricle volume overload exhibit more cardiac hypertrophy but fewer myocardial transcriptional changes than males. *Scientific Reports* 7(1):729
- Beaumont C, Walsh-Wilkinson É, Drolet M-C, Roussel É, Melançon N, Fortier É, Harpin G, Beaudoin J, Arsenault M, Couet J. 2019. Testosterone deficiency reduces cardiac hypertrophy in a rat model of severe volume overload. *Physiological Reports* 7(9):e14088
- Blenck CL, Harvey PA, Reckelhoff JF, Leinwand LA. 2016. The importance of biological sex and estrogen in rodent models of cardiovascular health and disease. *Circulation Research* 118(8):1294-312
- Bouchard-Thomassin AA, Lachance D, Drolet MC, Couet J, Arsenault M. 2011. A high-fructose diet worsens eccentric left ventricular hypertrophy in experimental volume overload. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 300(1):H125-H134
- Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G, Tarone G. 2006. Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovascular Research* 70(3):422-433
- Brower GL, Gardner JD, Janicki JS. 2003. Gender mediated cardiac protection from adverse ventricular remodeling is abolished by ovariectomy. *Molecular and Cellular Biochemistry* 251(1-2):89-95
- Champetier S, Bojmehrani A, Beaudoin J, Lachance D, Plante É, Roussel E, Couet J, Arsenault M. 2009. Gene profiling of left ventricle eccentric hypertrophy in aortic regurgitation in rats: rationale for targeting the β -adrenergic and renin-angiotensin systems. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 296(3):H669-H677
- Dent MR, Tappia PS, Dhalla NS. 2010a. Gender differences in apoptotic signaling in heart failure due to volume overload. *Apoptosis* 15(4):499-510
- Dent MR, Tappia PS, Dhalla NS. 2010b. Gender differences in cardiac dysfunction and remodeling due to volume overload. *Journal of Cardiac Failure* 16(5):439-449

Der Sarkissian S, Marchand E-L, Duguay D, Hamet P, Deblois D. 2003. Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. *Cardiovascular Research* 57(3):775-783

Drolet MC, Desbiens-Brassard V, Roussel E, Tu V, Couet J, Arsenault M. 2015. Blockade of the acute activation of mTOR complex 1 decreases hypertrophy development in rats with severe aortic valve regurgitation. *Springerplus* 4 Article 435

Drolet MC, Lachance D, Plante E, Roussel E, Couet J, Arsenault M. 2006. Gender-related differences in left ventricular remodeling in chronic severe aortic valve regurgitation in rats. *Journal of Heart Valve Disease* 15(3):345-351

Gardner JD, Brower GL, Janicki JS. 2002. Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload. *Journal of Cardiac Failure* 8(2):101-107

Graham D, Hamilton C, Beattie E, Spiers A, Dominiczak AF. 2004. Comparison of the effects of omapatrilat and irbesartan/hydrochlorothiazide on endothelial function and cardiac hypertrophy in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat: sex differences. *Journal of Hypertension* 22(2):329-337

Humphries K, Izadnegahdar M, Sedlak T, Saw J, Johnston N, Schenck-Gustafsson K, Shah R, Regitz-Zagrosek V, Grewal J, Vaccarino V+2 more. 2017. Sex differences in cardiovascular disease-Impact on care and outcomes. *Frontiers in Neuroendocrinology* 46:46-70

Katz AM, Rolett EL. 2016. Heart failure: when form fails to follow function. *European Heart Journal* 37(5):449-454

Lachance D, Plante E, Bouchard-Thomassin AA, Champetier S, Roussel E, Drolet MC, Arsenault M, Couet J. 2009. Moderate exercise training improves survival and ventricular remodeling in an animal model of left ventricular volume overload. *Journal of Cardiac Failure* 2(5):437-45

Leinwand LA. 2003. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *Journal of Clinical Investigation* 112(3):302-307

Leon MB, Smith CR, Mack MJ, Makkar RR, Svensson LG, Kodali SK, Thourani VH, Tuzcu EM, Miller DC, Herrmann HCEAFTPI. 2016. Transcatheter or surgical aortic-valve replacement in intermediate-risk patients. *New England Journal of Medicine* 374(17):1609-1620

Li W, Sun N, Liu W, Chen Y, Yu Y. 2002. Influence of Valsartan on myocardial apoptosis in spontaneously hypertensive rats. *Chinese Medical Journal* 115(3):364-366

Maric-Bilkan C, Arnold AP, Taylor DA, Dwinell M, Howlett SE, Wenger N, Reckelhoff JF, Sandberg K, Churchill G, Levin E. 2016. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group on sex differences research in cardiovascular disease: scientific questions and challenges. *Hypertension* 67(5):802-807

Marijon E, Mirabel M, Celermajer DS, Jouven X. 2012. Rheumatic heart disease. *The Lancet* 379(9819):953-964

Michel MC, Brunner HR, Foster C, Huo Y. 2016. Angiotensin II type 1 receptor antagonists in animal models of vascular, cardiac, metabolic and renal disease. *Pharmacology & Therapeutics* 164:1-81

Pfeffer J, Pfeffer M, Mirsky I, Braunwald E. 1983. Prevention of the development of heart failure and the regression of cardiac hypertrophy by captopril in the spontaneously hypertensive rat. *European Heart Journal* 4(suppl_A):143-148

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher P, Fishbein MC, Braunwald E. 1982a. Favorable effects of therapy on cardiac performance in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 242(5):H776-H784

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Mirsky I, Braunwald E. 1982b. Regression of left ventricular hypertrophy and prevention of left ventricular dysfunction by captopril in the spontaneously hypertensive rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(10):3310-3314

Plante E, Couet J, Gaudreau M, Dumas M-P, Drolet M-C, Arsenault M. 2003. Left ventricular response to sustained volume overload from chronic aortic valve regurgitation in rats. *Journal of Cardiac Failure* 9(2):128-140

Plante E, Gaudreau M, Lachance D, Drolet MC, Roussel E, Gauthier C, Lapointe E, Arsenault M, Couet J. 2004a. Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents volume overload cardiomyopathy in experimental chronic aortic valve regurgitation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 82(3):191-199

Plante E, Lachance D, Beaudoin J, Champetier S, Roussel E, Arsenault M, Couet J. 2009. Comparative study of vasodilators in an animal model of chronic volume overload caused by severe aortic regurgitation. *Journal of Cardiac Failure* 2(1):25-32

Plante E, Lachance D, Champetier S, Drolet MC, Roussel E, Arsenault M, Couet J. 2008. Benefits of long-term beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 294(4):H1888-95

Plante E, Lachance D, Gaudreau M, Drolet M-C, Roussel É, Arsenault M, Couet J. 2004b. Effectiveness of β -blockade in experimental chronic aortic regurgitation. *Circulation* 110(11):1477-1483

Regitz-Zagrosek V, Oertelt-Prigione S, Seeland U, Hetzer R. 2010. Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. *Circulation Journal* 74(7):1265-1273

Romero M, Caniffi C, Bouchet G, Costa MA, Elesgaray R, Arranz C, Tomat AL. 2015. Chronic treatment with atrial natriuretic peptide in spontaneously hypertensive rats: beneficial renal effects and sex differences. *PLOS ONE* 10(3):e0120362

Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, Ahmed M, Aksut B, Alam T, Alam K+90 more. 2017. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *Journal of the American College of Cardiology* 70(1):1-25

Ryan TD, Rothstein EC, Aban I, Tallaj JA, Husain A, Lucchesi PA, Dell' Italia LJ. 2007. Left ventricular eccentric remodeling and matrix loss are mediated by bradykinin and precede cardiomyocyte elongation in rats with volume overload. *Journal of the American College of Cardiology* 49(7):811-821

Swynghedauw B. 1999. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiological Reviews* 79(1):215-262

Tachikawa H, Kodama M, Hui L, Yoshida T, Hayashi M, Abe S, Kashimura T, Kato K, Hanawa H, Watanabe K. 2003. Angiotensin II type 1 receptor blocker, valsartan, prevented cardiac fibrosis in rat cardiomyopathy after autoimmune myocarditis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 41:S105-S110

Zendaoui A, Lachance D, Roussel É, Couet J, Arsenault M. 2011. Usefulness of carvedilol in the treatment of chronic aortic valve regurgitation clinical perspective. *Circulation: Heart Failure* 4(2):207-213

Zühlke LJ, Beaton A, Engel ME, Hugo-Hamman CT, Karthikeyan G, Katzenellenbogen JM, Ntusi N, Ralph AP, Saxena A, Smeesters PR+3 more. 2017. Group A streptococcus, acute rheumatic fever and rheumatic heart disease: epidemiology and clinical considerations. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine* 19(2) Article 15

3.9 Tables

Table 3.1 Name and symbol of all primer pairs used for gene expression analysis by quantitative RT-PCR.

mRNA	Symbol	Catalog no.	Amplicon (bp)
procollagen-1 alpha-1	<i>Col1</i>	Rn.PT.58.7562513	134
procollagen-3 alpha-1	<i>Col3</i>	Rn.PT.58.11138874	100
fibronectin 1	<i>Fn1</i>	Rn.PT.58.18226984	114
osteosarcoma viral oncogene homolog	<i>Fos</i>	QT01576330	73
krüppel-like factor 15	<i>Klf15</i>	Rn.PT.58.12431283	129
lysyl oxidase	<i>Lox</i>	Rn.PT.58.10677971	150
matrix metalloproteinase-2	<i>Mmp2</i>	Rn.PT.58.44737355	87
myosin, heavy polypeptide 6, cardiac	<i>Myh6</i>	Rn.PT.58.8646063	150
myosin, heavy polypeptide 7, cardiac	<i>Myh7</i>	Rn.PT.58.34623828	125
natriuretic peptide precursor type A	<i>Nppa, Anp</i>	Rn.PT.58.5865224	79
natriuretic peptide precursor type B	<i>Nppb, Bnp</i>	Rn.PT.58.5595685	108
tissue inhibitor of metalloproteases 1	<i>Timp1</i>	Rn.PT.58.34442920	127
transient receptor potential cation channelC6	<i>Trpc6</i>	Rn.PT.58.18089975	94
integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	<i>Itgb1</i>	QT00187656	117
connective tissue growth factor	<i>Ctgf</i>	QT00182021	102
cyclophilin A	<i>Ppia</i>	Rn.PT.39a,22214830	140

The table also includes catalogue numbers (from IDT or Qiagen) and the size of the amplicon.

Table 3.2 Characteristics of male sham-operated and AR animals at the end of the protocol.

Parameters	Sh (n = 6)	ShV (n = 6)	AR (n = 6)	ARV (n = 11)
Body weight, g	586 ± 9	637 ± 31	599 ± 31	619 ± 12
Tibial length, mm	57 ± 0.2	57 ± 0.7	58 ± 0.3	58 ± 0.3
Heart, mg	1303 ± 30	1322 ± 68	1989 ± 54*	1889 ± 87*
Heart/BW, mg/g	2.2 ± 0.06	2.1 ± 0.06	3.3 ± 0.08*	3.1 ± 0.11*
Left ventricle, mg	1000 ± 28	976 ± 46	1538 ± 55*	1426 ± 58*
Right ventricle, mg	225 ± 9	247 ± 20	311 ± 28*	325 ± 23*
Left atria, mg	32 ± 2	30 ± 3	61 ± 3*	58 ± 5*
Lungs, g	2.6 ± 0.3	2.1 ± 0.2	2.5 ± 0.1	2.4 ± 0.1

BW: body weight M: males F: females V: valsartan. Values are expressed as the mean ± SEM. Group comparisons were made using two-way ANOVA followed by Holm-Sidak pos t-test for intergroup comparisons. *p < 0.05 vs. respective sham group.

Table 3.3 Characteristics of females AR animals at the end of the protocol.

Parameters	Sh (n = 5)	ShV (n = 6)	AR (n = 6)	ARV (n = 10)
Body weight, g	318 ± 6	328 ± 3	337 ± 12	332 ± 9
Tibial length, mm	50 ± 0.4	50 ± 0.2	50 ± 0.5	50 ± 0.2
Heart, mg	836 ± 22	812 ± 26	1375 ± 107*	1115 ± 59***
Heart/BW, mg/g	2.6 ± 0.04	2.5 ± 0.07	4.1 ± 0.31*	3.4 ± 0.14***
Left ventricle, mg	638 ± 22	612 ± 24	1068 ± 81*	862 ± 44***
Right ventricle, mg	144 ± 3	149 ± 4	225 ± 20*	171 ± 12***
Left atria, mg	24 ± 1	15 ± 1**	43 ± 4*	32 ± 3*
Lungs, g	2.1 ± 0.2	1.8 ± 0.3	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.1

BW: body weight. Values are expressed as the mean ± SEM. Group comparisons were made using two-way ANOVA followed by Holm-Sidak pos t-test for intergroup comparisons. *p < 0.05 vs. respective sham group. **p < 0.05 vs. the respective untreated group.

3.10 Figure legends

Figure 3.1: Effects of a 9-week treatment with valsartan on cardiac hypertrophy development caused by severe volume overload from AR. Results are expressed as the percentage of variation of the indicated parameter compared to the mean of the same parameter for the respective sham-operated group. (A) Heart weight, (B) Left ventricular weight, (C) right ventricular weight and (D) left atrial weight. Results are expressed as the mean \pm SEM. *: $p < 0.05$ between groups.

Figure 3.2: Effects of a 9-week treatment with valsartan on LV hypertrophy development caused by AR on echocardiographic parameters. Results are expressed as the percentage of variation of the indicated parameter compared to the mean of the same parameter of the respective untreated sham-operated group. (A) End-diastolic diameter, (B) end-systolic diameter, (C) inter-ventricular septal wall thickness and (D) posterior wall thickness. Results are expressed as the mean \pm SEM. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ between groups.

Figure 3.3: AR caused a general degradation of diastolic parameters that was improved by valsartan treatment in females but not in males. (A) E wave, (B) A wave, (C) E wave slope. Results are expressed as the percentage of variation of the indicated parameter compared to the mean of the same parameter of the respective untreated sham-operated group. Results are expressed as the mean \pm SEM. *: $p < 0.05$ between groups.

Figure 3.4: Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for several hypertrophy markers in AR animals relative to sham controls. (A) Anp, (B) Bnp, (C) c-Fos, (D) Trpc6, (E) Klf15, (F) Myh6, (G) Myh7 and (H) Myh6/Myh7 ratio. The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean \pm SEM ($n = 5 - 6/\text{gr.}$). Messenger RNA levels of the respective sham group were normalized to 1 and is represented by the dotted line. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ vs. respective untreated sham group. +: $p < 0.05$, ++: $p < 0.01$ and +++: $p < 0.001$ between the indicated groups.

Figure 3.5: Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for several extracellular matrix markers in AR animals relative to sham controls. (A) Col1a1, (B) Col3a1, (C) Fn1, (D) Itgb1, (E) Mmp2, (F) Timp1, (G) Lox and (H) Ctgf. The results are reported in arbitrary units (AU) as the mean \pm SEM ($n = 5 - 6/\text{gr.}$). Messenger RNA levels of the respective sham group were normalized to 1 and is

represented by the dotted line. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ vs. respective untreated sham group. +: $p < 0.05$ between the indicated groups.

3.11 Figures

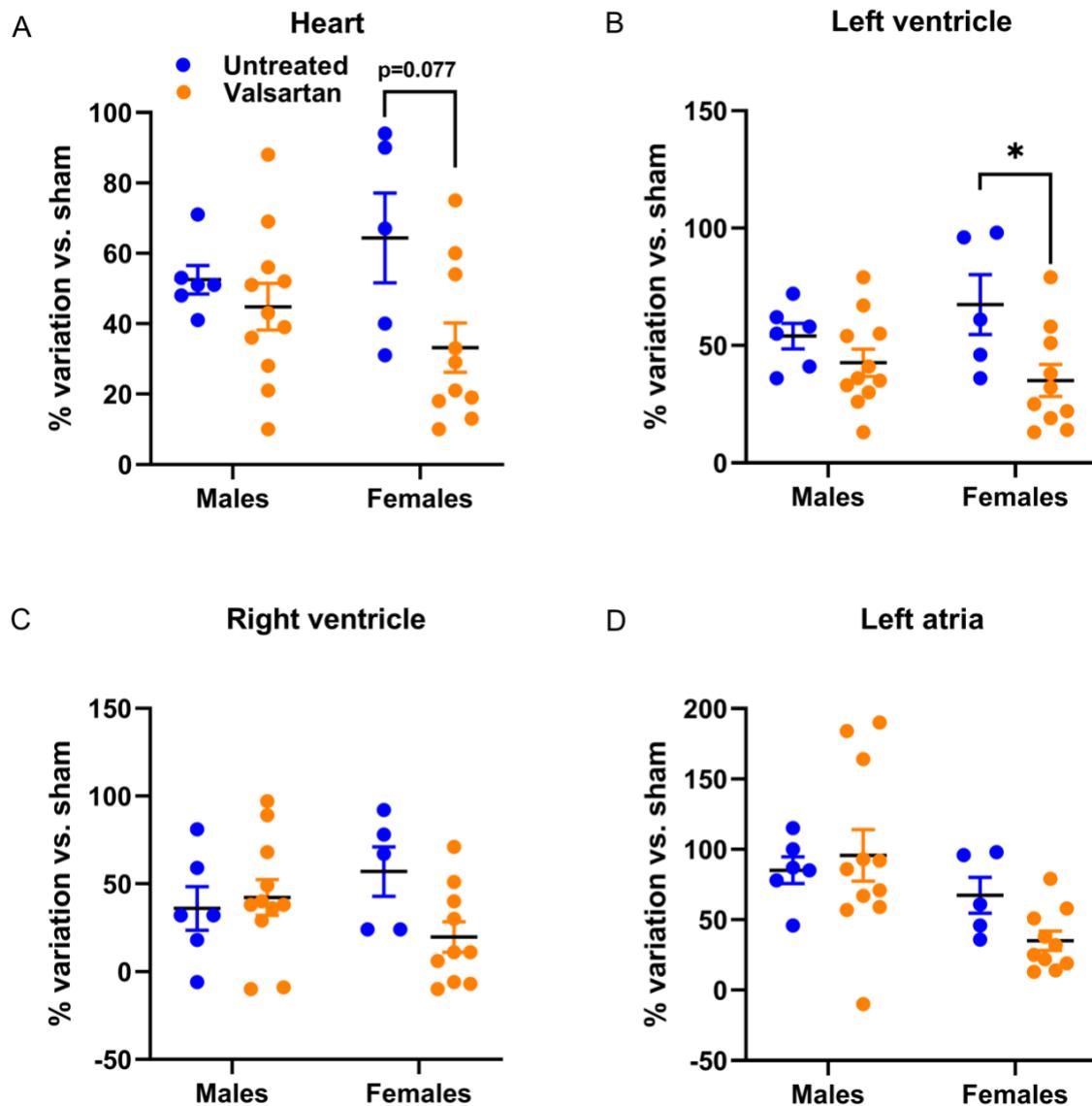


Figure 3.1 Effects of a 9-week treatment with valsartan on cardiac hypertrophy development caused by severe volume overload from AR.

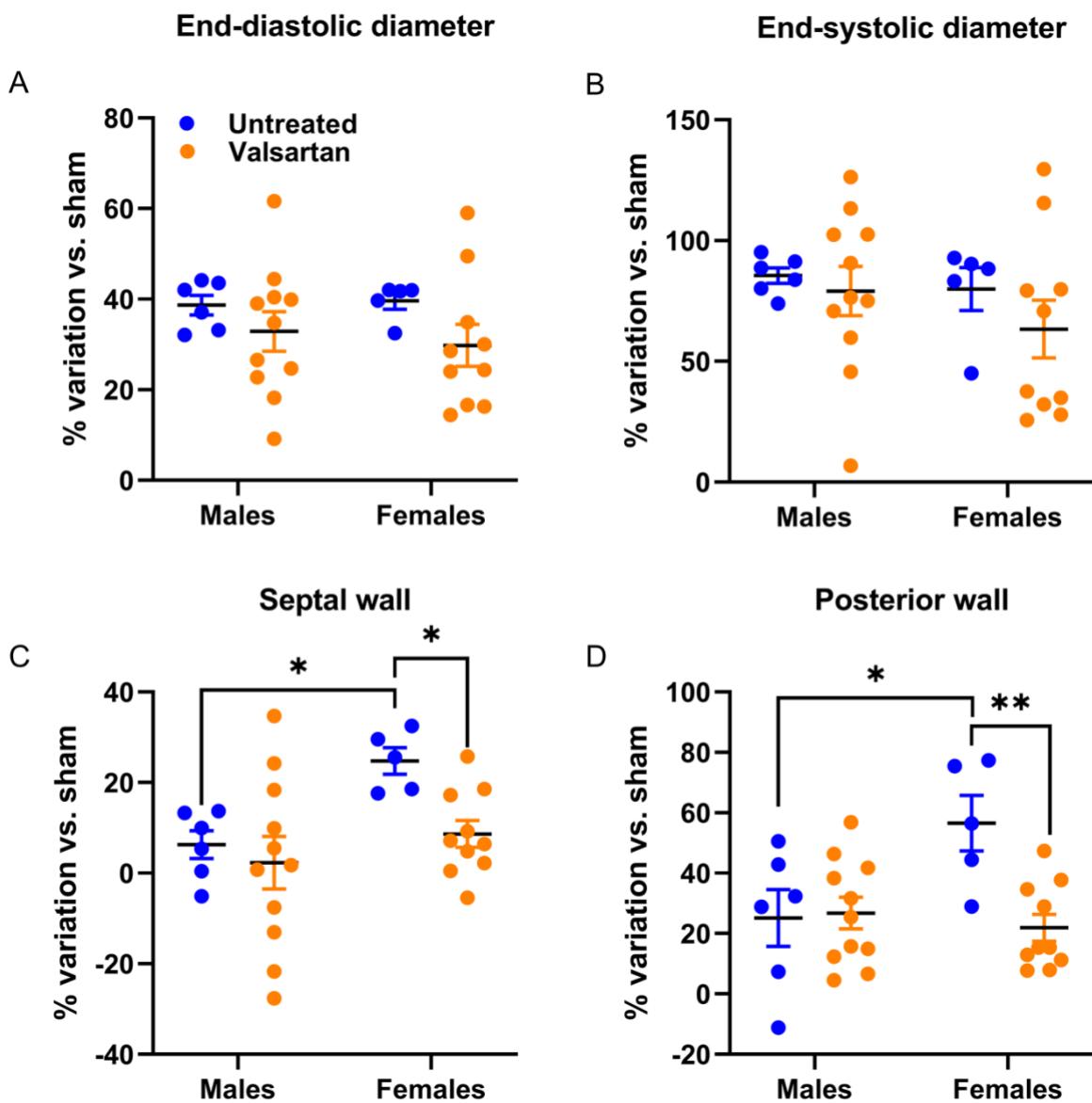


Figure 3.2 Effects of a 9-week treatment with valsartan on LV hypertrophy development caused by AR on echocardiographic parameters.

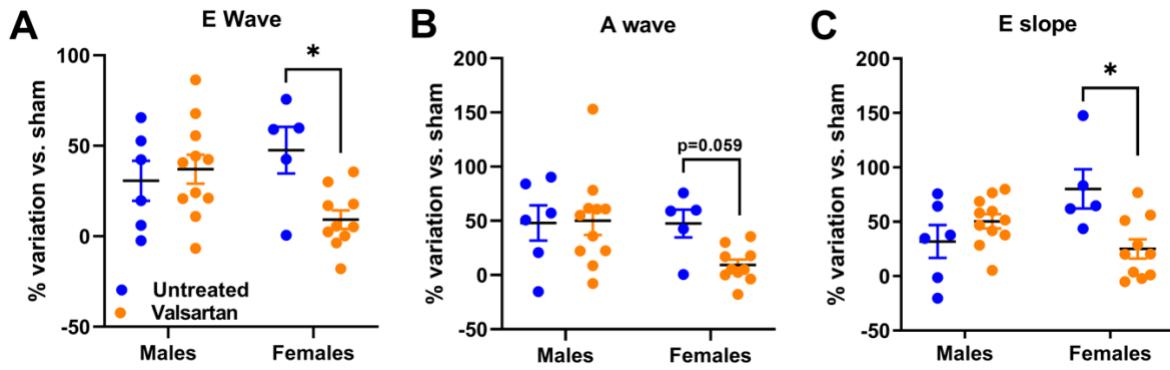


Figure 3.3 AR caused a general degradation of diastolic parameters that was improved by valsartan treatment in females but not in males.

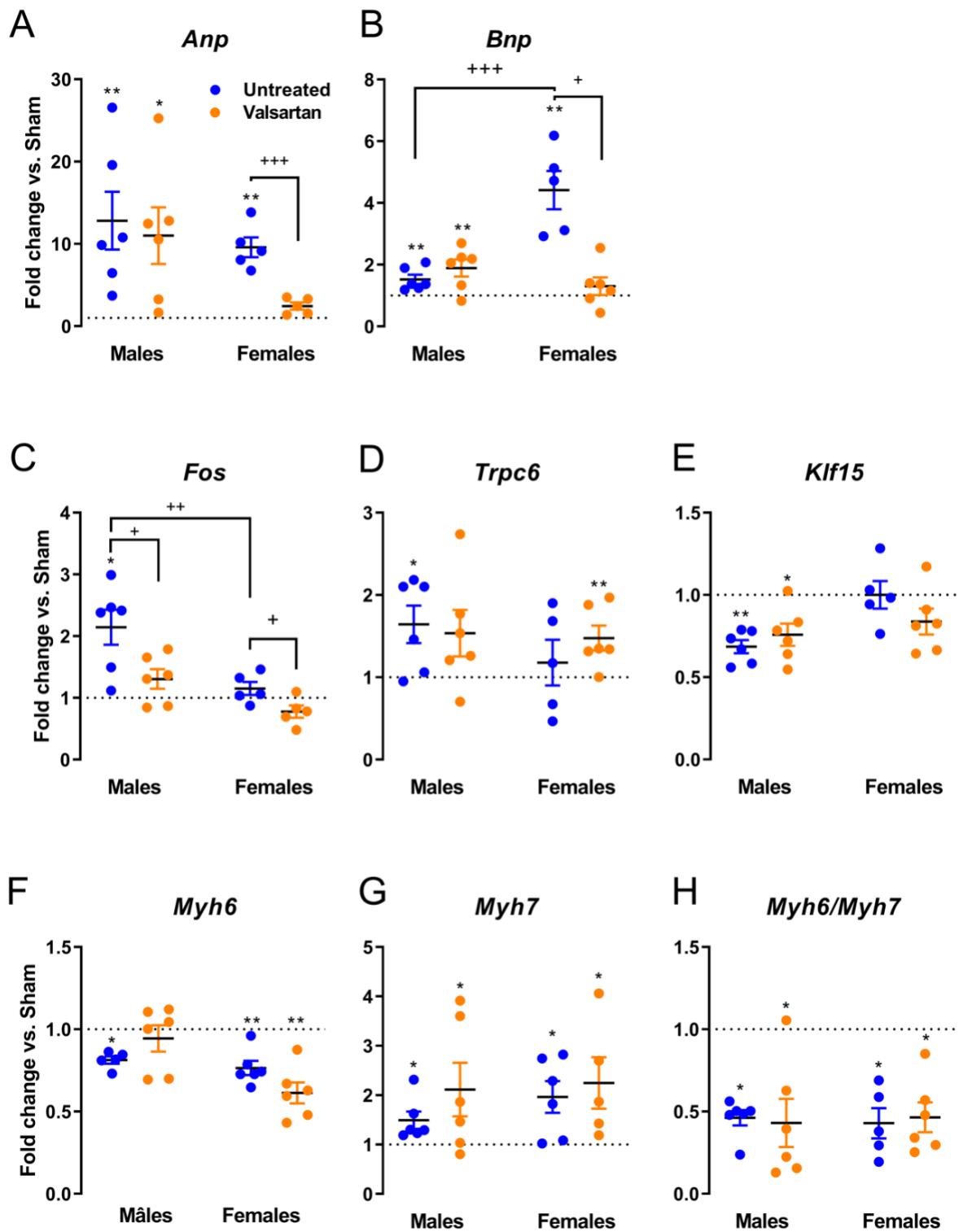


Figure 3.4 Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for several hypertrophy markers in AR animals relative to sham controls.

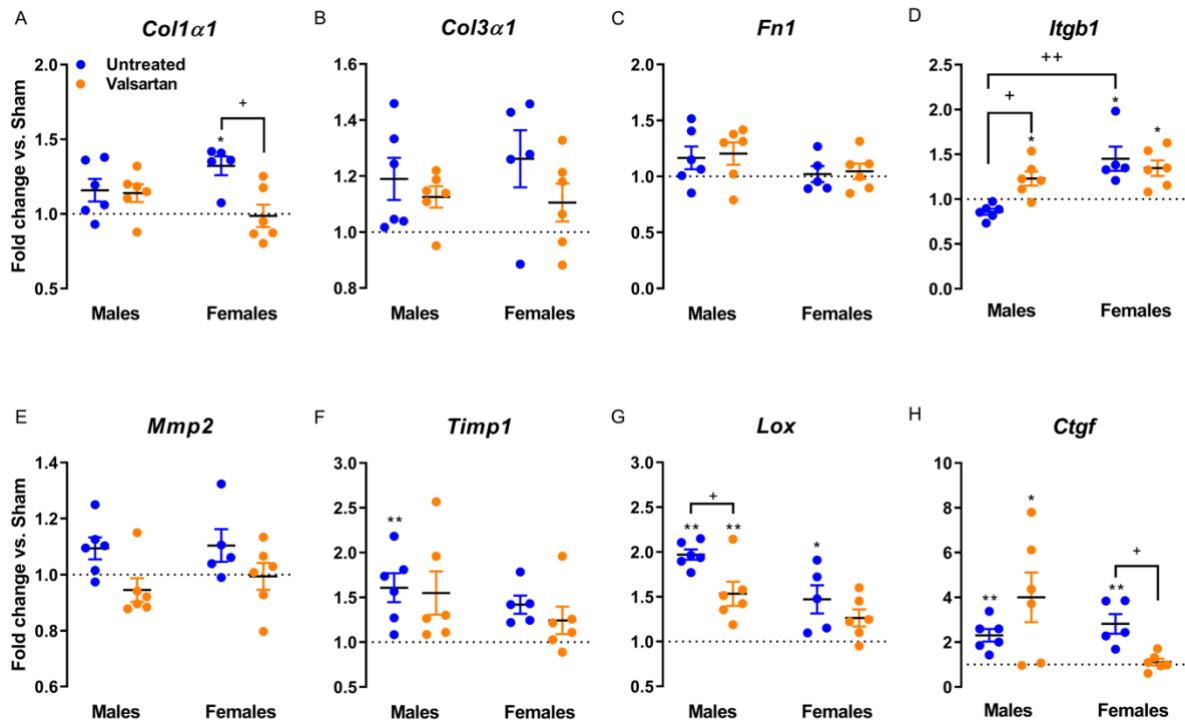


Figure 3.5 Evaluation by real-time quantitative RT-PCR of the LV mRNA levels of genes encoding for several extracellular matrix markers in AR animals relative to sham controls.

Chapitre 4. Sex differences in the evolution of left ventricle remodeling in rats with severe volume overload.

4.1 Page titre

Sex differences in the evolution of left ventricle remodeling in rats with severe volume overload

Élisabeth Walsh-Wilkinson, Marie-Claude Drolet, Marie Arsenault and Jacques Couet

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

Corresponding author: Jacques Couet PhD

Groupe de Recherche en Valvulopathies, Centre de Recherche,
Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec
2725, Chemin Sainte-Foy, Québec, (Québec), Canada, G1V 4G5
Phone: 1-418-656-4760; Fax: 1-418-656-4509

Email: jacques.couet@med.ulaval.ca

4.2 Résumé

Contexte : La régurgitation de la valve aortique (RA) entraîne une surcharge volumique (VO) du ventricule gauche (VG), entraînant sa dilatation et son hypertrophie (H). Nous étudions un modèle de RA sévère en perforant un ou deux feuillets à l'aide d'un cathéter. La plupart de nos études sont menées chez des animaux mâles. Récemment, nous avons commencé à étudier le dimorphisme sexuel dans le modèle de rat RA. Nous avons observé que les femelles développaient autant d'hypertrophie du VG que les mâles, mais des différences morphologiques au niveau du remodelage hypertrophique étaient présentes. Une comparaison directe des modifications morphologiques et fonctionnelles du VG a été effectuée chez les mâles (M) et les femelles (F) en utilisant les dernières techniques d'imagerie cardiaque par échocardiographie.

Méthodes: Nous avons effectué une étude longitudinale pour évaluer le développement de l'hypertrophie du VG causée par la RA chronique chez les rats mâles et femelles pour une durée de 6 mois. Des animaux avec une opération fantôme sham ont été utilisés comme contrôles.

Résultats: Les volumes diastoliques du VG (EDV) ont augmenté de façon plus importante chez les mâles que chez les femelles en 6 mois de RA (38% vs. 23% pour le EDV, les deux p <0,01). La RA a entraîné une dilatation du VG significative pour les deux sexes (augmentation de 54% vs. 51% du EDD) par rapport aux valeurs initiales. Comme la croissance cardiaque normale était inférieure chez les femelles, la dilatation en réponse à la RA était relativement plus importante pour celles-ci (augmentation de 88% (M) vs. 157% (F)). La RA a induit un épaissement des parois du VG chez les mâles et les femelles. Cela s'est produit plus tôt chez les femelles RA et l'épaissement était plus important que chez les mâles (augmentation de l'épaisseur du septum de 25% (M) vs. 56% (F) à 2 mois et 10% (M) vs. 30% (F) à 6 mois). Nous avons ensuite évalué si la RA était associée à des modifications de la capacité de déformation du VG (*strain*) par échocardiographie 2D par *speckle tracking*. La valeur de strain global en longitudinal est restée similaire entre les animaux RA et les animaux sham. La valeur de strain global en circonférentiel était modulée négativement par la RA, mais seulement chez les femelles et tôt après l'induction de la VO (13% (M) vs. à 26% (F)).

Conclusion: La RA a entraîné une plus grande dilatation du VG et un épaissement plus rapide des parois du VG chez les rates femelles que chez les mâles. La valeur de *strain*

global circonférentiel était modulée négativement chez les femelles RA, mais pas chez les mâles. La RA semble également mener à une forme de VG plus sphérique chez les femelles, alors que le VG garde une forme plus ellipsoïde chez les mâles. Ceci peut influencer la validité de l'estimation de la masse du VG dilaté chez les femelles par échocardiographie 2D.

4.3 Abstract

Background: Aortic valve regurgitation (AR) results in left ventricle (LV) volume overload (VO) leading to its dilation and hypertrophy (H). We study a rat model of severe AR induced by puncturing one or two leaflets using a catheter. Most of our studies were conducted in male animals. Recently, we started investigating if sex dimorphism existed in the AR rat model. We observed that AR females developed as much LVH as males, but morphological remodeling differences were present. A head-to-head comparison of LV morphological and functional changes had never been performed in AR males (M) and females (F) using the latest modalities in cardiac imaging by echocardiography.

Methods: We performed a longitudinal study to evaluate the development of LV hypertrophy caused by chronic AR in male and female rats over 6 months. Sham-operated (sham) animals were used as controls.

Results: LV diastolic volumes (EDV) increased more over 6 months in sham males than in females (38% vs. 23% for EDV, both $p<0.01$). AR resulted in significant LV dilation for both sexes (54% vs. 51% increase in EDD) vs. baseline values. Since normal cardiac growth was less in females, dilation from AR was relatively more important for them (88% (M) vs. 157% (F) increase in EDV over sham). AR caused LV wall thickening in both males and females. It happened sooner for AR females and was more important than in males (25% (M) vs. 56% (F) increase in septum thickness at 2 months and 10% (M) vs. 30% (F) at 6 months). We then evaluated if AR was associated with changes in LV strain using speckle-tracking 2D echocardiography. Global longitudinal strain remained similar between AR and sham animals. Circumferential strain was negatively modulated by AR but only in females and early after VO induction (13% (M) vs. 26% (F)).

Conclusion: AR resulted in more LV dilation and quicker wall thickening in female AR rats compared to males. Global circumferential strain was negatively modulated in AR females but not in males. AR also seemed to lead to a more spherical LV shape in females whereas, it kept mostly an ellipsoid shape in males. This can influence validity of mass estimation of the dilated LV in females by echocardiography.

4.4 Introduction

Study of volume overload (VO) has sometimes lagged behind the research dedicated to pressure overload (PO). Often secondary to other causes, heart valve regurgitations leading to VO have not received the same interest in part because the main historical cause, rheumatic fever, has been mostly eradicated in modern industrialized countries. Rheumatic valve diseases are still occurring at an alarming rate in low/middle-income countries. In the Western world, they are still prevalent in poor and remote indigenous communities and in immigrants from countries where rheumatic fever is still endemic. The estimated burden worldwide of rheumatic valve diseases is estimated to more than 15 million existing cases with 280k new cases each year and 230k deaths [1]. Secondary mitral regurgitation is a relatively common consequence of non-revascularized cardiac ischemia whereas secondary moderate to severe aortic regurgitation (AR) occurs in a small proportion of patients (5-10%) undergoing transcatheter aortic valve replacement (TAVR) [2]. Since TAVR is now a procedure routinely performed, management of secondary AR is a developing concern.

Cardiac hypertrophy (CH) is an adaptive response to overload [3] and is an independent cause of morbidity and mortality from heart diseases. Although as prevalent in men and women over lifetime, heart failure (HF) is now well recognized to display many differences based on biological sex. HF is often more ischemic in men, happens sooner in life and leads to loss of left ventricle (LV) ejection fraction (EF). In women, HF is more often a consequence of a lingering hypertensive disease, it happens later in life and EF is often preserved. Sex dimorphisms are also well-described in rodent models of HF. In pre-clinical models of pathological CH and/or HF such as in mice with transverse aortic constriction (TAC; a LV PO model), males develop concentric LV hypertrophy (LVH) sooner than females. Myocardial remodeling in males evolves more rapidly towards eccentric LVH and heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) than in females [4]. A sex dimorphism is thus present in the hypertrophic response to an overload in both patients and in pre-clinical models. [5]. If sexually dimorphic response to PO (hypertension) and effects of treatment have been relatively well-documented, this is not the case for VO.

We have studied for a number of years LV remodeling in response to significant VO from experimental AR in male Wistar rats. We observed that it results in important eccentric hypertrophy (dilation) to accommodate the excess regurgitating aortic blood to pump [6] [7].

We recently observed in this rat model of chronic VO (6 months) that female animals developed as much if not more LVH than males [8]. However, male LVs displayed more eccentric hypertrophy and worse contractile function than those of females. Interestingly, LV wall thickening was more prominent in AR females than in males [8]. In another rat VO model (aorto-caval fistula), a faster progression toward HFrEF was observed in males and resulted in poorer survival compared to females [9].

At the cellular and molecular levels, male AR rat LVs show important downregulation of many fatty acid oxidation genes and up-regulation of those related to glucose metabolism [10, 11]. This characteristic energy metabolism switch [12] does not happen in AR female rats [8]. Activation of the tissue renin-angiotensin- aldosterone system (RAAS) system is a characteristic feature of the myocardial response to a pathological and chronic stress such as significant valve regurgitation (VO) or a LV pressure overload such as in hypertension or aortic valve stenosis. We previously showed that blocking the RAAS in male AR rats could reduce development of LVH, improve myocardial function and survival [13] [14] [15]. More recently, we observed that early LV remodeling events triggered by AR such as dilation were not influenced by RAAS inhibition. On the other hand, LV wall thickening taking place in female animals was abrogated by RAAS inhibition suggesting that this sexually dimorphic feature is under the control of angiotensin II [16].

In this study, we wanted to document LVH development in the AR rat model and identify morphological and functional sex differences. New capacities in cardiac imaging by echocardiography (echo) allow better characterization of morphological changes taking place during LVH development. The use of four-dimensional (4D) analysis can provide important information about LV geometry and volumes whereas strain analyses using speckle-tracking two-dimensional (2D) echo can help detect early dysfunction. We thus longitudinally studied by echo male and female AR rats over a 6-month period. Healthy sham-operated rats of both sexes were used as controls.

Our results indicate that LV VO from AR may be more adverse for females than previously suggested by our past studies. LV dilation is more important and systolic function quickly diminished after AR induction compared to males. LV geometry is also different between AR males and females.

4.5 Methods

4.5.1 Animals

Rats were purchased from Charles River (St-Laurent, Canada). Severe AR was induced in males (300-325g, n=14/group) and females (200-225g, n=14/group) Wistar rats (9-10 weeks of age) by retrograde puncture of one or two aortic valve leaflets under echocardiographic guidance as previously described [6, 7]. Only animals with more than 50% of regurgitation were included in the study. Several animals (2 for each sex) were excluded from the follow-up on this basis. Sham-operated rats had their right carotid ligated (n=8/group). Rats were randomly assigned to the sham or AR group. The regurgitant fraction was estimated by the ratio of the forward systolic flow time–velocity integral (VTI) to the reversed diastolic flow VTI measured by pulsed Doppler in the thoracic descending aorta. Animals were housed in pairs in standard plastic caged (same experimental group). Fibercore was used for bedding, a red plastic tunnel and chewing toy were provided for environmental enrichment. The protocol was approved by the Université Laval's Animal Protection Committee and followed the recommendations of the Canadian Council on Laboratory Animal Care.

4.5.2 Echocardiography

Echo studies: Echo studies were performed the day before AR surgery, then 2 weeks, 2 months, 4 months post-operation and at the end of protocol (6 months). Echo images were acquired using Vevo LAB software on a Vevo 3100 imaging system (VisualSonics, Fujifilm, Toronto, Canada) by the same trained investigator. The investigator was blinded for animal identification, but it was not possible to do so for the different groups (sex and AR). Rats were anesthetized and positioned on a platform ventral side up. The concentration of isoflurane was maintained around 2-2.5%, so the heart rate was between 350-370 beats/minute.

2D echo: M-mode images were recorded to measure diastolic and systolic LV wall thickness from the parasternal long-axis (PSLAX) view and the short-axis (SAX) view at the papillary muscle level. From these measurements, LV Mass was obtained using the following equation: $1.053x[(EDD + PW + IVSW)3 - EDD3]$ where: EDD is the internal dimension of the LV at the end of diastole, PW is the thickness of the posterior wall at the end of diastole and IVSW is the thickness of the inter-ventricular septum at the end of diastole. A corrected LV mass estimation was obtained by multiplying by 0.8 the LV mass estimated by the

equation above. Ejection fraction from M-mode images was also calculated using the following equation: $(EDD_2 - ESD_2)/EDD_2$ where: ESD is the internal dimension of the LV at the end of systole. Pulsed wave Doppler was used to measure the mitral flow from an apical four-chamber view. Peak early diastolic filling velocity (E wave), peak filling velocity at atrial contraction (A wave), E wave deceleration slope (slope) and the E/A ratio were calculated.

4D echo: 4D-Mode images were acquired from the PSLAX and short-axis (SAX; at the papillary muscle level) views to measure LV diastolic and systolic volumes. 4D-Mode is a 3-dimensional EKV mode (ECG-based Kilohertz Visualization) image acquisition at every 3D motor position during a complete heart cycle. Thus, we obtained a 2D loop at every motor position, creating a 4D clip of the heart cycle. The Multi-slice method was used to measure LV volumes. LV contour was drawn for 3 slices minimum (middle and both LV end) in the PSLAX and SAX views. Vevo LAB software automatically determined contour on every slice between the drawn contours. These contours were manually adjusted, if needed. These steps were completed for the first, the middle and the quarter time point. The volume is displayed in mm³ for every slice and every time point. Diastolic volume, systolic volume, stroke volume (SV; Diastolic volume-Systolic volume) and ejection fraction (EF; $100 \times ((\text{Stroke volume}) / (\text{Diastolic volume}))$) were obtained from these LV volume measurements.

Speckle-tracking echo (STE): 2D echo B-mode loops were acquired from the PSLAX and SAX views and analysed using Vevo Strain software (VisualSonics). Images were acquired at the highest frame rate possible and strain analysis was performed in the longitudinal, radial and circumferential axes. PSLAX view was used for longitudinal and radial strains, whereas SAX view was used for circumferential strain analysis. Three cardiac cycles of the highest quality cine loop were selected to avoid animal respiration, echo gel artefact, and significant obstruction from the ribs. Endocardial and epicardial borders were traced at mid-diastole. For the PSLAX view, tracing was started from the anterior wall close from the aorta root to the posterior wall close from the mitral valve. For the SAX view, borders were traced in the counterclockwise direction, starting from the top anterior wall. Vevo Strain software then build the dynamic LV tracing for all selected frames. Cine loops were replayed to confirm good border tracking over cardiac cycles and manual adjustments were made if needed. LV myocardium was divided into 6 equal anatomical segments and peak systolic strain were calculated for every segment. Peak systolic strain= $(L_s - L_d) / (L_d)$ where: L_s= Length at end systole and L_d= Length at end diastole. Global peak systolic strain in the 3 directions were calculated by averaging the peak systolic values of the 6 segments.

At the end of the protocol, euthanasia was performed under isoflurane anesthesia. Saturated potassium chloride (2-3ml) was injected directly in the heart. The thorax was then opened, and the heart and lungs were harvested and weighed.

4.5.3 Statistical analysis

Results are presented as the mean and the standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed on the log of the data. (Graph Pad Prism 8.02, San Diego, CA). A Student's t-test was used when two groups were compared. ANOVA and Holm-Sidak post-test was used when more than two groups were compared. A p-value lower than 0.05 was considered significant.

4.6 Results

4.6.1 Animal characteristics

Eleven of twelve AR rats in both the male and female groups were alive at the end of the protocol. All sham-operated rats survived the duration of the protocol. In Table 1 are summarized the characteristics of the animals at the end of the protocol. As expected, AR caused important increases in total heart weight as well as for the left ventricle, right ventricle and left atrium weight. The increase in heart weight was similar for both male and female AR rats compared to sham (around 70%). LV weight was also similarly increased by AR in males and females (72% increase in males vs. 76% for females). The same was true for the right ventricle (32% vs. 35%) and left atrium (174% vs. 164%).

4.6.2 Echocardiography data

As for the animal and heart characteristics described above, most echo parameters were significantly changed by AR (Table 2). End-diastolic and end-systolic LV diameters measured by M-mode, were both increased in AR males and females. On the other hand, LV walls (septal; SW and posterior; PW) were significantly thicker compared to respective sham groups in females but not in males. Diastolic function parameters such as the E and A waves and E wave slope were unchanged in AR rats compared to sham after 6 months but also compared to baseline values measured six months earlier (Table 3).

We used two views to estimate 2D echo parameters namely PSLAX and SAX views. As illustrated in Figure 1, both views provide similar LV measurements. In sham animals, over the 6 months of the study, normal cardiac growth was more important in males. LV EDD remained stable in females whereas in males, the increase was steady. As expected, AR caused important increases in LV diameters. This was more important for females than for males and more evident for the ESD (Figure 1 A-F). Inter-ventricular septal wall thickness (IVSW) increased in both sham and AR animals resulting in a raise of the relative wall thickness (RWT) during the protocol. In AR animals, increase in IVSW was more important in females than in males (Figure 1 G-I). As expected for VO, RWT decreased, suggesting eccentric LV remodeling compared to sham animals in both male and female AR rats. Interestingly, LV wall thickening taking place early in AR females first resulted in concentric LV remodeling, then reversed with increasing LV dilation to a reduced RWT (Figure 1 J-L).

Four dimensional (4D)-mode images were acquired from the PSLAX and SAX views to measure LV diastolic and systolic volumes. In Figure 2, only results obtained using SAX views are illustrated in order to avoid overloading graphs. End-diastolic volumes (EDV) in sham animals increased by 60% in males but only by 22% in females suggesting that normal cardiac growth was more limited in females during the course of the protocol. AR caused strong increases in EDV as expected. This resulted in AR females EDV being more than 2.5 times larger than sham ones from 4 months after surgery, whereas AR males EDV were about 1.9 times larger than sham (Figure 2 A-C). End-systolic volumes (ESV) followed a similar trend being larger in AR females than in males compared to respective sham group after 6 months (296% vs. 135%) (Figure 2 D-E). LV ejection fraction (EF) decreased over 6 months for both sham and AR animals. This decrease was more pronounced for AR animals and appeared as soon as 2 weeks after surgery in females. The loss of EF in AR animals compared to sham was relatively more important for females although final values were similar for both AR groups (Figure 2 G-I). Stroke volume (SV) remained stable over 6 months in sham females while it raised in males. In AR rats, SV increased throughout the protocol to reach 1.5 time values recorded in sham males and 1.8 time for females (Figure 2 J-L).

The estimation of ejection fraction using M-mode 2D views (Table 2) and 4D-mode images (Figure 2 G-I) lead to marked differences in estimated values. In Figure 3, we plotted the mean +/- standard error of EF values for both methods at each time point of the protocol for sham (A and B) and AR (C and D) rats. Using M-mode views for the estimation of EF led to higher values for every group at every time points. Interestingly, EF values calculated from

M-mode views were less able to discriminate changes occurring with aging in sham animals. We were then interested to correlate LV mass estimation using echo compared with dissected LV weight. In males, both echo methods correlated well with values from the weighted tissue. For females, larger LV mass as found in AR animals were overestimated by echo equations (Figure 3 E-F). LV mass echo equations infer that this heart chamber has an ellipsoid shape. As illustrated in Figure 4A, general shape of the end-diastolic LV inner border tracing in sham animals and AR males is indeed one of an ellipse. It does not seem to be the case for AR female LVs, which become more spheroid. In order to substantiate this observation, we measured the end-diastolic LV diameter on PSLAX view at three different locations. The standard LV EDD measurement at the level of the papillary muscle was designated EDD1. We then measured LV length from EDD1 to the apex. Two other EDD measurements (EDD2 and EDD3) were then performed respectively at one and two third of this length as indicated in Figure 4B. Ratios of EDD2 and EDD3 on EDD1 diameter were then calculated. As illustrated in Figure 4C, the EDD2/EDD1 ratio remained similar between the groups in both AR males and females compared to sham controls although important LV dilation had taken place in AR rats. The EDD3/EDD1 ratio, on the other hand was significantly more elevated in AR females compared to sham. This ratio remained similar in sham animals and AR males.

In Figure 5 are illustrated the evolution of global longitudinal (GLS) and global circumferential (GCS) strains in male and female sham and AR rats. Strain is defined as the fractional change in a dimension in comparison to the original dimension. For both parameters, GLS and GCS, more negative values are associated with better fractional change of the myocardium during the cardiac cycle. In sham animals, both GLS and GCS remained stable for the first two months before deteriorating slightly (Figure 5A-D). This deterioration took longer in sham females for GCS, becoming evident at 4 months (Figure 5D). In AR animals, strain values also became worse with time as expected. Interestingly, GCS strain values were only significantly different between sham and AR animals in females.

4.7 Discussion

The availability of improved pre-clinical imaging systems designed for small rodents now allow thorough analysis of the geometric and functional changes taking place during the development of cardiac remodeling and can help identify differences associated with the biological sex. In this study, we observed several differences in the evolution of LV

remodeling in male and female rats where a severe and similar aortic valve regurgitation had been induced. AR females displayed relative to sham control more dilation and wall thickening, quicker decrease in ejection fraction as well as deterioration of global circumferential strain compared to AR males. Diastolic function remained similar between sham and AR animals notwithstanding the biological sex.

In both males and females, LV end-diastolic volume gained 50% over their baseline values after only two weeks of severe VO. This raise in LV volume stabilized after two months in males (85% over sham), and after four months in females (150% over sham). In sham females, LV EDV and stroke volume (SV) remained mostly stable (+23% and +2%, respectively) over time. In males, EDV and SV increased over time in sham males (+60% and +28%, respectively). This suggests that normal cardiac growth taking place in females did not resulted in the LV pumping more blood in sham females although end-diastolic diameter was larger (Tables 2 and 3). Ejection fraction went down by about 10% in sham rats of both sexes. It is interesting to put these SV values in parallel with the changes of body weight taking place during the protocol. Male and female body weights more than doubled over 6 months whereas cardiac output increased by 37% in males and remained stable in females (-2.4%). This suggests that the animals, which were sedentary, adapted their cardiac physiology accordingly and the gain of mass (mostly fat) did not result in an increase in circulatory needs. Our results also underscore the need of proper negative sham controls with similar age and obviously of the same biological sex to correctly put in perspective changes caused by a cardiac overload.

Observations made in this study seem to lead to the conclusion that LV hyper-trophy from AR is less well tolerated by females. LV dilation was more important in females compared to males in spite of similar severity of AR levels. Loss of EF came earlier for females although at the end of the protocol, EF values were similar for all AR animals. This seems to go against observations we had reported in the past comparing AR males and females [8]. We had also observed previously that LV dilation and wall thickening were more important in AR females compared to males. EF was less reduced in AR females than in males. In addition, we had shown that myocardial capillary density was significantly reduced in AR males but not in females. We speculated this helped the LV in AR females maintaining a better access to both oxygen and nutriments for cardiomyocytes. Moreover, we demonstrated that most genes related to oxidation of fatty acids (the preferred energy substrate of the myocardium were more downregulated in AR males than in females probably forcing the AR

male myocardium to rely more on glucose as an energy substrate [8]. Hypertrophy markers were expressed similarly between the sexes, though. Two-dimensional echo parameters were very similar between this study and the ones presented here. It is possible that the geometry of LV remodeling is being at play in the sex differences observed here. In females, early response to AR is characterized by both LV dilation, significant wall thickening and loss of global circumferential strain. It is important to note that GCS was more important in females than males at baseline. A similar observation had been reported in young women having a more important GCS compared to men [17]. It has been reported that women have greater LV twist mechanics than males during acute reductions to preload [18, 19]. Here, in a situation of acute increase of preload after AR induction, it is possible that the female LV twist mechanics maybe more strongly affected for females. Early LV dilation in AR females lead to GCS values similar to males. LV dilation in females probably leads to a more spheroid shape. In fact, it appeared the apex region of the LV in AR females underwent a marked geometric change whereas in males, the general shape of the LV was more conserved elliptic. We were not able to confirm this using 3D reconstructions of LVs mostly because of interference caused by the animal ribs.

LV ejection fraction values obtained by more conventional methods using 2D echo seemed to be overestimated compared to those coming from 4D echo as illustrated in Figure 3. We had reported in the past using micro-positron emission tomography (PET) scan, EDV and ESV from LV 3D reconstructions from male sham and AR rats [15]. Using micro-PET scan, we obtained LV volumes that were similar to those reported here (around 10% of difference) in sham males. For AR males, LV volumes obtained by micro-PET scan were higher (25-30%) than those we obtained here. Rats had similar age as those here. Normal ejection fraction was estimated as a little over 50% and in AR rats around 40%, which is similar to values obtained here using 4D echo [15]. 2D echo data in these two studies differed by less than 5%. We observed 2D echo underestimated the loss of EF probably taking place in sham animals (Figure 3A-C). This was not the case for AR animals. EF was probably overestimated by 2D echo but followed a similar trend as the one obtained from 4D echo. Again, changes in LV geometry taking place during normal cardiac growth of sedentary rats may be difficult to observe by limiting measurements to 2D M-mode echo.

Role of gonadal hormones in the control of LV remodeling and development of heart failure are well recognized. In the AR rat model, we recently studied their roles in the hypertrophic response to severe VO. In males, we showed that loss of testosterone reduced normal

cardiac growth of both sham and AR rats and LVH in AR ones [20]. For females, loss of estrogens also resulted in lesser cardiac growth in sham and AR animals. On the other hand, it did not significantly modulated the hypertrophic response to AR[21]. In AR males, castration helped normalize the expression of many genes implicated in myocardial energetics, myocardial fibrosis as well as some LVH markers [20]. On the other hand, in females, hypertrophy markers such as atrial natriuretic peptide (Anp) and myosin heavy chains (MHC) alpha and beta genes (Myh6 and Myh7) were modulated strongly following loss of estrogens in sham rats. Response of these genes to AR was as expected but the extent of the modulation in gene expression was modified by the absence of estrogens. Raise in Anp mRNA levels was more important in Ovx AR females. MHC genes, on the other hand, were less modulated in Ovx AR females compared to non-Ovx ones. Genes related to myocardial energetics are relatively less modulated in AR females compared to males. Loss of estrogens had little to no effects on the expression of these genes [21, 8]. Put together, these results suggest that AR in females is associated with important LV dilation with relatively maintained energetics and that estrogens have little control over these adaptations whereas androgens seems to be more involved in the LV remodeling taking place in AR males.

The roles of estrogens in the development of LVH has been studied mostly in pressure overload animal models. Less attention was given in VO situations such as in valve regurgitation models or in the aortocaval fistula (ACF) model. ACF is a model of global cardiac VO. Less relevant from a clinical standpoint, it remains the most studied pre-clinical VO model. ACF females develop less hypertrophy than males and evolve more slowly towards heart failure than males. Their survival is also better. [22] This advantage seems to rely on estrogens as ovariectomy (Ovx) reverses the disease development as the one observed in males [23]. Estradiol administration can help normalize the effects of Ovx [24]. Evidently, results reported here and in recent studies on the AR rat model seem to contradict those made in the ACF rat model. A few differences have to be highlighted between the ACF and the AR models. In the ACF model studies, evolution towards heart failure was documented (at least in males) whereas in the AR model, overt heart failure symptoms are a rare occurrence [24, 9]. In fact, most of the deaths in the AR model, are sudden, happening during the night, the active period of the animals [15][25][26] and are probably associated to fatal arrhythmias. In addition, since ACF is a global form of VO targeting the right heart first,

it is likely that than lungs are more seriously affected compared to the AR model, leading to heart failure.

Pathological cardiac hypertrophy is associated with an important remodeling of the myocardial structure, a consequence of cardiomyocyte size increase and extra-cellular matrix rearrangement. Neurohormonal factors such as catecholamines and vasoactive factors such as endothelin-1 and angiotensin II (AngII) are implicated in LVH development, the myocardial fibrotic process ensuing as well as loss in systolic function [27, 28]. We have shown in the past in male AR rats that beta-adrenergic receptor blockade and/or AngII inhibition of formation or of action could improve most parameters namely hypertrophy, fibrosis, function and survival in long-term studies (6 months or more) [29, 15, 30, 26, 13, 31]. In these studies, treatment was initiated two weeks after AR induction. In a recently published study, we studied the effects of AngII receptor blockade using valsartan in both male and female AR rats [16]. Instead of starting treatment after AR induction like in a clinical situation, we debited valsartan one week before AR induction in order to delineate if AngII was implicated in the early events leading to LVH. Valsartan treatment had relatively little effects on LV gain of mass, dilation or wall thickening in male AR rats. On the other hand, it blocked LV wall thickening efficiently in females suggesting that this early event we observed in the present study as soon as two weeks after AR induction is probably under the control of the RAAS system.

We want to point out several limitations in this study. Heart adaptations to VO in women (with the exception of pregnancy) have received very little attention in the literature. Observations made in animals cannot necessarily be transposed to humans, and caution must be used. This study did not take into account ageing (using young rats) and menopause (Ovx), factors that are highly relevant to heart disease in women. The effect of gonadectomy and/or hormone replacement therapy was not assessed in this study. Simpson method was not used for the evaluation of EF as routinely performed in humans. We limited ourselves to the simple 2D M-mode method which is the most frequently used in rodents and the one using volumes estimated from 4D echo. Longitudinal strain could not be integrated from three-angle views: apical four chamber, two chamber and long-axis views, because rat anatomy limits good quality image acquisition in apical views.

4.8 Conclusion

In conclusion, we showed that sex differences exist between male and female rats in which a severe LV VO was induced. Both the extent of the hypertrophic response to AR and its development showed interesting sexual dimorphisms.

4.9 Abbreviations

2D Two-dimensional/ 3D Three-dimensional/ 4D Four-dimensional/ ACF Aorto- caval fistula/ ANGII Angiotensin II/ ANOVA Analysis of variance/ ANP Atrial natriuretic peptide/ AR Aortic regurgitation/ CH Cardiac hypertrophy/ d Dias- tole/ ECG Electrocardiogram/ EDD End-diastolic diameter/ EDV End-diastolic volume/ EF Ejection fraction/ EKV ECG-gated Kilohertz Visualization/ ESD End- systolic diameter/ ESV End-systolic volume/ GCS Global circumferencial strain/ GLS Global longitudinal strain/ HF Heart failure/ HFrEF Heart failure with reduced ejection fraction/ IVSW Interventricular septal wall/ L Length/ LV Left ventricle/ LVH Left ventricle hypertrophy/ MHC Myosin heavy chain/ MYH6 Myosin heavy chain 6/ MYH7 Myosin heavy chain 7/ OVX Ovariectomized/ PET Positron emission tomography/ PO Pressure overload/ PSLAX Parasternal long axis/ PW Posterior wall/ RAAS Renin-angiotensin II-aldosterone system/ RWT Relative wall thickness/ s Systole/ SAX Short axis/ SEM Standard error of the mean/ SV Stroke volume/ TAC Transverse aortic constriction/ TAVR Transcatheter aortic valve re- placement/ VO Volume overload/ VTI Flow time-velocity integral/

4.10 Declarations

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

Consent for publication. All authors have consented for the publication of this manuscript.

Raw data. Raw data are included in a supplemental file.

Author's contributions. EWW and MCD performed the experiments, compiled the data and produced initial versions of tables and figures. EWW also participated in the writing of the manuscript. MA helped writing the manuscript and revised the final version. She also contributed to the design of the study. JC conceived and was responsible for the study. He

wrote the final version of the manuscript, approved the final versions of tables and figures and got the authorization of each author for the submission of the manuscript.

Funding. This work was supported by operating grants to JC and MA from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-106479), the Heart and Stroke Foundation of Canada and the IUCPQ Foundation.

Acknowledgments. The authors want to acknowledge the technical help of Elise Roussel for the realization of this study.

Author details. 1 Groupe de recherche en valvulopathies, Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Université Laval, 2725, Chemin Sainte-Foy, G1V 4G5 Quebec City, Canada. 2 Groupe de recherche en valvulopathies, Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Université Laval, 2725, Chemin Sainte-Foy, G1V 4G5 Quebec City, Canada.

4.11 References

1. Marijon, E., Mirabel, M., Celermajer, D.S., Jouven, X.: Rheumatic heart disease. *The Lancet* 379(9819), 953–964 (2012)
2. Leon, M.B., Smith, C.R., Mack, M.J., Makkar, R.R., Svensson, L.G., Kodali, S.K., Thourani, V.H., Tuzcu, E.M., Miller, D.C., Herrmann, H.C., et al.: Transcatheter or surgical aortic-valve replacement in intermediate-risk patients. *New England Journal of Medicine* 374(17), 1609–1620 (2016)
3. Swynghedauw, B.: Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiological reviews* 79(1), 215–262 (1999)
4. Regitz-Zagrosek, V., Oertelt-Prigione, S., Seeland, U., Hetzer, R.: Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. *Circulation Journal* 74(7), 1265–1273 (2010)
5. Blenck, C.L., Harvey, P.A., Reckelhoff, J.F., Leinwand, L.A.: The importance of biological sex and estrogen in rodent models of cardiovascular health and disease. *Circ Res* 118(8), 1294–312 (2016). doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.307509

6. Arsenault, M., Plante, E., Drolet, M., Couet, J.: Experimental aortic regurgitation in rats under echocardiographic guidance. *The Journal of heart valve disease* 11(1), 128–134 (2002)
7. Plante, E., Couet, J., Gaudreau, M., Dumas, M.-P., Drolet, M.-C., Arsenault, M.: Left ventricular response to sustained volume overload from chronic aortic valve regurgitation in rats. *Journal of cardiac failure* 9(2), 128–140 (2003)
8. Beaumont, C., Walsh-Wilkinson, E., Drolet, M.-C., Roussel, E., Arsenault, M., Couet, J.: Female rats with severe left ventricle volume overload exhibit more cardiac hypertrophy but fewer myocardial transcriptional changes than males. *Scientific reports* 7(1), 729 (2017)
9. Dent, M.R., Tappia, P.S., Dhalla, N.S.: Gender differences in apoptotic signaling in heart failure due to volume overload. *Apoptosis* 15(4), 499–510 (2010). doi:10.1007/s10495-009-0441-8
10. Lachance, D., Dhahri, W., Drolet, M.-C., Roussel, E., Gascon, S., Sarrhini, O., Rousseau, J.A., Lecomte, R., Arsenault, M., Couet, J.: Endurance training or beta-blockade can partially block the energy metabolism remodeling taking place in experimental chronic left ventricle volume overload. *BMC cardiovascular disorders* 14(1), 190 (2014)
11. Roussel, E., Drolet, M.-C., Walsh-Wilkinson, E., Dhahri, W., Lachance, D., Gascon, S., Sarrhini, O., Rousseau, J.A., Lecomte, R., Couet, J., et al.: Transcriptional changes associated with long-term left ventricle volume overload in rats: impact on enzymes related to myocardial energy metabolism. *BioMed research international* 2015 (2015)
12. Sambandam, N., Lopaschuk, G.D., Brownsey, R.W., Allard, M.F.: Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart failure reviews* 7(2), 161–173 (2002)
13. Plante, E., Lachance, D., Beaudoin, J., Champetier, S., Roussel, E., Arsenault, M., Couet, J.: Comparative study of vasodilators in an animal model of chronic volume overload caused by severe aortic regurgitation. *Circ Heart Fail* 2(1), 25–32 (2009). doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.801548
14. Plante, E., Gaudreau, M., Lachance, D., Drolet, M.C., Roussel, E., Gauthier, C., Lapointe, E., Arsenault, M., Couet, J.: Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril

prevents volume overload cardiomyopathy in experimental chronic aortic valve regurgitation. *Can J Physiol Pharmacol* 82(3), 191–9 (2004). doi:10.1139/y04-005

15. Arsenault, M., Zendaoui, A., Roussel, É., Drolet, M.-C., Dhahri, W., Grenier, A., Gascon, S., Sarrhini, O., Rousseau, J.A., Lecomte, R., et al.: Angiotensin ii-converting enzyme inhibition improves survival, ventricular remodeling, and myocardial energetics in experimental aortic regurgitationclinical perspective. *Circulation: Heart Failure* 6(5), 1021–1028 (2013)
16. Walsh-Wilkinson, É., Drolet, M.-C., Le Houillier, C., Roy, E`.-M., Arsenault, M., Couet, J.: Sex differences in the response to angiotensin ii receptor blockade in a rat model of eccentric cardiac hypertrophy. *PeerJ* 7(8), 7461 (2019)
17. Lawton, J.S., Cupps, B.P., Knutsen, A.K., Ma, N., Brady, B.D., Reynolds, L.M., Pasque, M.K.: Magnetic resonance imaging detects significant sex differences in human myocardial strain. *Biomedical engineering online* 10(1), 76 (2011)
18. Williams, A.M., Shave, R.E., Cheyne, W.S., Eves, N.D.: The influence of adrenergic stimulation on sex differences in left ventricular twist mechanics. *The Journal of physiology* 595(12), 3973–3985 (2017)
19. Williams, A.M., Shave, R.E., Stemberge, M., Eves, N.D.: Females have greater left ventricular twist mechanics than males during acute reductions to preload. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 311(1), 76–84 (2016)
20. Beaumont, C., Walsh-Wilkinson, É., Drolet, M.-C., Roussel, É., Melançon, N., Fortier, É., Harpin, G., Beaudoin, J., Arsenault, M., Couet, J.: Testosterone deficiency reduces cardiac hypertrophy in a rat model of severe volume overload. *Physiological reports* 7(9), 14088 (2019)
21. Walsh-Wilkinson, É., Beaumont, C., Drolet, M.-C., Roy, E`.-M., Le Houillier, C., Beaudoin, J., Arsenault, M., Couet, J.: Effects of the loss of estrogen on the heart's hypertrophic response to chronic left ventricle volume overload in rats. *PeerJ* 7(11), 7924 (2019)
22. Gardner, J.D., Brower, G.L., Janicki, J.S.: Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload. *J Card Fail* 8(2), 101–7 (2002)

23. Brower, G.L., Gardner, J.D., Janicki, J.S.: Gender mediated cardiac protection from adverse ventricular remodeling is abolished by ovariectomy. *Mol Cell Biochem* 251(1-2), 89–95 (2003)
24. Dent, M.R., Tappia, P.S., Dhalla, N.S.: Gender differences in cardiac dysfunction and remodeling due to volume overload. *J Card Fail* 16(5), 439–49 (2010). doi:10.1016/j.cardfail.2009.12.017
25. Lachance, D., Plante, E., Bouchard-Thomassin, A.A., Champetier, S., Roussel, E., Drolet, M.C., Arsenault, M., Couet, J.: Moderate exercise training improves survival and ventricular remodeling in an animal model of left ventricular volume overload. *Circ Heart Fail* 2(5), 437–45 (2009). doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.845487
26. Plante, E., Lachance, D., Champetier, S., Drolet, M.C., Roussel, E., Arsenault, M., Couet, J.: Benefits of long-term beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(4), 1888–95 (2008). doi:10.1152/ajpheart.01286.2007
27. Forrester, S.J., Booz, G.W., Sigmund, C.D., Coffman, T.M., Kawai, T., Rizzo, V., Scalia, R., Eguchi, S.: Angiotensin ii signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 98(3), 1627–1738 (2018)
28. De Lucia, C., Eguchi, A., Koch, W.J.: New insights in cardiac β-adrenergic signaling during heart failure and aging. *Frontiers in pharmacology* 9, 904 (2018)
29. Champetier, S., Bojmehrani, A., Beaudoin, J., Lachance, D., Plante, E., Roussel, E., Couet, J., Arsenault, M.: Gene profiling of left ventricle eccentric hypertrophy in aortic regurgitation in rats: rationale for targeting the β-adrenergic and renin-angiotensin systems. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 296(3), 669–677 (2009)
30. Plante, E., Lachance, D., Gaudreau, M., Drolet, M.-C., Roussel, E., Arsenault, M., Couet, J.: Effectiveness of β-blockade in experimental chronic aortic regurgitation. *Circulation* 110(11), 1477–1483 (2004)
31. Zendaoui, A., Lachance, D., Roussel, E., Couet, J., Arsenault, M.: Usefulness of carvedilol in the treatment of chronic aortic valve regurgitation. *Circ Heart Fail* 4(2), 207–13 (2011). doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.958512

4.12 Tables

Table 4.1. Characteristics of sham-operated and AR animals at the end of the protocol.

Parameters	ShM (n = 8)	ARM (n = 11)	SHF (n = 8)	ARF (n = 11)
Body weight, g	800 ± 27	790 ± 25	480 ± 24	441 ± 22
Tibial length, mm	61 ± 0.3	61 ± 0.3	53 ± 0.2	53 ± 0.3
Heart, mg	1626 ± 45	2777 ± 114*	1059 ± 26	1801 ± 78*
Heart/BW, mg/g	2.1 ± 0.05	3.5 ± 0.10*	2.2 ± 0.08	4.2 ± 0.22*
Left ventricle, mg	1226 ± 37	2112 ± 67*	796 ± 20	1399 ± 52*
Right ventricle, mg	300 ± 12	405 ± 20*	197 ± 7	261 ± 19*
Left atria, mg	39 ± 4	107 ± 12*	22 ± 1	58 ± 9*
Lungs, g	2.7 ± 0.18	3.0 ± 0.17	2.0 ± 0.10	2.1 ± 0.09

BW: body weight. Values are expressed as the mean +/- SEM. Group comparisons were made using Student's t-test. *: p < 0.0001 vs. respective sham group.

Table 4.2. Echocardiographic parameters (short-axis view, M-mode images) of male and females animals at the end of the protocol.

Parameters	ShM (n=8)	ARM (n=11)	ShF (n=8)	ARF (n=11)
AR severity, %	NA	66 ± 5	NA	73 ± 4
EDD, mm	9.4 ± 0.2	12.6 ± 0.3*	7.9 ± 0.1	11.1 ± 0.3*
ESD, mm	5.4 ± 0.3	8.4 ± 0.4*	4.3 ± 0.1	7.5 ± 0.3*
IVSW, mm	1.6 ± 0.02	1.6 ± 0.03	1.2 ± 0.03	1.5 ± 0.03*
PW, mm	1.9 ± 0.06	2.3 ± 0.06	1.6 ± 0.05	2.1 ± 0.05*
RWT, unitless	0.36 ± 0.011	0.32 ± 0.006*	0.36 ± 0.010	0.33 ± 0.010*
EF, %	70 ± 2	60 ± 3*	79 ± 1	59 ± 2*
E wave, cm/s	89 ± 2	88 ± 4	80 ± 3	81 ± 4
A wave, cm/s	49 ± 3	41 ± 2	39 ± 1	39 ± 3
E wave slope	4278 ± 402	4185 ± 355	3954 ± 246	4626 ± 371

NA: non applicable, EDD: end-diastolic diameter, ESD: end-systolic diameter, SW: septum wall thickness, PW: posterior wall thickness, RWT: relative wall thickness, HR: heart rate, bpm: beats per minute. Values are expressed as the mean +/- SEM. Group comparisons were made using Student's t-test. *: p < 0.05 vs. respective sham group.

Table 4.3. Echocardiographic parameters (short-axis view, M-mode images) of male and female Wistar rats at baseline (10-11 weeks of age).

Parameters	Males	Females
	(n=22)	(n=22)
EDD, mm	7.9 ± 0.1	7.0 ± 0.1
ESD, mm	4.4 ± 0.1	3.6 ± 0.1
IVSW, mm	0.8 ± 0.03	0.7 ± 0.03
PW, mm	1.2 ± 0.04	1.1 ± 0.03
LV mass, mg	389 ± 18	318 ± 16
RWT, unitless	0.24 ± 0.009	0.26 ± 0.008
EF, %	74 ± 1.2	81 ± 1.3
E wave, cm/s	85 ± 2.9	85 ± 3.6
A wave, cm/s	52 ± 2.8	50 ± 2.2
E wave slope	3728 ± 197	3993 ± 200

EDD: end-diastolic diameter, ESD: end-systolic diameter, SW: septum wall thickness, PW: posterior wall thickness, LV: left ventricle, RWT: relative wall thickness, FS: Fractional shortening. Values are expressed as the mean +/- SEM.

4.13 Figure legends

Figure 4.1. Left ventricular dimensions increases more strongly in female AR rats than in males compared to sham-operated animals. End-diastolic (EDD; A and B), end-systolic (ESD; D and E) LV diameters and septum thickness (IVSW; G and H) were measured in M-mode LV short axis (SAX) and parasternal long axis (PSLAX) views in sham (blue) and AR (red) male and female rats at four different time points over a six months after surgery. Relative wall thickness (RWT; J and K) was then calculated using the equation described in the Methods section. Ratios of the mean values for each parameter in AR rats over sham ones was calculated for each time point and are illustrated in Panels C, F, I and L. Results are expressed as mean +/- standard error of the mean (SEM; N=8-10 animals/group). *: p<0.05 and **: p<0.01 between corresponding sham and AR groups at a given time point.

Figure 4.2. Left ventricular volumes increase more strongly in female AR rats than in males compared to sham-operated animals. End-diastolic (EDV; A and B) and end-systolic (ESV; D and E) LV volumes were estimated using three-dimensional reconstruction of stacked LV short axis (SAX) views in sham (blue) and AR (red) male and female rats at

four different time points over a six months after surgery. LV ejection fraction (EF; G and H) stroke volume (SV; J and K) were then calculated using the equation described in the Methods section. Ratios of the mean values for each parameter in AR rats over sham ones was calculated for each time point and are illustrated in Panels C, F, I and L. Results are expressed as mean +/- standard error of the mean (SEM; N=8-10 animals/group). *: p<0.05 and **: p<0.01 between corresponding sham and AR groups at a given time point.

Figure 4.3. Comparison of various echo methods to estimate ejection fraction and LV mass. Means +/- SEM of calculated ejection fractions either using M-mode SAX view (X-axis) or three-dimensional reconstruction of stacked LV short axis (3DSAX) views (Y-axis) were plotted for each time point (red; months) for sham (A and C) and AR (B and D) groups. The oblique solid line represents the expected results if both methods were equivalent. In panels E and F are shown the correlation of estimated LV mass by echo (Y-axis) compared to wet LV weights obtained at the end of the protocol at 6 months. Two equations described in the Methods section were used to estimate LV mass in blue and red, respectively. Slope +/- SEM for each regression line is indicated. The oblique solid line represents the expected results if methods were equivalent.

Figure 4.4. Evidence of a sex dimorphism in the LV geometry of the dilated AR left ventricle. A. Representative end-diastolic parasternal long axis (PSLAX) LV views from 6-month sham (up) and AR (bottom) rats of both sexes (left: females and right: males). Images were calibrated in order to be at the exact same scale. Vertical and horizontal bars correspond to 3mm. B. From the PSLAX LV end-diastolic views at 6 months of sham and AR rats, three diameters were determined (EDD1 to 3). EDD1 represents the normal EDD from data or table 2. The bottom part of the LV was then divided into thirds along the longitudinal axis (orange line) and EDD2 and EDD3 were determined. C. Ratio of EDD2/EDD1 (top) and EDD3/EDD1 (bottom) were plotted for male and female sham and AR animals at six months. Results are expressed as mean +/- standard error of the mean (SEM; N=8-11 animals/group). *: p<0.05 between indicated groups.

Figure 4.5. Evolution of global LV strain rates in male and female sham and AR rats. Global longitudinal (A and B) and circumferential (C and D) strain rates were calculated from parasternal long axis LV views in sham (blue) and AR (red) male and female rats at four different time points over six months after surgery. Results are expressed as mean +/-

standard error of the mean (SEM; N=8-10 animals/group). **: p<0.01 between corresponding sham and AR groups at a given time point.

4.14 Figures

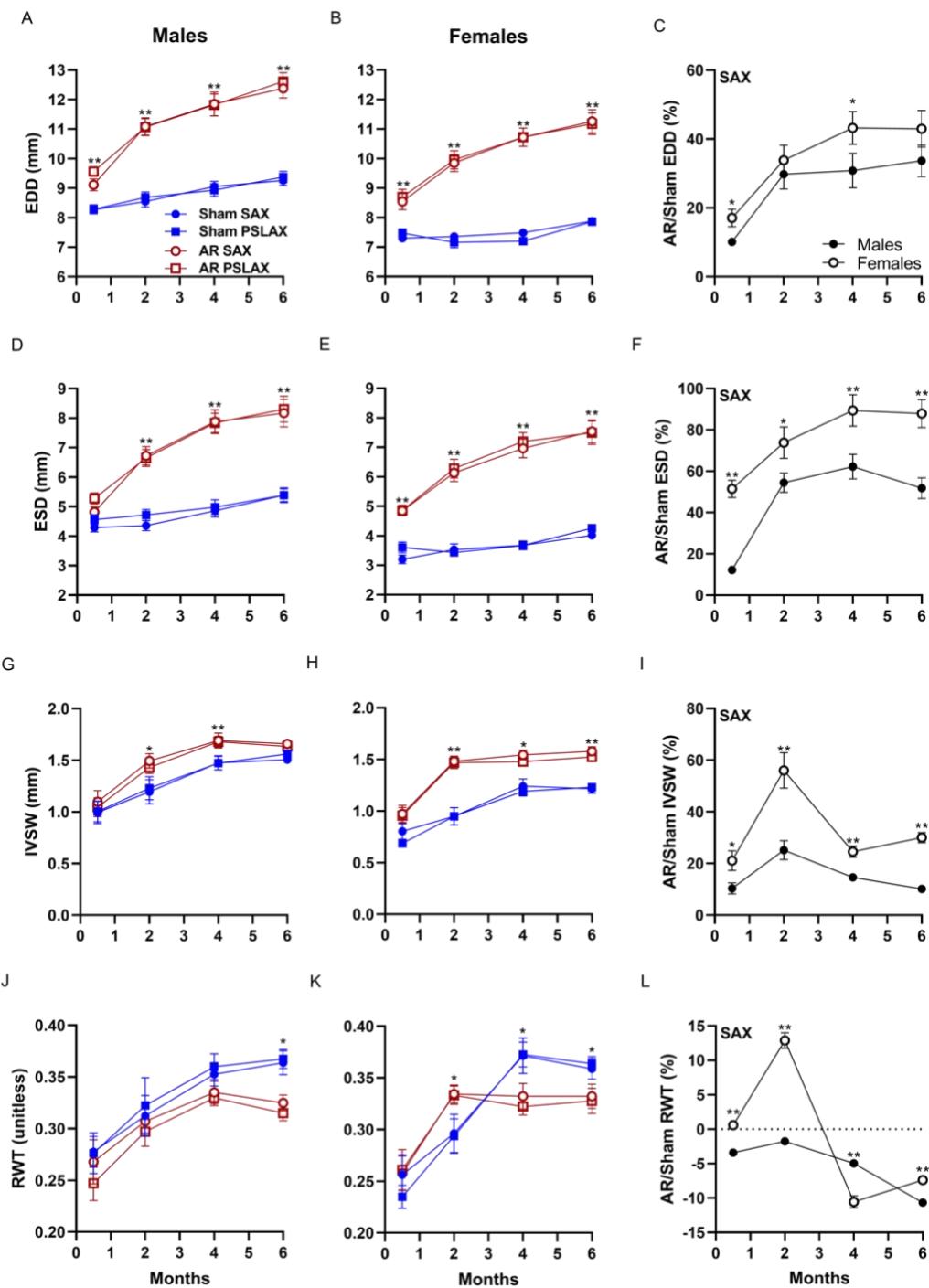


Figure 1 WW et al. 2019

Figure 4.1. Left ventricular dimensions increases more strongly in female AR rats than in males compared to sham-operated animals.

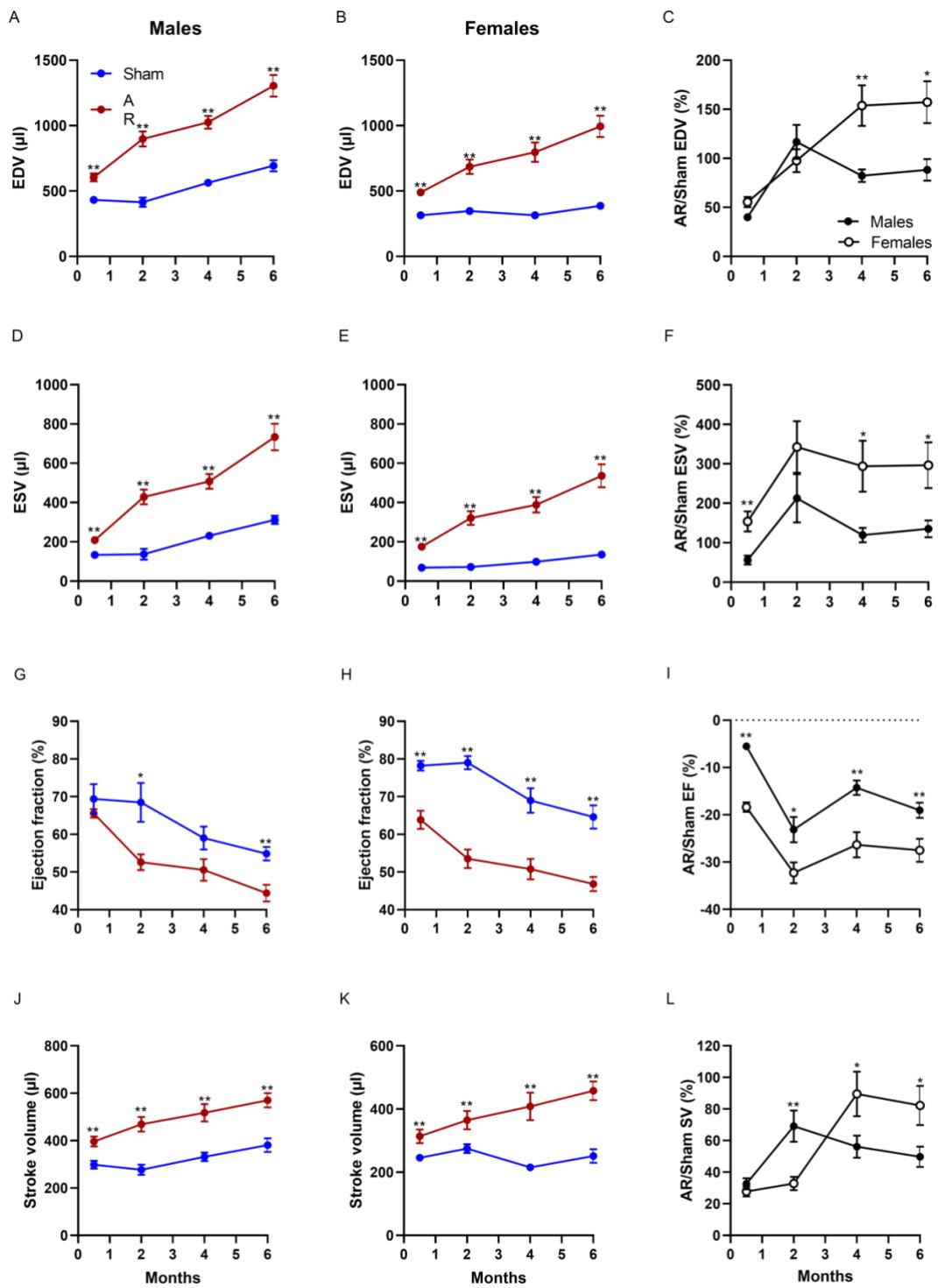


Figure 2 WW et al. 2019

Figure 4.2. Left ventricular volumes increase more strongly in female AR rats than in males compared to sham-operated animals.

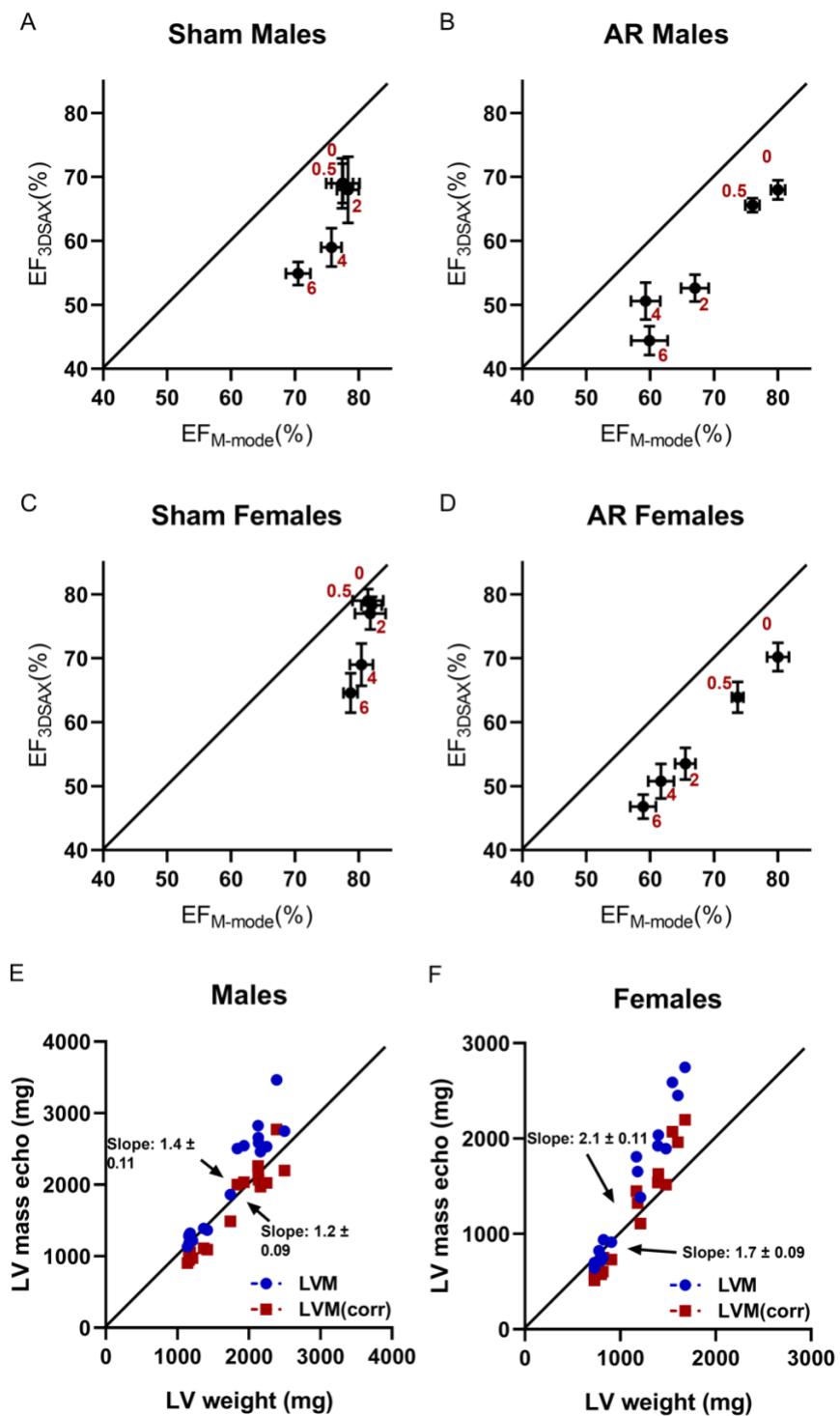


Figure 3 WW et al. 2019

Figure 4.3. Comparison of various echo methods to estimate ejection fraction and LV mass.

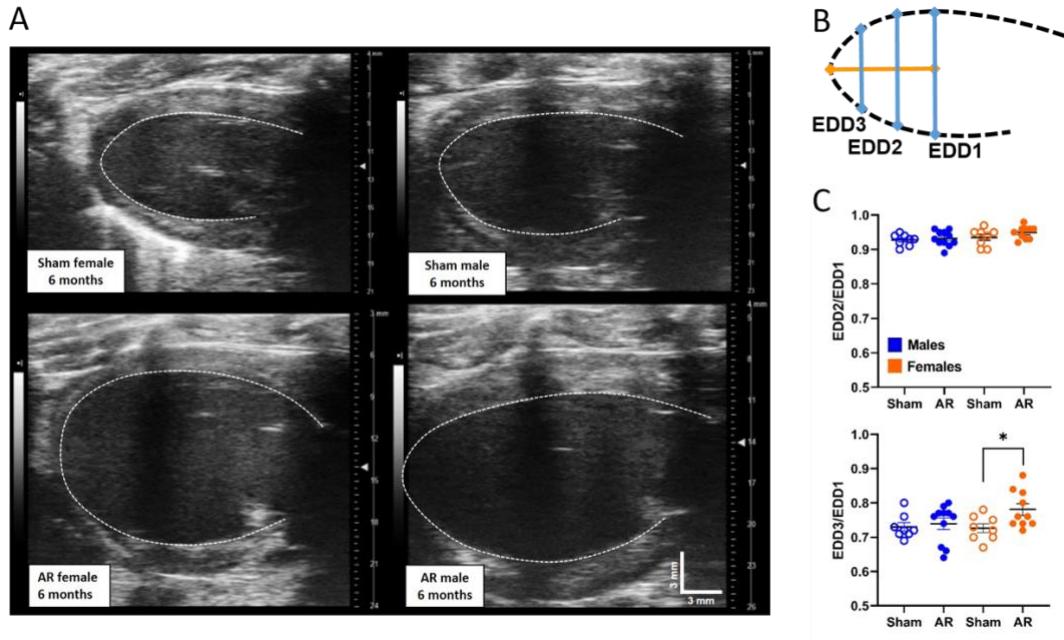


Figure 4, WW et al. 2019

Figure 4.4. Evidence of a sex dimorphism in the LV geometry of the dilated AR left ventricle.

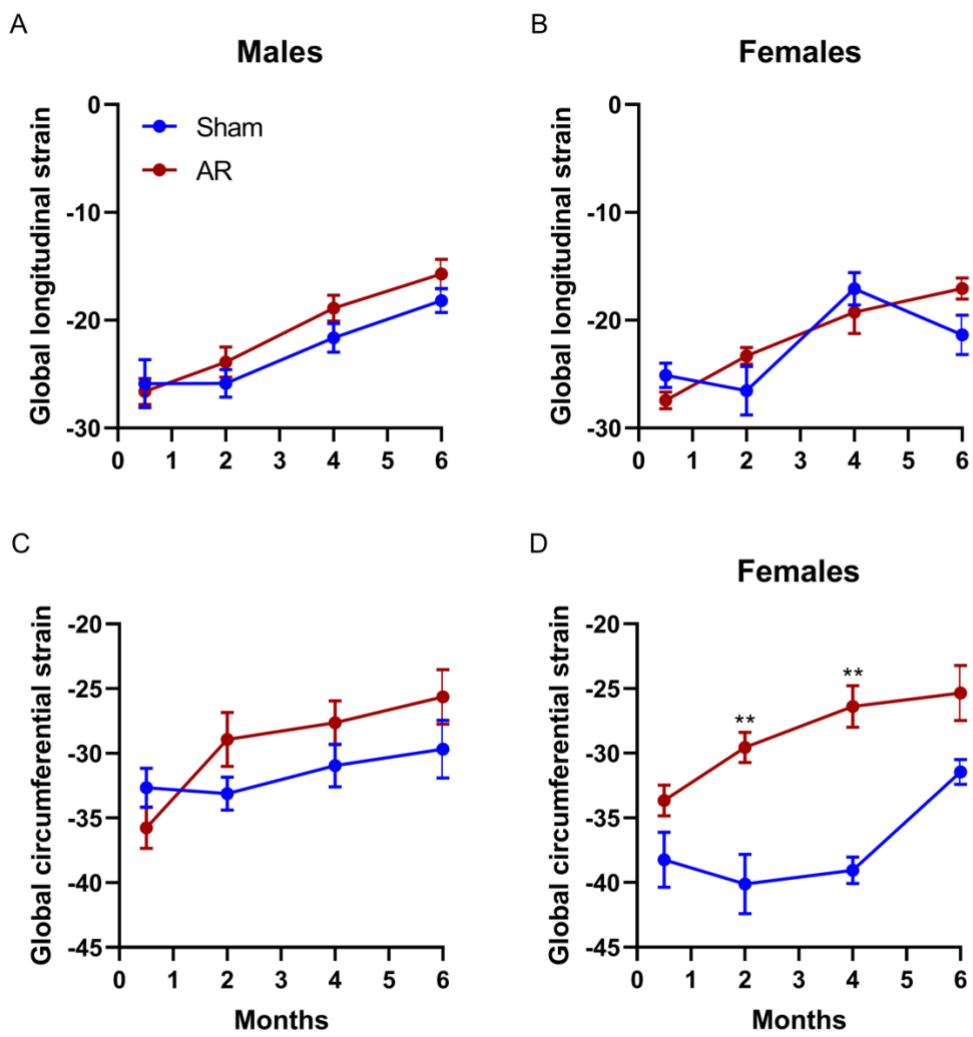


Figure 5 WW et al. 2019

Figure 4.5. Evolution of global LV strain rates in male and female sham and AR rats.

Conclusion

Discussion

Ce mémoire montre d'importantes différences sexuelles dans l'hypertrophie cardiaque développée en réponse à la régurgitation sévère de la valve aortique chez le rat. Les études présentées suggèrent que le sexe biologique influence grandement la façon dont le cœur réagit à un stress hémodynamique et à un traitement visant à en contrer les conséquences. Nous avons déjà montré que l'HC pathologique observée chez les rats mâles est différente chez les femelles¹⁸⁴. Ces dernières ont un remodelage cardiaque plus concentrique, un stress pariétal moins important, une meilleure densité capillaire myocardique et une expression génique de plusieurs marqueurs de la fonction mitochondriale et du métabolisme énergétique près de la normale¹⁸⁴. C'est à partir de ces résultats que nous avons voulu savoir si les hormones sexuelles pouvaient expliquer une partie de ces différences.

En premier lieu, nous avons étudié l'effet de la perte des androgènes par l'orchidectomie chez les rats mâles RA. Sachant que les androgènes ont un effet anabolique⁶⁸, mon hypothèse était que la perte des androgènes réduirait les modifications hypertrophiques au niveau de la masse cardiaque, ce qui en conséquence pourrait aider à la normalisation du profil transcriptionnel myocardique et des fonctions cardiaques. Les estrogènes ont été souvent étudiés considérant la faible incidence des maladies cardiovasculaires chez les femmes préménopausées. La réduction de la concentration d'estrogènes a d'abord été identifiée comme responsable de l'augmentation du risque cardiovasculaire chez les femmes ménopausées, tandis que les androgènes n'ont pas reçu beaucoup d'attention en recherche. Peu d'évidences montrent que les androgènes prédisposent les hommes à développer une maladie cardiovasculaire à un âge plus jeune que les femmes. D'un côté, les androgènes ont un important effet anabolisant et sont associés au développement de l'HC, à la fibrose et à la progression du cœur vers l'IC¹⁹³. D'autres études suggèrent plutôt qu'un faible taux de testostérone chez les hommes âgés est associé à un risque cardiovasculaire augmenté²⁰⁶. La testostérone semble augmenter dans une certaine mesure la capacité fonctionnelle cardiaque et réduire les symptômes chez les hommes avec IC²⁵⁵. Les résultats de notre étude confirment

l'hypothèse de départ, puisque la déficience en testostérone chez les rats mâles RA réduit l'hypertrophie excentrique, normalise le profil transcriptionnel lié au remodelage cardiaque et au métabolisme énergétique, améliore la fonction cardiaque et tend à améliorer la survie. Ainsi, les androgènes jouent un certain rôle dans le dimorphisme sexuel observé chez le rat en réponse à la RA. Ils semblent être impliqués dans le changement de préférence du substrat énergétique du VG. La testostérone favorise possiblement le métabolisme du glucose par l'augmentation de l'entrée de glucose par le transporteur Glut4, comme montré par Wilson et al.⁷⁸. On remarque que la déficience en testostérone à un jeune âge (6 semaines) chez le rat réduit considérablement la croissance générale de l'animal. L'effet anabolique des androgènes jouerait non seulement un rôle en condition pathologique, mais aussi physiologique. La voie signalétique Akt/mTOR est importante pour la synthèse protéique et la croissance cellulaire normale au niveau du cœur et son activation favorise aussi l'hypertrophie cardiaque pathologique^{252,256}. Chez nos animaux normaux, la perte des androgènes réduit la croissance du cœur sans affecter significativement le profil transcriptionnel du VG. Bien que les rats RA étaient comparés à leur groupe *sham* respectif, nous ne pouvons pas totalement écarter la possibilité que l'inhibition de la croissance normale du cœur par la perte des androgènes soit responsable, du moins en partie, de la réponse hypertrophique moindre en réponse à la régurgitation de la valve aortique. L'activation de la voie de signalisation Akt/mTOR est donc potentiellement réduite par la perte des androgènes chez les rats oox et sa faible activité avant l'induction de la RA réduit possiblement la réponse hypertrophique du VG⁷³. Il aurait été intéressant de mesurer l'expression protéique de S6K1 et de mTORC1 pour mieux comprendre l'effet de la testostérone sur la croissance cellulaire.

Pour faire suite à l'étude des androgènes, nous avons voulu comprendre l'implication des estrogènes dans les différences sexuelles cardiaques de la réponse à la RA. Puisque les estrogènes semblent protéger les femmes des maladies cardiovasculaires avant la ménopause et puisque plusieurs modèles animaux montrent un effet négatif de l'ovariectomie sur les adaptations du cœur en surcharge de pression et de volume¹⁸⁷⁻¹⁸⁹, l'hypothèse était que la perte des estrogènes augmenterait la réponse hypertrophique et affecterait le profil métabolique des rats RA. Les résultats montrent que la perte des estrogènes par l'ovariectomie a finalement peu d'effets sur la réponse du cœur à la régurgitation aortique.

Nos résultats montrent que l'ovx n'affecte pas l'hypertrophie ni le métabolisme énergétique des rats RA. La majorité des études animales est réalisée avec des modèles de surcharge de pression et l'implication des estrogènes n'est possiblement pas la même dans le modèle de surcharge de volume sur le VG. Les études réalisées dans les modèles de surcharge de volume s'intéressent davantage au modèle de fistule aorto-cave, une surcharge de volume sur l'ensemble du cœur (prioritairement le cœur droit)^{189,257}. Puisque la surcharge affecte d'abord le ventricule droit et possiblement les poumons, les animaux montrent des symptômes d'IC plus tôt et le cœur progresse vers l'IC, ce qui est plutôt rare dans le modèle de rats RA. Ces différences peuvent expliquer pourquoi les résultats présentés au chapitre 2 ne vont pas dans le même sens que ce qu'on peut lire dans la littérature sur le modèle de fistule aorto-cave^{189,257}. Considérant les résultats plutôt décevants observés chez les souris RA ovx, il est aussi possible que la durée du protocole n'était pas optimale pour identifier un effet significatif de la perte des estrogènes sur le remodelage ventriculaire dans notre modèle. Puisque la RA, malgré sa sévérité chez les rats, est bien tolérée chez le rongeur et progresse lentement vers l'insuffisance cardiaque, il est possible que le temps optimal soit de 12 mois ou plus. Le sexe chromosomal féminin joue possiblement un rôle bénéfique dans la réponse hypertrophique à la RA malgré la perte des estrogènes dans les premiers mois de la maladie. Il serait pertinent de s'intéresser à cette avenue pour de futures études. Il est aussi possible que l'action des estrogènes puisse perdurer au-delà de leur présence et qu'ils laissent une certaine empreinte au niveau du cœur avant l'ovariectomie, leur permettant de jouer un certain rôle sur la transcription génique malgré leur absence. Autrement dit, jusqu'à l'âge de 6 semaines, les rates ont subi l'action des estrogènes et les conséquences de leurs effets pourraient perdurer dans le temps malgré leur disparition. Les estrogènes semblent davantage influencer la croissance normale de l'animal que la réponse hypertrophique après 6 mois de RA. En effet, l'ovariectomie à l'âge de 6 semaines réduit la croissance chez les rates ovx.

La perte des androgènes chez les mâles RA réduit l'hypertrophie ventriculaire gauche et féminise la réponse du cœur. Par contre, la perte des estrogènes a peu d'effets sur la réponse hypertrophique du cœur. Ces observations sont décevantes comparativement à ce qu'on peut retrouver dans la littérature, où la perte des estrogènes exagère la réponse hypertrophique du cœur à une surcharge hémodynamique. Selon nos résultats, les androgènes seraient les

principaux responsables du dimorphisme sexuel observé au niveau de l'hypertrophie cardiaque développée après 6 mois de RA chez le rat. Par contre, les hormones sexuelles ne sont probablement pas les seuls facteurs influençant les différences sexuelles. Puisque la perte des androgènes ne ramène pas totalement la réponse du cœur masculin vers un profil féminin et que les estrogènes interviennent peu dans le remodelage hypertrophique, le cœur masculin et féminin est probablement différent en d'autres points qu'au niveau hormonal. Il est possible que le sexe chromosomique, soit le système XY de détermination sexuelle, offre un certain bénéfice chez les femelles. Le fait d'être femelle et d'avoir deux chromosomes X a sans doute un effet non relié aux estrogènes.

Le second objectif de ce projet était de mieux comprendre l'implication de l'angiotensine II dans la réponse hypertrophique cardiaque après 8 semaines de RA chez les rats mâles et femelles. Nous avons déjà montré que l'inhibition du RAAS est bénéfique chez les rats mâles RA à long terme (6 mois)¹⁴², mais ce type de traitement n'a jamais été étudié chez les femelles RA. Les résultats présentés au chapitre 3 montrent que l'inhibition du récepteur AT1 par le valsartan réduit l'épaississement des parois chez les femelles après 8 semaines de RA, mais qu'il n'a pas d'effet sur la dilatation du VG tant chez les mâles que chez les femelles RA. Ces résultats suggèrent que l'implication de l'angiotensine II dans l'initiation du remodelage cardiaque en phase précoce de la RA chez le rat est différente selon le sexe. Il est aussi possible que l'absorption, la distribution et le métabolisme du valsartan soient différents entre les mâles et les femelles. C'est la première étude s'intéressant à l'effet d'un traitement ciblant le RAAS chez les deux sexes dans un modèle de surcharge de volume. Le traitement ramène la morphologie du VG semblable entre les deux sexes (hypertrophie excentrique) et il n'est pas clair si la réduction de l'épaississement des parois chez les femelles est bénéfique dans ce contexte de surcharge. D'un côté, l'HC est un important facteur prédicteur de la progression du cœur vers l'IC₉₈ et le traitement au valsartan offre des bénéfices comme l'amélioration de la fonction diastolique et la réduction de l'expression génique de marqueurs hypertrophiques comme *Anp* et *Bnp* chez les femelles RA. D'un autre côté, la réduction de l'épaisseur des parois augmente possiblement le stress pariétal selon la loi de Laplace et ramène les femelles vers un remodelage plus excentrique, comme celui des mâles qui ont tendance à avoir un moins bon pronostic après 6 mois de RA¹⁸⁴.

Notre équipe a déjà montré que 8 semaines de traitement à la rapamycine⁷³, un inhibiteur spécifique de mTOR, et à la metformine²⁵⁸, un activateur de AMPK (inhibiteur de la voie mTOR), pouvaient réduire la dilatation du VG chez les rats RA mâles. Le traitement au valsartan pour 8 semaines de RA montre des résultats plus décevants. Il semble que l'inhibition du RAAS à plus long terme (6 mois) soit nécessaire pour réduire l'hypertrophie excentrique chez le rat¹⁴². Contrairement à la voie signalétique mTOR, le RAAS n'est donc pas impliqué dans l'initiation du remodelage excentrique chez les deux sexes. Par contre, le RAAS serait impliqué dans le développement de l'hypertrophie concentrique féminine dès 8 semaines de RA. Le traitement au valsartan a été initié une semaine avant l'induction de la RA chez les rats. De cette façon, l'activité du RAAS est déjà réduite au moment de la création de la surcharge de volume, ce qui nous permet d'étudier l'implication du RAAS dans l'initiation de la réponse hypertrophique de la RA^{73,258}. Notre équipe a déjà montré que plusieurs voies signalétiques sont activées dès deux jours après l'induction de la RA¹⁰⁷. Le but de cette étude n'était donc pas d'évaluer l'efficacité des traitements en insuffisance aortique, comme c'est souvent le cas^{87,142,259}.

Le troisième objectif de ce travail était d'étudier l'évolution du remodelage ventriculaire gauche pour une durée de 6 mois chez le rat RA en comparant les deux sexes de façon longitudinale. Nous avons déjà montré que l'épaississement des parois du VG était plus important chez les femelles RA¹⁸⁴. Nous avions observé que la fraction d'éjection était davantage réduite chez les mâles RA, que la densité capillaire était significativement réduite dans le VG des mâles RA et que l'expression de la majorité des gènes liés à l'oxydation des acides gras était plus fortement réduite chez les mâles RA¹⁸⁴. Ces résultats suggèrent que le sexe féminin s'adapte mieux à la RA chez le rat. Pour mieux comprendre ce dimorphisme sexuel dans la réponse hypertrophique, nous avons voulu identifier les différences morphologiques et fonctionnelles chez les deux sexes. Les nouvelles techniques d'imagerie cardiaque par échocardiographie chez le rongeur permettent une meilleure caractérisation des changements morphologiques cardiaques qui s'installent en HC. Le suivi longitudinal à l'échocardiographie sur une période de 6 mois chez le rat RA indique que la réponse à la surcharge de volume chez les rates pourrait être plus défavorable que ce qu'on pouvait suggérer dans les précédentes études. Les résultats présentés au chapitre 4 montrent que les

femelles RA développent plus d'hypertrophie, montrent une réduction rapide de leur fraction d'éjection et perdent davantage de capacité de déformation en circonférentiel que les mâles RA. Les mesures de volumes et de la fraction d'éjection prises à l'échocardiographie 2D semblent sous-estimer les valeurs réelles, comparativement à l'échocardiographie 4D. En effet, l'échocardiographie 2D utilise l'assumption que la forme du VG est elliptique, ce qui est possiblement moins valide chez le rat âgé et dans notre modèle de RA. L'échocardiographie 4D serait plus représentative de la géométrie globale du VG. D'ailleurs, les valeurs de fraction d'éjection obtenues par cette dernière méthode sont semblables à celles obtenues précédemment par microtomographie par émission de positrons chez des rats du même âge⁸⁷. La perte de capacité de déformation en circonférentiel est plus importante chez les femelles dès 2 semaines de RA, mais il est important de noter que le GCS en début de protocole était aussi plus grand chez les femelles, comparativement aux mâles. Cette observation est semblable à ce qui est rapporté chez l'humain^{244,248} et cette différence sexuelle pourrait être expliquée par la différente géométrie des VG. Chez les rates RA, la dilatation du VG par la surcharge de volume semble mener à une forme plus sphéroïde, comparativement aux mâles qui conservent la forme elliptique normale du VG. Dans le ventricule dilaté, les fibres sont étirées, elles prennent une orientation davantage circonférentielle et cette géométrie arrondie affecte possiblement la capacité de rotation du VG²⁶⁰. Cette capacité, mesurée par le GCS ou par la torsion du VG (différence entre le GCS de la base du VG et l'apex; n'a pas été mesurée ici), pourrait être un marqueur du remodelage ventriculaire à intégrer dans la pratique clinique pour mesurer la sévérité de l'hypertrophie cardiaque excentrique²⁶⁰. Cette étude longitudinale a permis de mieux comprendre la croissance et le vieillissement des rats *sham* normaux. Chez les femelles *sham*, le volume du VG et le volume d'éjection restent assez stables au cours des 6 mois. Chez les mâles *sham*, le volume du VG et le volume d'éjection ont significativement augmenté au cours des 6 mois, ce qui signifie que la croissance cardiaque de l'animal varie d'un sexe à l'autre. Comme montré dans l'étude du chapitre 1, les androgènes sont possiblement responsables de cette croissance cardiaque masculine plus importante. Malgré un important gain de poids (majoritairement du gras) semblable chez les rats mâles et femelles au cours des 6 mois du protocole, le débit cardiaque augmente chez les mâles et reste stable chez les femelles. Le cœur féminin normal maintient donc sa capacité à pomper le sang malgré le vieillissement

(6 mois) chez les rats, alors que le cœur masculin normal est plus gros et augmente ainsi sa capacité cardiaque.

Les résultats démontrent aussi l'importance de toujours inclure des animaux contrôles négatifs de même âge et de même sexe pour mesurer les changements induits par un événement cardiaque. Les résultats présentés dans cette étude mettent en lumière les différences sexuelles cardiaques physiologiques et pathologiques chez le rat. L'hypothèse de départ est infirmée, puisque les observations suggèrent que la dilatation induite par la régurgitation aortique pourrait être moins bien tolérée par les femelles. C'est la première étude s'intéressant au remodelage ventriculaire gauche de façon longitudinale chez les rats des deux sexes. Malgré que les mâles RA montrent une avidité accrue du glucose au niveau de la paroi libre du VG, à mi-chemin entre l'apex et le haut du VG, la déformation ventriculaire dans les trois axes est similaire et synchrone (résultats non montrés). Il serait tout de même intéressant de s'intéresser à l'uniformité de l'expression génique et protéique à travers le myocarde pour de futures études. Les facteurs hypertrophiques pourraient être exprimés différemment selon la région du VG (Apex, septum ou paroi libre). L'identification d'une géométrie arrondie à l'apex du VG chez les femelles a été possible grâce au nouvel appareil d'échocardiographie permettant de visualiser le VG entier en 2D et en 3D. Cette dilatation rapide (dès 2 semaines de RA) et la forme arrondie du VG sont probablement responsables de la réduction des valeurs de GCS. Williams et al.²⁴⁸ suggèrent d'ailleurs que les capacités de rotation et de torsion sont influencées par la géométrie arrondie chez les femelles. La géométrie du VG pourrait être un facteur influençant la fonction cardiaque et il sera intéressant de poursuivre ces observations pour de futures études.

Peu d'études sont réalisées avec les modèles animaux de surcharge de volume et encore moins le sont avec le modèle de la régurgitation de la valve aortique, qui présente de près la réalité de la régurgitation aortique chez l'humain. La littérature rapporte principalement des observations faites à partir de différents modèles de surcharge de pression et mes hypothèses de recherche s'appuyaient sur celles-ci^{76,189}. Certaines différences entre ces modèles méritent d'être mentionnées. En réponse à la surcharge de pression, l'hypertrophie est d'abord concentrique et la fonction systolique est souvent réduite plus

rapidement, du moins chez les animaux mâles²⁶¹. En réponse à une surcharge volumique, l'hypertrophie développée est de type excentrique et la fonction diastolique est souvent affectée. Il semble que les mâles ont un moins bon pronostic que les femelles dans les deux cas de surcharge hémodynamique et que la testostérone favorise le développement de l'hypertrophie cardiaque dans plusieurs modèles de maladies cardiovasculaires²³. Par contre, selon nos résultats, les femelles semblent développer un remodelage hypertrophique et des mécanismes adaptatifs différents selon le type de surcharge et le modèle animal étudié. Plusieurs études montrent que les estrogènes ont un effet cardioprotecteur dans différents modèles animaux^{186,188}, ce qui ne semble pas le cas dans notre modèle de régurgitation de la valve aortique.

Il n'est pas clair si l'hypertrophie concentrique, du moins l'épaississement des parois du VG développé chez les femelles, est bénéfique dans le contexte de la surcharge de volume. Selon la loi de Laplace, l'épaississement des parois permet de réduire le stress pariétal. Puisque la surcharge de volume cause la dilatation du ventricule gauche dans le contexte de la RA, des parois plus épaisses permettent possiblement une meilleure fonction cardiaque grâce au maintien d'une morphologie plus normale (épaisseur des parois/diamètre de la cavité). Les femelles RA développent plus d'hypertrophie, mais conservent aussi une meilleure oxygénation du tissu (densité capillaire) et une bonne fonction cardiaque¹⁸⁴. Lors de la grossesse, les femmes sont touchées par une forme d'hypertrophie physiologique et réversible qui résulte en une augmentation de 10% des dimensions du VG et un épaississement des parois de 20%¹⁷⁰. Puisque le sexe féminin épaisse ses parois du VG en condition de surcharge de volume physiologique, cela suppose qu'un remodelage semblable pourrait être bénéfique chez les femelles en condition de surcharge de volume pathologique (RA) et que la réduction de l'hypertrophie n'est pas nécessairement une bonne stratégie thérapeutique dans tous les contextes. En d'autres mots, l'HC n'a possiblement pas la même importance diagnostic chez les deux sexes et une hypertrophie plus concentrée pourrait être bénéfique dans une certaine mesure pour le sexe féminin dans le contexte de régurgitation valvulaire^{255,262}. Les résultats présentés au chapitre 3 montrent encore une fois l'importance d'inclure les deux sexes lorsqu'on étudie l'efficacité d'un traitement ciblant une maladie cardiovasculaire. Les hommes et les femmes ne gèrent pas les molécules de la même façon

et l'effet de ces dernières est potentiellement différent selon le sexe. Ici, nous observons que l'épaississement des parois du VG en phase aigüe de la RA est, en bonne partie, sous le contrôle du RAAS chez les rates femelles seulement.

Limites

Plusieurs études suggèrent un effet de la perte des hormones sexuelles sur le remodelage cardiaque et le modèle le plus utilisé est la gonadectomie chez le rongeur. Il est important de comprendre que l'ovariectomie chez la femelle ne mime pas parfaitement l'effet de la ménopause, puisqu'elle représente une perte abrupte des estrogènes par chirurgie, contrairement à une réduction progressive des hormones sexuelles. Il en est de même pour l'orchidectomie chez les mâles. De plus, les études en recherche cardiaque sont en général menées comme ici, sur de jeunes animaux, ce qui ne représente pas la population âgée ménopausée ou vivant l'andropause. L'étude des animaux gonadectomisés mâles et femelles permet de comprendre l'implication des hormones sexuelles sur les adaptations du cœur. Puisque les rongeurs femelles n'ont pas de ménopause comme telle, mais une baisse des capacités reproductives avec l'âge, la gonadectomie reste le modèle le mieux adapté pour comprendre l'implication des hormones sexuelles.

Il aurait été intéressant d'étudier l'effet du remplacement hormonal des animaux mâles gonadectomisés pour vérifier que la testostérone a le potentiel de renverser les modifications induites par l'ocx¹⁹³. Il n'est pas évident de reproduire les concentrations physiologiques d'androgènes sur une longue période de 6 mois ni d'atteindre la balance normale de testostérone et de DHT chez le rat. De plus, les méthodes d'administration ne peuvent reproduire la production physiologique. Il faudrait mesurer les niveaux d'androgènes, puisque des niveaux supra-physiologiques sont connus pour être délétère pour le cœur²⁶³.

Nous avons étudié l'effet du remplacement hormonal chez les femelles ovx et il aurait été intéressant d'étudier l'effet de l'E2 chez les mâles. Certaines études montrent un important bénéfice du traitement à l'E2 chez les mâles et les femelles dans les modèles animaux de surcharge hémodynamique^{187,188}. L'E2 aurait tendance à améliorer les fonctions

du VG. Dans notre modèle, l’implication de l’E2 chez les mâles pourrait être différente de ce qu’on observe chez les femelles. La méthode de remplacement d’E2 ne reproduit pas totalement les conditions physiologiques féminines. Dans notre étude, le poids utérin a été rétabli environ aux deux tiers, suggérant que la concentration physiologique n’a pas été atteinte. De plus, le modèle utilisé relâche l’estradiol de façon continue, ce qui ne reproduit pas le cycle ovarien qui est de 4 à 5 jours chez le rat²⁶⁴. Plusieurs études s’intéressant aux effets de la perte des estrogènes chez les rongeurs mentionnent que la présence de phytoestrogènes dans la nourriture des animaux pourrait avoir un certain effet sur le cœur^{23,25,36}. On peut retrouver des phytoestrogènes dans plus de 300 plantes, dont certaines contenues dans la nourriture régulière des animaux de laboratoire²⁶⁵. Parmi ces phytoestrogènes, on trouve la génisteine, une molécule connue pour avoir une activité agoniste des récepteurs aux estrogènes¹⁸¹. Bien que tous les rats mangent la même nourriture, l’effet des phytoestrogènes peut être différent selon le sexe et peut influencer la réponse du cœur chez les animaux gonadectomisés.

Le modèle de régurgitation aortique chez le rat est utilisé dans notre laboratoire depuis plus de 17 ans²⁰⁸. C’est le modèle de surcharge de volume représentant le plus fidèlement les effets de la régurgitation aortique chez l’humain. Par contre, il est important de mentionner que la RA est induite de façon chirurgicale et sévère chez le rat, ce qui mène à une réponse aigüe et rapide. Puisque l’induction de la maladie est sévère et drastique, les symptômes et les adaptations observées chez l’animal ne reproduisent pas exactement les adaptations lentes et insidieuses chez l’humain. Le rongeur est un excellent modèle animal pour l’étude des maladies cardiovasculaires, mais il est important d’être vigilant lorsqu’on transpose les résultats chez l’humain. Le rat reste un animal moins complexe, sachant que les humains sont aussi affectés par une variété de facteurs biologiques, sociaux et environnementaux. Par exemple, la notion de genre n’est présente que chez l’humain. Le genre influence la perception des autres, il relève des habitudes de vie, de l’environnement et des comportements. Il est difficile de séparer le sexe du genre chez l’humain, puisque les effets du genre s’additionnent à ceux du sexe biologique. L’étude des animaux en recherche fondamentale permet ainsi de distinguer ces deux notions et de comprendre l’implication du sexe biologique dans les maladies cardiovasculaires.

La déficience en hormones sexuelles affecte la croissance des rats mâles et femelles, rappelant l'importance d'indexer les valeurs mesurées en fin de protocole par rapport au poids de l'animal ou à la grandeur du tibia. La gonadectomie dès 6 semaines d'âge permet de limiter l'empreinte génétique des hormones sexuelles chez les rats. Cette empreinte pourrait favoriser l'expression de certains gènes cibles à long terme, malgré l'absence des hormones stéroïdiennes. L'étude d'animaux déficients en récepteurs aux hormones sexuelles (ERs ou ARs) pourrait limiter l'effet de cette empreinte.

Puisque nos animaux sont jeunes, ils ne représentent pas la population âgée, grandement touchée par les maladies cardiovasculaires. Sachant que le vieillissement peut être étudié chez le rongeur²³⁴, il serait pertinent de s'intéresser au vieillissement dans le modèle de surcharge de volume. Puisqu'il existe un important dimorphisme sexuel dans le vieillissement tant chez l'humain que chez le rongeur^{25,266,267}, les différences sexuelles chez le rat RA sont possiblement affectées par le vieillissement. Par exemple, il semble que les hommes ont un nombre réduit de cardiomyocytes avec l'âge, causé par l'augmentation de l'apoptose²⁵⁰. L'étude des animaux âgés serait à privilégier pour le futur, mais elle présente un défi pour le vieillissement des animaux et les frais liés au protocole deviennent plus importants.

L'utilisation de l'appareil *Vivo 3100* chez le rat a demandé quelques ajustements, cet appareil ayant été initialement conçu pour la souris. L'anatomie du rat (côtes, gras, grosseur) a limité l'acquisition d'images de bonne qualité dans certains cas. Une vue apicale optimale n'a d'ailleurs pas été possible. Les valeurs de *strain* ont été obtenues à partir de vues parasternales seulement, contrairement à chez l'humain où le GLS est intégré de trois différentes vues : apicale 4 chambres, apicale 2 chambres et parasternale long-axe. De plus, la méthode de Simpson n'a pas été utilisée pour mesurer la valeur de fraction d'éjection. Il serait intéressant de comparer la méthode de Simpson avec la méthode 2D et 4D pour le futur. Pour finir, il est important de noter que les mesures de déformation obtenues par échocardiographie par *speckle tracking* ne peuvent être comparées avec un autre appareil ou

un autre logiciel que le *Vevo Strain 3100*, puisque les formules utilisées sont différentes selon le fournisseur.

Perspectives

Les androgènes seraient en partie responsables du dimorphisme sexuel observé chez le rat après 6 mois de régurgitation aortique. Les estrogènes ne semblent pas jouer un grand rôle dans la protection du cœur des femelles après 6 mois de RA, ce qui suppose que le sexe chromosomique pourrait avoir un effet particulièrement important sur le cœur des femelles.

Les études chez l'animal se sont principalement intéressées au rôle des hormones libérées par les gonades. Ce n'est que récemment qu'on a commencé à étudier l'effet du sexe chromosomique²⁶⁸, soit le fait d'avoir les chromosomes XX ou XY. Bien que le gène *Sry* joue un rôle important dans la différenciation sexuelle, il n'est pas le seul responsable.

La majorité des gènes du chromosome X ne montre pas de différence entre les sexes dans leur niveau d'expression, puisqu'un chromosome X est inactivé dans les cellules somatiques XX²⁶⁹. De ce fait, les gènes du chromosome X devraient être exprimés de façon semblable dans les cellules XX et XY. L'implication des gènes liés au chromosome X ont longtemps été ignorés comme cause potentielle des différences sexuelles, mais des évidences montrent maintenant que certains gènes échappent à l'inactivation du deuxième chromosome X^{26,269}. On estime à 15% le nombre de gènes liés au chromosome X échappant à l'inactivation du deuxième chromosome X chez les femmes²⁶⁹. Chez la souris, on parle de 3%, ou de 13 gènes²⁶⁹. Parmi ces gènes, on retrouve les histones déméthylases Kdm5c et Kdm6a, le facteur d'initiation de la traduction Eif2s3x et l'hélicase Ddx3x²⁷⁰. Puisqu'ils sont impliqués dans la transcription génique, ils sont possiblement responsables en partie du dimorphisme sexuel²⁷⁰. Par contre, aucun n'a encore été montré comme impliqué dans les différences sexuelles observées dans les maladies cardiovasculaires²⁸.

L'empreinte parentale est une autre cause potentielle du dimorphisme sexuel. Les cellules XY reçoivent une empreinte nécessairement maternelle du chromosome X, alors que les cellules XX reçoivent une empreinte des deux parents^{28,271}. Cette empreinte peut jouer un

rôle au niveau de l'expression de gènes liés au chromosome X et contribuer aux différences sexuelles dans les maladies cardiovasculaires.

Pour étudier les différences liées aux chromosomes sexuels, le modèle de souris «*Four core genotype*» est le plus fréquemment utilisé. Dans ce modèle, on inactive le gène *Sry* sur le chromosome Y et on le relocalise sur le chromosome 3²⁶⁸. Ainsi, la détermination des gonades sexuelles (descente des testicules) est séparée des chromosomes sexuels et les souris peuvent être XX et XY-*sry* indépendamment des gonades. Les chromosomes X et Y combinent de façon indépendante, ce qui veut dire qu'un accouplement entre une femelle XX et un mâle XY-*sry* donnera des progénitures femelles XX et XY- et des mâles XX-*sry* et XY-*sry* (Figure 8)^{28,268,272}. La production des hormones sexuelles est comparable entre les souris mâles XX et XY-*sry*²⁷³. Chez les femelles XX et XY-, les niveaux d'estrogènes sont probablement différents, car les femelles XY- sont infertiles, elles ont un nombre réduit d'ovocytes²⁷³ et donc une activité ovarienne différente des femelles XX²⁶⁸. Pour éviter ces différences hormonales, on peut étudier des animaux gonadectomisés recevant un remplacement hormonal. C'est donc en comparant les femelles XX et XY- ou les mâles XX et XY-*sry* que l'on peut étudier l'effet du sexe chromosomique. En comparant les femelles XX et les mâles XX ou les femelles XY- et les mâles XY-*sry*, on étudie l'effet du sexe biologique. Lorsqu'on identifie le sexe chromosomique comme étant impliqué dans le dimorphisme sexuel, on peut savoir si cet effet est causé par le chromosome X ou Y en utilisant le modèle de souris XY*²⁷². Dans ce modèle, le chromosome Y* exprime le gène *Sry*, mais il a une région recombinant anormalement avec le chromosome X, permettant une fusion des chromosomes X et Y^{271,272}. On obtient ainsi des souris mâles XXY et XY et des femelles XX et XO. En les comparant, on étudie l'effet d'avoir un ou deux chromosomes X.

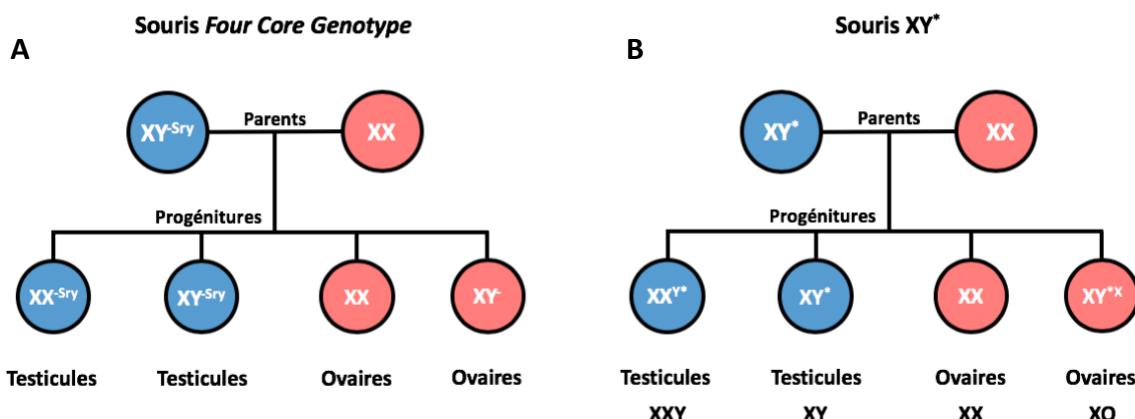


Figure 8. Les modèles de souris *Four Core Genotype* et *XY pour étudier l’effet du sexe chromosomique.**

A : Modèle *Four Core Genotype*, où le gène *Sry* est retiré du chromosome Y et déplacé au chromosome 3.
B : Modèle *XY**, où l’on retrouve une région recombinante pour le chromosome X sur le chromosome Y. Figure par Walsh-Wilkinson, É (2019) non publiée.

Les différences biologiques et socioculturelles chez les humains influencent le risque pour la santé, la prise en charge des patients et l’évolution des maladies. Depuis juillet 2009, les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) obligent la considération du sexe et du genre dans les demandes de subvention des projets de recherche en santé, pour mieux répondre aux besoins des hommes et des femmes²⁷⁴. Les femelles ont longtemps été ignorées comme sujets expérimentaux selon la croyance que le cycle ovarien induit de la variabilité et complique les expérimentations. Par contre, il semble que les femelles ne montrent pas plus de variabilité^{275,276} et que les mâles ont leurs propres sources de variations comme les changements hormonaux induits par la dominance dans un groupe de souris, par exemple¹⁷⁴. L’étude des deux sexes permet non seulement d’être inclusif, mais aussi de déterminer les processus biologiques impliqués chez les individus masculins et féminins dans le but d’améliorer et de personnaliser les traitements et la prise en charge des patients²⁵⁰.

Le vieillissement est un important facteur de risque des maladies cardiovasculaires⁴⁵. Avec la population vieillissante, les patients nécessitant des traitements en cardiologie sont plus âgés et la moitié sont des femmes⁴⁵. Malgré cela, les études fondamentales impliquent souvent des animaux jeunes et ne prennent pas en compte le vieillissement cardiovasculaire¹⁷⁴. Le vieillissement est caractérisé par du remodelage cardiaque, des

altérations du métabolisme du calcium, du métabolisme mitochondrial et des systèmes β -adrénergiques et RAAS²⁵⁰. Les études chez les rongeurs montrent que ces changements sont différents selon le sexe et qu'ils arrivent généralement plus tardivement chez les femelles²⁵⁰. Par exemple, on sait que l'apoptose réduit le nombre de cardiomyocytes avec l'âge de façon plus importante chez les hommes comparativement aux femmes²⁵⁰. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le vieillissement cardiaque des deux sexes permettra d'améliorer notre compréhension des maladies cardiovasculaires chez les femmes et donc de bonifier la prise en charge des patients¹⁷⁴. Ainsi, pour faire suite aux études présentées dans ce mémoire, il serait pertinent d'étudier la contribution des chromosomes sexuels sur l'évolution des maladies cardiovasculaires chez des rongeurs mâles et femelles âgés sur une plus longue période de temps.

Les études cliniques comparant les hommes aux femmes dans toutes les sphères de la médecine permettront une meilleure compréhension des différents mécanismes impliqués dans les maladies en fonction du sexe et permettront éventuellement de meilleurs soins et un suivi mieux adapté au patient. Pour faire suite aux études réalisées dans ce mémoire, d'un côté plus clinique, il serait pertinent de réaliser une étude comparative chez les hommes et les femmes ayant subi un remplacement de la valve aortique pour insuffisance aortique sévère. Il serait intéressant de suivre la récupération fonctionnelle (systolique et diastolique) et la réduction de l'hypertrophie ventriculaire gauche en fonction du sexe biologique.

Conclusion et retombées

Pour conclure, nous avons amélioré notre compréhension et montré de nouvelles différences sexuelles au niveau de la réponse hypertrophique chez le rat RA. Sachant que les individus masculins et féminins ne répondent pas de la même façon à l'HC, nous avons étudié l'implication des hormones sexuelles dans ce dimorphisme. Dans un premier temps, il semble que les androgènes favorisent l'hypertrophie cardiaque développée en réponse à la surcharge de volume chez les rats mâles. La déficience en testostérone chez les mâles RAréduit la dilatation du VG, améliore les fonctions cardiaques et a tendance à améliorer la survie. Ensuite, nous avons montré que la perte des estrogènes chez les femelles RA n'était pas associée à d'importants changements de la réponse du cœur à la surcharge volumique. Contrairement à ce qui a été montré dans différents modèles animaux de surcharge

hémodynamique^{76,189}, les estrogènes ne semblent pas être le principal responsable des différences sexuelles observées au niveau du cœur en réponse à la régurgitation de la valve aortique chez le rat. Considérant l'important dimorphisme sexuel dans l'HC, les traitements utilisés en clinique n'ont possiblement pas le même effet chez les deux sexes. En effet, nous avons montré que la réponse hypertrophique était modifiée par un inhibiteur du récepteur 1 à l'angiotensine II, le valsartan, chez les femelles RA seulement. Il semble que le RAAS, activé en réponse à la surcharge de volume, soit nécessaire à l'adaptation hypertrophique du cœur féminin en phase précoce de la RA. Finalement, nous avons montré dans l'étude s'intéressant aux changements morphologiques et fonctionnels chez les deux sexes en réponse à la régurgitation de la valve aortique que le VG des femelles réduisait rapidement sa capacité de déformation en circonférentiel, sa fraction d'éjection et qu'il perdait sa forme elliptique.

Les résultats présentés dans ce mémoire montrent l'importance des différences sexuelles en hypertrophie cardiaque. Les réponses du cœur sont influencées par le sexe biologique, les hormones sexuelles, le genre et les habitudes de vie. L'étude des deux sexes dans les maladies cardiovasculaires est essentielle à la compréhension de l'évolution des mécanismes pathologiques et l'inclusion du sexe féminin dans toutes les études améliorera la prise en charge des femmes en clinique. Notre meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans l'HC et le développement de thérapies ciblées et personnalisées permet de croire que ces dernières seront plus efficaces et qu'elles pourront retarder ou empêcher la progression de l'HC vers l'IC.

Bibliographie

1. Tortora, G. J. & Derrickson, B. *Principes d'anatomie et de physiologie*, 2e ed. (2007).
2. Kobirumaki-Shimozawa, F. *et al.* Cardiac thin filament regulation and the Frank–Starling mechanism. *J. Physiol. Sci.* **64**, 221–232 (2014).
3. Katz, A. M. *Physiology of the Heart*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2010).
4. Fabiato, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* **245**, C1-14 (1983).
5. Tobacman, L. S. Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 447–481 (1996).
6. Ahlquist, R. P. A study of adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.-Leg. Content* **153**, 586–600 (1948).
7. Lands, A. M., Arnold, A., Mcauliff, J. P., Luduena, F. P. & Brown, T. G. Differentiation of Receptor Systems activated by Sympathomimetic Amines. *Nature* **214**, 597–598 (1967).
8. Hoffman, B. B. & Lefkowitz, R. J. Alpha-adrenergic receptor subtypes. *N. Engl. J. Med.* **302**, 1390–1396 (1980).
9. Lymeropoulos, A., Rengo, G. & Koch, W. J. Adrenergic Nervous System in Heart Failure: Pathophysiology and Therapy. *Circ. Res.* **113**, 739–753 (2013).
10. Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D. L., Jaswal, J. S. & Stanley, W. C. Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **90**, 207–258 (2010).
11. Kuang, M., Febbraio, M., Wagg, C., Lopaschuk, G. D. & Dyck, J. R. B. Fatty Acid Translocase/CD36 Deficiency Does Not Energetically or Functionally Compromise Hearts Before or After Ischemia. *Circulation* **109**, 1550–1557 (2004).
12. Houten, S. M. & Wanders, R. J. A. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J. Inherit. Metab. Dis.* **33**, 469–477 (2010).
13. Shao, D. & Tian, R. Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy. *Compr. Physiol.* **6**, 331–351 (2015).
14. Frohnert, B. I., Hui, T. Y. & Bernlohr, D. A. Identification of a Functional Peroxisome Proliferator-responsive Element in the Murine Fatty Acid Transport Protein Gene. *J. Biol. Chem.* **274**, 3970–3977 (1999).
15. Martin, G. *et al.* Induction of the Fatty Acid Transport Protein 1 and Acyl-CoA Synthase Genes by Dimer-selective Retinoids Suggests That the Peroxisome Proliferator-activated Receptor-Retinoid X Receptor Heterodimer Is Their Molecular Target. *J. Biol. Chem.* **275**, 12612–12618 (2000).
16. Djouadi, F., Brandt, J. M. & Weinheimer, C. J. The role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in the control of cardiac lipid metabolism. *5* (1999).

17. Vega, R. B., Huss, J. M. & Kelly, D. P. The Coactivator PGC-1 Cooperates with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in Transcriptional Control of Nuclear Genes Encoding Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Enzymes. *Cell Metab.* **20**, 9 (2000).
18. Arany, Z. *et al.* Transcriptional coactivator PGC-1 α controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab.* **1**, 259–271 (2005).
19. Luczak, E. D. & Leinwand, L. A. Sex-Based Cardiac Physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 1–18 (2009).
20. Nakagawa, M. *et al.* Gender Differences in Autonomic Modulation of Ventricular Repolarization in Humans. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **16**, 278–284 (2005).
21. Leinwand, L. A. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J. Clin. Invest.* **112**, 302–307 (2003).
22. Peterson, L. *et al.* Sex differences in myocardial oxygen and glucose metabolism. *J. Nucl. Cardiol.* **14**, 573–581 (2007).
23. Blenck, C. L., Harvey, P. A., Reckelhoff, J. F. & Leinwand, L. A. The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease. *Circ. Res.* **118**, 1294–1312 (2016).
24. Swynghedauw, B. Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. *Phys Rev* **79**, 48 (1999).
25. Fazal, L. *et al.* Effects of biological sex on the pathophysiology of the heart: Sex differences in cardiac pathophysiology. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 555–566 (2014).
26. Balaton, B. P. & Brown, C. J. Escape Artists of the X Chromosome. *Trends Genet.* **32**, 348–359 (2016).
27. Eggers, S., Ohnesorg, T. & Sinclair, A. Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 673–683 (2014).
28. Arnold, A. P., Cassis, L. A., Eghbali, M., Reue, K. & Sandberg, K. Sex Hormones and Sex Chromosomes Cause Sex Differences in the Development of Cardiovascular Diseases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, 746–756 (2017).
29. Mahmoodzadeh, S., Fliegner, D. & Dworatzek, E. Sex differences in animal models for cardiovascular diseases and the role of estrogen. *Handb. Exp. Pharmacol.* 23–48 (2012) doi:10.1007/978-3-642-30726-3_2.
30. Stocco, C. Tissue physiology and pathology of aromatase. *Steroids* **77**, 27–35 (2012).
31. Ventura-Clapier, R. *et al.* Sex in basic research: concepts in the cardiovascular field. *Cardiovasc. Res.* **113**, 711–724 (2017).
32. Knowlton, A. A. & Lee, A. R. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol. Ther.* **135**, 54–70 (2012).
33. Bishopric, N. Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**, 141–150 (2001).
34. Pugazhenthi, S. *et al.* Akt/Protein Kinase B Up-regulates Bcl-2 Expression through cAMP-response Element-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 10761–10766 (2000).

35. Stice, J. P. *et al.* 17 β -Estradiol, Aging, Inflammation, and the Stress Response in the Female Heart. *Endocrinology* **152**, 1589–1598 (2011).
36. Rouet-Benzineb, P., Merval, R. & Polidano, E. Effects of hypoestrogenism and/or hyperaldosteronism on myocardial remodeling in female mice. *Physiol. Rep.* **6**, e13912 (2018).
37. Miller, V. M. & Duckles, S. P. Vascular Actions of Estrogens: Functional Implications. *Pharmacol. Rev.* **60**, 210–241 (2008).
38. Barnabas, O., Wang, H. & Gao, X.-M. Role of estrogen in angiogenesis in cardiovascular diseases. *J. Geriatr. Cardiol. JGC* **10**, 377–382 (2013).
39. Knowlton, A. A. & Korzick, D. H. Estrogen and the female heart. *Mol. Cell. Endocrinol.* **389**, 31–39 (2014).
40. Deschamps, A. M. & Murphy, E. Activation of a novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **297**, H1806–H1813 (2009).
41. Lindsey, S. H., Carver, K. A., Prossnitz, E. R. & Chappell, M. C. Vasodilation in Response to the GPR30 Agonist G-1 is Not Different From Estradiol in the mRen2.Lewis Female Rat: *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **57**, 598–603 (2011).
42. Luo, T. & Kim, J. K. The Role of Estrogen and Estrogen Receptors on Cardiomyocytes: An Overview. *Can. J. Cardiol.* **32**, 1017–1025 (2016).
43. Rossmanith, W. G. *et al.* Pulsatile Cosecretion of Estradiol and Progesterone by the Midluteal Phase Corpus Luteum: Temporal Link to Luteinizing Hormone Pulses*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**, 990–995 (1990).
44. Gardner, D. G. & Shoback, D. *Greenspan's basic & clinical endocrinology* 9th ed. (2011).
45. Benjamin, E. J. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **139**, e56–e528 (2019).
46. Pelzer, T. *et al.* 17 β -Estradiol Prevents Programmed Cell Death in Cardiac Myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 192–200 (2000).
47. Pelzer, T., Neumann, M., de Jager, T., Jazbutyte, V. & Neyses, L. Estrogen Effects in the Myocardium: Inhibition of NF- κ B DNA Binding by Estrogen Receptor- α and - β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 1153–1157 (2001).
48. Camper-Kirby, D. *et al.* Myocardial Akt Activation and Gender: Increased Nuclear Activity in Females Versus Males. *Circ. Res.* **88**, 1020–1027 (2001).
49. Wu, C.-H. *et al.* 17 β -Estradiol reduces cardiac hypertrophy mediated through the up-regulation of PI3K/Akt and the suppression of calcineurin/NF-AT3 signaling pathways in rats. *Life Sci.* **78**, 347–356 (2005).
50. Patten, R. D. *et al.* 17 β -Estradiol Reduces Cardiomyocyte Apoptosis In Vivo and In Vitro via Activation of Phospho-Inositide-3 Kinase/Akt Signaling. *Circ. Res.* **95**, 692–699 (2004).
51. Liou, C.-M. *et al.* Effects of 17beta-estradiol on cardiac apoptosis in ovariectomized rats. *Cell Biochem. Funct.* **28**, 521–528 (2010).

52. Lin, Y.-Y. *et al.* Combined effects of 17 β -estradiol and exercise training on cardiac apoptosis in ovariectomized rats. *PLOS ONE* **13**, e0208633 (2018).
53. Rosselli, M., Imthurn, B., Macas, E., Keller, P. J. & Dubey, R. K. Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated NO release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 1543–1552 (1994).
54. Rees, D. D., Palmer, R. M. & Moncada, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 3375–3378 (1989).
55. Moncada, S. & Higgs, E. A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* **9**, 1319–1330 (1995).
56. Nuedling, S. *et al.* Activation of estrogen receptor β is a prerequisite for estrogen-dependent upregulation of nitric oxide synthases in neonatal rat cardiac myocytes. *FEBS Lett.* **502**, 103–108 (2001).
57. Rahimian, R., Chan, L., Goel, A., Poburko, D. & van Breemen, C. Estrogen modulation of endothelium-derived relaxing factors by human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 373–379 (2004).
58. Russell, K. S., Haynes, M. P., Sinha, D., Clerisme, E. & Bender, J. R. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 5930–5935 (2000).
59. Rubanyi, G. M., Johns, A. & Kauser, K. Effect of estrogen on endothelial function and angiogenesis. *Vascul. Pharmacol.* **38**, 89–98 (2002).
60. Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L. & McMullen, J. R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol. Ther.* **128**, 191–227 (2010).
61. Ardel, A. A. *et al.* Estradiol Regulates Angiopoietin-1 mRNA Expression Through Estrogen Receptor- α in a Rodent Experimental Stroke Model. *Stroke* **36**, 337–341 (2005).
62. Chen, Y. *et al.* 17 β -estradiol prevents cardiac diastolic dysfunction by stimulating mitochondrial function: A preclinical study in a mouse model of a human hypertrophic cardiomyopathy mutation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **147**, 92–102 (2015).
63. Rossouw, J. E. *et al.* Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* **288**, 321–333 (2002).
64. Grady, D. *et al.* Cardiovascular Disease Outcomes During 6.8 Years of Hormone Therapy: Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study Follow-up (HERS II). *JAMA* **288**, 49 (2002).
65. Manson, J. E., Assaf, A. R., Heckbert, S. R. & Crouse, J. R. Estrogen plus Progestin and the Risk of Coronary Heart Disease. *N. Engl. J. Med.* **348**, 12 (2003).
66. Harman, S. M. *et al.* Arterial Imaging Outcomes and Cardiovascular Risk Factors in Recently Menopausal Women: A Randomized Trial. *Ann. Intern. Med.* **161**, 249 (2014).
67. Hodis, H. N. *et al.* Vascular Effects of Early versus Late Postmenopausal Treatment with Estradiol. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1221–1231 (2016).

68. Marsh, J. D. *et al.* Androgen Receptors Mediate Hypertrophy in Cardiac Myocytes. *Circulation* **98**, 256–261 (1998).
69. Azzouni, F. & Mohler, J. Role of 5 α -Reductase Inhibitors in Prostate Cancer Prevention and Treatment. *Urology* **79**, 1197–1205 (2012).
70. van Weerden, W. M., Bierings, H. G., Van Steenbrugge, G. J., De Jong, F. H. & Schröder, F. H. Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci.* **50**, 857–861 (1992).
71. McGill, H. C. & Sheridan, P. J. Nuclear uptake of sex steroid hormones in the cardiovascular system of the baboon. *Circ. Res.* **48**, 238–244 (1981).
72. Du, X.-J., Fang, L. & Kiriazis, H. Sex dimorphism in cardiac pathophysiology: Experimental findings, hormonal mechanisms, and molecular mechanisms. *Pharmacol. Ther.* **111**, 434–475 (2006).
73. Drolet, M.-C. *et al.* Blockade of the acute activation of mTOR complex 1 decreases hypertrophy development in rats with severe aortic valve regurgitation. *SpringerPlus* **4**, (2015).
74. Duran, J. *et al.* GSK-3 β /NFAT Signaling Is Involved in Testosterone-Induced Cardiac Myocyte Hypertrophy. *PLOS ONE* **11**, e0168255 (2016).
75. Froese, N. *et al.* Anti-androgenic therapy with finasteride improves cardiac function, attenuates remodeling and reverts pathologic gene-expression after myocardial infarction in mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **122**, 114–124 (2018).
76. Zwadlo, C. *et al.* Antiandrogenic Therapy With Finasteride Attenuates Cardiac Hypertrophy and Left Ventricular Dysfunction. *Circulation* **131**, 1071–1081 (2015).
77. LeGros, T. *et al.* The effects of 17 β -methyltestosterone on myocardial function in vitro: *Med. Sci. Sports Exerc.* 897–903 (2000) doi:10.1097/00005768-200005000-00004.
78. Wilson, C. *et al.* Testosterone increases GLUT4-dependent glucose uptake in cardiomyocytes: TESTOSTERONE REGULATES GLUCOSE UPTAKE. *J. Cell. Physiol.* **228**, 2399–2407 (2013).
79. Koenig, H., Fan, C. C., Goldstone, A. D., Lu, C. Y. & Trout, J. J. Polyamines mediate androgenic stimulation of calcium fluxes and membrane transport in rat heart myocytes. *Circ. Res.* **64**, 415–426 (1989).
80. Vicencio, J. M. *et al.* Testosterone Induces an Intracellular Calcium Increase by a Nongenomic Mechanism in Cultured Rat Cardiac Myocytes. *Endocrinology* **147**, 1386–1395 (2006).
81. Thum, T. & Borlak, J. Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *FASEB J.* **16**, 1537–1549 (2002).
82. Goodale, T. Testosterone and the heart. 5 (2017).
83. Hwang, K. & Miner, M. Controversies in testosterone replacement therapy: testosterone and cardiovascular disease. *Asian J. Androl.* **17**, 187 (2015).
84. Morgentaler, A. *et al.* Fundamental Concepts Regarding Testosterone Deficiency and Treatment. *Mayo Clin. Proc.* **91**, 881–896 (2016).

85. Nakamura, M. & Sadoshima, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 387–407 (2018).
86. Dahri, W., Drolet, M.-C., Roussel, E., Couet, J. & Arsenault, M. Chronic high-fat diet-induced obesity decreased survival and increased hypertrophy of rats with experimental eccentric hypertrophy from chronic aortic regurgitation. *BMC Cardiovasc. Disord.* **14**, (2014).
87. Arsenault, M. *et al.* Angiotensin II-Converting Enzyme Inhibition Improves Survival, Ventricular Remodeling, and Myocardial Energetics in Experimental Aortic Regurgitation. *Circ. Heart Fail.* **6**, 1021–1028 (2013).
88. Lachance, D. *et al.* Endurance training or beta-blockade can partially block the energy metabolism remodeling taking place in experimental chronic left ventricle volume overload. *BMC Cardiovasc. Disord.* **14**, (2014).
89. Gardner, J. D., Brower, G. L. & Janicki, J. S. Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload. *J. Card. Fail.* **8**, 101–107 (2002).
90. Lindman, B. R. *et al.* Calcific aortic stenosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**, (2016).
91. Akinseye, O. A., Pathak, A. & Ibebuogu, U. N. Aortic Valve Regurgitation: A Comprehensive Review. *Curr. Probl. Cardiol.* **43**, 315–334 (2018).
92. Singh, J. P. *et al.* Prevalence and clinical determinants of mitral, tricuspid, and aortic regurgitation (the Framingham Heart Study). *Am. J. Cardiol.* **83**, 897–902 (1999).
93. Nkomo, V. T. *et al.* Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *The Lancet* **368**, 1005–1011 (2006).
94. Bitar, F. F. *et al.* Rheumatic Fever in Children: A 15-Year Experience in a Developing Country. *Pediatr. Cardiol.* **21**, 119–122 (2000).
95. Schaffer, W. L. *et al.* Prevalence and correlates of rheumatic heart disease in American Indians (The Strong Heart Study)**This study presents views of the authors and not necessarily those of the Indian Health Service. *Am. J. Cardiol.* **91**, 1379–1382 (2003).
96. Pibarot, P., Hahn, R. T., Weissman, N. J. & Monaghan, M. J. Assessment of Paravalvular Regurgitation Following TAVR. *JACC Cardiovasc. Imaging* **8**, 340–360 (2015).
97. Nishimura, R. A. *et al.* 2017 AHA/ACC Focused Update of the 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* **135**, (2017).
98. Bonow, R. O. *et al.* Reversal of left ventricular dysfunction after aortic valve replacement for chronic aortic regurgitation: influence of duration of preoperative left ventricular dysfunction. *Circulation* **70**, 570–579 (1984).
99. Huffman, M. D. *et al.* Lifetime Risk for Heart Failure Among White and Black Americans. *J. Am. Coll. Cardiol.* **61**, 1510–1517 (2013).
100. Loehr, L. R., Rosamond, W. D., Chang, P. P., Folsom, A. R. & Chambliss, L. E. Heart Failure Incidence and Survival (from the Atherosclerosis Risk in Communities Study). *Am. J. Cardiol.* **101**, 1016–1022 (2008).

101. Burchfield, J. S., Xie, M. & Hill, J. A. Pathological Ventricular Remodeling: Mechanisms: Part 1 of 2. *Circulation* **128**, 388–400 (2013).
102. Lorell, B. H. & Carabello, B. A. Left Ventricular Hypertrophy: Pathogenesis, Detection, and Prognosis. *Circulation* **102**, 470–479 (2000).
103. Shioi, T. *et al.* Rapamycin Attenuates Load-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice. *Circulation* **107**, 1664–1670 (2003).
104. Hudlicka, O., Brown, M. & Egginton, S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *72*, 49.
105. Semenza, G. L. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Cardiovascular Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **76**, 39–56 (2014).
106. Sano, M. *et al.* p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* **446**, 444–448 (2007).
107. Roussel, E. *et al.* Transcriptional Changes Associated with Long-Term Left Ventricle Volume Overload in Rats: Impact on Enzymes Related to Myocardial Energy Metabolism. *BioMed Res. Int.* **2015**, 1–15 (2015).
108. Zendaoui, A., Lachance, D., Roussel, É., Couet, J. & Arsenault, M. Usefulness of Carvedilol in the Treatment of Chronic Aortic Valve Regurgitation. *Circ. Heart Fail.* **4**, 207–213 (2011).
109. Borer, J. S. *et al.* Myocardial Fibrosis in Chronic Aortic Regurgitation: Molecular and Cellular Responses to Volume Overload. *Circulation* **105**, 1837–1842 (2002).
110. Weidemann, F. *et al.* Impact of Myocardial Fibrosis in Patients With Symptomatic Severe Aortic Stenosis. *Circulation* **120**, 577–584 (2009).
111. Kong, P., Christia, P. & Frangogiannis, N. G. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 549–574 (2014).
112. Palmer, B. M. Thick Filament Proteins and Performance in Human Heart Failure. *Heart Fail. Rev.* **10**, 187–197 (2005).
113. Tuomainen, T. & Tavi, P. The role of cardiac energy metabolism in cardiac hypertrophy and failure. *Exp. Cell Res.* **360**, 12–18 (2017).
114. Pascual, F. & Coleman, R. A. Fuel availability and fate in cardiac metabolism: A tale of two substrates. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1861**, 1425–1433 (2016).
115. Liaudet, L., Calderari, B. & Pacher, P. Pathophysiological mechanisms of catecholamine and cocaine-mediated cardiotoxicity. *Heart Fail. Rev.* **19**, 815–824 (2014).
116. Osadchii, O. E., Norton, G. R., McKechnie, R., Deftereos, D. & Woodiwiss, A. J. Cardiac dilatation and pump dysfunction without intrinsic myocardial systolic failure following chronic β -adrenoreceptor activation. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **292**, H1898–H1905 (2007).
117. Schmieder, R. Mechanisms for the Clinical Benefits of Angiotensin II Receptor Blockers. *Am. J. Hypertens.* **18**, 720–730 (2005).

118. Hartupee, J. & Mann, D. L. Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat. Rev. Cardiol.* **14**, 30–38 (2017).
119. Orsborne, C., Chaggar, P. S., Shaw, S. M. & Williams, S. G. The renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure for the non-specialist: the past, the present and the future. *Postgrad. Med. J.* **93**, 29–37 (2017).
120. Silva-Antonialli, M. A lower ratio of AT1/AT2 receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* **62**, 587–593 (2004).
121. Griendling, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D. & Alexander, R. W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **74**, 1141–1148 (1994).
122. Kusaka, H. *et al.* LCZ696, Angiotensin II Receptor-Neprilysin Inhibitor, Ameliorates High-Salt-Induced Hypertension and Cardiovascular Injury More Than Valsartan Alone. *Am. J. Hypertens.* **28**, 1409–1417 (2015).
123. Tsutamoto, T. *et al.* Possibility of downregulation of atrial natriuretic peptide receptor coupled to guanylate cyclase in peripheral vascular beds of patients with chronic severe heart failure. *Circulation* **87**, 70–75 (1993).
124. Forfia, P. R. *et al.* Acute Phosphodiesterase 5 Inhibition Mimics Hemodynamic Effects of B-Type Natriuretic Peptide and Potentiates B-Type Natriuretic Peptide Effects in Failing But Not Normal Canine Heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 1079–1088 (2007).
125. Potter, L. R. & Garbers, D. L. Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. *J. Biol. Chem.* **267**, 14531–14534 (1992).
126. Baerts, L., Gomez, N., Vanderheyden, M., De Meester, I. & Mc Entee, K. Possible mechanisms for brain natriuretic peptide resistance in heart failure with a focus on interspecies differences and canine BNP biology. *Vet. J.* **194**, 34–39 (2012).
127. Niederkofler, E. E. *et al.* Detection of endogenous B-type natriuretic peptide at very low concentrations in patients with heart failure. *Circ. Heart Fail.* **1**, 258–264 (2008).
128. Chen, H. H. Heart Failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 1089–1091 (2007).
129. Ni, X.-P. Increased Activity of cGMP-Specific Phosphodiesterase (PDE5) Contributes to Resistance to Atrial Natriuretic Peptide Natriuresis in the Pregnant Rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1254–1260 (2004).
130. Krum, H. Beta-blockers in chronic heart failure: What have we learned? What do we still need to know? *Curr. Opin. Pharmacol.* **3**, 168–174 (2003).
131. Eichhorn, E. J. *et al.* Effect of metoprolol on myocardial function and energetics in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **24**, 1310–1320 (1994).
132. Olsen, S. L. *et al.* Carvedilol improves left ventricular function and symptoms in chronic heart failure: A double-blind randomized study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **25**, 1225–1231 (1995).

133. Krum, H. *et al.* Double-blind, placebo-controlled study of the long-term efficacy of carvedilol in patients with severe chronic heart failure. *Circulation* **92**, 1499–1506 (1995).
134. Waagstein, F., Hjalmarson, A., Varnauskas, E. & Wallentin, I. Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy. *Heart* **37**, 1022–1036 (1975).
135. The Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group. 3-year follow-up of patients randomised in the metoprolol in dilated cardiomyopathy trial. *Lancet Lond. Engl.* **351**, 1180–1181 (1998).
136. Australia/New Zealand Heart Failure Research Collaborative Group. Randomised, placebo-controlled trial of carvedilol in patients with congestive heart failure due to ischaemic heart disease. *Lancet Lond. Engl.* **349**, 375–380 (1997).
137. Plante, E. *et al.* Effectiveness of β -Blockade in Experimental Chronic Aortic Regurgitation. *Circulation* **110**, 1477–1483 (2004).
138. Champetier, S. *et al.* Gene profiling of left ventricle eccentric hypertrophy in aortic regurgitation in rats: rationale for targeting the α_1 -adrenergic and renin-angiotensin systems. *296*, 10 (2009).
139. Plante, E., Lachance, D., Champetier, S., Drolet, M.-C. & Couet, J. Benefits of long-term beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation. *294*, 9 (2008).
140. Thürmann, P. A. Angiotensin II antagonism and the heart: valsartan in left ventricular hypertrophy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **33 Suppl 1**, S33-36; discussion S41-43 (1999).
141. Okin, P. M. *et al.* Regression of Electrocardiographic Left Ventricular Hypertrophy by Losartan Versus Atenolol: The Losartan Intervention For Endpoint Reduction in Hypertension (LIFE) Study. *Circulation* **108**, 684–690 (2003).
142. Plante, E. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents volume overload cardiomyopathy in experimental chronic aortic valve regurgitation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **82**, 191–199 (2004).
143. Kawamura, M., Imanashi, M., Matsushima, Y., Ito, K. & Hiramori, K. CIRCULATING ANGIOTENSIN II LEVELS UNDER REPEATED ADMINISTRATION OF LISINOPRIL IN NORMAL SUBJECTS. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **19**, 547–553 (1992).
144. Jorde, U. P. *et al.* Maximally Recommended Doses of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitors Do Not Completely Prevent ACE-Mediated Formation of Angiotensin II in Chronic Heart Failure. *Circulation* **101**, 844–846 (2000).
145. Wolny, A. *et al.* Functional and Biochemical Analysis of Angiotensin II-Forming Pathways in the Human Heart. *Circ. Res.* **80**, 219–227 (1997).
146. Urata, H., Healy, B., Stewart, R. W., Bumpus, F. M. & Husain, A. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ. Res.* **66**, 883–890 (1990).

147. Kinoshita, A., Urata, H., Bumpus, F. M. & Husain, A. Multiple determinants for the high substrate specificity of an angiotensin II-forming chymase from the human heart. *J. Biol. Chem.* **266**, 19192–19197 (1991).
148. Cohn, J. N. A Randomized Trial of the Angiotensin-Receptor Blocker Valsartan in Chronic Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **344**, 9 (2001).
149. Pitt, B. *et al.* Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial—the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *The Lancet* **355**, 1582–1587 (2000).
150. Mistry, N. B., Westheim, A. S. & Kjeldsen, S. E. The angiotensin receptor antagonist valsartan: a review of the literature with a focus on clinical trials. *Expert Opin. Pharmacother.* **7**, 575–581 (2006).
151. Plante, E. *et al.* Comparative Study of Vasodilators in an Animal Model of Chronic Volume Overload Caused by Severe Aortic Regurgitation. *Circ. Heart Fail.* **2**, 25–32 (2009).
152. McMurray, J. J. V. *et al.* Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N. Engl. J. Med.* **371**, 993–1004 (2014).
153. Packer, M. *et al.* Angiotensin receptor neprilysin inhibition compared with enalapril on the risk of clinical progression in surviving patients with heart failure. *Circulation* **131**, 54–61 (2015).
154. Singh, J. S. S. *et al.* Sacubitril/valsartan: beyond natriuretic peptides. *Heart* **103**, 1569–1577 (2017).
155. Mione, M. C., Ralevic, V. & Burnstock, G. Peptides and vasomotor mechanisms. *Pharmacol. Ther.* **46**, 429–468 (1990).
156. Trivedi, R. K. *et al.* Combined Angiotensin Receptor–Neprilysin Inhibitors Improve Cardiac and Vascular Function Via Increased NO Bioavailability in Heart Failure. *J. Am. Heart Assoc.* **7**, e013222 (2018).
157. McMullen, J. R. *et al.* Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110 β) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 612–617 (2007).
158. Lachance, D. *et al.* Effects of Exercise in Volume Overload: Insights from a Model of Aortic Regurgitation. *Med. Sci. Sports Exerc.* **41**, 1230–1238 (2009).
159. Lachance, D. *et al.* Moderate Exercise Training Improves Survival and Ventricular Remodeling in an Animal Model of Left Ventricular Volume Overload. *Circ. Heart Fail.* **2**, 437–445 (2009).
160. Lerner, D. J. & Kannel, W. B. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: A 26-year follow-up of the Framingham population. *Am. Heart J.* **111**, 383–390 (1986).
161. Regitz-Zagrosek, V. & Seeland, U. Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. *Wien. Med. Wochenschr.* **161**, 109–116 (2011).

162. Bell, J. R., Bernasochi, G. B., Varma, U., Raaijmakers, A. J. A. & Delbridge, L. M. D. Sex and sex hormones in cardiac stress—Mechanistic insights. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **137**, 124–135 (2013).
163. Beale, A. L., Meyer, P., Marwick, T. H., Lam, C. S. P. & Kaye, D. M. Sex Differences in Cardiovascular Pathophysiology: Why Women Are Overrepresented in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation* **138**, 198–205 (2018).
164. Dewan, P. *et al.* Differential Impact of Heart Failure With Reduced Ejection Fraction on Men and Women. *J. Am. Coll. Cardiol.* **73**, 29–40 (2019).
165. Aurigemma, G. P. & Gaasch, W. H. Gender Differences in Older Patients with Pressure-Overload Hypertrophy of the Left Ventricle. *Cardiology* **86**, 310–317 (1995).
166. Cifkova, R., Pitha, J., Krajcoviechova, A. & Kralikova, E. Is the impact of conventional risk factors the same in men and women? Plea for a more gender-specific approach. *Int. J. Cardiol.* (2019) doi:10.1016/j.ijcard.2019.01.039.
167. Garcia, M., Mulvagh, S. L., Merz, C. N. B., Buring, J. E. & Manson, J. E. Cardiovascular Disease in Women: Clinical Perspectives. *Circ. Res.* **118**, 1273–1293 (2016).
168. Treibel, T. A. *et al.* Sex Dimorphism in the Myocardial Response to Aortic Stenosis. *JACC Cardiovasc. Imaging* **11**, 962–973 (2018).
169. Regitz-Zagrosek, V., Oertelt-Prigione, S., Seeland, U. & Hetzer, R. Sex and Gender Differences in Myocardial Hypertrophy and Heart Failure. *Circ. J.* **74**, 1265–1273 (2010).
170. Melchiorre, K., Sharma, R. & Thilaganathan, B. Cardiac structure and function in normal pregnancy: *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **24**, 413–421 (2012).
171. Eghbali, M., Wang, Y., Toro, L. & Stefani, E. Heart Hypertrophy During Pregnancy: A Better Functioning Heart? *Trends Cardiovasc. Med.* **16**, 285–291 (2006).
172. Sanghani, M. & Rutherford, J. D. Cardiovascular Physiology of Pregnancy. *Circulation* **130**, 1003–1008 (2014).
173. Foryst-Ludwig, A. & Kintscher, U. Sex differences in exercise-induced cardiac hypertrophy. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **465**, 731–737 (2013).
174. Maric-Bilkan, C. *et al.* Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group on Sex Differences Research in Cardiovascular Disease: Scientific Questions and Challenges. *Hypertension* **67**, 802–807 (2016).
175. Kararigas, G. *et al.* Sex-dependent regulation of fibrosis and inflammation in human left ventricular remodelling under pressure overload: Sex-specific LV gene regulation in pressure overload. *Eur. J. Heart Fail.* **16**, 1160–1167 (2014).
176. Toyofuku, M. *et al.* Sex Differences in Severe Aortic Stenosis — Clinical Presentation and Mortality —. *Circ. J.* **81**, 1213–1221 (2017).
177. Fliegner, D. *et al.* Female sex and estrogen receptor- β attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**, R1597–R1606 (2010).

178. Douglas, P. S. *et al.* Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**, 1118–1125 (1998).
179. Witt, H. *et al.* Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice. *J. Mol. Med.* **86**, 1013–1024 (2008).
180. Weinberg, E. O. *et al.* Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **34**, 264–273 (1999).
181. Gardner, J. D., Brower, G. L. & Janicki, J. S. Effects of dietary phytoestrogens on cardiac remodeling secondary to chronic volume overload in female rats. *J. Appl. Physiol.* **99**, 1378–1383 (2005).
182. Dent, M. R., Tappia, P. S. & Dhalla, N. S. Gender Differences in Cardiac Dysfunction and Remodeling due to Volume Overload. *J. Card. Fail.* **16**, 439–449 (2010).
183. Drolet, M.-C., Lachance, D., Plante, E., Roussel, E. & Couet, J. Gender-Related Differences in Left Ventricular Remodeling in Chronic Severe Aortic Valve Regurgitation in Rats. *J Heart Valve Dis* **15**, 7 (2006).
184. Beaumont, C. *et al.* Female rats with severe left ventricle volume overload exhibit more cardiac hypertrophy but fewer myocardial transcriptional changes than males. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
185. Muka, T. *et al.* Association of Age at Onset of Menopause and Time Since Onset of Menopause With Cardiovascular Outcomes, Intermediate Vascular Traits, and All-Cause Mortality: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Cardiol.* **1**, 767–776 (2016).
186. Lagranha, C. J., Deschamps, A., Aponte, A., Steenbergen, C. & Murphy, E. Sex Differences in the Phosphorylation of Mitochondrial Proteins Result in Reduced Production of Reactive Oxygen Species and Cardioprotection in Females. *Circ. Res.* **106**, 1681–1691 (2010).
187. Iorga, A. *et al.* Rescue of Pressure Overload-Induced Heart Failure by Estrogen Therapy. *J. Am. Heart Assoc.* **5**, (2016).
188. Gardner, J. D. *et al.* Estrogen attenuates chronic volume overload induced structural and functional remodeling in male rat hearts. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **298**, H497–H504 (2010).
189. Brower, G. L., Gardner, J. D. & Janicki, J. S. Gender mediated cardiac protection from adverse ventricular remodeling is abolished by ovariectomy. *Mol. Cell. Biochem.* **251**, 89–95 (2003).
190. Skavdahl, M. *et al.* Estrogen receptor- β mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **288**, H469–H476 (2005).
191. Babiker, F. A. *et al.* Estrogen Receptor β Protects the Murine Heart Against Left Ventricular Hypertrophy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1524–1530 (2006).
192. Pedram, A. *et al.* Estrogen Inhibits Cardiac Hypertrophy: Role of Estrogen Receptor- β to Inhibit Calcineurin. *Endocrinology* **149**, 3361–3369 (2008).

193. Mishra, J. S., More, A. S., Gopalakrishnan, K. & Kumar, S. Testosterone plays a permissive role in angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy in male rats†. *Biol. Reprod.* (2018) doi:10.1093/biolre/oyy179.
194. Montalvo, C. et al. Androgens Contribute to Sex Differences in Myocardial Remodeling under Pressure Overload by a Mechanism Involving TGF- β . *PLoS ONE* **7**, e35635 (2012).
195. Song, J., Kost, C. K. & Martin, D. S. Androgens augment renal vascular responses to ANG II in New Zealand genetically hypertensive rats. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**, R1608–R1615 (2006).
196. Xue, B., Pamidimukkala, J. & Hay, M. Sex differences in the development of angiotensin II-induced hypertension in conscious mice. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **288**, H2177–H2184 (2005).
197. Sullivan, J. C., Bhatia, K., Yamamoto, T. & Elmarakby, A. A. Angiotensin (1-7) Receptor Antagonism Equalizes Angiotensin II-Induced Hypertension in Male and Female Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* **56**, 658–666 (2010).
198. Fischer, M. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* **53**, 672–677 (2002).
199. Freshour, J. R., Chase, S. E. & Vikstrom, K. L. Gender differences in cardiac ACE expression are normalized in androgen-deprived male mice. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **283**, H1997–H2003 (2002).
200. Liu, P. Y., Death, A. K. & Handelsman, D. J. Androgens and Cardiovascular Disease. *Endocr. Rev.* **24**, 313–340 (2003).
201. Baggish, A. L. et al. Long-Term Anabolic-Androgenic Steroid Use Is Associated With Left Ventricular Dysfunction. *Circ. Heart Fail.* **3**, 472–476 (2010).
202. Sachtleben, T. R. et al. The effects of anabolic steroids on myocardial structure and cardiovascular fitness. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25**, 1240–1245 (1993).
203. Collier, A., Ghosh, S., McGlynn, B. & Hollins, G. Prostate Cancer, Androgen Deprivation Therapy, Obesity, the Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes, and Cardiovascular Disease: A Review. *Am. J. Clin. Oncol.* **35**, 504–509 (2012).
204. Huang, C.-K., Lee, S. O., Chang, E., Pang, H. & Chang, C. Androgen receptor (AR) in cardiovascular diseases. *J. Endocrinol.* **229**, R1–R16 (2016).
205. Araujo, A. B. et al. Endogenous Testosterone and Mortality in Men: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 3007–3019 (2011).
206. Ruige, J. B., Mahmoud, A. M., De Bacquer, D. & Kaufman, J.-M. Endogenous testosterone and cardiovascular disease in healthy men: a meta-analysis. *Heart* **97**, 870–875 (2011).
207. Rubio-Gayosso, I. et al. Testosterone metabolites mediate its effects on myocardial damage induced by ischemia/reperfusion in male Wistar rats. *Steroids* **78**, 362–369 (2013).
208. Arsenault, M., Plante, E., Drolet, M.-C. & Couet, J. Experimental aortic regurgitation in rats under echocardiographic guidance. *J. Heart Valve Dis.* **11**, 128–134 (2002).

209. Levy, D., Garrison, R. J., Savage, D. D., Kannel, W. B. & Castelli, W. P. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N. Engl. J. Med.* **322**, 1561–1566 (1990).
210. Dent, M. R., Tappia, P. S. & Dhalla, N. S. Gender related alterations of β -adrenoceptor mechanisms in heart failure due to arteriovenous fistula. *J. Cell. Physiol.* **227**, 3080–3087 (2012).
211. Dent, M. R., Tappia, P. S. & Dhalla, N. S. Gender differences in apoptotic signaling in heart failure due to volume overload. *Apoptosis* **15**, 499–510 (2010).
212. Tayyareci, Y., Yildirimturk, O., Aytekin, V., Demiroglu, I. C. C. & Aytekin, S. Subclinical Left Ventricular Dysfunction in Asymptomatic Severe Aortic Regurgitation Patients with Normal Ejection Fraction: A Combined Tissue Doppler and Velocity Vector Imaging Study. *Echocardiography* **27**, 260–268 (2010).
213. Marciniaik, A. *et al.* Myocardial deformation abnormalities in patients with aortic regurgitation: a strain rate imaging study. *Eur. J. Echocardiogr.* **10**, 112–119 (2009).
214. Streeter, D. D., Spotnitz, H. M., Patel, D. P., Ross, J. & Sonnenblick, E. H. Fiber Orientation in the Canine Left Ventricle during Diastole and Systole. *Circ. Res.* **24**, 339–347 (1969).
215. Carew, T. E. & Covell, J. W. Fiber orientation in hypertrophied canine left ventricle. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **236**, H487–H493 (1979).
216. Greenbaum, R. A., Ho, S. Y., Gibson, D. G., Becker, A. E. & Anderson, R. H. Left ventricular fibre architecture in man. *Heart* **45**, 248–263 (1981).
217. D'hooge, J. Regional Strain and Strain Rate Measurements by Cardiac Ultrasound: Principles, Implementation and Limitations. *Eur. J. Echocardiogr.* **1**, 154–170 (2000).
218. Voigt, J.-U. *et al.* Definitions for a Common Standard for 2D Speckle Tracking Echocardiography: Consensus Document of the EACVI/ASE/Industry Task Force to Standardize Deformation Imaging. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **28**, 183–193 (2015).
219. Bonow, R. O., Lakatos, E., Maron, B. J. & Epstein, S. E. Serial long-term assessment of the natural history of asymptomatic patients with chronic aortic regurgitation and normal left ventricular systolic function. *Circulation* **84**, 1625–1635 (1991).
220. Gorgulu, S. *et al.* Comparison of Left Ventricular Contractility in Pressure and Volume Overload: A Strain Rate Study in the Clinical Model of Aortic Stenosis and Regurgitation: Comparison of Myocardial Contractility in Different Overload Patterns. *Echocardiography* **27**, 798–802 (2010).
221. Olsen, N. T. *et al.* Speckle-Tracking Echocardiography for Predicting Outcome in Chronic Aortic Regurgitation During Conservative Management and After Surgery. *JACC Cardiovasc. Imaging* **4**, 223–230 (2011).
222. Kaneko, A. *et al.* Subendocardial dysfunction in patients with chronic severe aortic regurgitation and preserved ejection fraction detected with speckle-tracking strain imaging and transmural myocardial strain profile. *Eur. Heart J. - Cardiovasc. Imaging* **14**, 339–346 (2013).

223. Enache, R. *et al.* Left ventricular shape and mass impact torsional dynamics in asymptomatic patients with chronic aortic regurgitation and normal left ventricular ejection fraction. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* **31**, 1315–1326 (2015).
224. Paraskevaidis, I. A. *et al.* Ventricular Long-Axis Contraction as an Earlier Predictor of Outcome in Asymptomatic Aortic Regurgitation. *Am. J. Cardiol.* **100**, 1677–1682 (2007).
225. Kusunose, K., Agarwal, S., Marwick, T. H., Griffin, B. P. & Popović, Z. B. Decision Making in Asymptomatic Aortic Regurgitation in the Era of Guidelines: Incremental Values of Resting and Exercise Cardiac Dysfunction. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **7**, 352–362 (2014).
226. Park, S. H. *et al.* Left Ventricular Strain as Predictor of Chronic Aortic Regurgitation. *J. Cardiovasc. Ultrasound* **23**, 78 (2015).
227. Smedsrød, M. K. *et al.* Detection of Left Ventricular Dysfunction by Global Longitudinal Systolic Strain in Patients with Chronic Aortic Regurgitation. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **24**, 1253–1259 (2011).
228. Verseckaite, R. *et al.* The predictive value of left ventricular myocardium mechanics evaluation in asymptomatic patients with aortic regurgitation and preserved left ventricular ejection fraction. A long-term speckle-tracking echocardiographic study. *Echocardiography* **35**, 1277–1288 (2018).
229. Fung, M. J., Leung, D. Y. & Thomas, L. Differential Myocardial Fibre Involvement by Strain Analysis in Patients With Aortic Stenosis. *Heart Lung Circ.* **27**, 1357–1367 (2018).
230. Ng, A. C. T. *et al.* Left ventricular global longitudinal strain is predictive of all-cause mortality independent of aortic stenosis severity and ejection fraction. *Eur. Heart J. - Cardiovasc. Imaging* **19**, 859–867 (2018).
231. Chan, J. *et al.* Differentiation of Subendocardial and Transmural Infarction Using Two-Dimensional Strain Rate Imaging to Assess Short-Axis and Long-Axis Myocardial Function. *J. Am. Coll. Cardiol.* **48**, 2026–2033 (2006).
232. Bhan, A. *et al.* High-frequency speckle tracking echocardiography in the assessment of left ventricular function and remodeling after murine myocardial infarction. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **306**, H1371–H1383 (2014).
233. Shepherd, D. L. *et al.* Early detection of cardiac dysfunction in the type 1 diabetic heart using speckle-tracking based strain imaging. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **90**, 74–83 (2016).
234. de Lucia, C. *et al.* Echocardiographic Strain Analysis for the Early Detection of Left Ventricular Systolic/Diastolic Dysfunction and Dyssynchrony in a Mouse Model of Physiological Aging. *J. Gerontol. Ser. A* **74**, 455–461 (2019).
235. Yingchoncharoen, T., Agarwal, S., Popović, Z. B. & Marwick, T. H. Normal Ranges of Left Ventricular Strain: A Meta-Analysis. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **26**, 185–191 (2013).
236. Alashi, A. *et al.* Incremental Prognostic Utility of Left Ventricular Global Longitudinal Strain in Asymptomatic Patients With Significant Chronic Aortic Regurgitation and

- Preserved Left Ventricular Ejection Fraction. *JACC Cardiovasc. Imaging* **11**, 673–682 (2018).
- 237. Alashi, A. *et al.* Long-Term Outcomes After Aortic Valve Surgery in Patients With Asymptomatic Chronic Aortic Regurgitation and Preserved LVEF. *JACC Cardiovasc. Imaging* (2019) doi:10.1016/j.jcmg.2018.12.021.
 - 238. Rady, M. *et al.* Left Ventricular Torsion — A New Echocardiographic Prognosticator in Patients With Non-Ischemic Dilated Cardiomyopathy —. *Circ. J.* **83**, 595–603 (2019).
 - 239. Ewe, S. H. *et al.* Detection of subtle left ventricular systolic dysfunction in patients with significant aortic regurgitation and preserved left ventricular ejection fraction: speckle tracking echocardiographic analysis. *Eur. Heart J. - Cardiovasc. Imaging* (2015) doi:10.1093/ehjci/jev019.
 - 240. Salaun, E. *et al.* Apical four-chamber longitudinal left ventricular strain in patients with aortic stenosis and preserved left ventricular ejection fraction: analysis related with flow/gradient pattern and association with outcome. *Eur. Heart J. - Cardiovasc. Imaging* **19**, 868–878 (2018).
 - 241. Klaeboe, L. G. & Edvardsen, T. Echocardiographic assessment of left ventricular systolic function. *J. Echocardiogr.* **17**, 10–16 (2019).
 - 242. Koshizuka, R. *et al.* Longitudinal Strain Impairment as a Marker of the Progression of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction in a Rat Model. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **26**, 316–323 (2013).
 - 243. Bairey Merz, C. N., Moriel, M., Rozanski, A., Klein, J. & Berman, D. S. Gender-related differences in exercise ventricular function among healthy subjects and patients. *Am. Heart J.* **131**, 704–709 (1996).
 - 244. Williams, A. M., Shave, R. E., Stembidge, M. & Eves, N. D. Females have greater left ventricular twist mechanics than males during acute reductions to preload. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **311**, H76–H84 (2016).
 - 245. Lawton, J. S. *et al.* Magnetic resonance imaging detects significant sex differences in human myocardial strain. *Biomed. Eng. OnLine* **10**, 76 (2011).
 - 246. Augustine, D. *et al.* Global and regional left ventricular myocardial deformation measures by magnetic resonance feature tracking in healthy volunteers: comparison with tagging and relevance of gender. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* **15**, 8 (2013).
 - 247. Hurlburt, H. M. *et al.* Direct ultrasound measurement of longitudinal, circumferential, and radial strain using 2-dimensional strain imaging in normal adults. *Echocardiogr. Mt. Kisco N* **24**, 723–731 (2007).
 - 248. Williams, A. M., Shave, R. E., Cheyne, W. S. & Eves, N. D. The influence of adrenergic stimulation on sex differences in left ventricular twist mechanics: Sex differences in left ventricular twist. *J. Physiol.* **595**, 3973–3985 (2017).
 - 249. Iung, B. & Vahanian, A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nat. Rev. Cardiol.* **8**, 162–172 (2011).

250. Keller, K. M. & Howlett, S. E. Sex Differences in the Biology and Pathology of the Aging Heart. *Can. J. Cardiol.* **32**, 1065–1073 (2016).
251. Kloner, R. A., Carson, C., Dobs, A., Kopecky, S. & Mohler, E. R. Testosterone and Cardiovascular Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **67**, 545–557 (2016).
252. Altamirano, F. *et al.* Testosterone induces cardiomyocyte hypertrophy through mammalian target of rapamycin complex 1 pathway. *J. Endocrinol.* **202**, 299–307 (2009).
253. Harman, S. M. Estrogen replacement in menopausal women: Recent and current prospective studies, the WHI and the KEEPS. *Gend. Med.* **3**, 254–269 (2006).
254. Di Salvo, G. *et al.* Early myocardial abnormalities in asymptomatic patients with severe isolated congenital aortic regurgitation: An ultrasound tissue characterization and strain rate study. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **18**, 122–127 (2005).
255. Schiattarella, G. G. & Hill, J. A. Inhibition of Hypertrophy Is a Good Therapeutic Strategy in Ventricular Pressure Overload. *Circulation* **131**, 1435–1447 (2015).
256. Maillet, M., van Berlo, J. H. & Molkentin, J. D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 38–48 (2013).
257. El Hajj, M. C., Ninh, V. K., El Hajj, E. C., Bradley, J. M. & Gardner, J. D. Estrogen receptor antagonism exacerbates cardiac structural and functional remodeling in female rats. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **312**, H98–H105 (2017).
258. Dhahri, W. Metformin Reduces Left Ventricular Eccentric Re-modeling In Experimental volume Overload in the Rat. *J. Clin. Exp. Cardiol.* **03**, (2012).
259. Couet, J. *et al.* Treatment of Combined Aortic Regurgitation and Systemic Hypertension: Insights From an Animal Model Study. *Am. J. Hypertens.* **19**, 843–850 (2006).
260. Kinova, E., Spasova, N., Borizanova, A. & Goudev, A. Torsion Mechanics as an Indicator of More Advanced Left Ventricular Systolic Dysfunction in Secondary Mitral Regurgitation in Patients with Dilated Cardiomyopathy: A 2D Speckle-Tracking Analysis. *Cardiology* **139**, 187–196 (2018).
261. You, J. *et al.* Differential cardiac hypertrophy and signaling pathways in pressure versus volume overload. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* *ajpheart.00212.* (2017) doi:10.1152/ajpheart.00212.2017.
262. Crozatier, B. & Ventura-Clapier, R. Inhibition of Hypertrophy, Per Se, May Not Be a Good Therapeutic Strategy in Ventricular Pressure Overload: Other Approaches Could Be More Beneficial. *Circulation* **131**, 1448–1457 (2015).
263. Pirompol, P., Teekabut, V., Weerachatyanukul, W., Bupha-Intr, T. & Wattanapermpool, J. Supra-physiological dose of testosterone induces pathological cardiac hypertrophy. *J. Endocrinol.* **229**, 13–23 (2016).
264. Marcondes, F. K., Bianchi, F. J. & Tanno, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* **62**, 609–614 (2002).

265. Thigpen, J. E. *et al.* Phytoestrogen content of purified, open- and closed-formula laboratory animal diets. *Lab. Anim. Sci.* **49**, 530–536 (1999).
266. Wu, J., Dai, F., Li, C. & Zou, Y. Gender Differences in Cardiac Hypertrophy. *J Cardiovasc. Transl. Res.* (2019) doi:10.1007/s12265-019-09907-z.
267. van Grootel, R. W. J. *et al.* Influence of age and sex on left ventricular diastolic strain analysis. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* **35**, 491–498 (2019).
268. Arnold, A. P. & Chen, X. What does the “four core genotypes” mouse model tell us about sex differences in the brain and other tissues? *Front. Neuroendocrinol.* **30**, 1–9 (2009).
269. Berletch, J. B., Yang, F., Xu, J., Carrel, L. & Disteche, C. M. Genes that escape from X inactivation. *Hum. Genet.* **130**, 237–245 (2011).
270. Snell, D. M. & Turner, J. M. A. Sex Chromosome Effects on Male–Female Differences in Mammals. *Curr. Biol.* **28**, R1313–R1324 (2018).
271. Arnold, A. P. *et al.* The importance of having two X chromosomes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **371**, 20150113 (2016).
272. Arnold, A. P. Conceptual frameworks and mouse models for studying sex differences in physiology and disease: Why compensation changes the game. *Exp. Neurol.* **259**, 2–9 (2014).
273. Gatewood, J. D. *et al.* Sex Chromosome Complement and Gonadal Sex Influence Aggressive and Parental Behaviors in Mice. *J. Neurosci.* **26**, 2335–2342 (2006).
274. Gouvernement du Canada. Politique en matière d’analyse comparative fondée sur le sexe et le genre. (2018).
275. Becker, J. B., Prendergast, B. J. & Liang, J. W. Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. *Biol. Sex Differ.* **7**, (2016).
276. Itoh, Y. & Arnold, A. P. Are females more variable than males in gene expression? Meta-analysis of microarray datasets. *Biol. Sex Differ.* **6**, (2015).