



HAL
open science

Variabilité glycémique : exploration in vitro des fonctions cellulaires et mitochondriales sur la lignée de cardiomyocyte HL-1

Patrick Mordel

► **To cite this version:**

Patrick Mordel. Variabilité glycémique : exploration in vitro des fonctions cellulaires et mitochondriales sur la lignée de cardiomyocyte HL-1. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMC415 . tel-01690743

HAL Id: tel-01690743

<https://theses.hal.science/tel-01690743v1>

Submitted on 23 Jan 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Variabilité glycémique : exploration in vitro des fonctions cellulaires et mitochondriales sur la lignée de cardiomyocytes HL-1

Présentée et soutenue par

Patrick MORDEL

Thèse soutenue publiquement le 18 décembre 2017 devant le jury composé de

Marie-Christine VANTYGHEM	PU-PH, Université de Lille	Rapporteur
Pascal REYNIER	PU-PH, Université d'Angers	Rapporteur
Romain GUINAMARD	PU, Université de Caen Normandie	Examineur
Stéphane ALLOUCHE	PU-PH, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Pr. Stéphane ALLOUCHE, laboratoire SEILIRM Signalisation, électrophysiologie et imagerie des lésions d'ischémie reperfusion myocardique.



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



EdNBISE
Ecole doctorale Normande
Biologie Intégrative,
Santé, Environnement

EA 4650 Signalisation,
électrophysiologie et imagerie
des lésions d'ischémie
reperfusion myocardique

Remerciements

Je tiens premièrement à remercier les membres du jury, notamment Madame le Professeur Marie-Christine Vantigham et Monsieur le Professeur Pascal Reynier, qui ont accepté d'être rapporteurs et de juger mon travail.

Je remercie ensuite Monsieur le Professeur Romain Guinamard d'avoir accepté de faire partie du jury.

Mes remerciements vont également à mon directeur de thèse, le Professeur Stéphane Allouche. Merci d'avoir été présent (même si parfois tu étais difficile à trouver...), merci pour ton aide et ton soutien.

Je remercie le Professeur Alain Manrique pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe EA-4650. J'en profite pour remercier tous les membres de l'équipe qui ont participé de près ou de loin à ce projet, et tout particulièrement le Docteur Michael Joubert. Merci également à toutes les autres équipes qui ont pu apporter un soutien technique ou logistique.

Ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans une ambiance conviviale quotidienne, apportées par les étudiants, stagiaires et autres thésards passés dans « le bureau ». Je pense notamment à Camille, Pierre et Matthieu, qui ont dû me supporter pendant leurs années recherche. Je remercie également Romain Richer et Quentin Dupas, avec qui j'ai passé le plus de temps pendant ces années. Merci également au Docteur Christophe Simard, chercheur/chasseur/agriculteur, pour les moments de détente et les pauses déjeuners/café/apéros.

Je souhaite également remercier mes « copains de thèse » et amis qui ont partagé cette aventure : Emmanuelle et Robin, mais aussi ma voisine de labo Eva sans qui je n'aurai peut-être pas tenu bon. Et merci à Laura, sans qui nous ne serions peut-être pas amis aujourd'hui.

Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans la présence du service de Biochimie du CHU, et notamment les « techniciennes des mitos » : Chantal, toi qui es maintenant jeune retraitée, tu savais me donner le sourire grâce à tes blagues et anecdotes. Estelle dernière recrue, Magali, Marie-Louise et Thérèse, je sais qu'il aura été difficile de me voir râler ou ronchonner, mais c'est toujours un plaisir de

vous voir au labo et de pouvoir discuter. Merci pour votre aide précieuse et vos conseils dans les manips.

Il y a bien sûr les personnes qui sont un peu plus éloignées de ce projet, mais qui comptent tout autant, et qui m'ont permis de me vider la tête, de penser à bien d'autres choses et de me défouler. Amis grimpeurs, amis slackliners, merci à vous. Et merci à toi Muriel.

Je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce projet, chacun à sa manière. Merci à tous mes amis caennais et parisiens. Je ne citerai pas de noms de peur d'en oublier.

Je terminerai par remercier ma famille qui m'a soutenu, mes parents, ma sœur, bien que je n'aie pas toujours fait l'effort de vous expliquer en quoi consistait mon travail.

Table des figures

Figure 1 : Prévalence du diabète dans le monde en 2015 (Atlas du diabète de la Fédération Internationale du Diabète 2015)	11
Figure 2 : Représentation de l'effet incrétine à la suite d'un repas.	18
Figure 3 : Représentation schématique du développement des complications micro-vasculaires du diabète.....	19
Figure 4 : Profils glycémiques de deux patients diabétiques présentant une HbA1c identique mais des variabilités glycémiques différentes (d'après Kovatchev et al., 2016) (GV : glycemic variability)	27
Figure 5 : Ultrastructure mitochondriale, d'après Kühlbrandt, 2015.	37
Figure 6 : Structure schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale : phosphorylation oxydative.....	39
Figure 7 : Carte globale du complexe I déterminée par cryo-microscopie à électron d'après Vinothkumar et al., 2014.....	40
Figure 8 : Structure globale de la succinate déshydrogénase	41
Figure 9 : Diagramme en ruban de l'ubiquinol-cytochrome c réductase sous forme dimérique d'après Gao et al., 2002.	42
Figure 10 : Structure dimérique de la cytochrome c oxydase bovine, d'après Maréchal et al., 2012	43
Figure 11 : Organisation des sous-unités de l'ATP synthase d'après Walker, 2013	44
Figure 12 : Représentation des mécanismes de génération d'EROs par la chaîne respiratoire d'après Chen and Zweier, 2014.	46
Figure 13 : Mécanisme de fusion mitochondriale d'après Kanamaru et al., 2012	48
Figure 14 : Mécanisme de fission mitochondriale d'après Elgass et al., 2013	49
Figure 15 : Schéma décrivant les voies intrinsèque et extrinsèque menant à l'apoptose d'après Youle and Strasser, 2008).	52
Figure 16: Photographie de la lignée HL-1 en microscopie optique (objectif x40)	57
Figure 17 : Représentation schématique du traitement effectué sur 12 heures.	59
Figure 18 : Principe du dosage protéique par la méthode BCA	60
Figure 19 : Effets des fluctuations en glucose sur les voies de signalisation cellulaire.	75
Figure 20 : Effets des fluctuations en glucose sur l'activation de l'autophagie.	76
Figure 21 : Tracé représentatif d'une mesure de la consommation d'O ₂ par polarographie.	77

Figure 22 : Effets des fluctuations en glucose sur la consommation d'oxygène après 12 heures de traitement.	78
Figure 23 : Effets des fluctuations en glucose sur l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.	81
Figure 24 : Effets des fluctuations en glucose sur l'expression de sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.	82
Figure 25 : Effets des fluctuations en glucose sur la production d'ATP.	83
Figure 26 : Effets des fluctuations en glucose sur le potentiel de membrane mitochondrial.	84
Figure 27 : Effets des fluctuations en glucose sur l'ouverture du mPTP.	85
Figure 28 : Effets des fluctuations en glucose sur la production d'anions superoxydes après 12 heures de traitement.	86
Figure 29 : Effets des fluctuations en glucose sur l'oxydation des protéines.	87
Figure 30 : Caractérisation de la mort cellulaire après 14 heures d'hypoxie.	89
Figure 31 : Mesure de la consommation d'O ₂ après un épisode de 14 heures d'hypoxie.	90
Figure 32 : Evaluation du potentiel de membrane mitochondriale après 7 et 14 heures d'hypoxie.	91
Figure 33 : Lésions cellulaires après une cinétique d'hypoxie.	92
Figure 34 : Effets des fluctuations en glucose sur la mort cellulaire induite par un épisode d'hypoxie de 36 heures.	93
Figure 35 : Effets des fluctuations en glucose sur la consommation d'oxygène après 72 heures de traitement.	98
Figure 36 : Effets des fluctuations en glucose sur la production d'anions superoxydes après 72 heures de traitement.	100
Figure 37 : Effet du temps de traitement sur la production mitochondriale d'anions superoxydes.	101

Table des tableaux

Tableau I : Mode d'action des principales classes d'agents antidiabétiques (Chi et al., 2017).....	17
Tableau II : Impact d'un traitement intensif sur les risques de complications du diabète. Résultats des essais cliniques majeurs (Bergenstal et al., 2010).....	26
Tableau III : Liste des index de mesure de l'instabilité glycémique	31
Tableau IV : Composition des différents milieux de culture.....	58
Tableau V : Modèle in vitro de variabilité glycémique	59
Tableau VI : Composition des gels de polyacrylamide.....	61
Tableau VII : Conditions d'utilisation des anticorps	62
Tableau VIII : Conditions des expériences de dosage des activités des complexes de la chaîne respiratoire	64
Tableau IX : Bilan des résultats obtenus concernant l'effet des fluctuations en glucose.....	109

Liste des abréviations

ACCORD : Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine di-phosphate

ADVANCE : Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicron Modified Release Controlled Evaluation

ADRR : average daily risk range

AGE : Produit avancé de glycation

AIF : Apoptosis inducing factor

ANOVA : Analyse de variance

Ant A : Antimycine A

ANT : Adénine nucléotide translocase

Apaf1 : Apoptosis activating factor 1

ARN : Acide ribonucléique

ASB : Albumine de sérum bovin

ATP : Adénosine tri-phosphate

AVC : Accident vasculaire cérébral

BCA : Acide bicinchonique

Bcl-2 : B cell lymphoma-2

BET : Bromure d'éthidium

CCCP : Carbonylcyanure *m*-chlorophénylhydrazone

CONGA : Continuous overlapping net glycemc action

CV : Coefficient de variation

DCCT : Diabetes Control and Complications Trial

DCIP : 2,6-Dichlorophenolindophenol

DNPH : 2,4-dinitrophénylhydrazine

DPP-4 : Dipeptidyl peptidase 4

Drp : Dynamin related protein

DT1 : Diabète de type 1

DT2 : Diabète de type 2

DTT : Dithiothréitol

EDIC : Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

EGTA : Acide éthylène glycol tétraacétique

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

ERO : Espèce réactive de l'oxygène

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FADH : Flavine adénine dinucléotide hydrogénée

GAD65 : Acide glutamique décarboxylase

GIP : Gastric inhibitory polypeptide
GLP-1 : Glucagon-like peptide 1
GLUT4 : Transporteur de glucose de type 4
GSK : Glycogen synthase kinase
GTP : Guanosine tri-phosphate
HbA1C : Hémoglobine glyquée A1c
HBGI : High blood glucose index
HBSS : Hank's balanced salt solution
HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HIF : Hypoxia inducible factor
HLA : Human leukocyte antigen
HUVCEC : Human umbilical vein endothelial cells
IA-2 : Islet Antigen 2
IDM : Infarctus du myocarde
IRS : Substrats du récepteur à l'insuline
LBGI : Low blood glucose index
LC3 : Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LDH : Lactate déshydrogénase
MAG : Mean absolute glucose
MAGE : Mean amplitude of glycemic excursions
Mff : Facteur de fission mitochondrial
MFN : Mitofusine
MODD : Mean of daily difference
mPTP : Pore de transition de perméabilité mitochondriale
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide hydrogénéé
NOX : NADPH oxydase
OPA : Optic atrophy
OSCP : Oligomycin-sensitivity-conferral protein
PBS : Phosphate buffered saline
PHD2 : Prolyl hydroxylase domain 2
P_i : Phosphate inorganique
PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase
RIP : Receptor-interacting protein
SD : Déviation standard
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis
SEM : Erreur standard de la moyenne
SERCA2a : ATPase 2a Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique
SGLT2 : Cotransporteur de sodium-glucose 2
SOD : Superoxyde dismutase

SVF : S rum de veau foetal
TBS : Tris-buffered saline
TIM : Translocase of the inner membrane
TMRE : Tetramethylrhodamine ethyl ester
TNF : Tumor necrosis factor
TNFR1 : Tumor necrosis factor receptor 1
TOM : Translocase of the outer membrane
TZD : Thiazolidinedione
UKPDS : United Kingdom Prospective Diabetes Study
VADT : Veteran Affairs Diabetes Trial
VDAC : Voltage-dependent anion channel
VG : Variabilité glycémique
ZNT-8 : Transporteur de zinc 8
 $\Delta\Psi_m$: Potentiel de membrane mitochondrial

Table des matières

Remerciements	1
Table des figures	3
Table des tableaux	5
Liste des abréviations	6
Introduction	11
I. Diabète	11
1. Définition	11
2. Diabète de type 1.....	12
3. Diabète de type 2.....	14
4. Complications liées au diabète	19
5. Importance du contrôle glycémique dans la réduction des complications du diabète	23
II. Variabilité glycémique	28
1. Définition	28
2. Evaluation de la variabilité glycémique	28
3. Contribution de la variabilité glycémique aux complications du diabète.....	32
4. Mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la variabilité glycémique	33
III. Mitochondrie	36
1. Structure	36
2. Fonctionnement énergétique	38
3. Production d'espèces réactives de l'oxygène	45
4. Dynamique mitochondriale	47
5. Rôle de la mitochondrie dans la mort cellulaire	50
6. Mitochondrie et hypoxie	53
Problématique du travail de thèse	55
Matériels et méthodes	57
I. Culture cellulaire	57
II. Traitement	58
III. Western blot	59
1. Extraction et dosages protéiques	59
2. Western blot.....	60
IV. Etude des fonctions mitochondriales	62
1. Polarographie (Rustin et al., 1994)	62
2. Activité des complexes de la chaîne respiratoire	63
3. Production d'ATP	67
4. Potentiel de membrane mitochondrial $\Delta\psi_m$	67
5. Stress oxydatif.....	68
6. Ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP)	70
V. Susceptibilité au développement de lésions hypoxiques	71
1. Cinétique d'hypoxie	71
2. Libération de Lactate Déshydrogénase (LDH).....	72
3. Double coloration Hoechst / Bromure d'éthidium (BET).....	72
VI. Analyses statistiques	73
Résultats	74
I. Signalisation cellulaire	74

1.	Activité ERK 1/2, p38, Akt, GSK-3 β	74
2.	Activation de l'autophagie.....	74
II.	Fonctions mitochondriales.....	77
1.	Respiration mitochondriale : phosphorylation oxydative	77
2.	Activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire.....	79
3.	Production d'ATP	82
4.	Potentiel de membrane mitochondriale	83
5.	Ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale.....	85
III.	Stress oxydatif.....	86
1.	Production d'anions superoxydes	86
2.	Oxydation des protéines.....	87
IV.	Susceptibilité à l'hypoxie	88
1.	Détermination de la mort cellulaire	88
2.	Fonctions mitochondriales	89
3.	Impact des fluctuations en glucose	92
	<i>Discussion</i>.....	94
I.	Choix du modèle et conditions de traitement.....	94
II.	Signalisation et autophagie.....	95
III.	Fonctions mitochondriales.....	96
IV.	Modèle d'hypoxie	102
	<i>Perspectives</i>.....	105
	<i>Conclusion</i>	108
	<i>Bibliographie</i>	110
	<i>Annexes</i>.....	126
	Liste des communications	126
	Liste des articles	126
	<i>Curriculum Vitae</i>	192
	<i>Résumé/Abstract</i>	195

Introduction

I. Diabète

1. Définition

Le diabète est une affection métabolique chronique, résultant d'un défaut de production d'insuline, d'une incapacité de l'organisme à utiliser correctement cette hormone ou de ces deux phénomènes. L'insuline est une hormone, sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Elle régule le taux de glucose dans le sang en permettant la captation et le stockage du glucose par plusieurs types cellulaires. En l'absence de cette hormone, l'organisme ne peut donc plus réguler sa glycémie.

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de personnes atteintes de diabète était de 415 millions en 2015 et pourrait atteindre 642 millions en 2040 (Figure 1). Sa prévalence ne cesse d'augmenter, elle a presque doublé depuis le début des années 1980, passant de 4,7 % à 8,5 %. L'hyperglycémie chronique résultant de ces troubles métaboliques peut engendrer de nombreuses complications

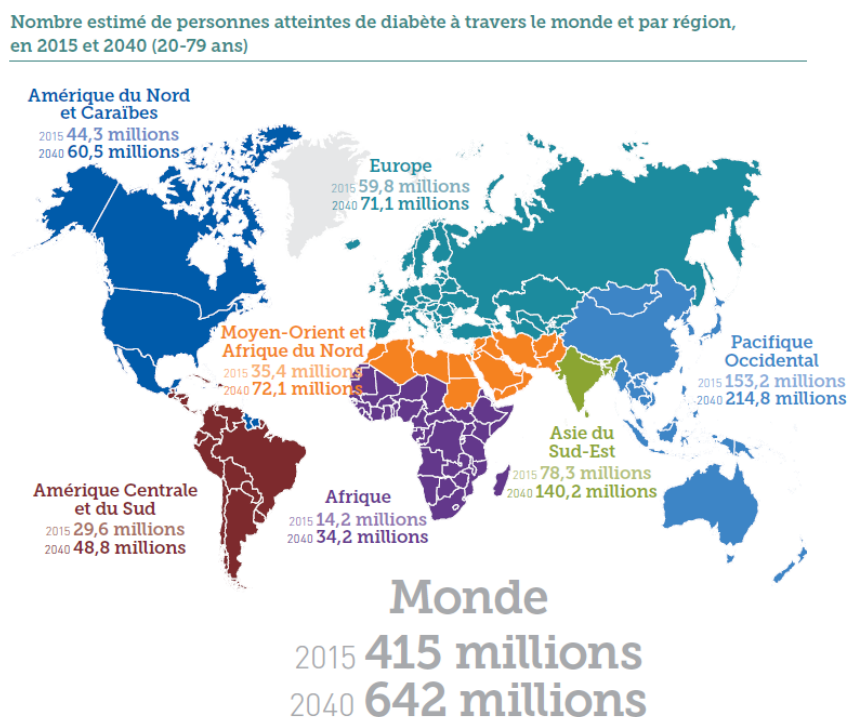


Figure 1 : Prévalence du diabète dans le monde en 2015 (Atlas du diabète de la Fédération Internationale du Diabète 2015)

au niveau cardiaque, vasculaire, oculaire, rénal et nerveux. Sont considérées diabétiques des personnes présentant une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L, une glycémie supérieure à 2 g/L deux heures après un test de tolérance au glucose ou à n'importe quel moment de la journée, ou une hémoglobine glyquée (HbA1c) supérieure à 6,5 % (American Diabetes Association, 2015). Quatre types de diabète ont été définis par l'OMS : le diabète de type 1 (DT1) et de type 2 (DT2), le diabète gestationnel et les diabètes secondaires.

2. Diabète de type 1

Le diabète de type 1, autrefois nommé diabète insulino-dépendant, est une maladie chronique auto-immune. Elle apparaît de façon soudaine, le plus souvent chez l'enfant, caractérisée par une hyperglycémie due à une destruction des cellules β pancréatiques sécrétrices d'insuline (Eisenbarth, 1986). Les symptômes pouvant survenir sont une perte de poids rapide, une fatigue générale, une soif intense et des urines abondantes.

L'apparition d'auto-anticorps a lieu plusieurs mois avant les premiers symptômes, permettant de suivre le développement de l'auto-immunité. Ces auto-anticorps ciblent l'insuline, l'acide glutamique décarboxylase (GAD65), l'IA-2 (Islet Antigen 2), le transporteur de zinc 8 (ZNT-8) et sont utilisés en tant que biomarqueurs (Ilonen et al., 2013; Ziegler et al., 1999). L'apparition de ces auto-anticorps se déroule le plus souvent pendant l'enfance. Les facteurs qui déclenchent cette apparition ne sont à ce jour pas encore connus, malgré plusieurs études de suivi d'enfants depuis leur naissance (Nejentsev et al., 1999; Rewers et al., 1996; TEDDY Study Group, 2007).

a. Épidémiologie

Parmi les 8,8 % de la population mondiale ayant un diabète, seulement 10 à 15 % sont concernés par le DT1. C'est néanmoins la forme la plus commune chez l'enfant. L'incidence du DT1 ne cesse d'augmenter et il est estimé que 90 000 enfants sont nouvellement diagnostiqués chaque année. Cette incidence est différente en fonction de la situation géographique. Elle est plus élevée dans les pays européens et nord-américains, alors qu'en Asie, le DT1 est considéré comme une maladie rare. Ces différences s'expliqueraient principalement par des

prédispositions génétiques (facteur de risque génétique lié aux complexes majeurs d'histocompatibilité ou HLA (Human leukocyte antigen), génotypes HLA-DR-DQ), des facteurs environnementaux et les habitudes de vies (Askar et al., 2013; Serrano-Rios et al., 1999). Les personnes développant un DT1 passent par un DT1 dit « pré-symptomatique » lors duquel les cellules B perdent progressivement leur fonction, laissant apparaître l'hyperglycémie. Lorsque les premiers symptômes apparaissent, le DT1 est dit « symptomatique ».

b. Facteurs génétiques et environnementaux

Les facteurs de risques génétiques principaux sont les haplotypes HLA de classe II HLA-DR3-DQ2 et HLA-DR4-DQ8 (Nerup et al., 1974). La susceptibilité génétique ne peut à elle seule expliquer l'incidence du DT1, suggérant l'existence de facteurs environnementaux.

Ces facteurs environnementaux incluent notamment les évènements ayant lieu lors de la gestation (infections et complications), les infections virales, ainsi que certaines habitudes alimentaires. L'hypothèse d'une combinaison d'évènements pouvant mener à l'apparition des premiers auto-anticorps reste la plus probable, mais les mécanismes de déclenchement restent encore inconnus.

c. Auto-anticorps

Ces anticorps peuvent être dosés et utilisés en tant que marqueur prédictif d'un DT1, ou lors du diagnostic.

Les anticorps ciblant l'insuline reconnaissent la chaîne B de l'insuline ou de la pro-insuline (Palmer et al., 1983). La GAD65 est une enzyme impliquée dans la réaction immunitaire du DT1. Le système immunitaire reconnaît une séquence de la protéine GAD65, car identique à une partie de la séquence d'une protéine d'un coxsackie virus (Kaufman et al., 1992). L'IA-2 est une protéine à activité tyrosine phosphatase, présente dans les membranes des vésicules sécrétrices (Lan et al., 1996). La protéine ZNT8 permet le transport de zinc du cytoplasme à l'intérieur des vésicules de sécrétion (Wenzlau et al., 2007).

Ces mécanismes auto-immuns mènent la destruction des cellules β , et donc à l'absence de production d'insuline. La mise en place d'un traitement supplétif est donc nécessaire.

d. Traitement du DT1

L'unique traitement pour le diabète de type 1 est l'administration d'insuline par injection via des stylos ou par pompe à insuline. Le but est de réduire l'hyperglycémie tout en évitant les épisodes hypoglycémiques. Quatre catégories d'insuline sont commercialisées : insulines ultra-rapides, rapides, intermédiaires et lentes. Elles se différencient par leur délai et leur durée d'action. Les insulines ultra-rapides vont agir entre 2 et 4 h après l'injection se rapprochant de l'action normale de l'insuline pendant un repas. Les insulines rapides agissent entre 4 et 6 heures, les intermédiaires entre 10 et 16 heures et les insulines lentes entre 20 et 24 heures. Le traitement repose en général sur un schéma basal-bolus consistant en l'administration d'une insuline lente pour les besoins de base de l'organisme et l'administration d'insuline rapide lors des repas.

Lorsque le diabète devient trop instable, une greffe de pancréas peut être effectuée. Elle est souvent associée à une greffe de rein. La thérapie cellulaire peut également être envisagée, grâce à la transplantation d'îlots de Langerhans. Cette technique repose sur l'isolement des îlots de Langerhans à partir d'un pancréas de donneur, qui seront injectés au niveau du foie. Grâce à cette technique, 50 % des patients ne sont plus traités par insuline 5 ans après transplantation (Vantyghem et al., 2014). Elle nécessite deux à trois injections, mais reste peu invasive et présente un taux de complications inférieur à une greffe de pancréas entier.

3. Diabète de type 2

Le diabète de type 2, anciennement appelé diabète non insulino-dépendant, survient généralement chez l'adulte de plus de 40 ans, et constitue la forme de diabète la plus répandue, avec 90 % des cas. Du fait de mauvaises habitudes alimentaires, l'organisme développe au cours du temps une résistance à l'insuline, pouvant être due à une altération des récepteurs à l'insuline. Pour compenser cette insulino-résistance, l'organisme augmente sa production d'insuline, mais lorsque la production d'insuline ne suffit plus à compenser l'insulino-résistance,

l'hyperglycémie apparaît. Les principaux facteurs de risque de déclenchement de la maladie sont la surcharge pondérale, une alimentation trop riche en lipides et glucides, le manque d'activité physique, mais également l'hérédité.

a. Epidémiologie

Le DT2 constitue un problème majeur de santé publique, représentant entre 5 et 20 % des dépenses de santé des pays occidentaux. On estime à 5 millions le nombre de décès dus au diabète (tous types confondus) dans le monde. Le nombre de cas ne cesse d'augmenter, mais des pays tels que la Chine et l'Inde sont particulièrement touchés. La prévalence du diabète y a augmenté de façon importante, due à un changement rapide des habitudes de consommation et de nutrition (Hu, 2011). Il existe des différences de prévalence en fonction des groupes ethniques, indiquant le rôle des facteurs génétiques et environnementaux dans la prédisposition au diabète.

b. Physiopathologie du diabète de type 2

Le DT2 est une maladie multifactorielle faisant intervenir à la fois facteurs génétiques et environnementaux. Les principaux changements physiopathologiques sont une inflammation chronique à bas bruit liée à la production de cytokines pro-inflammatoires par le tissu adipeux, qui vont participer à l'insulino-résistance en modifiant la signalisation des récepteurs à l'insuline. Ceci va évoluer vers une dysfonction des cellules β du pancréas, qui ne seront plus en capacité de produire de l'insuline. Ces changements engendrent une perte du contrôle glycémique, amenant à l'hyperglycémie chronique. Les cellules β subissent des changements fonctionnels, des processus de dédifférenciation, ainsi que des changements d'expression géniques et protéiques, dus au stress glycémique. Ces dysfonctions cellulaires sont notamment causées par une augmentation du stress oxydant, une perturbation de l'homéostasie calcique et du métabolisme mitochondrial. Tous ces changements mènent à des complications micro- et macrovasculaires.

La résistance à l'insuline est une conséquence de l'obésité et du manque d'activité physique (Mokdad et al., 2000). Ce phénomène précède la pathologie diabétique de plusieurs années (DeFronzo, 2009). La résistance à l'insuline est associée à la voie de signalisation de la protéine phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)

(Cusi et al., 2000). En condition physiologique, la fixation de l'insuline à son récepteur va activer des tyrosine kinases et la phosphorylation des substrats du récepteur à l'insuline (IRS) (Krüger et al., 2008). Ces IRS phosphorylés vont notamment permettre l'activation de la PI3K. Cela provoque la translocation du transporteur de glucose de type 4 (GLUT4) à la membrane plasmique, permettant la captation du glucose par les tissus utilisateurs. Le développement de la résistance à l'insuline est associé à une phosphorylation des résidus sérine des IRS, inhibant la phosphorylation des tyrosines (Copps and White, 2012).

Il existe des facteurs de risque génétiques dans l'apparition du DT2. Les gènes associés à une susceptibilité de développer la maladie sont pour la plupart impliqués dans l'activité et le métabolisme des cellules β . Des polymorphismes nucléotidiques de divers gènes ont été rapportés et reliés au risque de développement du DT2 (Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT, Lund University, and Novartis Institutes of BioMedical Research et al., 2007).

Plusieurs mécanismes contribuent à la dysfonction des cellules β : l'âge, la glucotoxicité, la lipotoxicité, la résistance et/ou déficience des hormones incrétines (glucagon like-peptide 1 (GLP-1) et gastric inhibitory polypeptide (GIP)), la résistance à l'insuline, les espèces réactives de l'oxygène (ERO).

c. Traitement non-médicamenteux du DT2

Du fait de l'obésité et de la surcharge pondérale, constatées chez la plupart des patients diabétiques de type 2, la modification du régime alimentaire est la première mesure à prendre. Une réduction de l'apport en glucides et en lipides est nécessaire. Les sucres rapides sont à proscrire, à remplacer par des glucides à faible index glucidique. Le surpoids est réduit par un régime hypocalorique. Le régime dit « méditerranéen » a notamment été démontré comme ayant des effets bénéfiques sur le contrôle glycémique et le risque cardiovasculaire (Esposito et al., 2015).

La seconde mesure non médicamenteuse est la pratique d'une activité physique régulière comme l'indique le rapport détaillé de l'American College of Sports Medicine et de l'American Diabetes Association; ceci permet d'augmenter la sensibilité à l'insuline chez des patients DT2, pouvant persister jusqu'à 72 heures après le dernier jour d'activité (Way et al., 2016). L'activité physique a également

des effets bénéfiques sur les risques de comorbidités incluant hyperlipidémie, hypertension artérielle et cardiopathie ischémique (Colberg et al., 2010).

d. Traitements médicamenteux du DT2

Les traitements médicamenteux du DT2 reposent principalement sur l'utilisation d'agents anti-hyperglycémiques. Ils permettent d'améliorer le contrôle glycémique, évalué par une baisse de l'HbA1c, et de réduire les complications du diabète. Le principal médicament utilisé est un biguanide, la metformine. Il permet une diminution de la production de glucose par le foie ainsi qu'une meilleure utilisation du glucose par le muscle et le tissu adipeux. D'autres médicaments sont utilisés, tels que des insulinosécréteurs, des médicaments augmentant la sensibilité à l'insuline, des inhibiteurs des alpha-glucosidases, des inhibiteurs du cotransporteur de sodium-glucose 2 (SGLT2) ainsi que des agonistes dopaminergiques (American Diabetes Association, 2017).

Médicament	Mode d'action	Efficacité sur l'HbA1c
Metformine	Diminue la production hépatique de glucose Augmente l'utilisation périphérique du glucose	++
Sulfamide hypoglycémiant	Augmente la sécrétion d'insuline	++
Thiazolidinedione	Augmente la sensibilité à l'insuline	++
Agoniste du récepteur au GLP-1	Diminue la production de glucagon Augmente la sécrétion d'insuline	++
Inhibiteur de DPP-4	Diminue la production de glucagon Augmente la sécrétion d'insuline Augmente la demi-vie des incrétines	+
Inhibiteur de SGLT2	Diminue la réabsorption rénale du glucose Augmente la glycosurie	++
Inhibiteurs des alpha-glucosidases Acarbose/Miglitol	Ralentit l'absorption et la digestion des carbohydrates	+
Agonistes dopaminergiques	Augmente la sensibilité à l'insuline	+

Tableau 1 : Mode d'action des principales classes d'agents antidiabétiques (Chi et al., 2017).

Parmi les insulinosécréteurs, les sulfamides hypoglycémiants, stimulent la sécrétion d'insuline en fermant le canal potassium ATP sensible des cellules β (Bryan et al., 2005).

La seule classe de médicament permettant d'augmenter la sensibilité à l'insuline est la classe des thiazolidinediones (TZDs). Ils augmentent et préservent la fonction des cellules β , tout en réduisant le taux d'HbA1c. La sensibilité à l'insuline est améliorée dans le muscle, le foie et le tissu adipeux. Néanmoins, une méta-analyse en 2013 a montré que l'utilisation de TZDs (Pioglitazone) entraîne une augmentation du risque de cancer de la vessie (Ferwana et al., 2013), son utilisation a donc été interdite en France.

Il existe également des médicaments centrés sur l'effet incrétine (Figure 2). Les incrétines (GLP-1 et GIP) sont libérées à la suite d'un repas par les cellules endocrines de l'intestin et stimulent la sécrétion d'insuline de manière glucose-dépendante en activant le récepteur au GLP-1 présent à la surface des cellules β , tout en inhibant la sécrétion de glucagon. Le second médicament ciblant l'effet incrétine est un inhibiteur de la dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4), qui dégrade physiologiquement ces peptides. L'augmentation de la concentration des incrétines entraîne une meilleure sécrétion d'insuline.

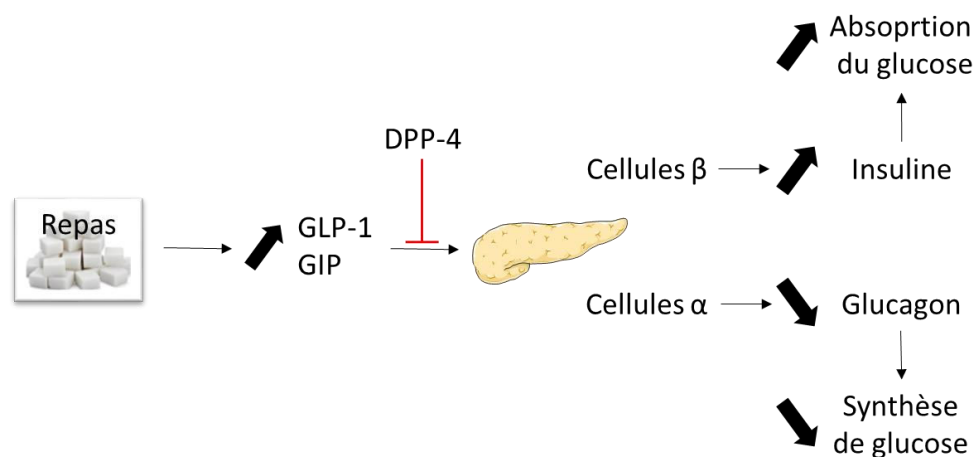


Figure 2 : Représentation de l'effet incrétine à la suite d'un repas.

Les inhibiteurs du SGLT2 sont une classe récente d'anti-diabétique, diminuant l'HbA1c (Vasilakou et al., 2013). Ils agissent en réduisant la réabsorption du glucose par le rein et augmentent l'excrétion du glucose dans les urines.

Lorsque les agents anti-diabétiques ne permettent pas d'atteindre un contrôle glycémique souhaité et notamment un taux d'HbA1c voulu, l'ajout d'insuline est souvent nécessaire. Certains patients, dont l'indice de masse corporelle est supérieur à 40 kg/m², peuvent également subir une chirurgie bariatrique (anneau gastrique, sleeve gastrectomy, bypass gastrique) ayant pour objectif une perte de poids. Le terme de chirurgie bariatrique a évolué vers le terme de chirurgie métabolique ; il a en effet été observé dans plusieurs études que ce type d'opération (bypass gastrique) permet une amélioration de l'équilibre glycémique, et une rémission du diabète (Amouyal and Andreelli, 2017). Il est néanmoins important de noter que pour la plupart des études, le suivi était réalisé un an après l'opération.

4. Complications liées au diabète

Les complications du diabète sont dépendantes de la durée et de la sévérité de l'hyperglycémie. Plusieurs voies sont impliquées dans le développement des complications microvasculaires (Figure 3) : la voie des polyols, la voie des produits avancés de la glycation (AGEs), l'activation du récepteur aux AGEs, l'activation d'isoformes de la protéine kinase C, l'augmentation du flux d'hexosamines, la production augmentée d'EROs (Brownlee, 2005; Giacco and Brownlee, 2010). Les facteurs de risques de développement de complications micro-vasculaires sont

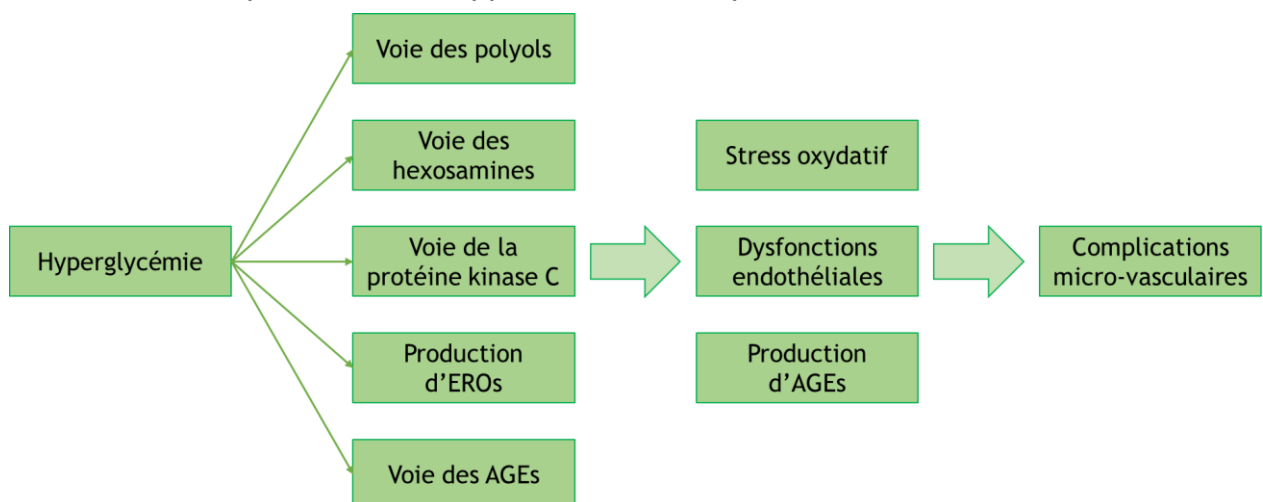


Figure 3 : Représentation schématique du développement des complications micro-vasculaires du diabète.

notamment l'âge du patient, l'augmentation de la pression artérielle systolique ou encore l'hypertriglycéridémie. Un mauvais contrôle glycémique est également un facteur de risque de développement de complications micro-vasculaires multiples (Raman et al., 2012).

a. Complications micro-vasculaires

➤ Néphropathie

Tout comme le diabète, la prévalence de la néphropathie diabétique ne cesse d'augmenter. L'hyperglycémie, associée à l'hypertension, provoquent des lésions au niveau des glomérules du rein, nécessaires à la capacité de filtration. Ces lésions initiales peuvent être détectées par le dosage de la micro-albuminurie (Hajhosseiny et al., 2014). La détérioration de la capacité à filtrer entraîne une accumulation de déchets dans le sang. Lors de l'évolution de la néphropathie diabétique, des lésions plus importantes apparaissent et conduisent à une insuffisance rénale chronique, nécessitant alors une dialyse ou une transplantation rénale.

➤ Neuropathie

Le plus souvent asymptomatique, la neuropathie diabétique est la complication la plus fréquente du diabète. Elle peut atteindre le système nerveux périphérique ou végétatif. L'hyperglycémie provoque la destruction de la myéline entourant les nerfs via différents mécanismes (polyols, AGEs...). Ceci entraîne des altérations structurelles et fonctionnelles des nerfs (Callaghan et al., 2012).

La neuropathie périphérique touche le plus souvent les nerfs sensoriels dans le pied. La baisse de sensibilité des nerfs peut empêcher aux patients de percevoir des blessures ou douleurs au niveau des pieds. Certaines petites blessures peuvent évoluer en plaie infectée ou gangrène, et nécessiter l'amputation (Boulton, 2016).

➤ Rétinopathie

La rétinopathie diabétique est la première cause de cécité chez les adultes. L'hyperglycémie chronique provoque des occlusions capillaires de la rétine, des hémorragies et des ischémies rétinienne, une angiogenèse et une atteinte de la macula qui se traduisent par une baisse de la vision. Un équilibre glycémique strict

permet de réduire les risques de développement de rétinopathie (Nordwall et al., 2015).

b. Complications macro-vasculaires

Les facteurs tels que l'hypertension artérielle, le tabagisme, les dyslipidémies sont associés au risque cardiovasculaire. Le diabète, selon sa durée et son déséquilibre, vient majorer ce risque. Que ce soit pour le diabète de type 1 ou de type 2, ces complications macro-angiopathiques résulteraient d'une dysfonction endothéliale, d'une inflammation à bas bruit et de la production de lipoprotéines de faible densité oxydées, qui participeraient à la formation de la plaque d'athérome. L'athérosclérose va ainsi réduire la lumière des artères provoquant l'apparition de signes cliniques tels que l'angor, des accidents ischémiques transitoires ou encore une claudication intermittente notamment des membres inférieurs. La plaque d'athérome, qui selon sa composition et des facteurs dynamiques locaux, peut se rompre et provoquer la formation d'un thrombus qui va alors obstruer totalement une artère coronaire et provoquer un infarctus du myocarde (IDM), une artère cérébrale et provoquer un accident vasculaire cérébral (AVC) ou une artère des membres inférieurs et provoquer une ischémie tissulaire conduisant à une nécrose des tissus et une amputation (Taskinen and Borén, 2015). Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de décès chez les patients diabétiques et une maîtrise optimale des facteurs de risques permet de prévenir ce type de complications (Wong et al., 2016).

➤ Cardiopathie ischémique

L'étude Framingham a depuis longtemps démontré que le diabète constitue un facteur de risque majeur de pathologies cardiaques. Chez les sujets diabétiques, le risque de développer une pathologie cardiaque est deux fois plus élevé chez les hommes, et trois à cinq fois plus élevé chez les femmes que chez les non diabétiques (Kannel and McGee, 1979). Concernant l'IDM, il a été montré qu'il est plus fréquent et plus grave chez le sujet diabétique (Cosson et al., 2003). Des études observationnelles ont également démontré l'augmentation du risque d'insuffisance cardiaque et l'importance du contrôle glycémique dans sa prévention chez des patients DT1 et DT2 (Lind et al., 2011; Shah et al., 2015). L'augmentation d'1 % de

l'HbA1c serait associée à une augmentation de 17 % de la mort par IDM (Stevens et al., 2004).

➤ Accident vasculaire cérébral

Les personnes diabétiques présentent un risque 2,27 fois plus important de développer un accident vasculaire cérébral que les sujets normoglycémiques (The Emerging Risk Factors Collaboration, 2010). Il a également été montré que la durée du diabète est associée au risque d'AVC, avec une augmentation du risque de 3 % par an, et un risque triplé lorsque la durée du diabète dépasse 10 ans (Banerjee et al., 2012). Le contrôle glycémique serait associé au pronostic vital suite à un AVC, une augmentation d'1 % de l'HbA1c serait associée à une augmentation de la létalité par AVC de 37 % (Stevens et al., 2004).

➤ Artériopathie des membres inférieurs

Les patients diabétiques présentent un risque accru de développer une artériopathie des membres inférieurs. Une augmentation d'1 % de l'HbA1c est corrélée à une augmentation de 28 % du risque d'artériopathie des membres inférieurs (Selvin et al., 2004).

➤ Cardiomyopathie diabétique

La cardiomyopathie diabétique est définie comme une dysfonction structurelle et fonctionnelle en absence de maladie coronarienne et d'hypertension. Il existerait également un lien entre cardiomyopathie diabétique et hypertrophie cardiaque et rigidité du myocarde (Aneja et al., 2008). De nombreux mécanismes physiopathologiques peuvent être à l'origine de cette pathologie, mais certains semblent être une meilleure cible thérapeutique pour la restauration de la fonction contractile et pour prévenir la progression vers l'insuffisance cardiaque. Les mécanismes ciblés seraient les dysfonctions mitochondriales, la signalisation cytoprotectrice ainsi que la régulation de la protéine ATPase 2a Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (SERCA2a) (Miki et al., 2013).

5. Importance du contrôle glycémique dans la réduction des complications du diabète

Partant du principe que les complications micro- et macro-angiopathiques du diabète sont liées aux épisodes d'hyperglycémie chronique, de nombreuses études cliniques interventionnelles ont été construites afin d'évaluer l'impact d'un meilleur contrôle glycémique sur ces complications. De grandes études cliniques ont permis de montrer l'importance de la diminution du taux d'HbA1c sur les complications du diabète par l'intensification des traitements anti-diabétiques à la fois pour des diabétiques de type 1 et de type 2 (Beck, 2010; Ehrhardt et al., 2011; Vigersky, 2015). Ces résultats sont résumés dans le

Etude	Micro-vasculaire		Macro-vasculaire		Mortalité	
UKPDS	↘	↘*	—	↘*	—	↘*
DCCT/EDIC	↘	↘*	—	↘*	—	—*
ACCORD			—		↗	
ADVANCE	↘		—		—	
VADT	↘		—	↘*	—	

Tableau II. D'autre part, le développement des systèmes de mesure en continu de la glycémie permet aujourd'hui aux patients de suivre efficacement leur glycémie et donc de mieux la contrôler.

a. Etudes cliniques pour le diabète de type 1

L'étude clinique Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) a été la première à avoir montré l'importance du contrôle glycémique sur les complications micro-angiopathiques à long terme (Control and Group, 1993). Plus de 1400 patients ont été recrutés pour participer à cette étude. La moitié d'entre eux a été soumise à un traitement standard d'insuline, tandis que l'autre moitié a été soumise à un traitement intensif avec pour objectif une HbA1c inférieure à 6,05 %. Cette étude a duré 6 ans et demi, et a permis de montrer qu'un traitement intensif du diabète de type 1 permettait de réduire de façon significative le développement de

complications micro-vasculaires. La réduction du risque de rétinopathie était de 76 %. Pour la néphropathie, le risque de micro et macro-albuminurie était réduit respectivement de 39 et 54 %, et pour la neuropathie, le risque était réduit de 60 % (Control and Group, 1993).

A la suite de cette étude, la cohorte de patients a été incluse dans une nouvelle étude observationnelle, l'étude Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC). L'objectif de l'étude était d'évaluer les effets à long terme de l'étude DCCT, notamment sur les complications cardio-vasculaires. Cette étude a pu montrer que la période de bon équilibre glycémique résultant du contrôle glycémique intensif initié lors de l'étude DCCT permettait de réduire les complications micro-vasculaires et cardiovasculaires à long terme du diabète (Nathan and Group, 2014).

b. Grands essais : diabète de type 2

➤ Etude United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)

La première étude qui a permis d'évaluer l'effet d'un traitement intensif de la glycémie a été l'étude UKPDS. Cette étude comportait plus de 4000 patients DT2, séparés en deux groupes de traitement : un groupe traité de façon intensive et un groupe traité de façon conventionnelle. Il avait été montré qu'une diminution de l'HbA1c permettait de réduire les complications micro- et macro-vasculaires du diabète (Stratton et al., 2000). Dix ans après l'arrêt de l'étude, des effets bénéfiques étaient constatés pour le groupe traité de façon intensive. Une baisse des événements liés au diabète, une baisse de la mortalité ainsi qu'une baisse des complications micro-vasculaires ont été observées, suggérant la présence d'une mémoire glycémique (Holman et al., 2008).

D'autres études parues en 2008 sont venues nuancer les résultats obtenus dans les études UKPDS et DCCT.

➤ Etude Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group (ACCORD)

L'étude ACCORD comportait 10251 patients diabétiques de type 2, et avait pour objectif d'évaluer l'effet d'un traitement intensif de la glycémie (avec pour but une valeur d'HbA1c inférieure à 6 %) versus un traitement standard (objectif

entre 7 et 7,9 % d'HbA1c) sur le développement d'évènements cardiovasculaires (Group, 2008a). Un arrêt prématuré de l'étude fut nécessaire dû à une surmortalité (augmentation de 22 %) dans le groupe de patients traité de façon intensive. Cette surmortalité peut être expliquée par une augmentation des épisodes d'hypoglycémies. Le groupe traité intensivement présentait jusqu'à trois fois plus d'épisodes hypoglycémiques. Une étude de 2010 a évalué le risque de décès suite à un ou plusieurs épisodes hypoglycémiques sévères et symptomatiques dans la cohorte ACCORD. Cette étude a également déterminé s'il existait une différence de risque entre les deux groupes. Les résultats de cette étude ont permis de montrer que les épisodes d'hypoglycémie sévères augmentaient le risque de décès, mais que l'augmentation du nombre de décès dans le groupe de traitement intensif n'était pas due à une augmentation d'épisodes hypoglycémiques sévères (Bonds et al., 2010).

➤ [Etude Action in Diabetes and Vascular Disease : Preterax and Diamicon Modified Release Controlled Evaluation \(ADVANCE\)](#)

Cette étude avait deux objectifs : le premier était d'évaluer si l'effet de l'ajout d'un traitement anti-hypertenseur permettait de réduire le risque de complication micro- et macro-vasculaires ; le second était d'évaluer si un contrôle intensif de la glycémie (objectif d'HbA1c inférieure à 6,5 %) permettait de diminuer les complications micro- et macro-vasculaires. Ce second objectif a été réalisé sur une cohorte de 11240 patients DT2 à haut risque cardiovasculaire, qui ont été séparés en deux groupes de traitement : intensif et standard. L'objectif d'HbA1c de 6,5 % a été atteint après 5 ans pour le groupe intensif, tandis que le taux d'HbA1c était de 7,3 % dans le groupe standard, alors que l'HbA1c initiale était de 7,5 %. Le groupe intensif présentait également une baisse relative de 10 % de la survenue d'évènements micro- et macro-vasculaires (Group, 2008b).

➤ [Etude Veteran Affairs Diabetes Trial \(VADT\)](#)

L'étude VADT avait pour objectif d'évaluer l'effet d'un contrôle glycémique intensif (cible d'HbA1c inférieure à 7 %) chez des patients DT2 à haut risque cardiovasculaire (HbA1c de 9,5 % au début de l'étude). Ainsi 1791 vétérans de l'armée américaine ont été séparés en deux groupes de traitement : intensif et standard. L'objectif d'HbA1c a été atteint, le groupe de traitement intensif

présentait une HbA1c de 6,9 % alors que le groupe de traitement conventionnel présentait une HbA1c de 8,4 %. Après 6 ans de suivi, aucune baisse des évènements cardiovasculaires majeurs n'a pu être observée (Duckworth et al., 2009). L'étude n'a montré qu'une baisse de la néphropathie dans le groupe de traitement intensif.

Cette étude a été suivie à 10 ans et les résultats publiés ont pu montrer une baisse des évènements cardiovasculaires pour les patients traités de façon intensive (Hayward et al., 2015). Malgré cette baisse, aucune amélioration n'a été observée quant à la survie globale.

Etude	Micro-vasculaire		Macro-vasculaire		Mortalité	
UKPDS	↘	↘*	—	↘*	—	↘*
DCCT/EDIC	↘	↘*	—	↘*	—	—*
ACCORD			—		↗	
ADVANCE	↘		—		—	
VADT	↘		—	↘*	—	

*Tableau II : Impact d'un traitement intensif sur les risques de complications du diabète. Résultats des essais cliniques majeurs (Bergenstal et al., 2010). (↗ = augmentation du risque; ↘ = diminution du risque; — = pas d'effet ; * = suivi à long terme)*

c. Contrôle glycémique et HbA1c

Toutes ces études sur le contrôle glycémique se basaient sur l'utilisation de l'HbA1c en tant que marqueur glycémique moyen. Des contrôles stricts de la glycémie sont donc nécessaires, néanmoins les traitements utilisés peuvent entraîner des épisodes d'hypoglycémies délétères (Seaquist et al., 2013). Les patients diabétiques doivent donc réduire leur glycémie moyenne tout en évitant les épisodes hypoglycémiques. Une maîtrise de l'hyperglycémie, à travers une réduction de l'HbA1c, ainsi qu'une réduction des fluctuations glycémiques, semblent être une stratégie plus optimale qu'un contrôle glycémique strict seul. La mesure de l'HbA1c ne reflète que la glycémie moyenne sur deux à trois mois, ne tenant pas compte des variations de glycémie journalière. Comme le montre la Figure 4, des patients présentant la même glycémie moyenne (dosée par l'HbA1c) peuvent présenter des excursions glycémiques très différentes. La variabilité glycémique a par ailleurs été suggérée comme étant un facteur de complications du diabète, indépendamment de l'HbA1c (Brownlee and Hirsch, 2006).

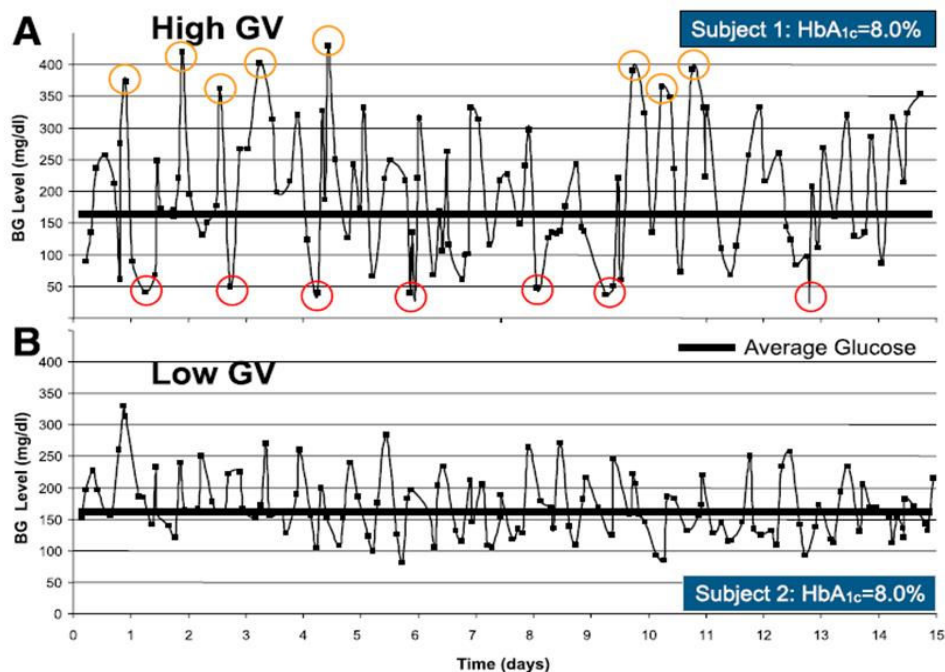


Figure 4 : Profils glycémiques de deux patients diabétiques présentant une HbA1c identique mais des variabilités glycémiques différentes (d'après Kovatchev et al., 2016) (GV : glycemic variability)

II. Variabilité glycémique

1. Définition

La variabilité glycémique (VG) est caractérisée par la durée, la fréquence et l'amplitude des fluctuations glycémiques. Il existe une VG à court terme, qui peut être inter- ou intra-journalière, et une VG à long terme, qui représente les fluctuations glycémiques sur plusieurs semaines ou mois.

Il existe aujourd'hui de nombreux systèmes de mesure de la glycémie : lecteurs de glycémie avec stylos auto-piqueurs et bandelettes de mesure. Le développement technologique a permis de créer des systèmes non-invasifs de mesure en continu de la glycémie. Ils permettent un grand nombre de mesures journalières (mesures à 5 minutes d'intervalle), permettant de suivre le profil glycémique du patient jour et nuit. Le patient peut alors savoir à tout moment s'il risque l'hypoglycémie ou si l'hyperglycémie doit être corrigée. La compilation des données collectées permet d'évaluer l'instabilité glycémique, et d'améliorer considérablement le contrôle glycémique (Buckingham, 2008). La VG peut être reconnue par le clinicien en se basant sur plusieurs paramètres : la survenue d'épisodes hypoglycémiques sévères (nombre et durée des épisodes), les excursions glycémiques post-prandiales ainsi que la présence d'autres variations de la glycémie. Cette instabilité glycémique peut être quantifiée de plusieurs manières, résumées dans le Tableau III.

2. Evaluation de la variabilité glycémique

a. Variabilité intra-journalière

➤ Déviation standard (SD) et coefficient de variation (CV)

La déviation standard autour de la moyenne glycémique, qui reste aujourd'hui le « gold standard » pour évaluer la VG, peut être mesurée sur 24 heures grâce aux systèmes de mesure en continu de la glycémie, ou grâce à 7 à 8 points de mesures sur une journée avec un lecteur de glycémie « classique ». Elle peut être associée au calcul du coefficient de variation, qui est un pourcentage calculé avec la SD et la glycémie moyenne ($CV (\%) = SD/moyenne \times 100$). L'équipe de Monnier a d'ailleurs

établi une valeur seuil à 36 %. Un CV inférieur à 36 % correspond à des niveaux de glycémie stables, alors qu'un CV supérieur correspond à des niveaux de glycémie instables (Monnier et al., 2016). Lorsque la SD et le CV sont déterminés grâce à l'utilisation de lecteurs de glycémie « classique », les fluctuations glycémiques ne peuvent pas être évaluées de façon optimale. Certaines variations peuvent en effet avoir lieu entre les mesures, et les prises de glycémie nocturnes sont difficiles à réaliser.

➤ **Moyenne des amplitudes des excursions glycémiques (MAGE)**

Une autre méthode permettant d'évaluer les fluctuations glycémiques se base sur le calcul de la moyenne des amplitudes des excursions glycémiques (Service et al., 1970). Elle permet de quantifier les excursions majeures (déviations standard supérieure à 1) et exclue les fluctuations mineures, qui pourraient être importantes. Elle est indépendante de la glycémie moyenne et ne prend pas en compte la fréquence des fluctuations.

➤ **Indice M**

L'indice M correspond à une transformation logarithmique de la déviation de la glycémie par rapport à une valeur moyenne définie arbitrairement, en fonction du statut du patient (Schlichtkrull et al., 1965). Bien que cette valeur ait pour but de fournir à la fois l'expression de la glycémie moyenne et l'effet des fluctuations glycémiques, la complexité de la formule est un frein à son utilisation.

➤ **Continuous overlapping net glycaemic action (CONGA)**

Cette méthode nécessite un système de mesure en continu de la glycémie. Elle calcule la différence entre les valeurs de glycémie séparées par un nombre n d'heures (entre une et huit heures) (McDonnell et al., 2005).

➤ **Mean absolute glucose (MAG)**

Ce paramètre a été décrit pour la première fois chez des patients hospitalisés avec passage en unité de soins intensifs. Le calcul est réalisé en prenant la somme des différences entre 7 points de mesures de glycémie réalisés sur 24 heures divisé par le temps en heure entre la première et la dernière mesure de glycémie (Hermanides et al., 2010). Cette étude avait permis de montrer qu'une plus grande VG était associée à une plus grande mortalité en unité de soins intensifs.

b. Variabilité inter-journalière

Le seul paramètre permettant d'estimer la VG inter-journalière consiste à calculer la moyenne absolue des différences quotidiennes (MADQ ou MODD : Mean amplitude of daily differences) (Molnar et al., 1972). Cette moyenne permet de déterminer la VG entre deux périodes consécutives de 24 heures, et reflète la stabilité glycémique jour après jour.

c. Variabilité à long-terme

Il existe également la possibilité de mesurer la VG à plus long terme. Elle peut être calculée entre plusieurs jours, semaines ou mois. Elle est évaluée par la déviation standard de l'HbA1c, mais il n'existe aujourd'hui pas de méthode standardisée, ni de définition précise (Kilpatrick, 2012).

d. Evaluation du risque d'hypoglycémie ou d'hyperglycémie

➤ Low (and High) blood glucose index (LBGI/HBGI)

Le LBGI est un indice permettant d'évaluer le risque de survenue d'hypoglycémies sévères (nécessitant l'aide d'un tiers). Le calcul du LBGI consiste en une transformation logarithmique des glycémies pour obtenir une expression gaussienne de la distribution des glycémies, ce qui permet de corriger l'asymétrie de la glycémie. Une valeur de 0 est ensuite attribuée pour les glycémies supérieures ou égales à 1,10 g/L et des valeurs progressives allant jusqu'à 100 pour les glycémies inférieures à 1,10 g/l, 100 correspondant à une valeur de glycémie à 0,20 g/L. L'étude de Kovatchev a permis de déterminer des valeurs seuil témoignant d'un risque de survenue d'épisodes d'hypoglycémie sévère : une valeur de LBGI inférieure à 2,5 correspond à un risque faible ; une valeur comprise entre 2,5 et 5 correspond à un risque intermédiaire et une valeur supérieure à 5 correspond à un risque élevé (Kovatchev et al., 1998).

Le HBGI permet de prédire le risque de survenue d'hyperglycémie, et est calculé de manière similaire au LBGI.

➤ **Average daily risk range (ADRR)**

L'ADRR permet de prédire le risque de survenue d'hypoglycémie et d'hyperglycémie. Il est calculé à partir des données de mesures de glycémie quotidiennes (3 à 5 mesures par jour) recueillies sur un mois (Kovatchev et al., 2006).

➤ **Index de labilité**

L'index de labilité est calculé sur une période de 4 semaines à partir d'au moins deux mesures de glycémie par jour, séparées d'au moins une heure et d'au plus 12 heures (Ryan et al., 2004). Ce paramètre a été développé pour mesurer la VG après transplantation d'îlots pancréatiques.

Index	Définition
SD	Déviati on standard : représente la dispersion des valeurs autour de la moyenne glycémique
CV	Coefficient de variation : Rapport de l'écart-type à la moyenne
MAGE	Moyenne des amplitudes des excursions glycémiques
Indice M	Permet d'élaborer un « score de pénalité » pour une valeur de glycémie par rapport à une valeur référence.
CONGA _n	Continuous overlapping net glycemic action : permet d'évaluer la deviation standard des valeurs de glucose pendant n heures de mesure de glucose en continu.
MAG	Moyenne absolu des glycémies : exprime le
MODD	Moyenne des différences journalières : moyenne de la valeur absolue des différences entre deux jours consécutifs
LBGI/HBGI	Index de valeurs basses/hautes : indicateur du risque de survenue d'hypoglycémies/hyperglycémies
ADRR	Rapport de risque quotidien moyen : indicateur du risque de survenue d'hypoglycémie et d'hyperglycémie
LI	Index de labilité : évalue la VG sur une période de 4 semaines

Tableau III : Liste des index de mesure de l'instabilité glycémique

3. Contribution de la variabilité glycémique aux complications du diabète

a. Variabilité glycémique à court terme

➤ Diabète de type 1

Concernant le DT1, la plupart des analyses de la VG à court terme proviennent de l'étude DCCT/EDIC et tendent à montrer qu'il n'existe pas de lien entre la VG (évaluée par SD ou MAGE) à court terme et le risque de développement ou de progression des complications micro-vasculaires (rétinopathie et néphropathie) (Kilpatrick et al., 2006; Lachin et al., 2017). Une étude a néanmoins montré que la VG (évaluée par la SD) pourrait jouer un rôle dans la survenue et l'évolution de la neuropathie périphérique (Bragd et al., 2008). Concernant les complications macro-vasculaires l'analyse des données de l'étude DCCT n'a pas permis de montrer de lien entre VG et développement de complications macro-vasculaires (Kilpatrick et al., 2008).

➤ Diabète de type 2

Deux études chez des patients DT2 ont montré une relation entre la variation de la glycémie plasmatique et le risque de développement de rétinopathie (Gimeno-Orna et al., 2003; Takao et al., 2010). Ces deux études sont remises en cause par l'étude de l'équipe de Zoppini, conduite sur un nombre de patients plus important, qui ne montre pas de lien entre variation de la glycémie plasmatique et développement ou progression de la rétinopathie (Zoppini et al., 2009).

Dans une récente étude, des patients diabétiques atteints d'une neuropathie périphérique présentaient une variabilité glycémique (évaluée par SD et MAGE) plus importante que des patients sans neuropathie (Xu et al., 2016). La relation entre VG et neuropathie autonome cardiaque a également été évaluée dans une étude de 2015. L'analyse des auteurs a permis de montrer une association entre la VG (évaluée par le CV calculé à partir des données de système de mesure en continu de la glycémie) et la présence de neuropathie autonome cardiaque (Jun et al., 2015).

L'analyse des données de l'étude HEART2D a permis de montrer qu'il n'existait pas de relation entre la VG et la survenue d'évènements cardiovasculaires. Cette étude comparait des patients ayant subi un infarctus et soumis à deux stratégies thérapeutiques différentes; un groupe suivait un contrôle glycémique par

des injections d'insuline rapide postprandiales, tandis que le second groupe suivait leur glycémie à jeun par injection d'insuline lente (Siegelar et al., 2011a). Une baisse significative de la VG dans le groupe à injections d'insuline postprandiales n'entraînait pas de baisse des évènements cardiovasculaires.

b. Variabilité glycémique à long terme

Concernant la variabilité glycémique à long terme, une méta-analyse publiée en 2015 s'est intéressée à l'impact de la variabilité de l'HbA1c sur le risque de mortalité et de complications liées au diabète (Gorst et al., 2015). Pour les patients DT1, les auteurs ont pu associer la VG à long terme à la survenue de rétinopathies, et de maladies rénales et cardiovasculaires. Pour les patients DT2, la VG à long terme est associée à une augmentation de la mortalité toute cause, des maladies rénales et des maladies cardiovasculaires.

Une étude réalisée chez 1706 adolescents DT1 a permis de montrer qu'une augmentation de la variabilité de l'HbA1c était associée au risque de néphropathie, de neuropathie autonome cardiaque et de rétinopathie (Virk et al., 2016). Un mauvais contrôle glycémique à long terme serait également associé à une augmentation des symptômes de dépression chez des patients DT2 (Ravona-Springer et al., 2017).

De nombreuses études ont ainsi été réalisées afin de déterminer l'impact de la VG sur les différentes complications du diabète, qu'il soit de type 1 ou de type 2. Néanmoins, la multitude de moyens de déterminer la VG et le manque d'une définition claire et reconnue par tous ne permet pas aujourd'hui d'utiliser la VG en tant que facteur de risque de complications ni en tant que marqueur du contrôle glycémique.

4. Mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la variabilité glycémique

a. Stress oxydatif

La production d'EROs et le stress oxydatif sont des phénomènes observés en cas d'hyperglycémie. Le stress oxydant peut être évalué par de nombreuses méthodes : étude de l'oxydation des protéines, de l'oxydation l'ADN, de l'oxydation

des lipides (dosage de la malonedialdéhyde), de l'oxydation des lipoprotéines (détection et quantification des lipoprotéines de faible densité oxydées), des activités anti-oxydantes enzymatiques (dosage de la glutathion peroxydase, superoxyde dismutase) ou non-enzymatique (vitamines et oligoéléments). Certaines études ont suggéré que les fluctuations glycémiques pourraient augmenter cette production d'EROs. La première étude à s'être intéresser à la contribution de la VG au stress oxydatif a été l'étude de Monnier *et al.* qui a corrélé la MAGE de 21 patients diabétiques de type 2 avec l'excrétion urinaire de 8-iso-PGF2 α , marqueur de stress oxydatif (Monnier et al., 2006). Les résultats de cette étude ont permis de montrer une corrélation entre VG et stress oxydatif. L'augmentation du stress oxydatif dû à la VG était majorée par rapport à l'hyperglycémie chronique. Deux autres études sont venues contredire ces résultats. Une étude réalisée chez 25 patients DT1 s'est intéressée à la corrélation entre GV (évaluée notamment par MAGE et CONGA) et stress oxydatif (évalué par dosage du 8-iso-PGF2 α urinaire). Les auteurs n'ont pu montrer de corrélation chez ces patients (Wentholt et al., 2008). La seconde étude en désaccord avec celle de Monnier a été menée chez 24 patients DT2. La GV a été évaluée par MAGE et SD, et aucune corrélation n'a pu être relevée avec le taux de 8-iso-PGF2 α urinaire (Siegelaar et al., 2011b). Une dernière étude a évalué la corrélation entre VG et stress oxydatif. Réalisée chez 26 patients DT2, une corrélation positive a été montrée entre GV (évaluée par CONGA) et stress oxydatif (évalué par 8-iso-PGF2 α urinaire) (Di Flaviani et al., 2011).

Des approches précliniques ont également été utilisées pour étudier les effets de la VG sur la production d'EROs et sa contribution au stress oxydatif. Plusieurs études *in vitro* ont notamment montré que des fluctuations en glucose provoquaient une augmentation de la production d'anions superoxydes mitochondriale. Ces études ont été réalisées sur des cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical (HUVEC) et suggèrent l'implication de la VG dans les dysfonctions endothéliales constatées chez les patients diabétiques (Piconi et al., 2006; Quagliaro et al., 2003, 2005).

b. Dysfonction endothéliale

Comme suggéré précédemment, les fluctuations glycémiques pourraient jouer un rôle dans la dysfonction endothéliale observée chez les patients diabétiques. Une

étude publiée en 2002 a démontré que des fluctuations répétées en glucose (pics d'hyperglycémie provoqués) induisaient une augmentation des cytokines pro-inflammatoires et une dysfonction endothéliale chez des patients DT2. L'utilisation d'un agent anti-oxydant a permis de diminuer ces deux phénomènes, suggérant un rôle clé du stress oxydatif (Esposito et al., 2002). D'autres études ont montré, à la fois chez des patients DT1 et DT2, que la VG pouvait altérer la fonction endothéliale, et participer ainsi à l'augmentation du risque cardiovasculaire. (Buscemi et al., 2010; Hoffman et al., 2013).

La dysfonction endothéliale a également été étudiée in vitro sur des modèles expérimentaux de VG. Une étude a en effet montré, sur des cellules HUVEC, que des fluctuations en glucose peuvent provoquer une augmentation de l'apoptose plus importante qu'en condition de forte concentration en glucose (Risso et al., 2001). Sur ce même type cellulaire, des études ont évalué l'effet de la VG sur l'expression de molécules d'adhésion, molécules associées à la formation des plaques d'athérome, et ont montré que des fluctuations en glucose augmentaient cette expression (Piconi et al., 2004; Quagliaro et al., 2005). Enfin, une augmentation de la senescence a pu être démontrée sur ces cellules HUVEC. Les cellules exposées à une fluctuation en glucose présentaient une senescence plus importante que des cellules exposées à des concentrations normale ou haute en glucose (Maeda et al., 2015; Rogers et al., 2013).

Beaucoup de ces études suggèrent un rôle clé du stress oxydatif, qui semble être majoré en cas de fluctuations glycémiques. Les EROs sont majoritairement produites par la mitochondrie, qui semble donc être une cible judicieuse dans l'étude des complications induites par des variations glycémiques.

III. Mitochondrie

La mitochondrie tire son nom du grec *mitos* (fil) *chondros* (grain). Cet organite est présent dans la plupart des cellules eucaryotes et participe à la production énergétique nécessaire au bon fonctionnement cellulaire. Ce sont des organites dynamiques qui sont capables de se déplacer au sein de la cellule, et de subir des phénomènes de fusion et fission. La mitochondrie est composée de deux compartiments, et délimitée par une double membrane.

1. Structure

La mitochondrie se compose de deux membranes, interne et externe, un espace inter-membranaire et une matrice (Figure 5, (Kühlbrandt, 2015)).

a. Membrane externe

Constituée d'une bicouche lipidique avec environ 60 % de protéines et 40 % de lipides, cette membrane est perméable aux ions et aux molécules d'une taille inférieure à 10 kDa. Cette perméabilité est possible grâce à la présence d'un canal transmembranaire, le VDAC (Voltage-dependent anion channel). Les molécules ayant une taille supérieure à 10 kDa, et possédant un signal d'adressage mitochondrial, peuvent traverser la membrane grâce à des complexes d'importation dénommés TOM (translocase of the outer membrane).

b. Membrane interne

La membrane interne diffère de la membrane externe de par sa composition. Elle est constituée d'une quantité plus importante de protéines (environ 80 %) et de seulement 20 % de phospholipides. Elle possède une composition lipidique particulière, très riche en cardiolipine. La membrane interne est alors beaucoup moins perméable que la membrane externe, puisqu'elle n'est perméable qu'à l'eau grâce à la présence d'aquaporines, à l'oxygène, au gaz carbonique, à l'ammoniac et à l'oxyde nitrique. Il existe néanmoins des transporteurs qui permettent le passage d'autres molécules. L'ANT (Adénine nucléotide translocase) réalise un échange ATP/ADP entre le cytosol et la matrice mitochondriale. L'ADP entre depuis le cytosol via le VDAC, et est échangé contre de l'ATP par l'ANT. D'autres transporteurs sont

présents au niveau de la membrane interne, tels que la navette malate/aspartate, le transporteur de pyruvate, la navette du glycérol-3-phosphate ou encore le transporteur de phosphate inorganique. Comme pour la membrane externe, il existe des systèmes de transports pour les protéines et grosses molécules : les TIM (translocase of the inner membrane). La membrane interne de la mitochondrie possède des invaginations ou replis formant les crêtes mitochondriales. C'est dans ces crêtes que se situe la machinerie enzymatique nécessaire à la production d'ATP (Vogel et al., 2006).

c. Espace inter-membranaire

L'espace inter-membranaire est très étroit, et situé entre les deux membranes mitochondriales. Il est chargé positivement grâce à une forte concentration en protons, et sa composition ionique est très proche de celle du cytosol, du fait de la perméabilité de la membrane externe.

d. Matrice mitochondriale

La matrice est délimitée par la membrane interne mitochondriale. Elle contient l'ADN mitochondrial, des mitoribosomes, des ARN de transfert. De nombreuses voies métaboliques s'y déroulent, telles que le cycle de Krebs ou

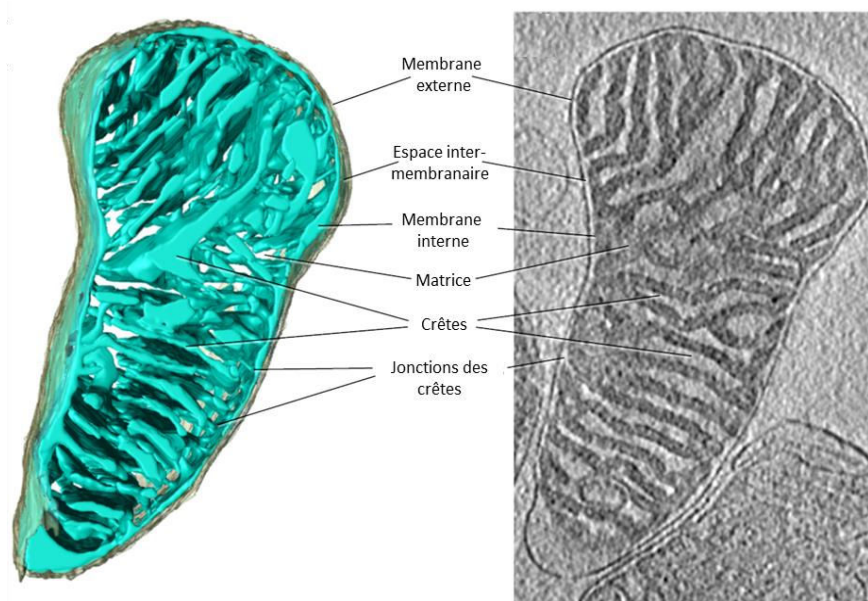


Figure 5 : Ultrastructure mitochondriale, d'après Kühlbrandt, 2015.

Vue tridimensionnelle d'une mitochondrie observée par cryotomographie électronique (à gauche), coupe tomographique (à droite).

l'oxydation des acides gras, et renferme les enzymes nécessaires au fonctionnement de ces voies.

2. Fonctionnement énergétique

a. Phosphorylation oxydative

La production d'énergie, l'ATP, est assurée en grande majorité par la phosphorylation oxydative (Figure 6). C'est à partir des nutriments, notamment des acides gras et du pyruvate (issu de la glycolyse), que le métabolisme oxydatif de la mitochondrie fonctionne. Le cycle de Krebs produit des coenzymes réduits sous forme de nicotinamide adénine dinucléotide hydrogénée (NADH, H⁺) et de flavine adénine dinucléotide hydrogénée (FADH₂). Ces équivalents réduits vont être pris en charge par une chaîne d'oxydoréduction. Les électrons provenant des équivalents réduits vont transiter par l'intermédiaire de différents complexes en fonction de leur potentiel d'oxydoréduction. Les coenzymes réduits sont alors réoxydés grâce au transfert de leurs électrons. L'accepteur final, possédant la plus grande affinité pour les électrons, est l'oxygène moléculaire qui est réduit en eau.

Le transfert des électrons est accompagné d'une libération d'énergie utilisée en partie pour un pompage de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire, au niveau des complexes I, III et IV. L'accumulation de protons au niveau de l'espace inter-membranaire crée une force proto-motrice constituée à la fois d'un gradient de pH et d'un potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). Ce gradient électrochimique permet d'activer la F₀-F₁ ATP synthase qui catalyse la transformation d'ADP + P_i en ATP. Ces mécanismes ont pour la première fois été évoqués au début des années 1960 et sont à la base de la théorie chimio-osmotique (Mitchell, 1961).

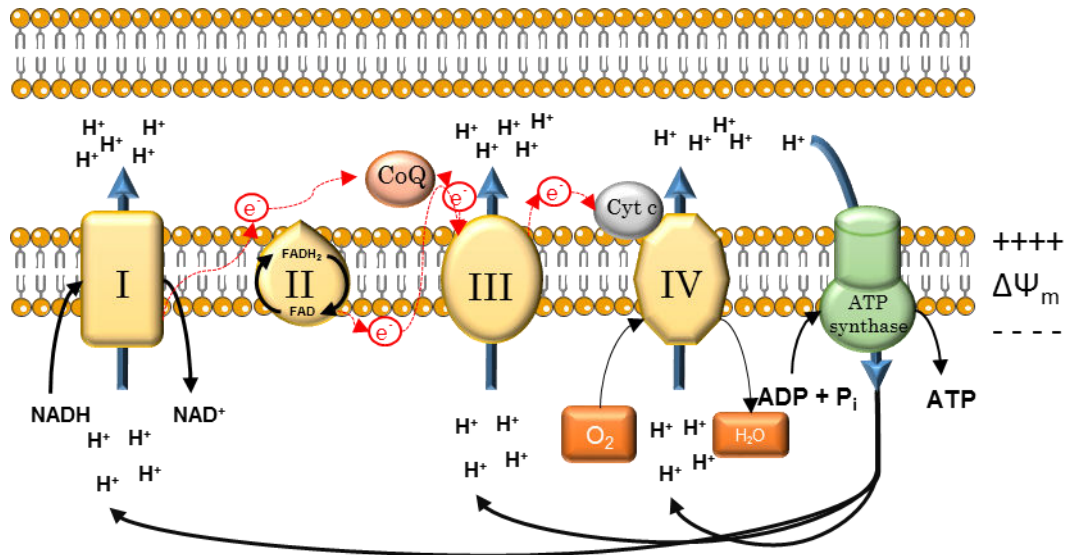


Figure 6 : Structure schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale : phosphorylation oxydative.

La chaîne respiratoire est composée de quatre complexes : le complexe I (NADH ubiquinol réductase), le complexe II (succinate ubiquinone oxydoréductase), le complexe III (ubiquinone cytochrome c oxydoréductase) et le complexe IV (cytochrome c oxydase). Les électrons sont transportés du complexe I à IV. Le gradient de protons résultant d'un pompage par les complexes I, III et IV est à l'origine du fonctionnement de l'ATP synthase.

b. Composition de la chaîne respiratoire

➤ Complexe I : NADH ubiquinone oxydoréductase

Il s'agit du premier et du plus gros complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale, possédant une masse moléculaire d'environ 980 kDa. Il est composé de 45 sous-unités. La plupart d'entre elles, 38, sont codées par le génome nucléaire et importées dans la mitochondrie après leur synthèse. Les 7 autres sont codées par le génome mitochondrial (Carroll et al., 2006). Ces sous-unités forment deux domaines, hydrophile et hydrophobe. Le domaine hydrophobe est composé des 7 sous-unités codées par le génome mitochondrial. Il contient la machinerie de pompage des protons ainsi que le site de réduction des quinones. Le domaine hydrophile de ce complexe comporte le site de fixation du NADH, 8 à 9 centres Fer/Soufre et la flavine mononucléotide (Figure 7)(Vinothkumar et al., 2014).

Le transfert des électrons du NADH s'effectue par l'intermédiaire de la flavine mononucléotide et les centres Fer/Soufre. Pour chaque paire d'électrons transférée vers l'ubiquinone, quatre protons transitent de la matrice vers l'espace inter-membranaire. Le principal inhibiteur du complexe I est la roténone, qui agit en tant

qu'analogue de l'ubiquinone (Degli Esposti, 1998). Elle se fixe à celle-ci et empêche le transfert des électrons du centre Fer/Soufre.

➤ **Complexe II : succinate déshydrogénase**

Le complexe II est composé de quatre sous-unités A à D, pour une masse moléculaire d'environ 200 kDa, et participe également au cycle de Krebs. Il est constitué d'un domaine hydrophobe comportant les sous-unités C et D qui permettent un ancrage dans la membrane interne, et d'un domaine hydrophile comportant les sous-unités A et B qui dépassent dans la matrice mitochondriale (Figure 8, d'après Sun et al., 2005). Les quatre gènes qui codent pour les quatre sous-unités sont issus du génome nucléaire. Le complexe II permet l'oxydation du succinate en fumarate, en fournissant deux électrons par la réduction du FAD en FADH₂. Il n'y a pas pour le complexe II de couplage des transferts d'électrons à un transfert de protons (Hederstedt, 2003).

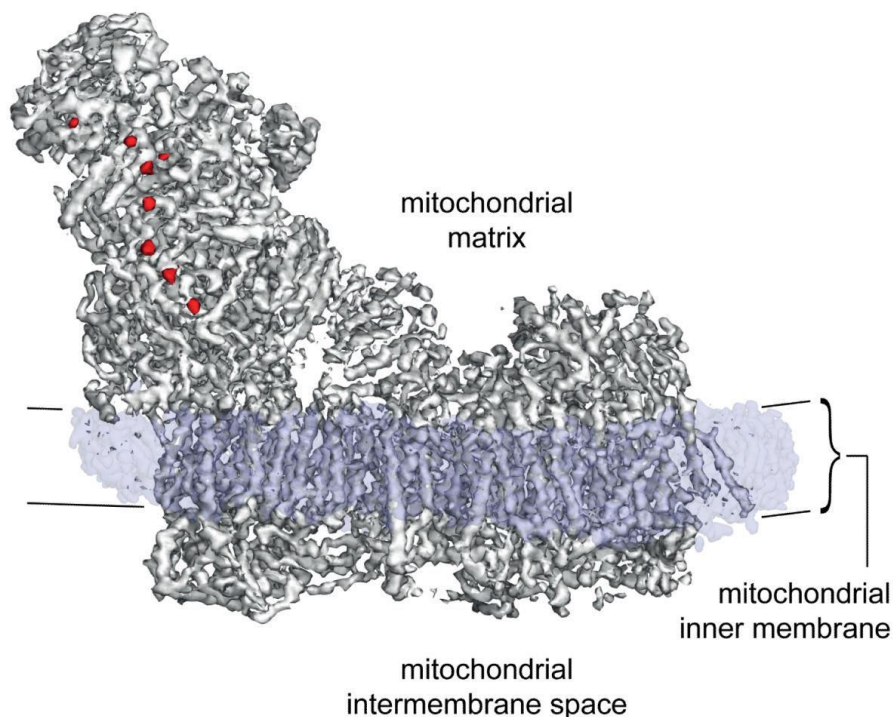


Figure 7 : Carte globale du complexe I déterminée par cryo-microscopie à électron d'après Vinothkumar et al., 2014.

En rouge les centres Fer/Souffre, en gris l'architecture globale du complexe et en bleu le domaine du complexe enchâssé dans la membrane interne.

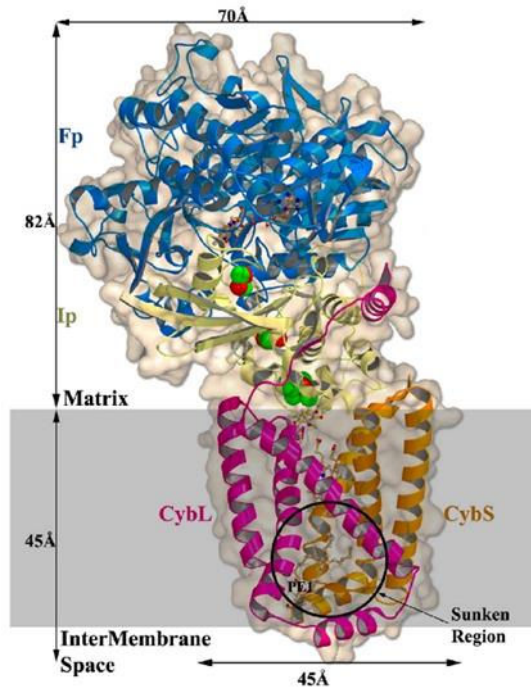


Figure 8 : Structure globale de la succinate déshydrogénase
Fp en bleu correspond au site de liaison du FAD, CybL et CybS correspondent respectivement aux sous-unités C et D. D'après Sun et al., 2005.

➤ **Complexe III : ubiquinol-cytochrome c réductase**

Le complexe III est constitué de deux monomères de 240 kDa, formant un homodimère de 480 kDa. Chacun des monomères comprend 11 sous-unités, dont 3 sont responsables du transfert d'électrons : le cytochrome c1, une protéine Fer/Soufre et le cytochrome b (Figure 9, d'après Gao et al., 2002), cette dernière étant la seule sous-unité codée par le génome mitochondrial (Meunier et al., 2013). Ce complexe permet le transfert de deux électrons de l'ubiquinol au cytochrome c, associé à une translocation de quatre protons vers l'espace inter-membranaire. Le principal inhibiteur de ce complexe est l'antimycine qui bloque le flux d'électrons entre le cytochrome b et le cytochrome c1. Le complexe III constitue également une source majeure d'espèces réactives de l'oxygène.

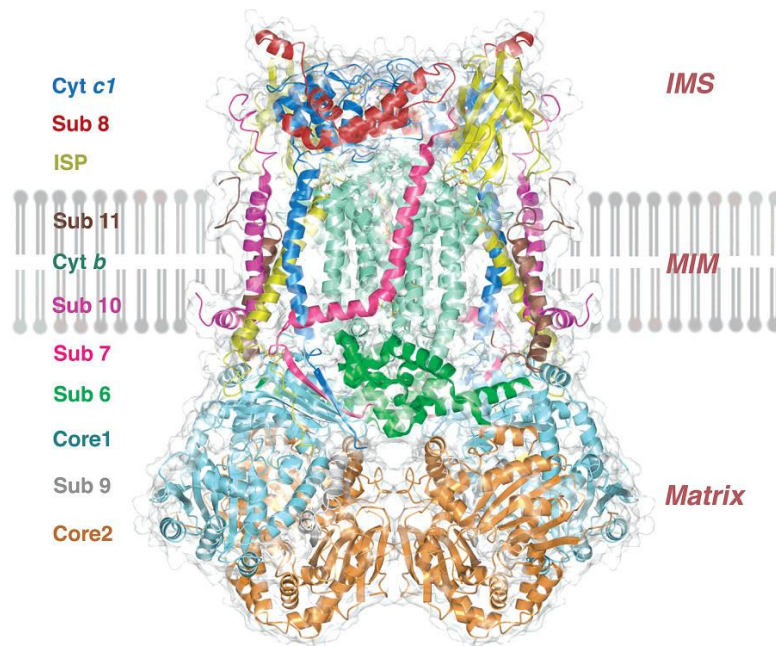


Figure 9 : Diagramme en ruban de l'ubiquinol-cytochrome c réductase sous forme dimérique d'après Gao et al., 2002.

Les 11 sous-unités sont indiqués à gauche (ISP pour la protéine Fer/Soufre, IMS : espace inter-membranaire, MIM : membrane interne mitochondriale)

➤ Complexe IV : cytochrome c oxydase

Le complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale est composé de 13 sous-unités (Figure 10, Maréchal et al., 2012), dont trois sont codées par le génome mitochondrial, pour une masse moléculaire de 400 kDa (Balsa et al., 2012). Il catalyse le transfert d'électrons du cytochrome c à l'oxygène moléculaire, qui est ensuite réduit en eau. La réduction d'une molécule de dioxygène en deux molécules d'eau consomme quatre protons, et est couplée à la translocation de quatre protons vers l'espace inter-membranaire. La cytochrome c oxydase peut être inhibée par le monoxyde d'azote, les azides, sulfides et cyanides, qui se lient au niveau du site de fixation de l'oxygène. Il en résulte un blocage de la chaîne respiratoire mitochondriale.

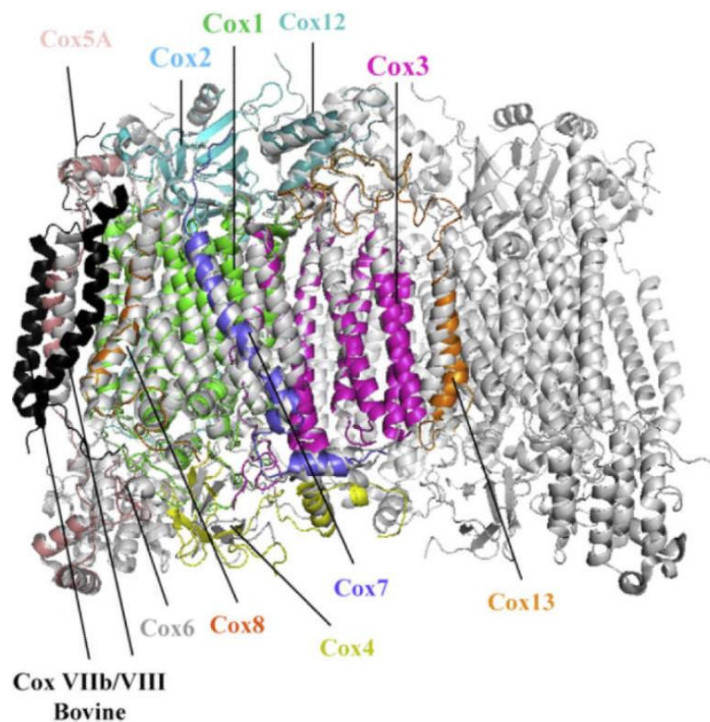


Figure 10 : Structure dimérique de la cytochrome c oxydase bovine, d'après Maréchal et al., 2012

Représentation superposée de la cytochrome c oxydase de levure monomérique sur la structure dimérique bovine. En gris la structure bovine, en couleur les sous-unités homologues et en noir les deux sous-unités sans homologie.

➤ F₀-F₁ ATP synthase / Complexe V

Le complexe V est composé de deux domaines F₀ et F₁ et possède une masse moléculaire d'environ 600 kDa (Figure 11, d'après Walker, 2013). Le domaine F₁ est matriciel et est constitué de cinq sous-unités, tandis que le domaine F₀ est transmembranaire permettant le retour des protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice (Grover et al., 2008). L'ATP synthase permet la synthèse d'ATP grâce au gradient de protons. Le flux de protons est couplé à la synthèse d'ATP par un mécanisme de rotation. Le gradient de proton permet la rotation de la sous-unité F₀ entraînant la rotation de l'axe reliant F₀ à F₁ (composé des sous-unités γ , δ et ϵ , voir Figure 11), ce qui induit un changement de conformation de sous-unités du domaine F₁. Cette déformation de la sous-unité F₁ libère l'énergie nécessaire à la production d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. L'ATP synthase est également capable de fonctionner en ATPase, hydrolysant l'ATP en ADP + phosphate inorganique (Wang and Oster, 1998). Ce mécanisme permet aux protons d'aller dans le sens inverse du gradient, de la matrice vers l'espace inter-membranaire, participant au maintien du potentiel de membrane.

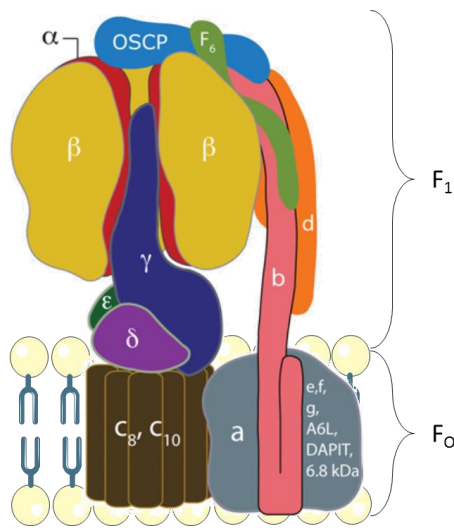


Figure 11 : Organisation des sous-unités de l'ATP synthase d'après Walker, 2013

Le domaine F_1 est matriciel, le domaine F_0 enchâssé dans la membrane interne. OSCP : oligomycin-sensitivity-conferral protein.

c. Régulation de la phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative permet la production d'énergie, nécessaire au bon fonctionnement des cellules. La régulation de ce processus est donc un enjeu majeur pour l'organisme. La régulation de la phosphorylation oxydative peut se faire par un contrôle de la vitesse de respiration mitochondriale ou par un contrôle de son efficacité.

La respiration mitochondriale peut être régulée par l'apport des coenzymes réduits NADH et FADH₂. Une augmentation de cet apport en substrats de la chaîne respiratoire va stimuler cette dernière, bien que tissu-dépendante. Il existe également un contrôle respiratoire. La vitesse de respiration, et donc du transport des électrons, dépend de la disponibilité en ADP (Chance and Williams, 1956). Cela permet aux mitochondries de s'adapter en fonction des besoins énergétiques.

Le rendement de la phosphorylation oxydative peut également être contrôlé. L'efficacité de la production d'ATP peut être définie par le rapport ATP/O, correspondant à la quantité d'ATP produite par molécule d'oxygène consommé. Ce rendement peut varier grâce à des phénomènes de découplage. Le découplage extrinsèque, phénomène de fuite de protons et cations dû à la perméabilité de la

membrane interne, et le découplage intrinsèque dû à une baisse de l'efficacité des pompes à protons.

3. Production d'espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène sont principalement produites par la mitochondrie lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire. Toutes les EROs sont des composés considérés comme toxiques, mais qui sont également impliqués dans la signalisation cellulaire (Rhee, 1999). Il existe néanmoins des systèmes anti-oxydants de détoxifications permettant un contrôle de la quantité d'EROs, et d'éviter le développement du stress oxydant.

a. Formes d'EROs

La phosphorylation oxydative constitue donc la source majeure d'EROs endogènes, telles que l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou encore le radical hydroxyle $\cdot OH$ (Wallace, 1999). La production d'anions superoxydes est due à une baisse de la phosphorylation oxydative, qui entraîne une fuite plus importante des électrons augmentant ainsi la production d' $O_2^{\cdot-}$. La réduction de l'oxygène moléculaire est l'étape par laquelle peuvent apparaître les différentes EROs : l' $O_2^{\cdot-}$, l' H_2O_2 , et l' $\cdot OH$. L' $\cdot OH$ constitue l'espèce radicalaire la plus nocive pour l'organisme, car très réactive.

b. Source de production des EROs

➤ Production mitochondriale

La production mitochondriale d'EROs, et notamment d' $O_2^{\cdot-}$, est due aux complexes I, II et III de la chaîne respiratoire (Figure 12, d'après Chen and Zweier, 2014). Le complexe I serait la source majeure de production d'ERO, il semblerait qu'il existe deux sites de production de l'anion superoxyde : un serait localisé au niveau du site de liaison à l'ubiquinone et l'autre serait localisé au niveau de la sous-unité flavine mononucléotide. Le complexe II semble lui aussi participer à la génération d'EROs, et posséderait deux régions productrices : une au niveau du cofacteur FAD, et l'autre, comme pour le complexe I, au niveau du site de liaison à

l'ubiquinone. Enfin, le complexe III est également source d'EROs. Il formerait l' $O_2^{\cdot-}$ lors du cycle de l'ubiquinone (Chen and Zweier, 2014).

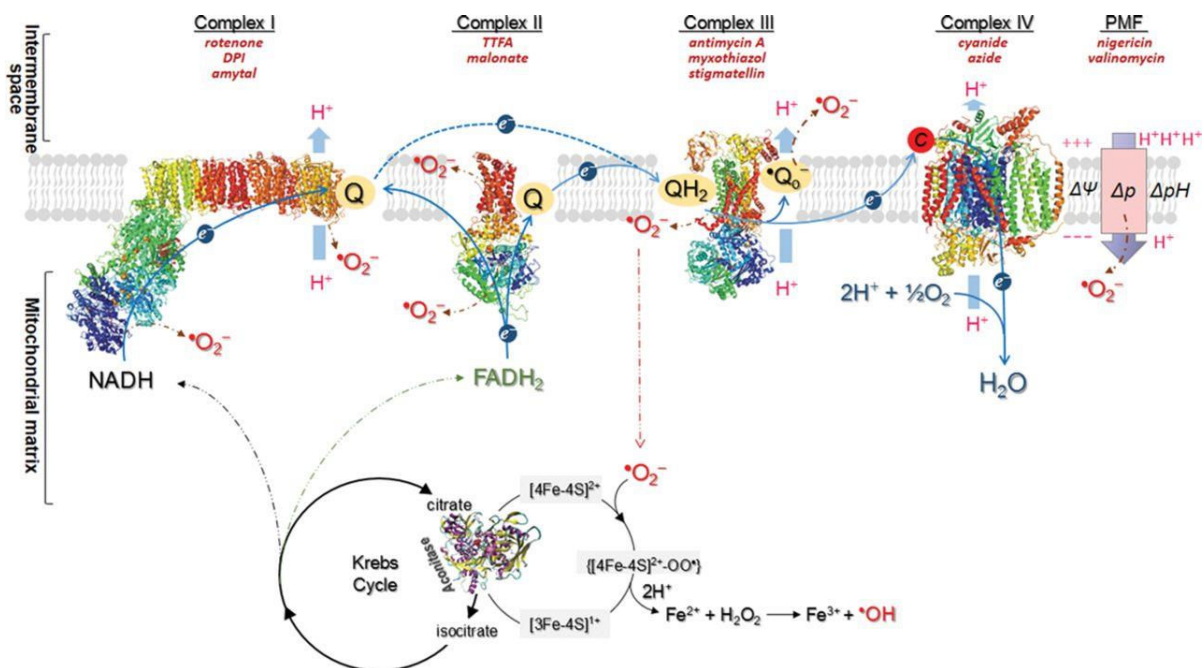


Figure 12 : Représentation des mécanismes de génération d'EROs par la chaîne respiratoire d'après Chen and Zweier, 2014.

Les sources d'espèces réactives de l'oxygène sont le complexe I, II, III, le cycle de Krebs ainsi que la force proton-motrice (PMF). Les inhibiteurs des complexes sont indiqués en rouge.

➤ Autres sources de production d'EROs

Il existe d'autres sources d'EROs, telles que la famille des nicotinamide adénine di-nucléotide phosphatases oxydases (NADPH oxydases, ou NOX), ou encore la xanthine oxydoréductase. Les NOX existent sous 5 isoformes, qui se différencient par leur mode d'activation, leur localisation mais aussi par le type d'ERO qu'elles produisent. La principale fonction des NOX est de catalyser le transfert des électrons du NADPH à l'oxygène, ce qui génère de l' $O_2^{\cdot-}$ et de l' H_2O_2 (Chanock et al., 1994). La xanthine oxydoréductase catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique. Cette xanthine déshydrogénase peut être convertie en xanthine oxydase, qui est capable de fournir des électrons directement à l'oxygène moléculaire, générant ainsi de l' $O_2^{\cdot-}$ et de l' H_2O_2 , puis le radical hydroxyle en présence de fer (Battelli et al., 2016).

c. Systèmes anti-oxydants

Il existe des systèmes de détoxification qui permettent d'éviter un développement trop important du stress oxydatif et des dommages qu'il entraîne. Ils peuvent être enzymatiques ou non-enzymatiques. Parmi les systèmes de détoxification enzymatiques, il existe la catalase, la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase. Les systèmes anti-oxydants non-enzymatiques comprennent notamment l'acide ascorbique (vitamine C), l' α -tocophérol (vitamine E), le glutathion, les caroténoïdes, les flavonoïdes (Valko et al., 2007).

La SOD est une métalloprotéine qui permet la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et eau. L' H_2O_2 peut ensuite être pris en charge par la catalase qui le transforme en eau et dioxygène. La réduction de l' H_2O_2 peut également se faire grâce à l'action de la glutathion peroxydase, qui transforme l' H_2O_2 en eau en utilisant le glutathion réduit.

La régulation des EROs est capitale pour le bon fonctionnement cellulaire. Une trop grande quantité d'EROs peut provoquer de nombreux dommages. Elles peuvent en effet endommager des protéines en altérant leur fonctionnement. Elles peuvent également induire des dommages sur l'ADN par cassure ou mutation. Si la balance régulatrice « système anti-oxydants / EROs » n'est plus contrôlée, les cellules subiront des dommages importants pouvant induire la mort cellulaire.

4. Dynamique mitochondriale

Les mitochondries s'organisent sous forme d'un réseau, donc la structure est dépendante des processus de fusion et de fission mitochondriale. Ce sont des organites dynamiques capables de se déplacer le long des microtubules du cytosquelette cellulaire. Lorsque les mitochondries d'une cellule vont fusionner, elles formeront un réseau interconnecté et filamenteux. A l'inverse, lorsque le taux de fission sera élevé, les mitochondries apparaîtront sous forme de point, avec un réseau très fragmenté. Certains des mécanismes et acteurs de ces processus de fusion et fission sont connus, mais ne sont néanmoins pas tous décrits.

a. Fusion

La fusion mitochondriale se déroule par l'intermédiaire de deux protéines : les mitofusines 1 et 2 (MFN1/2) et la protéine OPA1 (Optic atrophy 1) (Figure 13 d'après Kanamaru et al., 2012). Les protéines MFN1 et MFN2 font partie de la famille des GTPases et sont situées au niveau de la membrane externe mitochondriale, et sont indispensables à la fusion (Koshiba et al., 2004). Ce sont elles qui permettent l'interaction des mitochondries entre elles. Les mitochondries possédant deux membranes, une coordination fine de la fusion des membranes interne et externe est nécessaire dans le but de préserver les compartiments intra-mitochondriaux. Ce sont néanmoins deux évènements qui se déroulent de manière indépendante (Malka et al., 2005). Il semblerait que le potentiel de membrane mitochondrial puisse jouer un rôle. La fusion des membranes internes nécessite un maintien du $\Delta\Psi_m$ et une quantité de GTP importante, alors que la fusion des membranes externes nécessite une quantité moins importante de GTP sans maintien du $\Delta\Psi_m$ (Meeusen et al., 2004). OPA1 est également une GTPase, localisée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial. Son rôle reste incertain, mais il existerait une coordination fonctionnelle avec les mitofusines, (Cipolat et al., 2004) et serait impliquée dans la fusion des membranes internes, l'inhibition de l'expression de cette protéine empêche en effet la fusion (Chen et al., 2005).

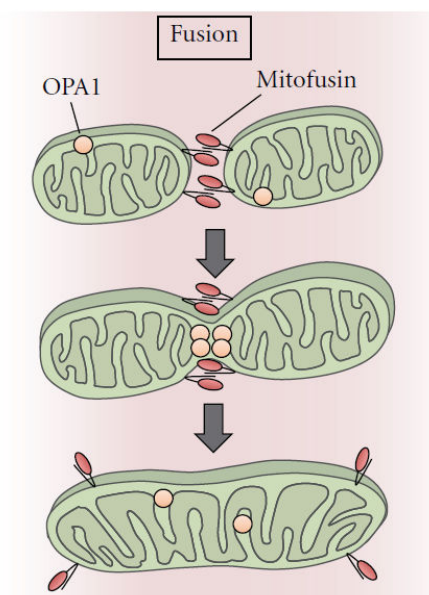


Figure 13 : Mécanisme de fusion mitochondriale d'après Kanamaru et al., 2012

La fusion mitochondriale est dépendante des protéines OPA1 et Mitofusines, qui permettent le rapprochement puis la fusion des mitochondries.

b. Fission

Le mécanisme de fission mitochondriale s'effectue par l'intermédiaire de plusieurs acteurs : les protéines Dynamin related protein 1 (Drp1), la protéine de fission mitochondriale (Fis1). Tout comme le mécanisme de fusion, le mécanisme de fission mitochondriale reste aujourd'hui peu connu. La protéine Drp1 est recrutée depuis le cytosol pour former une spirale autour de la mitochondrie, induisant la constriction des membranes externe et interne (Figure 14, d'après Elgass et al., 2013). Cette spirale se forme par fixation du GTP sur Drp1, qui induirait un changement de conformation de la protéine et une oligomérisation. L'hydrolyse du GTP fournirait ensuite l'énergie nécessaire à la constriction. Le recrutement de Drp1 se déroulerait par l'intermédiaire du facteur de fission mitochondrial (Mff) (Otera et al., 2010). Le rôle de la protéine Fis1 n'est pas encore clairement élucidé, mais sa surexpression induirait une fission plus importante des mitochondries. Elle est adressée à la membrane externe et serait impliquée dans le recrutement de Drp1 (Yoon et al., 2003). Les mécanismes de régulation de la fission mitochondriale sont en majeure partie contrôlés par des processus de phosphorylation ou ubiquitination de Drp1, dans le but de modifier son activité ainsi que sa localisation (Nakamura et al., 2006; Taguchi et al., 2007).

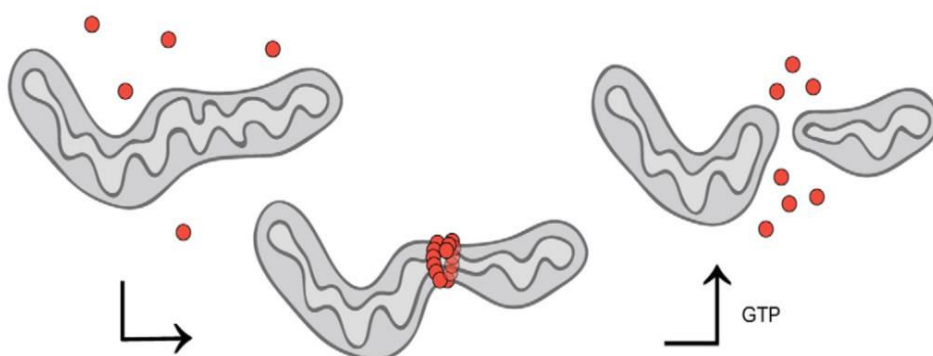


Figure 14 : Mécanisme de fission mitochondriale d'après Elgass et al., 2013

La fission mitochondriale s'effectue grâce à la protéine Drp1 (en rouge) qui forme un anneau de constriction autour de la mitochondrie, sous la dépendance de GTP.

c. Rôles de la dynamique mitochondriale

L'un des rôles principaux de la dynamique mitochondriale est de maintenir l'intégrité et la distribution de l'ADN mitochondrial au sein des cellules, qui code pour des composants essentiels de la chaîne respiratoire (Jokinen and Battersby, 2013). La dynamique mitochondriale joue également un rôle dans les processus de division cellulaire. Lors de la transition G1-S du cycle cellulaire, les mitochondries passent d'un réseau fragmenté, à un réseau hyper-fusionné (Mitra et al., 2009). Le blocage de ce mécanisme d'hyper-fusion entraîne un arrêt de la progression du cycle en phase S, démontrant le rôle actif des processus de fusion/fission. Une altération de la dynamique mitochondriale engendrée par une inhibition de la protéine Drp1 (augmentant ainsi le rapport fusion/fission) provoque des dommages à l'ADN et une aneuploïdie (Qian et al., 2012).

Les mécanismes de fission participent également au recyclage des mitochondries, en permettant de séquestrer les composants endommagés à l'intérieur de mitochondries qui subiront ensuite un recyclage spécifique, la mitophagie. Le terme de mitophagie réfère à une autophagie sélective des mitochondries, proposé par Lemasters (Lemasters, 2005). Lorsqu'une mitochondrie subit ce processus, elle est ubiquitinylée sur des protéines appartenant à la membrane externe, notamment sur les mitofusines (Gegg et al., 2010), puis reconnue par des protéines spécifiques se liant à l'ubiquitine. Elle peut également exprimer des récepteurs spécifiques qui interagissent avec la protéine LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3). La protéine LC3 est exprimée à la membrane des autophagosomes, qui vont séquestrer les mitochondries pour dégradation.

5. Rôle de la mitochondrie dans la mort cellulaire

La morphologie du réseau mitochondrial et sa dynamique sont également impliquées dans les mécanismes de mort cellulaire programmée et non programmée, que sont l'apoptose et la nécrose.

a. Apoptose

L'apoptose est un processus de mort programmé par la cellule, faisant intervenir de nombreux acteurs moléculaires. Elle permet l'élimination de cellules endommagées ainsi que le maintien de l'homéostasie de l'organisme. L'apoptose peut être mise en place par deux voies d'activation : la voie intrinsèque faisant intervenir la mitochondrie, et la voie extrinsèque impliquant des récepteurs membranaires à domaines de mort (notamment le Tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) et le FAS/CD95) (Figure 15, d'après Youle and Strasser, 2008). Ces deux voies ont pour but d'activer des caspases dites initiatrices, qui par un processus en cascade, permettent aux caspases effectrices d'être activées.

La voie intrinsèque impliquant la mitochondrie est activée par des protéines pro-apoptotiques de la famille B cell lymphoma-2 (Bcl-2) telles que Bax et Bak. Ces protéines régulent la libération de facteurs pro-apoptotiques à travers la membrane mitochondriale externe vers le cytosol, tels que le cytochrome c ou l'Apoptosis inducing factor (AIF). Le relargage du cytochrome c dans le cytosol s'effectue en parallèle à un mécanisme de fission mitochondriale (Suen et al., 2008). Le mécanisme de fission lors de l'apoptose est dépendant de la protéine Drp1, qui est recrutée à la membrane mitochondriale externe. Elle serait impliquée dans la fragmentation mitochondriale et la libération du cytochrome c, et donc dans l'apoptose (Frank et al., 2001).

Après libération, le cytochrome c se fixe ensuite à une protéine adaptatrice apoptosis activating factor 1 (Apaf1). Une fois activée, le complexe cytochrome c/Apaf1 se lie à la pro-caspase 9 pour former l'apoptosome. La pro-caspase 9 est ensuite activée par protéolyse et va ensuite activer la caspase-3. La destruction de la cellule est engendrée par la caspase-3 qui clive certains substrats et active des DNases. Une fragmentation du noyau et du cytosquelette aura lieu, ainsi qu'une condensation de la chromatine, entraînant la formation de corps apoptotiques, qui seront par la suite dégradés.

Les processus apoptotiques sont régulés par de nombreux mécanismes, mais certains nécessitent la présence d'ATP (Kass et al., 1996). Lorsque les quantités d'ATP sont insuffisantes, les cellules vont mourir par nécrose.

b. Nécrose

La nécrose correspond à une mort cellulaire dépourvue de processus régulateur. La mort cellulaire intervient par un gonflement, les cellules se gorgent d'eau, ce qui va entraîner une rupture de la membrane plasmique. Le milieu cytoplasmique est alors relargué dans le milieu extra-cellulaire, provoquant une réponse inflammatoire. Bien que longtemps considérée comme une mort cellulaire non-régulée, il existe aujourd'hui de solides preuves concernant l'existence d'une nécrose programmée et régulée, dénommée nécroptose.

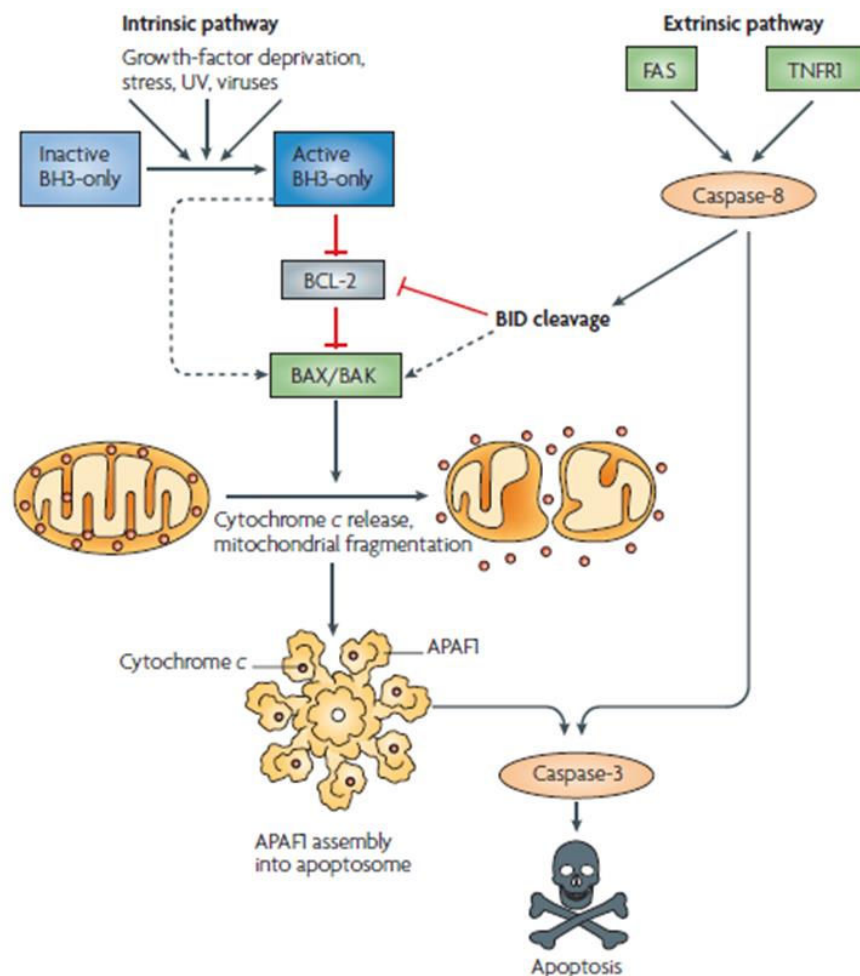


Figure 15 : Schéma décrivant les voies intrinsèque et extrinsèque menant à l'apoptose d'après Youle and Strasser, 2008).

Le mécanisme de nécroptose est initié par activation du TNFR1 par le TNF. L'activation du récepteur induit un changement de conformation, permettant l'assemblage d'un complexe composé de nombreuses protéines, dont la receptor-interacting protein 1 et 3 (RIP1 et RIP3) et des inhibiteurs cellulaires de l'apoptose.

La protéine RIP1 est par la suite poly-ubiquitinylée, permettant la formation du complexe DISC (Death-inducing signalling complex) ou nécrosome, comprenant notamment la caspase 8. Si cette dernière est inhibée, les protéines RIP1 et RIP3 sont phosphorylées et le mécanisme de nécroptose est enclenché. Lors de la nécroptose, il y a inhibition de l'ANT, ce qui a pour effet une baisse de la quantité d'ATP cytosolique. Le métabolisme oxydatif de la chaîne respiratoire est stimulé en amont par le nécrosome. Il y a alors une production exacerbée d'EROs, et un découplage mitochondrial élevé. Les dommages engendrés sont à l'origine de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP). L'ouverture de ce canal provoque la perméabilisation de la membrane mitochondriale, libérant dans le cytosol des protéines cytotoxiques (AIF notamment). Les cellules nécrotiques sont ensuite phagocytées par des macrophages pour être dégradées.

c. Rôle du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP)

Dans certaines situations pathologiques, telles que l'ischémie-reperfusion, le stress oxydatif, ou une augmentation des concentrations calciques matricielles, la mitochondrie va subir le processus de transition de perméabilité mitochondriale (mPT). Il s'agit d'un accroissement de la perméabilité de la membrane interne pour l'eau, et pour des molécules de taille inférieure à 1,5 kDa. Cette augmentation de perméabilité serait due à la formation et l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale. L'ouverture de ce pore provoque un gonflement de la mitochondrie et une rupture de la membrane externe, entraînant une chute du potentiel de membrane et un découplage de la phosphorylation oxydative. Le flux d'électrons est bloqué, et l'ATP synthase change d'activité pour une activité ATPase, ce qui provoque la consommation rapide de l'ATP présent. Selon la durée de l'ouverture du mPTP et le nombre de mitochondries touchées, la cellule va subir l'apoptose ou la nécrose (Rasola and Bernardi, 2011).

6. Mitochondrie et hypoxie

L'oxygène est un élément essentiel au fonctionnement de la chaîne respiratoire. Dans des situations pathologiques telles que les cancers ou l'insuffisance cardiaque, une diminution de la quantité d'oxygène disponible peut

être observée. Cet état d'hypoxie va induire des réponses de l'organisme à l'échelle cellulaire dans le but d'augmenter l'apport local en oxygène tout en diminuant sa consommation. Ces réponses notamment métaboliques sont induites par la famille des facteurs de transcription HIF (Hypoxia inducible factor). En conditions physiologiques de normoxie, les facteurs HIF, et notamment le facteur HIF-1 α , sont dégradés par le protéasome. Cette dégradation est possible grâce à l'hydroxylation de HIF-1 α sur résidus proline par la protéine prolyl hydroxylase domain 2 (PHD2) qui nécessite l' α -cétoglutarate comme substrat. Il existe de nombreux régulateurs de PHD2 comme le succinate ou les EROs à fortes concentrations, qui vont inhiber la PHD2 et donc stabiliser HIF-1 α (Wong et al., 2013). En conditions hypoxiques, la protéine PHD2 est inhibée, HIF-1 α s'accumule et est stabilisé puis transloqué vers le noyau pour interagir avec les éléments de réponse à l'hypoxie de gènes cibles (Wenger et al., 2005). Parmi ces gènes cibles, HIF-1 α est capable de se lier aux promoteurs de gènes codant pour les transporteurs de glucose, permettant de réguler la captation et le métabolisme du glucose. L'activation de HIF permet également une activation de la glycolyse anaérobie et une inhibition du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative. Il existe des mutations des gènes codant pour les sous-unités de la succinate déshydrogénase (SDHB, SDHC, SDHD) qui sont responsables de l'apparition de cancers (parangliomes). Une perte de la sous-unité SDHD induit une augmentation de la protéine HIF-1 α en conditions de normoxie (Tormos and Chandel, 2010).

Problématique du travail de thèse

Le diabète, et les complications associées à cette maladie, constituent aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique. Comme nous avons pu le voir précédemment, le phénomène de variabilité glycémique que l'on constate chez les patients diabétiques semble délétère. De nombreuses questions se posent quant au rôle de la VG dans le développement des complications du diabète, qu'elles soient micro- ou macro-vasculaires.

Dans le but d'approfondir l'hypothèse selon laquelle la variabilité glycémique serait délétère et impliquée dans le développement des complications du diabète (et notamment les complications cardiaques), et de par les thématiques de notre laboratoire centrées autour du cœur, nous avons choisi de travailler sur un modèle de cardiomyocytes immortalisés d'atrium de souris, la lignée HL-1. La mitochondrie étant l'organe clé du métabolisme énergétique, et le glucose une source majeure d'énergie, nous avons émis une première hypothèse selon laquelle les fluctuations en glucose pourraient altérer certaines fonctions mitochondriales ou cellulaires. La seconde hypothèse proposée repose sur des résultats précédemment obtenus au laboratoire. Il a en effet été suggéré que la variabilité glycémique pouvait avoir un rôle délétère dans un contexte d'ischémie reperfusion myocardique (Joubert et al., 2016).

Dans une première partie, nous avons développé un modèle nous permettant de mimer la variabilité glycémique. Nous avons fixé le temps et la fréquence des fluctuations, et avons soumis nos cellules au protocole mis en place. Nous avons évalué l'impact des fluctuations en glucose sur diverses voies de signalisation cellulaire et sur le métabolisme mitochondrial. Nous avons alors étudié le processus de phosphorylation oxydative, l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire, la production énergétique, l'oxydation des protéines, la production d'anions superoxydes mitochondriale, le potentiel de membrane mitochondrial, l'ouverture du mPTP.

Dans le but de tester notre seconde hypothèse, selon laquelle la variabilité glycémique serait délétère dans un contexte d'ischémie, nous avons cherché à savoir

si les fluctuations en glucose pouvaient avoir un impact sur les lésions induites par un épisode d'hypoxie (mimant une ischémie cardiaque). Nous avons tout d'abord cherché à mettre au point un protocole d'hypoxie pouvant mimer une situation d'ischémie myocardique. Nous avons déterminé le mécanisme de mort cellulaire induit par l'hypoxie, et les impacts de cette hypoxie sur certaines fonctions mitochondriales. Enfin, en réadaptant notre protocole d'hypoxie à nos conditions de traitement, nous avons évalué le rôle des fluctuations en glucose sur le développement des lésions induites par l'hypoxie.

J'ai eu également la chance de pouvoir travailler sur un projet parallèle concernant une mutation originale du gène ATP6, qui serait responsable d'un syndrome de neuropathie, ataxie, rétinite pigmentaire (syndrome de NARP). Dans ce projet, j'ai pu effectuer une exploration de certaines fonctions mitochondriales à partir de fibroblastes de patients témoins et présentant cette mutation. Ce travail a permis la rédaction d'un article accepté pour publication à *Biochemical & Biophysical Research Communications*.

Matériels et méthodes

A moins qu'il ne soit indiqué, le fournisseur des produits et réactifs décrits dans cette partie est Sigma Aldrich.

I. Culture cellulaire

La lignée HL-1 (Figure 16) est une lignée de cellules musculaires cardiaques, développée par le Professeur William Claycomb. Elle dérive de cellules AT-1, issues d'une tumeur auriculaire de souris. Elles possèdent des propriétés morphologiques, biochimiques et électrophysiologiques de cellules cardiaques auriculaires (Claycomb et al., 1998). Elles sont cultivées dans des flasques de cultures préalablement traitées avec une solution de gélatine (0,02 % (m:v))/fibronectine (5 µg/mL) dans une atmosphère humide à 37°C, 95 % d'air et 5 % de CO₂. Le milieu de culture est élaboré à partir du milieu Claycomb, contenant 4,5 g/L de glucose, auquel est ajouté 10 % (v:v) de sérum de veau foetal (SVF), 2 mM de glutamine, 0,3 mM d'acide ascorbique, 0,1 mM de norépinéphrine, 100 U/mL pénicilline et 100 mg/mL streptomycine (Clinisciences), Biomyc 10 µg/mL (Clinisciences). Ces conditions de culture permettent de conserver le phénotype battant spécifique de cette lignée.

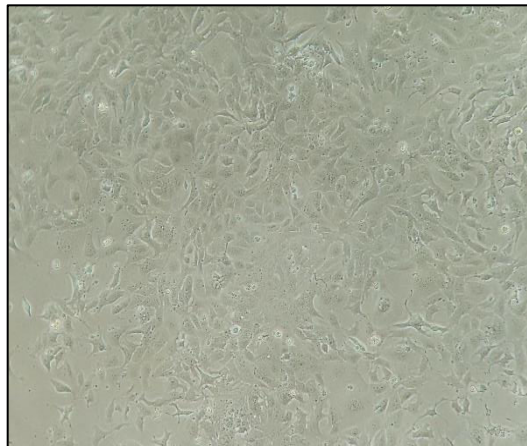


Figure 16: Photographie de la lignée HL-1 en microscopie optique (objectif x40)

Lorsque les cellules atteignent la confluence, elles sont détachées par une solution de trypsine/EDTA (0,05 %/0,02 % m:v), récoltées puis centrifugées 2 minutes à 300g. Elles sont ensuite réensemencées pour expérience ou entretien.

II. Traitement

Deux conditions de culture sont utilisées au long cours. Des cellules sont maintenues dans le milieu Claycomb classique, tandis que d'autres sont maintenues dans un milieu de Claycomb modifié, contenant 1,0 g/L de glucose. Un milieu à 0,5 g/L de glucose est également utilisé pour les expériences. Ces deux derniers sont préparés à partir de Claycomb, dilué dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ne contenant pas de glucose (Tableau IV). L'osmolarité de chacun des trois milieux a été mesurée. Elle est la même pour chaque milieu (300 mOsm/kg).

Les cellules utilisées sont des cellules cultivées au long cours à 1,0 g/L en glucose. Lors de chaque traitement les cellules sont exposées à différentes concentrations en glucose. Une concentration dite « normale » à 1,0 g/L (NG), une concentration basse à 0,5 g/L (LG) et une concentration haute à 4,5 g/L (HG). Une quatrième condition consiste en une exposition alternée entre les concentrations basse et haute (Figure 17, Tableau V). Ce traitement dure 12 ou 72 heures, avec un changement de milieu toutes les 2 ou 12 heures.

	Milieu à 0,5 g/L	Milieu à 1,0 g/L	Milieu à 4,5 g/L
Claycomb	22,1 mL	44,2 mL	172 mL
SVF	20 mL	20 mL	20 mL
Pen/Strep	2 mL	2 mL	2 mL
Norépinephrine/Acide ascorbique (30/10 mM)	2mL	2mL	2mL
Glutamine 200 mM	2mL	2mL	2mL
Biomyc 1 mg/mL	2mL	2mL	2mL
DMEM sans glucose	149,9 mL	127,8 mL	0 mL

Tableau IV : Composition des différents milieux de culture

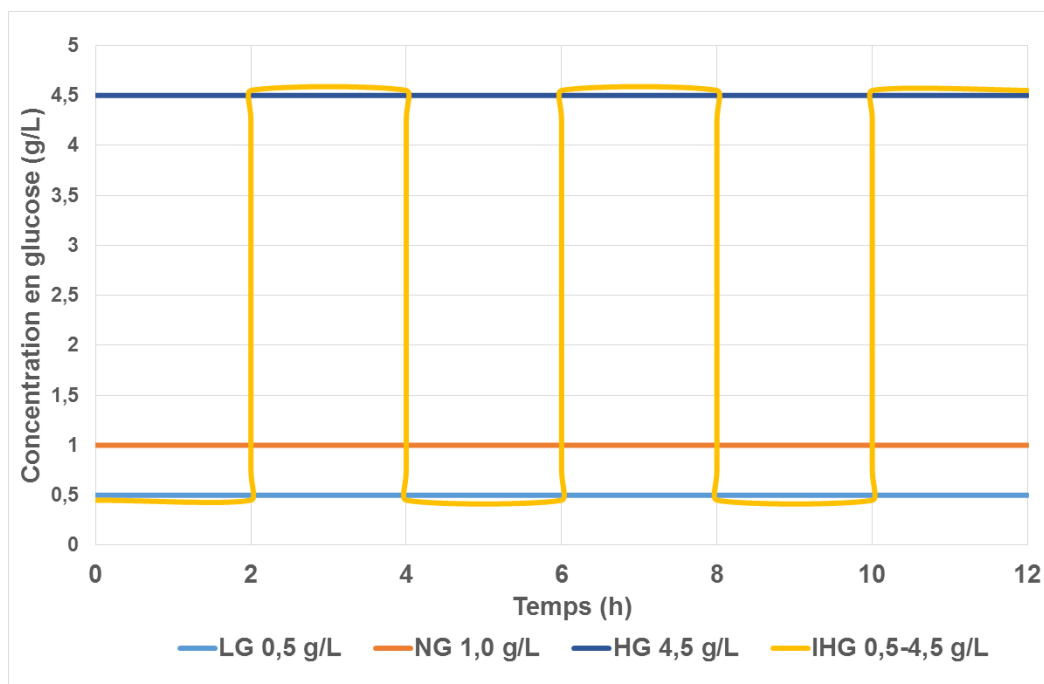


Figure 17 : Représentation schématique du traitement effectué sur 12 heures.

Effet mimé	Concentration en glucose	
Hypoglycémie (LG)	0,5 g/L	Traitement de 12 ou 72 heures, changement de milieu toutes les 2 ou 12 heures
Normoglycémie (NG)	1,0 g/L	
Hyperglycémie (HG)	4,5 g/L	
Variabilité glycémique (IHG)	Alternance (0,5 g/L - 4,5 g/L)	

Tableau V : Modèle *in vitro* de variabilité glycémique

III. Western blot

Suite au traitement, les cellules sont récupérées et lysées afin d'extraire les protéines. Selon les expériences, nous avons étudié soit les protéines totales soit les protéines mitochondriales.

1. Extraction et dosages protéiques

a. Extraction des protéines totales

L'extraction des protéines totales est effectuée à l'aide d'un tampon RIPA (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM ; IGEPAL 1 % (v:v); EGTA 1 mM ; NaF 1 mM ; Na-Deoxycholate 0,25 % (m:v) ; pH 8.0) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases.

Le lysat est incubé 10 minutes dans la glace puis centrifugé à 14000g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est enfin récupéré. Les protéines sont congelées à -20°C pour conservation.

b. Isolation des protéines mitochondriales

Les culots cellulaires obtenus après traitement sont repris dans un tampon d'isolation des mitochondries (sucrose 250 mM ; Hepes 20 mM ; KCl 10 mM ; MgCl₂ 1,5 mM ; EDTA 1mM ; EGTA 1 mM ; DTT 1mM ; cocktail d'inhibiteurs de protéases ; pH 7,4) puis passés 20 fois à travers une aiguille 26 gauges. Le lysat est centrifugé à 14000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les surnageants sont récupérés et constituent la fraction de protéines cytosoliques. Les culots sont à nouveau repris dans du tampon d'isolation des mitochondries puis soniqués 3 fois 10 secondes. Ils sont enfin centrifugés à 14000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les surnageants obtenus constituent la fraction de protéines mitochondriales. Les protéines sont ensuite congelées pour conservation.

c. Dosage protéique

Les protéines sont dosées selon la méthode de l'acide bicinchonique (BCA). Les protéines réagissent avec l'ion cuivre Cu²⁺ et le réduisent en Cu¹⁺. Le BCA réagit avec le Cu¹⁺ et forment un complexe coloré. L'absorbance est ensuite lue à 562 nm (Figure 18). Une gamme de protéine d'albumine de sérum bovin (ASB) est utilisée pour déterminer les concentrations protéiques des échantillons.

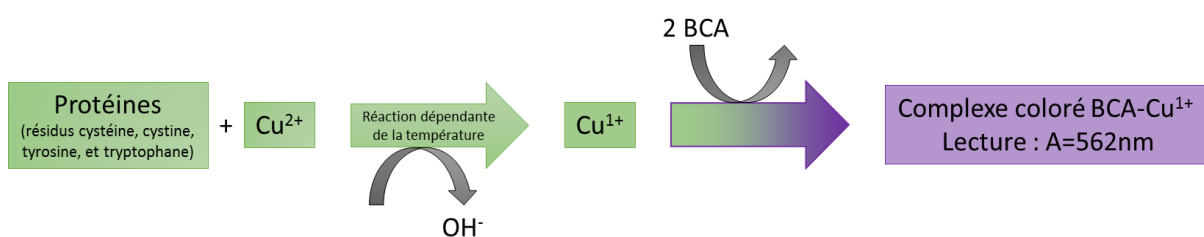


Figure 18 : Principe du dosage protéique par la méthode BCA

2. Western blot

Une quantité identique de protéines (20 à 40 µg selon les expériences) est préparée pour dépôt sur gel de polyacrylamide. Les protéines sont dénaturées par un tampon Laemmli (Tris-HCl 200 mM pH 6,8 ; glycérol 40 % (v:v) ; Sodium dodécyl

sulfate 8 % (m:v) ; bleu de bormophénol 0,4 % (m:v) ; 2-Mercaptoéthanol 5 % (v:v)), et chauffées à 95 °C pendant 5 minutes. Les échantillons sont déposés sur un gel d'acrylamide (12 % pour le gel de séparation et 4% pour le gel d'empilement ou gradient 4-15 % selon les expériences, Tableau VI). Elles sont ensuite séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes (Sodium Dodecyl Sulfate ; Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE ; 100 Volts ; 2 heures. Tampon d'électrophorèse : Tris 25 mM ; glycine 200 mM ; SDS 0,1 %). Les protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose (20 Volts ; 1 heure. Tampon de transfert : Tris 25 mM ; glycine 200 mM ; éthanol 20 %).

Pourcentage du gel	Acrylamide/ bisacrylamide (30%)	Eau distillée	Tris HCl 1,5M pH 8,8	SDS 10 %	Ammonium persulfate (0,1g/mL)	TEMED
12 %	4 mL	3,3 mL	2,5 mL	100 µL	80 µL	10 µL
4 %	500 µL	2,2 mL	940 µL (0,5 M pH 6,8)	38 µL	38 µL	4 µL

Tableau VI : Composition des gels de polyacrylamide

La membrane est alors mise en contact avec une solution de blocage (Tris-buffered saline ou TBS (Tris-HCl 15 mM; NaCl 150 mM, pH 7,4) / Tween 0,1 % (TBS/T) / ASB 5%), sous agitation pendant 1 heure, afin d'éviter des liaisons non spécifiques. Elle est ensuite incubée avec l'anticorps primaire reconnaissant la protéine d'intérêt à 4 °C pendant la nuit dans le TBS/T avec des concentrations différentes d'ASB selon les anticorps utilisés (Tableau VII). Après trois lavages de 10 minutes au TBS/T, la membrane est placée en contact avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort. Trois nouveaux lavages de 10 minutes au TBS/T permettent de retirer l'excédent d'anticorps secondaire. La membrane est enfin incubée avec une solution de révélation pendant une minute (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer). La luminescence produite est mesurée grâce au ChemiDoc XRS+ system (BioRad). L'analyse densitométrique a été réalisée grâce au logiciel ImageJ. Les différentes conditions d'anticorps utilisés sont indiquées dans le Tableau VII.

Anticorps primaires				
Cible	Source	Dilution	Tampon	Fournisseur
P38 totale	Lapin	1/1000	TBS-T BSA 1%	Cell signaling
Phospo P38	Lapin	1/1000	TBS-T BSA 1%	Cell signaling
Erk 1/2 totales	Lapin	1/1000	TBS-T BSA 1%	Cell signaling
Phospho Erk 1/2	Lapin	1/1000	TBS-T BSA 1%	Cell signaling
LC3 A/B	Lapin	1/1000	TBS-T BSA 5%	Cell signaling
Cocktail Mito	Souris	1/2000	TBS-T BSA 5%	Abcam
Anticorps secondaires couplés à la peroxydase				
Lapin	Chèvre	1/1000	TBS-T BSA 1%	Cell signaling
Souris	Cheval	1/1000	TBS-T BSA 1%	Cell signaling

Tableau VII : Conditions d'utilisation des anticorps

IV. Etude des fonctions mitochondriales

1. Polarographie (Rustin et al., 1994)

Afin d'évaluer la consommation d'oxygène par nos cellules, et d'avoir un reflet de la phosphorylation oxydative, des expériences en polarographie ont été réalisées. A la fin du traitement, les cellules sont rincées au Dulbecco's Phosphate buffered Saline (D-PBS, Gibco) puis détachées à l'aide de trypsine. Elles sont centrifugées 1 minute à 300 g puis reprises dans un tampon de respiration complet (K-MES 100 mM ; KH₂PO₄ 5 mM ; EGTA 1 mM ; EDTA 3mM ; BSA 1mg/mL ; ADP 1 mM ; pH 7,4 à 37°C). Les cellules sont placées dans une cuve de mesure contenant une électrode à oxygène, dite de Clark, constituée d'une cathode en platine et d'une anode en argent (Hansatech). Les électrodes sont au préalable calibrées, le maximum d'oxygène est évalué avec la cuve ouverte sous agitation ; le « zéro » est établi grâce à l'ajout de dithionite dans la cuve.

Les cellules sont ensuite perméabilisées à l'aide de digitonine (0,2 %). Différents substrats (succinate 25 mM + roténone 25 µM, palmitate 80 µM + malate 5 mM ; pyruvate 10 mM + malate 5 mM) sont utilisés afin de stimuler les complexes de

la chaîne respiratoire mitochondriale. L'exploitation des résultats se fait grâce au logiciel Oxygraph Plus, et permet le calcul des pentes de consommation d'oxygène. Un dosage protéique est effectué sur une fraction de l'échantillon passé en polarographie. Les résultats sont exprimés en nmol/min/mg.

2. Activité des complexes de la chaîne respiratoire

Les activités des différents complexes de la chaîne respiratoire ainsi que de la citrate synthase, marqueur de la quantité de mitochondries, ont été déterminées par spectrophotométrie à partir des mitochondries isolées extraites des cellules HL-1 exposées aux différentes concentrations de glucose (Medja et al., 2009). Les conditions expérimentales utilisées sont résumées dans le Tableau VIII.

a. Enrichissement des mitochondries

Après exposition pendant 12h aux différentes concentrations de glucose (une flasque 75 cm² par condition), les cellules sont détachées à l'aide d'une solution de trypsine/EDTA, centrifugées à 300 g pendant 1 minute, puis lavées avec 5 mL de PBS. Elles sont à nouveau centrifugées, le surnageant est retiré, puis le culot est repris par 400 µL de tampon CPT (Tris 50 mM ; KCl 150 mM ; pH 7,4) et soniqué 5 secondes dans la glace. L'extrait est ensuite centrifugé à 1500 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et à nouveau centrifugé, à 8000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot mitochondrial est repris dans 500 µL de tampon MAN (mannitol 225 mM ; sucrose 70 mM ; Tris 10 mM ; EDTA 0,1 mM ; pH 7,2 à 4°C). Les protéines mitochondriales sont dosées selon la méthode du BCA (voir Dosage protéique) puis conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

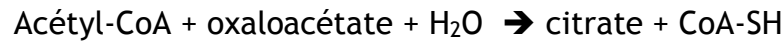
	CS	CI	CII	CIII	CII + III	CIV	CV
λ (nm)	412	340	600	550	550	550	340
Tampon	Tris 100 mM	KH ₂ PO ₄ 50 mM	KH ₂ PO ₄ 25 mM	KH ₂ PO ₄ 100 mM	KH ₂ PO ₄ 20 mM	KH ₂ PO ₄ 50 mM	Tris 50 mM
ϵ (mmol ⁻¹ cm ⁻¹)	13,6	6,2	19,1	18,5	18,5	18,5	6,2
pH	8,0	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Substrats /accepteurs d'électrons	DTNB 100 μ M Ac CoA 300 μ M	NADH 100 μ M DUB 100 μ M	Suc 20 mM DCPIP 50 μ M DUB 100 μ M	DUBH ₂ 200 μ M Cyt c 50 μ M	Suc 20 mM Cyt c 100 μ M	Cyt c H ₂ 100 μ M	NADH 200 μ M
Autres réactifs	Acide oxaloacétique 500 μ M	ASB 3 mg/mL	ASB 1 mg/mL KCN 1mM ATP 100 μ M	EDTA 250 μ M	ASB 1 mg/mL KCN 1 mM ATP 100 μ M	/	ASB 1mg/mL KCl 10 mM MgCl ₂ 4 mM PEP 2 mM PK/LDH 4 unités ATP 500 μ M
Inhibiteur	/	Roténone 12,5 μ M	/	Antimycine 12,5 μ M	/	/	Oligomycine 3 μ M CCCP 3 μ M Antimycine 1 μ M
Détergent	Triton 0,1 %	/	/	/	/	/	

Tableau VIII : Conditions des expériences de dosage des activités des complexes de la chaîne respiratoire

(Abréviations : CS, citrate synthase ; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) ; Ac CoA, acétyl coenzyme A ; Dub, décyubiquinone ; ASB, albumine de sérum bovin ; DCPIP, 2,6-dichlorophenolindophenol ; DUBH₂, décyubiquinol ; Cyt c, cytochrome c ; EDTA, Éthylène Diamine Tétracétique ; Cyt c H₂, cytochrome c réduit ; PK/LDH, Pyruvate Kinase/Lactate Déshydrogénase ; Suc, Succinate)

b. Activité citrate synthase

La citrate synthase est une enzyme permettant la formation de citrate à partir d'oxaloacétate et d'acétyl CoA, selon la réaction :



Cette mesure d'activité est utilisée pour évaluer la quantité de mitochondries présente dans l'échantillon.

Les mesures sont effectuées pendant 3 minutes, avec et sans acide oxaloacétique (Tableau VIII). Le dosage est effectué en présence de DTNB, qui réagit avec les groupements thiols (SH) du CoA-SH formé. Le composé résultant de cette réaction (TNB) absorbe spécifiquement la lumière à 412 nm. L'augmentation de l'absorbance à 412 nm sera donc proportionnelle à l'activité de la citrate synthase. Les activités sont exprimées en nmol/min/mg/ml.

c. Complexe I : NADH déshydrogénase

La réaction enzymatique catalysée par le complexe I est la suivante :



L'activité du complexe I est mesurée en présence du substrat NADH, avec et sans roténone, inhibiteur spécifique du complexe I. La diminution de l'absorbance du NADH à 340 nm sera suivie pendant 3 minutes. L'activité enzymatique spécifique du complexe I correspond à la différence d'activité avec et sans roténone.

d. Complexe II : Succinate déshydrogénase

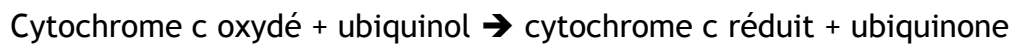
La réaction enzymatique catalysée par le complexe II est la suivante :



La succinate déshydrogénase catalyse l'oxydation du succinate en fumarate, et réduction de l'ubiquinone en ubiquinol. Ce dernier va ensuite transférer ces électrons sur un accepteur, le 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP), qui à l'état oxydé est bleu. IL absorbe à 600 nm mais est incolore à l'état réduit. L'activité du complexe II sera donc proportionnelle à la diminution de l'absorbance du DCPIP, qui est suivie pendant 3 minutes, en présence ou non de décylubiquinone (Tableau VIII).

e. Complexe III : Ubiquinol-cytochrome c réductase

La réaction enzymatique catalysée par le complexe III est la suivante :



Le complexe III catalyse l'oxydation de l'ubiquinol, avec réduction du cytochrome c ferrique en cytochrome c ferreux. L'activité enzymatique est mesurée avec et sans inhibiteur (antimycine A) pendant 3 minutes (Tableau VIII). L'obtention de la forme réduite du cytochrome c entraînera une augmentation de l'absorbance à 550 nm, proportionnelle à l'activité du complexe III. L'activité enzymatique spécifique du complexe III correspond à la différence d'activité sans et avec antimycine A.

f. Complexes II+III : succinate cytochrome c oxydo-réductase

La mesure de ces deux complexes combinés permet, outre le fait de déterminer l'activité de ces complexes, de rechercher une altération en coenzyme Q qui est un des deux transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire. Ce dosage est réalisé en présence de succinate qui après réduction du coenzyme Q en ubiquinol va réduire le cytochrome c. La présence de KCN dans le milieu réactionnel permet d'inhiber l'oxydation du cytochrome c réduit par le complexe IV. L'activité est évaluée par une augmentation de l'absorbance à 550 nm.

g. Complexe IV : Cytochrome c oxydase

La réaction enzymatique catalysée par le complexe IV est la suivante :



L'activité de la cytochrome c oxydase est mesurée en suivant la disparition du substrat, le cytochrome c réduit, à 550 nm. Ce dernier est préparé à partir de cytochrome c, réduit à 100 % par ajout de dithionite. Le cytochrome c est ensuite ajusté à un taux de réduction de 90-95 % pour utilisation. Un cytochrome c oxydé à 100 % par ajout de ferricyanide de potassium est utilisé en tant que référence.

h. Complexe V : F₁, F₀-ATP synthase

La F₁, F₀-ATP synthase est une enzyme responsable de la synthèse d'ATP. L'activité du complexe est mesurée en utilisant la lactate déshydrogénase et la pyruvate kinase comme enzyme de couplage. La réduction du NADH est suivie à 340

nm. L'activité du complexe est inhibée par l'oligomycine. L'activité enzymatique spécifique du complexe V correspond à la différence d'activité sans et avec oligomycine.

3. Production d'ATP

La majeure partie de l'ATP intracellulaire est produite par la phosphorylation oxydative mitochondriale. La production d'ATP peut être évaluée par une technique de bioluminescence. L'ATP sera transformée en lumière en présence de luciférine et de son enzyme la luciférase de luciole.

Luciférine + ATP + O₂ → oxyluciférine + AMP + CO₂ + pyrophosphate + lumière

Les cellules sont récupérées par détachement à la trypsine après 12 heures de traitement (une flasque 25cm² par condition), puis rincées au PBS. La mesure d'ATP est réalisée en conditions basale ou stimulée en présence de différents substrats énergétiques, palmitate 80 μM + malate 5 mM ou pyruvate 10 mM + malate 5 mM, dans un tampon de respiration complet (K-MES 100 mM ; KH₂PO₄ 5 mM ; EGTA 1 mM ; EDTA 3mM ; BSA 1mg/mL ; ADP 1 mM ; pH 7,4 à 37°C) pendant 15 minutes à 37°C. Après centrifugation et rinçage par du PBS, un lysat est réalisé avec un tampon de lyse (Cell Culture Lysis Buffer, Promega), puis vortexé et centrifugé à 12000 g 5 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et stocké à -80°C. L'ATP est dosée grâce au kit de détermination de l'ATP (Molecular Probes, A22066) en suivant les recommandations du fournisseur. Une gamme de concentration d'ATP est réalisée (1 à 500 μM). Chaque mesure est effectuée en triplicat. Les résultats sont exprimés en fonction de la quantité de protéines de l'échantillon, dosées par la méthode du BCA, décrite précédemment.

4. Potentiel de membrane mitochondrial ΔΨ_m

Le potentiel de membrane mitochondrial est évalué grâce à l'utilisation de la sonde fluorescente TMRE (Tetramethylrhodamine, Ethyl Ester, Life Technologies) ; ce composé fluorescent rouge-orangé est une molécule cationique qui s'accumule à l'intérieur des mitochondries actives en fonction du ΔΨ_m. En effet, le transfert d'électrons par la chaîne respiratoire provoque l'expulsion des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire ; les protons, via le gradient de concentration et le

$\Delta\Psi_m$, génèrent la force protomotrice indispensable pour la production d'ATP par l'ATP synthase.

Les cellules sontensemencées dans des plaques noires (Greiner Bio One) 96 puits à raison de 20000 cellules par puits 24 heures avant traitement. Les cellules sont ensuite traitées pendant 12h comme décrit précédemment, rincées avec du HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Life Technologies), puis incubées 30 minutes avec la sonde (200 nM TMRE dans HBSS) à 37°C à l'obscurité. L'excès de sonde est éliminé par 3 rinçages à l'aide de l'HBSS. L'ajout de l'agent découplant CCCP (carbonylcyanure *m*-chlorophénylhydrazone ; 10µM), pendant 30 minutes à 37°C à l'obscurité, a été utilisé en tant que témoin.

La mesure du $\Delta\Psi_m$ a été réalisée soit en absence de substrat énergétique (ci-dessus) soit en présence de succinate 25 mM + roténone 25 µM, palmitate 80 µM + malate 5 mM ou pyruvate 10 mM + malate 5 mM pendant 15 minutes à 37°C à l'obscurité. Après 3 nouveaux rinçages par l'HBSS, la plaque est lue par un lecteur de plaques (Victor 4, Perkin Elmer), en mode fluorescence (Excitation 544 nm ; Emission 572 nm). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur contrôle (NG). Pour chaque condition, les mesures sont réalisées en triplicat. Les valeurs de fluorescence contrôles (sans sonde) sont soustraites aux valeurs avec sonde. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur de la condition NG.

5. Stress oxydatif

a. Radicaux libres mitochondriaux

Afin d'évaluer la production de radicaux libres au sein de la mitochondrie, nous avons utilisé la sonde fluorescente MitoSOX Red (Life Technologies), qui est un composé cationique dérivé du dihydroéthidium. Il va pouvoir rentrer dans les mitochondries polarisées et être oxydé par l'anion superoxyde pour devenir fluorescent.

Vingt-quatre heures avant le traitement, les cellules sontensemencées dans des plaques noires 96 puits (20000 cellules par puits) puis exposées aux différentes concentrations de glucose comme indiqué précédemment pendant 12 ou 72h. Le milieu est alors remplacé par l'HBSS et la sonde MitoSox à 5 µM est ajoutée pendant 30 minutes à 1 heure à 37°C à l'obscurité.

La production d'anions superoxydes a été mesurée en conditions basale et stimulée ; dans ce dernier cas, les cellules sont prétraitées avec de l'antimycine A (10 μM ; inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire) pendant 2 heures. Après rinçage, la plaque est lue par un lecteur de plaques (Victor 4, Perkin Elmer) en mode fluorescence (Excitation 485 nm ; Emission 572 nm). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur contrôle (NG). Pour chaque condition, les mesures sont réalisées en triplicat. Les valeurs de fluorescence contrôles (sans sonde) sont soustraites aux valeurs avec sonde. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur de la condition NG.

b. Radicaux libres totaux

➤ Utilisation du kit Oxyblot

Le kit Oxyblot (Merck Millipore) permet de détecter et de quantifier les protéines qui ont été modifiées notamment par les radicaux libres de l'oxygène. Des groupes carbonyles sont introduits dans les chaînes protéiques lors de ces modifications dues au stress oxydatif.

Le principe de la méthode de l'Oxyblot repose sur la dérivation de ces groupes carbonyles avec le DNPH (2,4-dinitrophénylhydrazine). Ces protéines dérivées (en DNP-hydrazone) sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gel, BioRad 12 %) ; la technologie Stain Free (BioRad) a été utilisée afin de quantifier les protéines totales présentes dans le gel pour les différentes conditions de traitement. Les protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose (20 Volts ; 1 heure. Tampon de transfert : Tris 25 mM ; glycine 200 mM ; éthanol 20 %). Les protéines sont reconnues, après une heure de blocage (PBS-Tween 0,05 % (v:v), 1 % ASB (m:v)), par un anticorps primaire anti-DNP (incubation 1 heure à température ambiante, dilué au 1/150 dans du PBS-Tween, 1 % ASB, selon les recommandations du fournisseur). Après trois rinçages au PBS, la membrane est mise en présence de l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase (incubation 1 heure à température ambiante, dilué au 1/300 dans du PBS-Tween 0,05 % (v:v)).

Après trois nouveaux rinçages au PBS, la membrane est enfin incubée avec une solution de révélation (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer). La luminescence produite est mesurée grâce au ChemiDoc XRS+ system

(BioRad). L'analyse densitométrique a été réalisée grâce au logiciel ImageJ. Pour chacune des conditions, l'intensité moyenne sur la totalité de la piste (protéines oxydées) a été mesurée et rapportée à l'intensité des protéines totales (évaluées grâce au Stain Free) présentes sur cette même piste. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur contrôle (NG).

Des cellules cultivées au long cours à 1,0 g/L et 4,5 g/L de glucose ont été utilisées en tant que contrôle d'expérience.

6. Ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP)

L'ouverture du mPTP peut être évaluée grâce à l'utilisation de la calcéine acetoxymethyl ester (calcéine AM) et du chlorure de cobalt (CoCl_2) (Petronilli et al., 1999). Sous la forme AM, la calcéine va diffuser passivement à l'intérieur des cellules dans les différents organites, dont la mitochondrie. Une fois clivée par les estérases intracellulaires, la calcéine reste piégée à l'intérieur des différents compartiments et devient fluorescente. Lorsque le chlorure de cobalt est rajouté, il va diffuser vers les différents compartiments intracellulaires à l'exception de la mitochondrie ; en se combinant à la calcéine, le cobalt empêche l'émission de fluorescence sauf dans la mitochondrie. Enfin, l'ajout d'un ionophore telle que la ionomycine va permettre une entrée massive de calcium dans la cellule et stimuler l'ouverture du mPTP. Le cobalt présent dans le cytosol peut alors rentrer dans la mitochondrie et réduire la fluorescence de la calcéine. Donc plus l'ouverture du mPTP sera importante, moins la fluorescence sera importante.

Les cellules sontensemencées à une densité de 100 000 cellules par puits dans une plaque 6 puits (Thermo Fischer). Le traitement de 12 heures d'exposition aux différentes conditions de glucose est effectué sur les cellules HL-1, puis les milieux de culture sont éliminés et les cellules sont rincées au PBS. Elles sont ensuite incubées pendant 15 minutes à 37°C et à l'obscurité avec :

- la calcéine AM (2 μM) dans du HBSS
- la calcéine AM (2 μM) dans du HBSS en combinaison avec 400 μM de CoCl_2
- la calcéine AM (2 μM) dans du HBSS en combinaison avec 400 μM de CoCl_2 et 500 nM d'ionomycine.

Les cellules sont ensuite rincées en présence de PBS, détachées par action de la trypsine puis centrifugées. La fluorescence est mesurée par cytométrie en flux (cytomètre Galios, Beckman Coulter) avec pour laser d'émission 488 nm et pour excitation 517 nm sur 100 000 évènements. Les données ont été analysées avec le logiciel Kaluza et sont exprimés en pourcentage d'ouverture déclenchée par la ionomycine.

V. Susceptibilité au développement de lésions hypoxiques

1. Cinétique d'hypoxie

Dans le but de déterminer un temps optimal d'hypoxie, et de pouvoir ainsi observer une potentialisation des lésions suite au traitement, les cellules ont été placées pendant différents temps (0 à 48 heures) dans une chambre à hypoxie (Binder), à une concentration d'1 % en O₂. Vingt-quatre heures avant l'hypoxie, les cellules HL-1 sontensemencées dans une plaque 24 puits (Thermo Fischer) à raison de 100 000 cellules par puits. Les cellules sont rincées avec un tampon d'hypoxie (NaCl 140 mM ; KCl 3,6 mM ; MgSO₄ 1,2 mM ; CaCl₂ 1,3 mM ; HEPES 20 mM ; pH 7,0) et incubées dans ce même tampon en hypoxie (37°C en atmosphère humide ; 1 % O₂ ; 5 % CO₂ ; 94 % d'azote) ou en normoxie (37°C en atmosphère humide ; 95 % d'air ; 5 % CO₂).

En utilisant les mêmes conditions énoncées ci-dessus, les cellules HL-1 ont été soumises à un épisode d'hypoxie ou de normoxie, après le traitement d'exposition au glucose de 12 heures décrit précédemment.

Un second protocole d'hypoxie a été également utilisé, dans une chambre à hypoxie (Ruskin, plateforme Cycéron, Caen) contenant 0,1 % d'O₂, 5 % de CO₂ et 94,9 % d'azote. Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 24 puits (Thermo Fischer) à raison de 100 000 cellules par puits, puis placées dans un tampon d'hypoxie contenant : NaCl 99 mM ; KCl 7,4 mM ; CaCl₂ 2,5 mM ; MgSO₄ 1,2 mM ; KH₂PO₄ 1 mM ; NaHCO₃ 25 mM ; pH 7,0. Les cellules ont ensuite été placées dans la chambre à hypoxie ou en normoxie pendant différents temps (0 à 22 heures) afin de déterminer un temps optimal d'hypoxie pour lequel nous serions capables de déceler suffisamment de lésions.

2. Libération de Lactate Déshydrogénase (LDH)

Les lésions cellulaires induites par l'hypoxie ont été évaluées par un dosage de la LDH sur les surnageants de culture. Un dosage a également été effectué sur le lysat des cellules restantes dans le puits, afin de déterminer le pourcentage de libération de LDH dans le milieu extra-cellulaire. Les surnageants sont récupérés après hypoxie afin d'être dosés. Le tapis cellulaire est lysé par un tampon de lyse (TE-Triton 1% ; Tris-HCl 10 mM; NaCl 100 mM ; EDTA 1 mM ; EGTA 1 mM ; Triton 1% ; Glycérol 10% ; SDS 0,1 %), le lysat obtenu est centrifugé à 14000 g 15 minutes à 4°C.

Le dosage de la LDH s'effectue sur un analyseur AU (Beckman Coulter). La LDH catalyse l'oxydation du lactate en pyruvate accompagnée de la réduction de NAD⁺ en NADH. L'augmentation du NADH est mesurée à 340 nm et est directement proportionnelle à l'activité de l'enzyme dans l'échantillon. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité LDH totale. Pour chaque condition, trois mesures ont été réalisées.

3. Double coloration Hoechst / Bromure d'éthidium (BET)

Lors de ces expériences, les cellules ont été placées dans un tampon d'hypoxie différent (NaCl 99 mM ; KCl 7,4 mM ; CaCl₂ 2,5 mM ; MgSO₄ 1,2 mM ; KH₂PO₄ 1 mM ; NaHCO₃ 25 mM ; pH = 7,0), et à une concentration d'O₂ de 0,1 %. Les cellules HL-1 sontensemencées en plaque 24 puits, à une densité de 50 000 cellules par puits, sur des lamelles de verre prétraitées à la poly-L-lysine. A la suite des 14 heures d'hypoxie, les cellules sont incubées en présence de Hoechst (1 µg/mL final) pendant 1 heure à 37°C. L'incubation avec le BET (100 µg/mL final) s'effectue pendant 2 minutes à 37°C à l'obscurité. Les cellules sont ensuite rincées trois fois au PBS, puis fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4 % pour être montées sur lame grâce au Vectashield (Vector Labs). Les lames sont ensuite observées au microscope à fluorescence (Hoechst : Excitation 353 nm Emission 461 nm ; BET : Excitation 526 nm Emission 605 nm).

Les cellules apoptotiques seront révélées par un fort marquage au Hoechst, ainsi que par la présence de corps apoptotiques. Les cellules subissant un processus nécrotique auront accumulé du BET au sein de leurs noyaux. Les images acquises issues d'un même champ et pour les deux colorations seront superposées grâce au logiciel ImageJ. Les cellules sont ensuite comptées et triées selon le processus de

mort déterminé. Le pourcentage de mort est évalué de manière semi-quantitative à partir des comptages issus de 3-5 champs, et correspond au rapport entre le nombre de cellules colorées au BET (marquage nucléaire) et le nombre total de cellules observées.

VI. Analyses statistiques

Les résultats présentés correspondent à la représentation de la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (SEM) de n expériences. Les analyses ont été effectuées grâce au logiciel GraphPad Prism 6.0. Une analyse de variance (ANOVA) à simple ou double facteur est effectuée afin de déterminer les différences significatives, suivi d'un test post-hoc de Dunnett. Ces différences sont considérées comme étant significatives si $p < 0,05$.

Résultats

I. Signalisation cellulaire

1. Activité ERK 1/2, p38, Akt, GSK-3B

Nous nous sommes intéressés au rôle des fluctuations en glucose sur certaines voies de signalisation impliquées dans le métabolisme du glucose. Nous avons exposé nos cellules HL-1 à un traitement de 12 heures en faisant varier la concentration en glucose toutes les 2 heures, dans le but de mimer des fluctuations glycémiques constatées chez des patients diabétiques. A la suite du traitement, l'expression des formes phosphorylées des protéines Extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK 1/2), Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3B), Akt et p38 a été évaluée par western blot, et rapportée aux formes totales. L'intensité des protéines phosphorylées et totale ont été déterminées grâce au logiciel ImageJ, et les résultats ont été exprimés par rapport à la condition NG.

Les résultats présentés dans la Figure 19 ne nous ont pas permis de montrer de différences significatives d'expression des formes actives et phosphorylées des protéines étudiées ERK 1/2, p38, Akt ou GSK-3B pour des cellules exposées de façon alternée au glucose lorsqu'elles sont comparées à des cellules exposées à notre condition mimant la normoglycémie. Nous avons néanmoins observé une augmentation significative de l'expression de la forme phosphorylée de la protéine GSK-3B pour la condition mimant l'hyperglycémie (HG) comparée à notre condition contrôle NG (HG $159,5 \pm 16,6$ % vs NG $100 \pm 9,9$ %; $n=3$; $*p<0,05$ Figure 19d).

2. Activation de l'autophagie

Nous nous sommes également intéressés au rôle de l'autophagie en réponse à notre traitement. Nous avons étudié par western blot la quantité relative de la forme LC3-II par rapport à la forme LC3-I. En effet, lors de l'activation du processus d'autophagie, la protéine cytosolique LC3-I est conjuguée à un phospholipide pour produire la forme LC3-II, qui est ensuite recrutée au niveau de la membrane de l'autophagosome. Le ratio LC3-II / LC3-I reflète donc l'activation de ce processus autophagique.

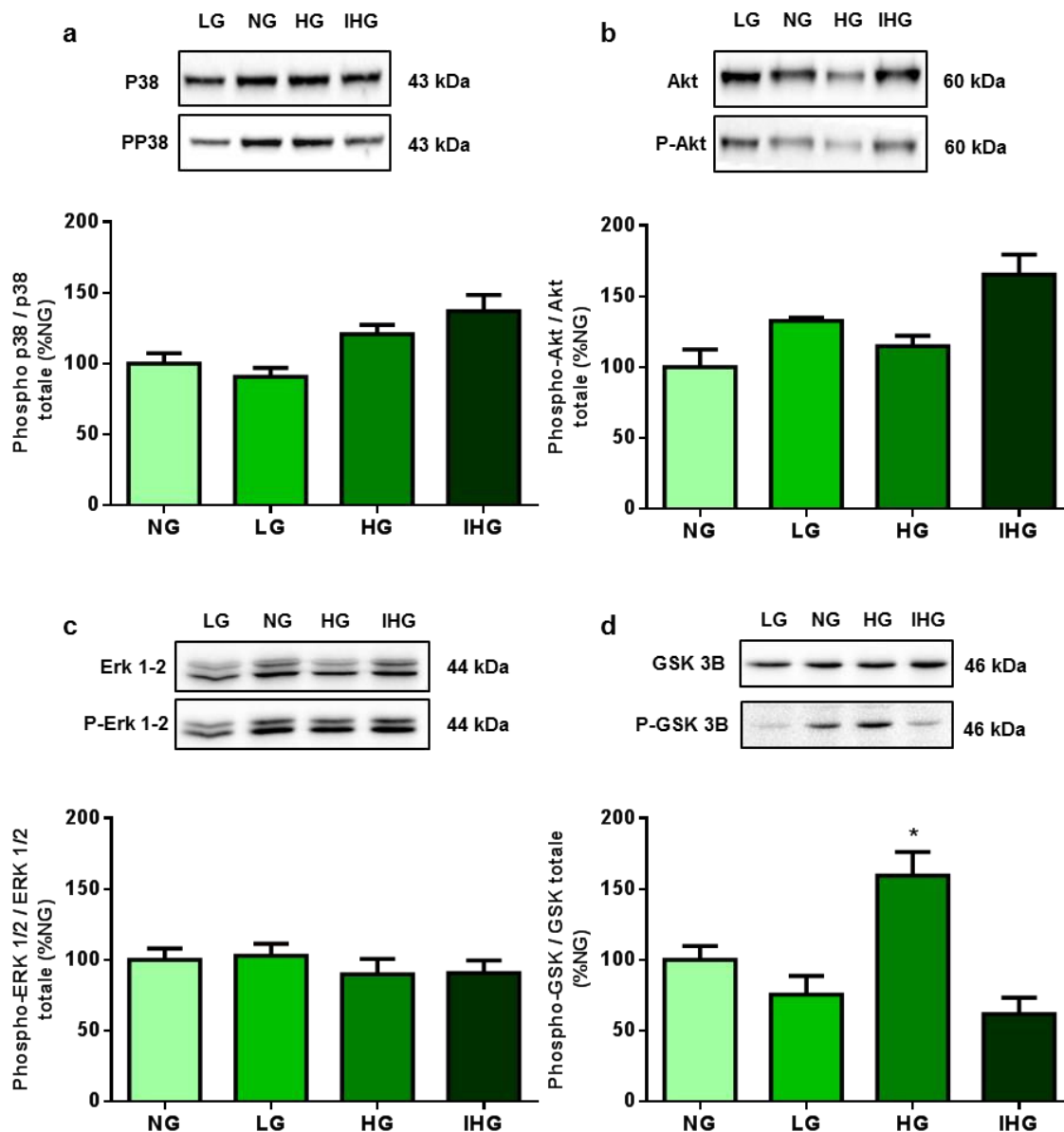


Figure 19 : Effets des fluctuations en glucose sur les voies de signalisation cellulaire.

Les cellules HL-1 ont été exposées aux différentes conditions de traitement (NG, LG, HG et IHG, mimant respectivement normoglycémie, hypoglycémie, hyperglycémie et variabilité glycémique). Les protéines ont été soumises à un western blot. Les niveaux d'expression des formes phosphorylées et totales des protéines p38 (a), Akt (b), ERK 1/2 (c) et GSK-3B (d) ont été évalués. Les résultats normalisés à la condition NG représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (n=3 ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett ; *p<0,05).

Nous avons tout d'abord vérifié que nous pouvions détecter dans notre modèle cellulaire l'activation de l'autophagie. Pour cela, les cellules HL-1 ont été exposées pendant 4 heures à une concentration de 30 μ M de chloroquine, qui entrave l'acidification des lysosomes et entraîne une accumulation de la protéine LC3-II, grâce à un blocage du turnover de cette protéine (Klionsky et al., 2012). Comme le montre la Figure 20, la chloroquine permet une augmentation significative du ratio

LC3-II / LC3-I. (Chloroquine $1272 \pm 258,9 \%$ vs Contrôle $100 \pm 31,9 \%$; $n=3$; $*p<0,05$).
 Les résultats suite à notre traitement de 12 heures ne nous ont pas permis de montrer de modification du rapport LC3-II / LC3-I pour notre condition IHG en comparaison à notre condition NG.

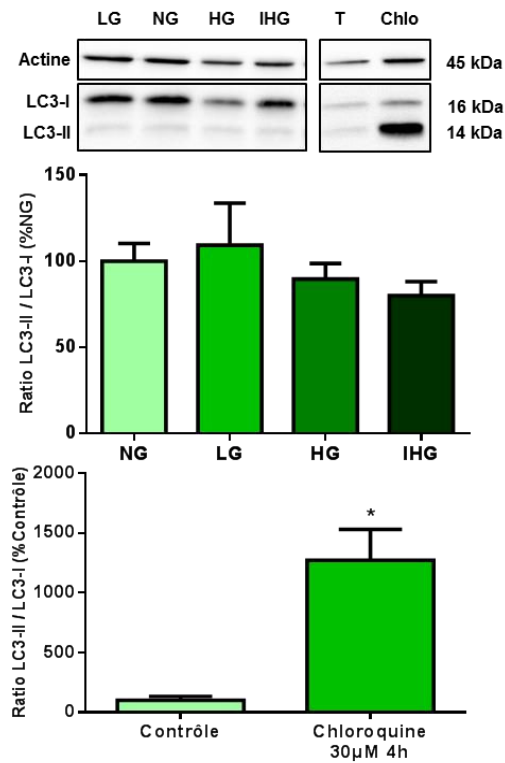


Figure 20 : Effets des fluctuations en glucose sur l'activation de l'autophagie.

Les cellules HL-1 ont été exposées aux différentes conditions de traitement NG, LG, HG et IHG pendant 12 heures, ainsi qu'à $30 \mu\text{M}$ de chloroquine (Chlo) pendant 4 heures. Les protéines ont été soumises à un western blot, les niveaux d'expression des formes LC3-I et LC3-II ont été évalués. Les résultats normalisés à la condition NG représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne ($n=3$ ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett ; $*p<0,05$).

II. Fonctions mitochondriales

Nous nous sommes ensuite intéressés à diverses fonctions mitochondriales, notamment énergétiques, en explorant les acteurs de la phosphorylation oxydative, mais aussi le potentiel de membrane mitochondriale et l'ouverture du mPTP.

1. Respiration mitochondriale : phosphorylation oxydative

Dans une approche globale d'évaluation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, nous avons effectué une mesure de la consommation d'oxygène sur cellules perméabilisées. Ces mesures ont été effectuées par polarographie, en présence de différents substrats de la chaîne respiratoire : succinate, pyruvate + malate, palmitate + malate ; en effet les cardiomyocytes utilisent dans des conditions physiologiques les acides gras comme principal substrat énergétique. A la suite de nos 12 heures d'exposition aux différentes concentrations en glucose, nous avons mesuré la consommation d'oxygène de nos cellules. La Figure 21 représente le type de tracé que nous obtenons après une mesure. Nous quantifions la quantité d' O_2 consommé en utilisant les pentes des courbes. La consommation linéaire nous

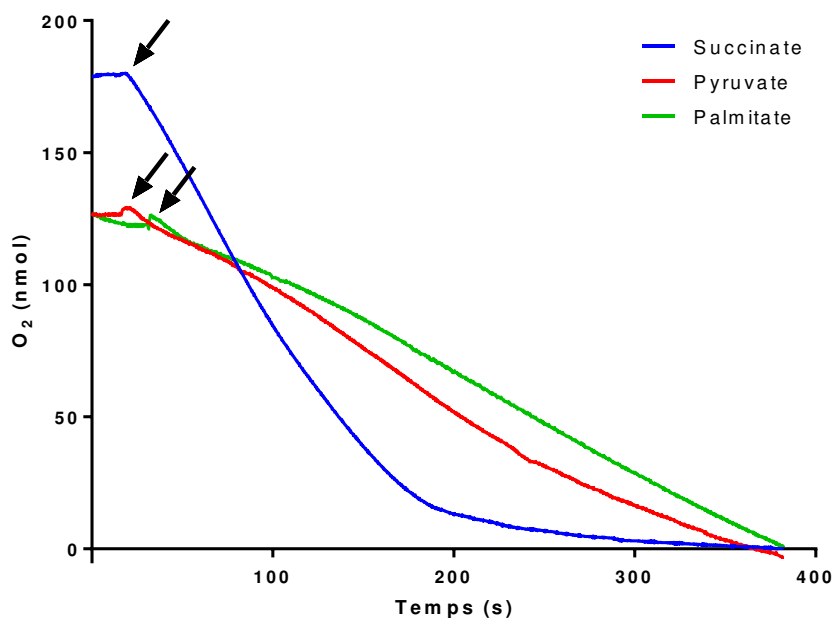


Figure 21 : Tracé représentatif d'une mesure de la consommation d' O_2 par polarographie.

Lors de la mesure en polarographie, 3 substrats sont utilisés : succinate (bleu), pyruvate (rouge) et palmitate (vert). Les flèches en noir correspondent au moment de l'ajout du substrat.

permet de déterminer la quantité d'O₂ par unité de temps. La valeur obtenue est ensuite ramenée à la quantité de protéine présente lors de la mesure. Les résultats obtenus sont exprimés en nmol O₂/min/mg de protéine.

Les résultats sont présentés dans la Figure 22. Lorsque le succinate est utilisé, nous observons des valeurs très proches de la consommation d'O₂ pour les différentes conditions (NG 32,1 ± 3,8 ; LG 30,4 ± 2,2 ; HG 36,4 ± 2,3 et IHG 37,9 ± 2,6 nmol/min/mg). Cette tendance est à nouveau observée lorsque les cellules sont stimulées avec le pyruvate, les conditions NG, HG et IHG présentant des valeurs proches (respectivement 26,7 ± 1,7 ; 26,2 ± 2,1 ; 27,1 ± 1,8 nmol/min/mg) ; néanmoins nous constatons une consommation plus basse pour la condition LG (17,8 ± 2,7 nmol/min/mg Figure 22b). Enfin, lorsque le palmitate est utilisé, nous

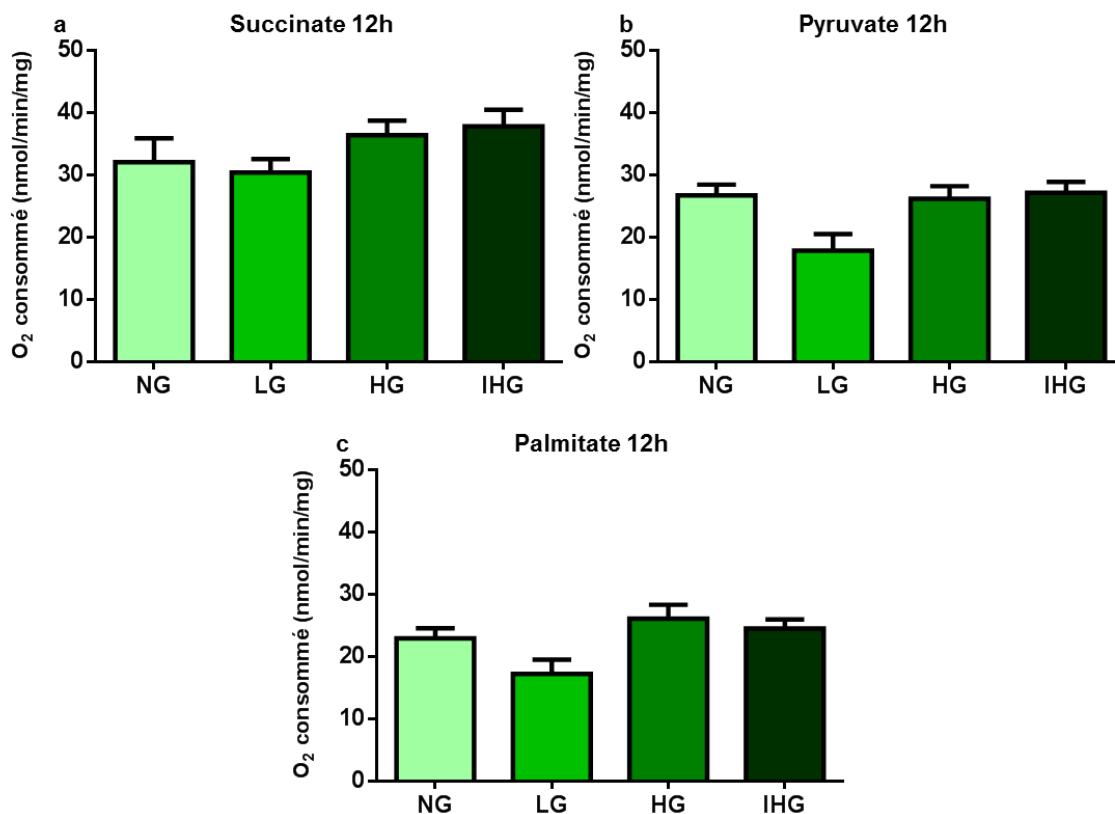


Figure 22 : Effets des fluctuations en glucose sur la consommation d'oxygène après 12 heures de traitement.

Les cellules HL-1 ont été exposées aux différentes conditions de traitement (NG, LG, HG et IHG, mimant respectivement normoglycémie, hypoglycémie, hyperglycémie et variabilité glycémique) pendant 12 heures. La consommation d'oxygène a ensuite été mesurée par polarographie grâce à une électrode de Clark. Différents substrats (a : succinate ; b : pyruvate ; c : palmitate) ont été utilisés. Les résultats représentent la moyenne ± l'erreur standard de la moyenne (n=6 ; une ANOVA à un facteur suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett n'a pas permis de montrer de différence significative).

observons à nouveau une consommation d'O₂ proche pour les conditions NG, HG et IHG (respectivement $23 \pm 1,6$; $26,1 \pm 2,3$ et $24,5 \pm 1,5$ nmol/min/mg Figure 22c) et une diminution non significative pour la condition LG ($17,2 \pm 2,3$ nmol/min/mg).

Du fait que ces mesures en polarographie ne soient qu'un reflet global de l'activité de la chaîne respiratoire, nous nous sommes ensuite penchés sur les activités enzymatiques de chacun des complexes impliqués dans la phosphorylation oxydative.

2. Activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire

Nous nous sommes par la suite intéressés à l'effet de fluctuations en glucose sur l'activité individuelle de chaque complexe de la chaîne respiratoire. Nos cellules ont été exposées aux différents traitements pendant 12 heures, puis les mitochondries ont été extraites afin de mener nos expériences. Grâce à des techniques de spectrophotométrie, nous avons déterminé l'activité des complexes I, II, III, II+III (reflétant l'activité des complexes II et III ainsi que la capacité du coenzyme Q à transférer les électrons), IV et V (ATP synthase). Toutes les mesures d'activité ont été rapportées à l'activité citrate synthase, marqueur couramment utilisé comme un reflet de la masse mitochondriale.

Les résultats sont regroupés dans la Figure 23. Concernant l'activité du complexe I, aucune différence n'apparaît entre nos conditions, avec un rapport de $47 \pm 6,6$ % pour notre condition NG contre $52 \pm 1,5$ %, $51 \pm 7,7$ % et $51 \pm 2,5$ % pour nos conditions LG, HG et IHG respectivement (Figure 23a). Le rapport complexe II / citrate synthase présente des différences en fonction des conditions. Nos conditions NG et LG ont pour rapport respectivement $39 \pm 4,7$ % et $45 \pm 6,8$ %, alors que les conditions HG et IHG présentent une augmentation non significative du rapport avec respectivement 59 ± 12 % et $62 \pm 4,5$ % (Figure 23b). L'activité du complexe III ne diffère pas entre les conditions NG, LG, HG et IHG, avec respectivement des rapports à la citrate synthase de $13 \pm 1,1$; $13 \pm 1,4$; $14 \pm 2,8$ et $17 \pm 2,3$ % (Figure 23c). L'activité combinée des complexes II + III + coenzyme Q n'est pas non plus affectée en fonction des traitements, bien que les conditions LG, HG et IHG présentent une augmentation du rapport à la citrate synthase par rapport à la condition NG (respectivement 99 ± 13 ; 92 ± 11 et $90 \pm 7,2$ % contre $68 \pm 7,5$ % ; Figure 23d). Les rapports d'activité pour le complexe IV ne sont significativement pas différents entre

nos conditions, bien que nous observons une augmentation des rapports pour nos conditions LG, HG et IHG (229 ± 30 ; 271 ± 42 et 238 ± 40 %, respectivement) en comparaison à notre condition contrôle NG (rapport de 190 ± 40 %) (Figure 23e). Enfin, concernant les rapports d'activité pour le complexe V, nous obtenons des valeurs similaires pour nos conditions NG et IHG (22 ± 3 et $20 \pm 2,5$ % respectivement) avec une augmentation non significative pour les conditions LG et HG (32 ± 5 et $31 \pm 4,5$ % respectivement) (Figure 23f). Tous ces résultats indiquent que les fluctuations en glucose n'influencent pas de manière significative l'activité des complexes de la chaîne respiratoire.

Nous avons également évalué l'expression de certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. A la suite du traitement de 12 heures et de l'extraction des protéines mitochondriales, l'expression de certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire a été évaluée par western blot en utilisant un mélange d'anticorps dirigés contre les sous-unités SDHB du complexe II, UQCRC2 du complexe III, COXII du complexe IV et ATP5A du complexe V. Les résultats, représentés comme l'expression des sous-unités par rapport à la tubuline et exprimés en % de la valeur contrôle NG, sont présentés en Figure 24 et ne nous ont pas permis de déceler de différence significative au niveau de l'expression des sous-unités ciblées.

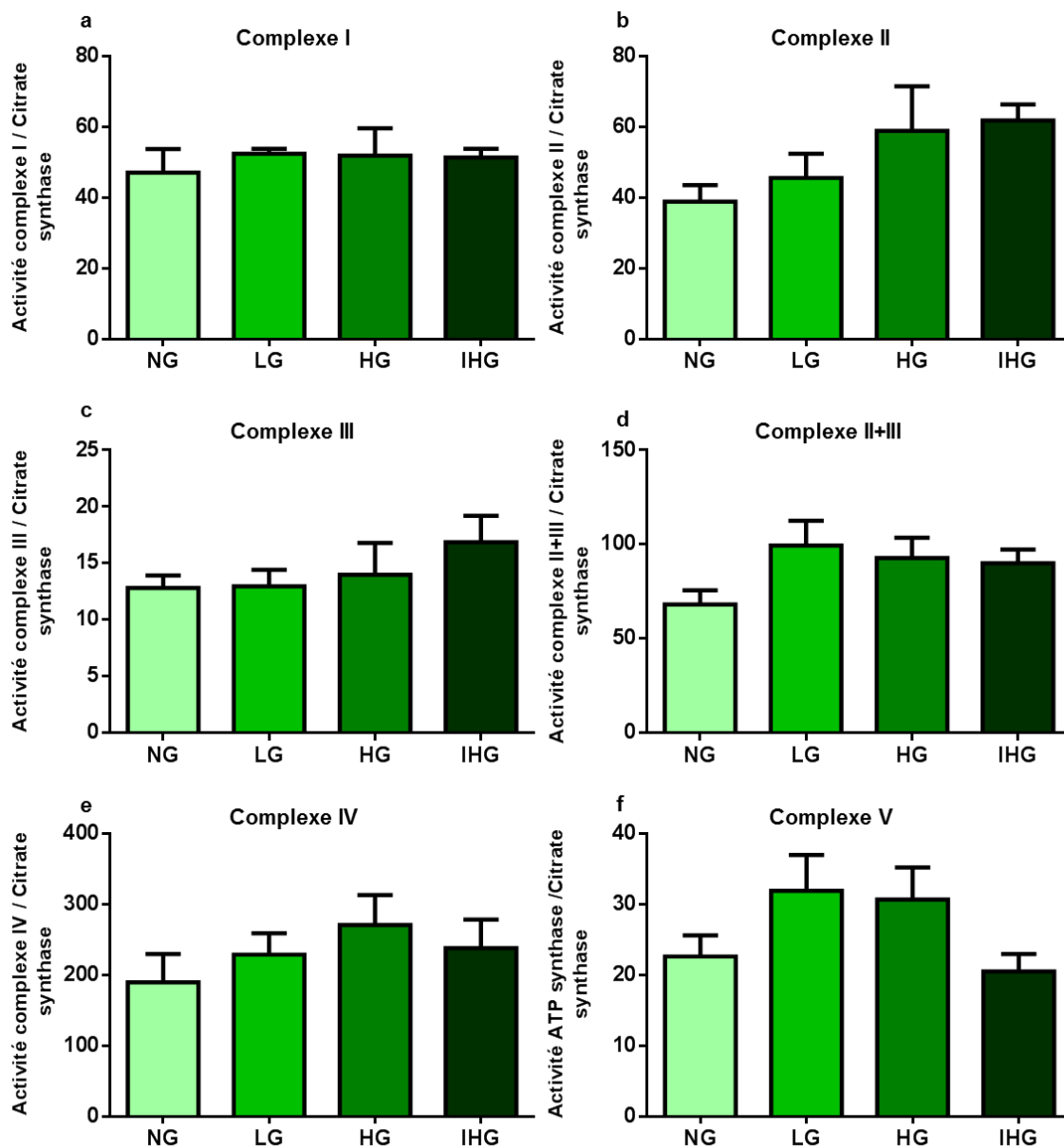


Figure 23 : Effets des fluctuations en glucose sur l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les cellules HL-1 ont été exposées aux différentes conditions de traitement pendant 12 heures. Après extraction des mitochondries, les activités des complexes ont été mesurées par spectrophotométrie (a : complexe I ; b : complexe II ; c : complexe III ; d : complexes II+III ; e : complexe IV ; f : complexe V). Les résultats d'activité sont rapportés à l'activité citrate synthase et représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne de 3 expériences indépendantes. Une ANOVA à un facteur suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett n'a pas permis de montrer de différence significative.

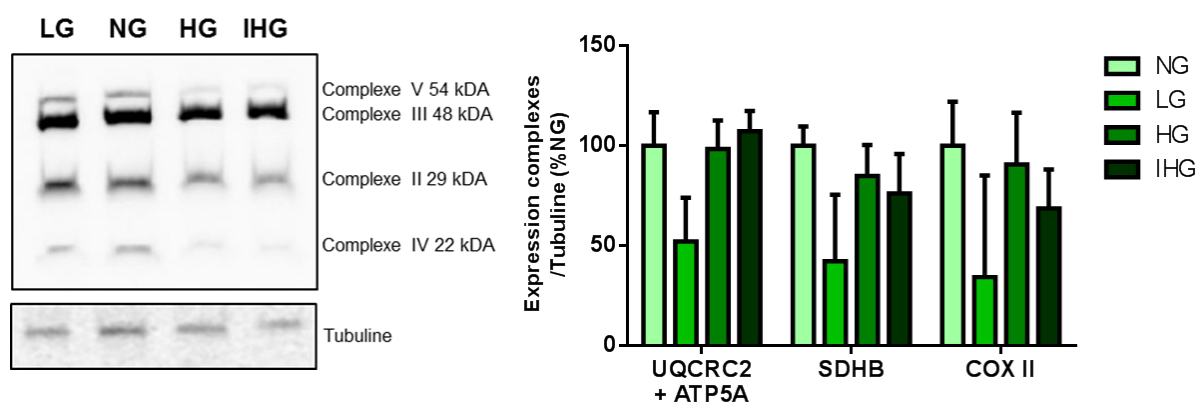


Figure 24 : Effets des fluctuations en glucose sur l'expression de sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les cellules HL-1 ont été exposées aux différentes conditions de traitement NG, LG, HG et IHG pendant 12 heures. Les protéines mitochondriales ont été extraites et soumises à un western blot ciblant certaines sous-unités des complexe II (SDHB), III (UQCRC2), IV (COX II) et V (ATP5A). Les résultats sont exprimés par rapport à la condition NG et représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne de 4 expériences indépendantes. Une ANOVA à un facteur suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett n'a pas permis de montrer de différence significative.

3. Production d'ATP

Le glucose étant un substrat majeur de la production d'ATP par la mitochondrie, nous avons évalué la production d'ATP par nos cellules lorsqu'elles étaient exposées à nos différents traitements. A la suite du traitement de 12 heures, le contenu cellulaire a été extrait, et la production basale d'ATP a été évaluée par bioluminescence. Nous avons également choisi d'évaluer la production énergétique après une stimulation de 15 minutes avec pyruvate + malate et palmitate + malate (utilisé aux mêmes concentrations que pour les expériences de polarographie). Comme le montre la Figure 25a, la production basale d'ATP est identique pour chaque condition (environ 10 μ M/mg de protéine). Lorsque la chaîne respiratoire est stimulée en présence de pyruvate + malate et palmitate + malate, la production d'ATP est décuplée pour chaque condition. Bien que les fluctuations en glucose ne semblent pas augmenter la production d'ATP en conditions stimulées, nous observons pour la condition HG une tendance à l'augmentation lorsque le pyruvate est utilisé (NG 101,2 \pm 4,0 vs HG 131,5 \pm 6,8 μ M/mg protéine ; $p=0,07$; Figure 25b). Cette

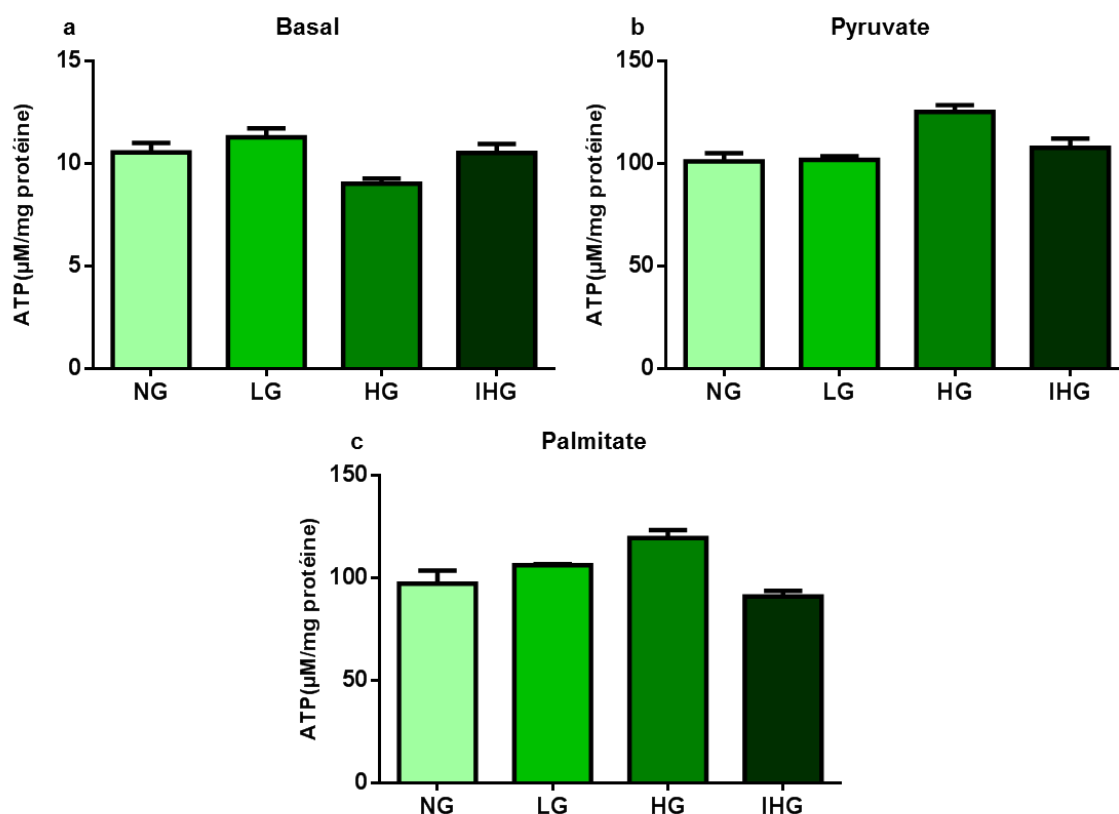


Figure 25 : Effets des fluctuations en glucose sur la production d'ATP.

Les cellules HL-1 ont été exposées aux différentes conditions de traitement NG, LG, HG et IHG pendant 12 heures. Après extraction du contenu cellulaire, l'ATP est dosé par bioluminescence, en condition basale (a), ou stimulée au terme du traitement avec du pyruvate + malate (b) ou du palmitate + malate (c). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{M}/\text{mg}$ protéine, déterminés grâce à une gamme d'étalonnage, et représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne de 3 expériences indépendantes, chaque mesure étant réalisée en triplicat. Une ANOVA à un facteur suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett n'a pas permis de montrer de différence significative.

augmentation est également observée lorsque le palmitate est utilisé, bien que non significative (NG $97,3 \pm 6,4$ vs HG $119,5 \pm 2,8$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protéine Figure 25c).

4. Potentiel de membrane mitochondriale

Ayant un rôle à la fois dans le métabolisme énergétique, la dynamique mitochondriale et la mort cellulaire, nous nous sommes par la suite intéressés au potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$). Nous avons mesuré le $\Delta\Psi_m$ sur les cellules HL-1 après exposition aux différentes concentrations en glucose. Nous nous sommes tout d'abord assurés de la spécificité de la mesure du $\Delta\Psi_m$ en utilisant la sonde fluorescente TMRE. Pour cela, les cellules HL-1 ont été exposées ou non à 10 μM de CCCP, décrit comme un agent découplant. Comme le montre la Figure 26a, le

CCCP entraîne une diminution d'environ 50 % du $\Delta\Psi_m$. La comparaison des différents traitements au glucose en conditions basales nous a permis d'observer une augmentation significative du $\Delta\Psi_m$ pour notre condition IHG comparée à la condition NG (IHG $129,9 \pm 5,3$ % vs NG $100 \pm 4,2$ % ; $n=3$; $p<0,05$, Figure 26a). Néanmoins, lorsque les cellules sont stimulées avec les substrats utilisés précédemment (succinate, pyruvate + malate, palmitate + malate), aucune différence de $\Delta\Psi_m$ n'a pu être observée entre nos conditions (Figure 26b).

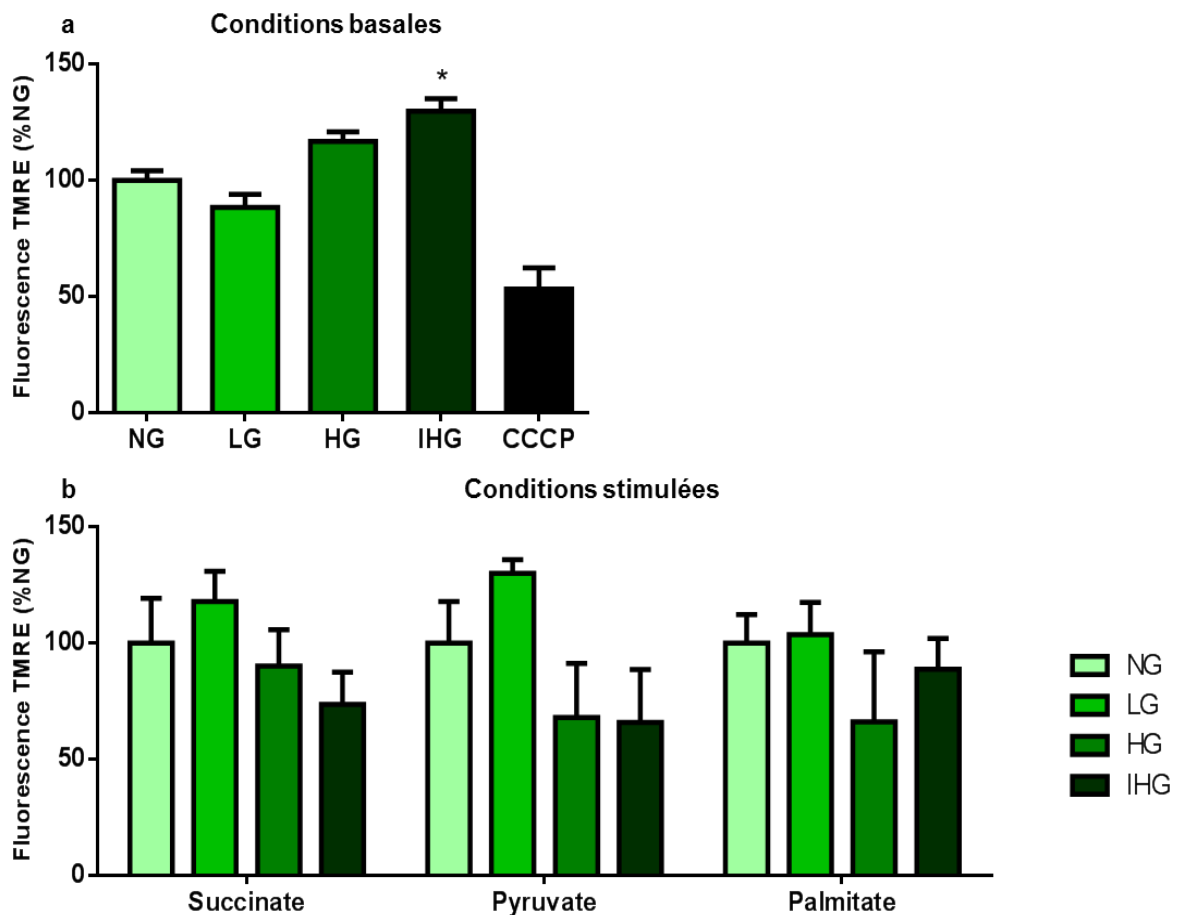


Figure 26 : Effets des fluctuations en glucose sur le potentiel de membrane mitochondrial.

Les cellules HL-1 ont été exposées aux différentes conditions de traitement NG, LG, HG et IHG pendant 12 heures. Elles ont ensuite été exposées à la sonde TMRE en conditions basales (a) ou stimulées (b) avec différents substrats. Le CCCP a été utilisé en tant qu'agent découplant pour dissiper le $\Delta\Psi_m$. Les résultats normalisés à la condition NG représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne de 3-5 expériences indépendantes, chaque mesure étant réalisée en triplicat (ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett ; * $p<0,05$).

5. Ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale

Par la suite, nous avons cherché à déterminer si les fluctuations en glucose pouvaient jouer un rôle dans l'ouverture du mPTP. Pour cela, nous avons utilisé la sonde fluorescente calcéine-AM, qui diffuse dans les différents compartiments intracellulaires, dont la mitochondrie et émet une fluorescence. L'ajout de cobalt, qui ne traverse pas les membranes mitochondriales, bloque la fluorescence de la calcéine en s'y complexant.

Nous avons soumis nos cellules aux 12 heures de traitement, puis mesuré l'intensité de fluorescence par cytométrie en flux en présence de calcéine seule et combinée au cobalt afin de déterminer par soustraction le signal spécifique dans les mitochondries. Comme le montre la Figure 27a, la fluorescence mitochondriale représente environ 25% du signal total et ne montre pas de différence entre les différentes conditions de traitement. Nous avons ensuite évalué l'ouverture du mPTP en ajoutant la ionomycine, un ionophore permettant d'augmenter la concentration de calcium intracellulaire et ainsi la probabilité d'ouverture du mPTP ; aucune différence significative n'a pu être observée entre nos conditions de traitement (Figure 27b).

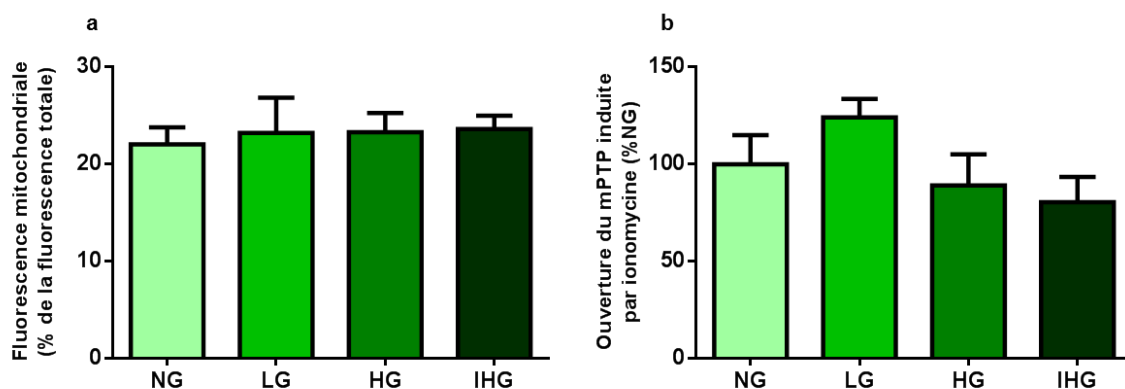


Figure 27 : Effets des fluctuations en glucose sur l'ouverture du mPTP

Les cellules HL-1 ont été exposées aux différentes conditions de traitement NG, LG, HG et IHG pendant 12 heures. Elles ont ensuite été exposées à la sonde calcéine, en présence ou non de cobalt (a) et de cobalt + ionomycine (b). Les résultats représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne de 5 expériences indépendantes. Une ANOVA à un facteur suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett n'a pas permis de montrer de différence significative.

III. Stress oxydatif

1. Production d'anions superoxydes

L'augmentation du stress oxydatif dans la pathologie diabétique est un élément bien connu. Il se développe notamment par la production de radicaux libres oxygénés, majoritairement générés par la mitochondrie. Afin d'évaluer l'impact des fluctuations en glucose sur la génération d'anions superoxydes, nous avons utilisé une sonde fluorescente MitoSox Red. Les cellules HL-1 ont été exposées à notre traitement de 12 heures puis incubées avec la sonde MitoSox. La fluorescence est déterminée par la différence de fluorescence avec et sans la sonde. La fluorescence a été mesurée dans des conditions basale et stimulée.

En conditions basales, nous avons pu observer une augmentation significative de la fluorescence pour les traitements HG et IHG par rapport à la condition NG (HG $139 \pm 6,9 \%$, IHG $137,1 \pm 7,4 \%$ vs NG $100 \pm 6,3\%$; $p < 0,05$ Figure 28a). Lorsque la production d'anions superoxydes est stimulée grâce à l'ajout d'antimycine A, inhibiteur spécifique du complexe III de la chaîne respiratoire, nous obtenons des résultats similaires à nos résultats en conditions basales, avec une augmentation de la production d'anions superoxydes pour les traitements HG et IHG par rapport à la condition NG (HG $125,9 \pm 2,9 \%$, IHG $119,3 \pm 1,6 \%$ vs NG $100 \pm 1,5 \%$; $p < 0,05$ Figure

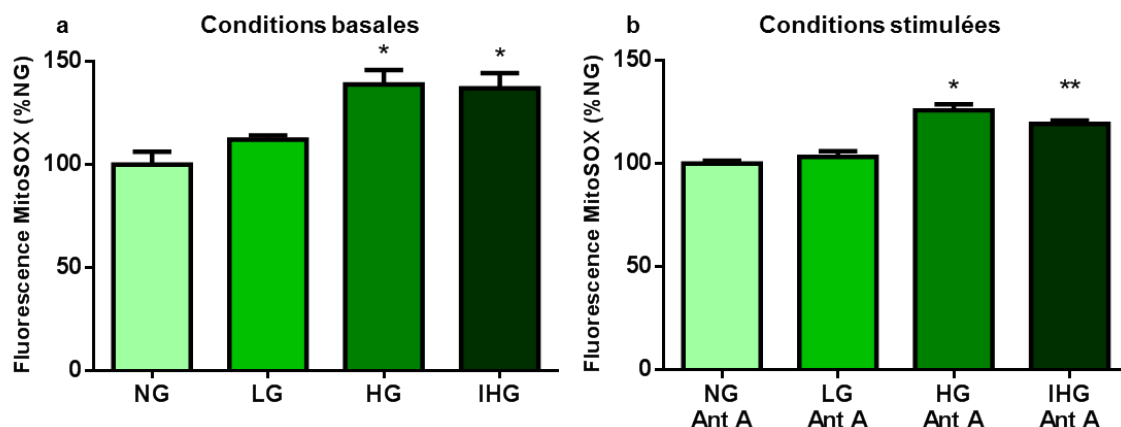


Figure 28 : Effets des fluctuations en glucose sur la production d'anions superoxydes après 12 heures de traitement

Les cellules HL-1 ont été exposées aux différentes conditions de traitement NG, LG, HG et IHG pendant 12 heures. Elles ont ensuite été exposées à la sonde MitoSox en conditions basales (a) ou stimulées (b) à l'antimycine A (Ant A). Les résultats normalisés à la condition NG représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne de 3-4 expériences indépendantes, chaque mesure étant réalisée en triplicat (ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

28b). La stimulation à l'antimycine permet d'augmenter la production d'anions superoxydes d'environ 30 % (résultats bruts, non présentés).

2. Oxydation des protéines

Comme nous avons mis en évidence que les traitements HG et IHG produisaient une augmentation de la production d'anions superoxydes, nous avons ensuite cherché à savoir si ces conditions augmentaient le stress oxydatif, en mesurant l'oxydation des protéines grâce à l'oxyblot. Nous avons soumis nos cellules à notre traitement de 12 heures, et évalué l'oxydation des protéines après extraction et dérivation ou non par le DNPH (+ : avec dérivation ; - : sans). D'après nos résultats présentés en Figure 29, 12 heures de traitement ne suffisent pas à induire une augmentation de l'oxydation protéique pour nos conditions LG, HG ou IHG alors qu'une exposition de 4 semaines à une concentration haute en glucose (cHG) permet de doubler la quantité de protéines oxydées (cHG $201 \pm 1,4$ % vs NG $100 \pm 1,1$ % ; $p < 0,01$).

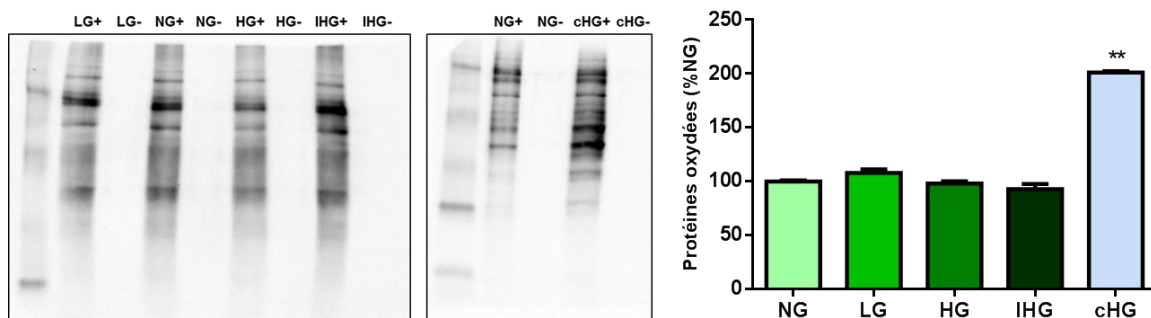


Figure 29 : Effets des fluctuations en glucose sur l'oxydation des protéines.

Les cellules HL-1 ont été exposées aux différentes conditions de traitement NG, LG, HG et IHG pendant 12 heures, ou exposées 4 semaines à HG (cHG). Les protéines ont ensuite été soumises à oxyblot (+ : protéines ayant subi une dérivation avec le DNPH ; - : protéines n'ayant pas subi de dérivation). Les résultats normalisés à la condition NG représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne. (ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett ; ** $p < 0,01$)

IV. Susceptibilité à l'hypoxie

Le diabète étant un facteur de risque de maladies cardiovasculaires, dont l'infarctus du myocarde, nous avons cherché à savoir si les fluctuations en glucose pouvaient avoir un impact dans le développement des lésions suite à un épisode d'hypoxie.

1. Détermination de la mort cellulaire

L'étude de l'hypoxie sur les cellules HL-1 a été réalisée en plaçant les cellules en chambre d'hypoxie à 0,1% d'O₂, en les comparant à des cellules en normoxie. Nous avons utilisé un tampon contenant des ions phosphates sans glucose et à pH 7 afin de mimer au mieux la composition du milieu extracellulaire dans ces conditions d'hypoxie. La mort cellulaire induite par l'hypoxie a été évaluée en mesurant la libération de LDH dans le surnageant de culture. En réalisant une cinétique, nous avons montré qu'un épisode d'hypoxie simulée de 14 heures permettait d'obtenir environ 60-70% des lésions maximales (données non présentées), temps que nous avons retenu pour les expériences ultérieures où nous avons cherché à caractériser les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire.

Afin de savoir si l'apoptose était impliquée dans la mort des cellules HL-1 induite par un épisode de 14h d'hypoxie simulée, les cellules ont été ou non traitées avec le Z-VAD, un inhibiteur pan-caspases. Comme le montrent les résultats présentés en Figure 30a (histogrammes blancs), cet inhibiteur de l'apoptose ne permet pas de réduire les lésions cellulaires induites par l'hypoxie et déterminées par la libération de LDH.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons évalué les processus de nécrose et d'apoptose par des expériences de microscopie à fluorescence à l'aide de la double coloration Hoechst-BET. Cette technique permet de mettre en évidence des cellules en apoptose présentant des corps apoptotiques et une forte coloration au Hoechst (en bleu), et des cellules en nécrose marquées par le BET (coloration rouge). En condition de normoxie, les cellules HL-1 présentent un faible marquage à la fois pour le Hoechst et le BET (Figure 30b). Après 14 heures d'hypoxie, nous avons observé et mesuré une forte augmentation du marquage au BET sans apparition de corps apoptotiques, suggérant un processus nécrotique (Figure 30a et b). Lorsque ces

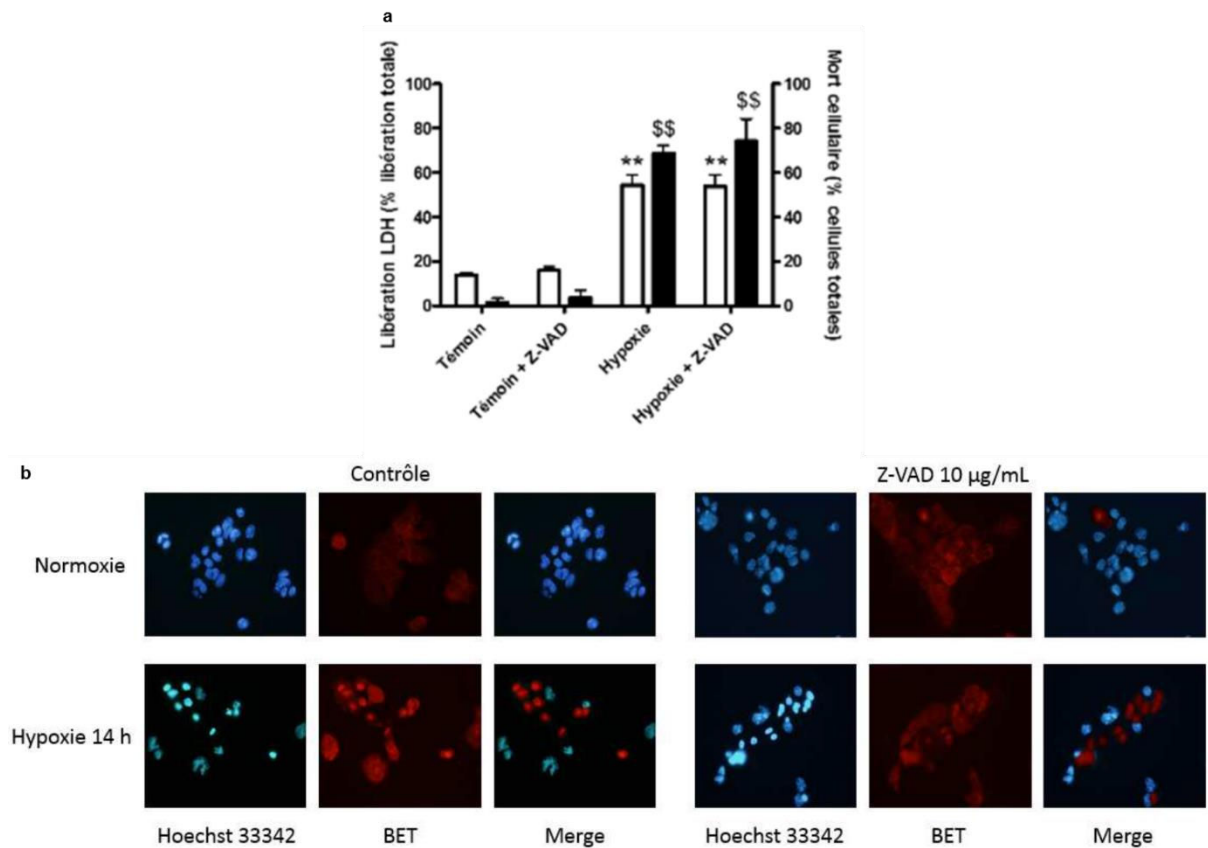


Figure 30 : Caractérisation de la mort cellulaire après 14 heures d'hypoxie.

La mort cellulaire est évaluée après 14 h de normoxie ou d'hypoxie. La figure a représente les résultats obtenus pour la libération de LDH (axe des ordonnées gauche, histogrammes blancs) ainsi que pour le dénombrement des cellules nécrosées (colorées au BET) après double coloration Hoechst 33342 / BET (mort cellulaire exprimée en pourcentage des cellules totales, axe des ordonnées droites, histogrammes noirs).

La figure b représente les images obtenues en microscopie à fluorescence (x40) après la double coloration. Les « merge » ont été obtenues grâce au logiciel ImageJ.

expériences ont été réalisées en présence de Z-VAD, aucun effet n'a pu être mis en évidence sur le marquage au BET indiquant que l'hypoxie stimulée induit une mort cellulaire par nécrose.

2. Fonctions mitochondriales

a. Phosphorylation oxydative

Nous avons ensuite cherché à déterminer l'impact d'un épisode d'hypoxie sur la respiration mitochondriale. Nous avons sélectionné deux temps d'hypoxie pour ces expériences de polarographie : le temps 7 heures pour lequel nous n'observons pas de mort cellulaire et le temps 14 heures où la mort cellulaire est sub-maximale. Comme dans les expériences précédentes, différents substrats ont été utilisés :

succinate, pyruvate + malate et palmitate + malate. Après 7 heures d'hypoxie simulée, aucune différence n'a pu être observée par comparaison avec les cellules placées dans le tampon mais en normoxie quel que soit le substrat utilisé (données non présentées). Lorsque les cellules sont placées en hypoxie pendant une période de 14 heures, nous observons une baisse significative de la consommation d'O₂ pour chaque substrat. En effet, nous obtenons des valeurs en normoxie de 101,7 ± 8 ; 43,9 ± 6,4 ; 51,7 ± 6,4 nmol/min/mg pour les substrats succinate, palmitate et pyruvate respectivement. Après 14 heures d'hypoxie, ces valeurs sont de 18,6 ± 3,7 ; 7 ± 2,5 ; 11,4 ± 4,7 nmol/min/mg pour les substrats succinate, palmitate et pyruvate respectivement (Figure 31). Néanmoins, le tampon d'hypoxie semble avoir un rôle, puisque les cellules placées en normoxie pendant 14 heures dans ce tampon présentent une baisse significative de la consommation d'O₂ pour le substrat succinate avec une valeur de 68 ± 8,0 nmol/min/mg (Figure 31).

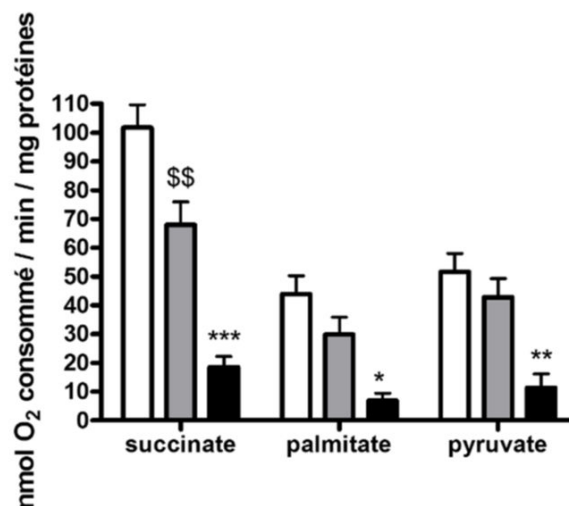


Figure 31 : Mesure de la consommation d'O₂ après un épisode de 14 heures d'hypoxie.

Les cellules HL-1 sont placées pendant 14 h dans du milieu de Claycomb en normoxie (témoins, histogrammes blancs), dans du tampon d'hypoxie et incubées en normoxie (tampon + normoxie, histogrammes gris) ou dans du tampon d'hypoxie et incubées dans une atmosphère contenant 0,1% d'O₂ (tampon + hypoxie, histogrammes noirs). La consommation d'oxygène a ensuite été mesurée par polarographie grâce à une électrode de Clark. Différents substrats ont été utilisés, Les résultats représentent la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de 4 expériences. L'analyse statistique a été réalisée par une ANOVA suivie d'un test de Bonferroni : \$\$, $p < 0,01$ par rapport aux cellules témoins ; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ par rapport aux cellules tampon + normoxie.

b. Potentiel de membrane mitochondriale

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de l'hypoxie sur le potentiel de membrane mitochondriale. Comme pour les expériences précédentes (voir 4. Potentiel de membrane mitochondrial $\Delta\psi_m$), nous l'avons mesuré grâce à la sonde fluorescente TMRE après un épisode de 7 ou 14 heures d'hypoxie. Après 7 heures d'hypoxie, nous observons une diminution significative du potentiel de membrane mitochondrial par comparaison avec les cellules placées en normoxie (100 % vs 63,2 \pm 5 % Figure 32); pour ces deux conditions, l'ajout de l'agent découplant CCCP permet de dissiper le $\Delta\psi_m$. Lorsque ces mêmes expériences sont réalisées après 14 heures d'hypoxie, le potentiel de membrane est significativement abaissé de 55 % par comparaison à la condition normoxie (Figure 32); alors que le CCCP permet de réduire le $\Delta\psi_m$ pour les cellules placées en normoxie, ce n'est plus le cas pour les cellules placées en hypoxie. Bien que le $\Delta\psi_m$ mesuré à 14 heures pour l'hypoxie soit plus bas qu'après 7 heures, cette différence n'est pas statistiquement significative (7 heures : 63,2 % vs 14 heures : 44,9 % $p = 0,13$ Figure 32).

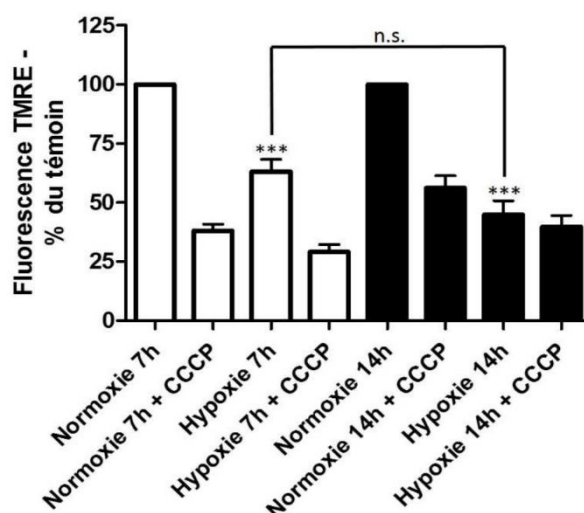


Figure 32 : Evaluation du potentiel de membrane mitochondriale après 7 et 14 heures d'hypoxie.

Les cellules HL-1 ont été soumises à un épisode d'hypoxie ou normoxie de 7 et 14h et le potentiel de membrane mitochondriale a été mesuré. Le CCCP a été utilisé en tant qu'agent découplant. Les résultats sont normalisés par rapport aux cellules placées en normoxie. (ANOVA suivie d'un test de Bonferroni ; ***, $p < 0,001$ par rapport aux cellules placées en normoxie pour chaque temps ; n.s., variation non significative)

3. Impact des fluctuations en glucose

Dans une dernière série d'expériences, nous avons évalué l'effet des fluctuations en glucose sur la susceptibilité des cellules HL-1 à développer des lésions après hypoxie. Pour des raisons de disponibilité de la chambre à hypoxie sur la plateforme de Cycéron, nous avons dû adapter notre protocole initialement utilisé pour simuler l'hypoxie : nous avons en effet utilisé une autre chambre d'hypoxie où le pourcentage en dioxygène ne pouvait être réduit qu'à 1 %. Nous avons également utilisé un tampon d'hypoxie légèrement différent notamment concernant le système tampon : nous avons remplacé les ions phosphates par de l'HEPES pour ne pas avoir besoin d'équilibrer le pH.

a. Cinétique d'hypoxie

Afin de déterminer le temps optimal d'hypoxie nous permettant d'obtenir un pourcentage de mort cellulaire pour lequel nous serions capables de déceler potentiellement des différences entre nos traitements, nous avons réalisé une cinétique d'hypoxie. Pour cela, les cellules HL-1 ont été placées pendant 6 à 48 heures dans une atmosphère contenant 1% de dioxygène. Le dosage de la LDH a été utilisé en tant que marqueur de mort cellulaire, mesuré à la fois dans le surnageant

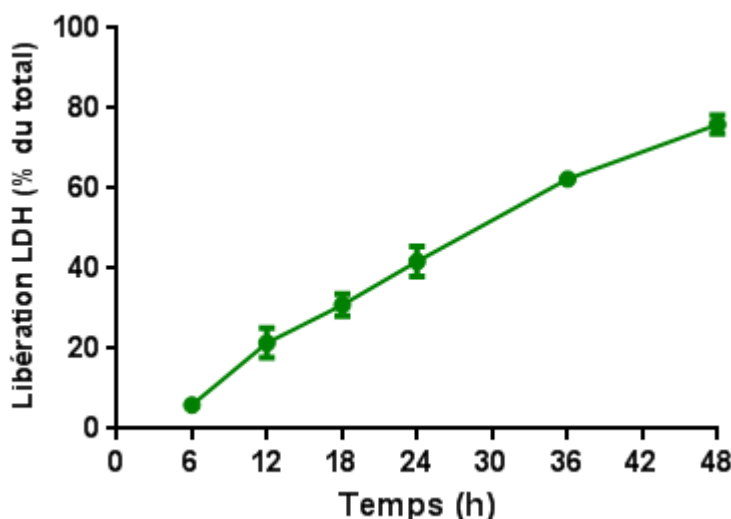


Figure 33 : Lésions cellulaires après une cinétique d'hypoxie.

Les cellules ont été placées en hypoxie (à 1 % d'O₂) dans un tampon adapté. Pour chacun des temps, le dosage de LDH a été réalisé en triplicat, sur le surnageant cellulaire ainsi que sur le lysat des cellules restantes. Les résultats représentent la moyenne ± l'écart standard de la moyenne de 3 expériences indépendantes.

et dans le lysat des cellules survivantes. Alors que 6 heures d'hypoxie provoquaient $6 \pm 0,4$ % de libération de la LDH totale, 48 heures d'hypoxie permettaient d'obtenir 76 ± 4 % de libération de LDH totale. Nos résultats présentés en Figure 16 nous ont permis de choisir le temps de 36 heures, pour lequel nous obtenons $62 \pm 1,0$ % de libération de LDH dans le surnageant.

b. Influence des fluctuations en glucose sur la mort cellulaire

Nous avons ensuite évalué le rôle des fluctuations en glucose sur la susceptibilité au développement de lésions hypoxiques. A la suite de nos différents traitements de 12 heures, les cellules ont été placées dans un tampon d'hypoxie en condition normoxie ou hypoxie pendant 36 heures. Nous avons évalué la mort cellulaire par libération de LDH. Pour les traitements LG et NG, nous observons une mort cellulaire de $49,6 \pm 1,0$ % et $48,8 \pm 0,7$ % respectivement (Figure 34). L'exposition des cellules aux conditions HG et IHG provoquent une augmentation significative de la mort cellulaire en comparaison à la condition NG (IHG $57,8 \pm 0,4$ % ; HG $55 \pm 0,2$ % vs NG $48,8 \pm 0,7$ % ; $p < 0,05$ Figure 34).

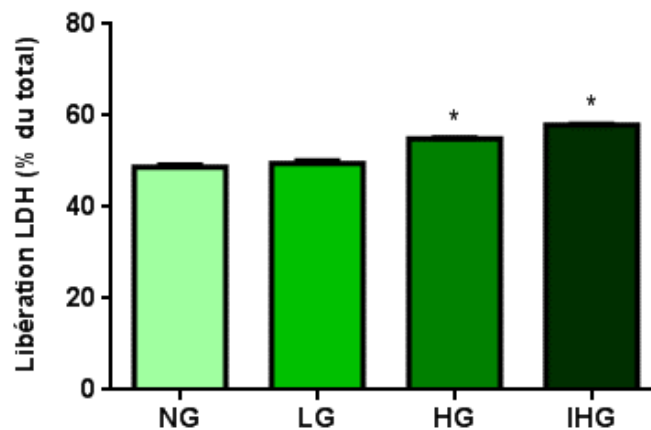


Figure 34 : Effets des fluctuations en glucose sur la mort cellulaire induite par un épisode d'hypoxie de 36 heures.

Les cellules HL-1 ont été exposées aux différentes conditions de traitement NG, LG, HG et IHG pendant 12 heures. Elles ont ensuite été placées dans un incubateur à hypoxie à 1 % d'O₂ pendant 36 heures. Un dosage de LDH a ensuite été réalisé sur le surnageant cellulaire ainsi que sur le lysat des cellules restantes. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart standard de la moyenne de 3 expériences indépendantes, chaque mesure étant réalisée en triplicat (ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett ; * $p < 0,05$).

Discussion

L'influence de la variabilité glycémique dans le développement des complications du diabète reste aujourd'hui un débat ouvert. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces complications sont encore très peu connus. Nous avons ainsi tenté de mettre au point un modèle in vitro mimant la variabilité glycémique nous permettant d'étudier certains mécanismes pouvant être impliqués dans le développement des complications cardiaques.

I. Choix du modèle et conditions de traitement

Très peu de données concernant des modèles de variabilité glycémique in vitro sont disponibles. Les études réalisées ont principalement pris pour modèle des cellules endothéliales (HUVEC) et des cellules β pancréatiques. Notre protocole expérimental avait pour but de mimer la variabilité glycémique journalière chez des patients diabétiques, sur le modèle de cardiomyocytes HL-1. L'originalité de notre étude repose sur le fait qu'il n'existe à notre connaissance aucune étude in vitro s'intéressant à la variabilité glycémique sur un modèle cellulaire cardiaque. La lignée HL-1 a été choisie car son utilisation était maîtrisée, bien que d'autres lignées auraient pu être utilisées, telles que la lignée H9c2 (Kimes and Brandt, 1976) ou AC16 (Davidson et al., 2005). La lignée HL-1 est une lignée qui, déjà en 2004, avait été utilisée dans de nombreuses études, afin d'évaluer les fonctions cardiaques, à la fois en conditions physiologiques et pathologiques (White et al., 2004).

Nous avons choisi dans un premier temps d'exposer nos cellules à des fluctuations en glucose sur une période de 12 heures, en faisant varier la concentration en glucose de 0,5 (2,8 mM) à 4,5 g/L (25 mM) toutes les deux heures. Nous avons choisi un temps de 12 heures, qui bien qu'inférieur aux temps utilisés dans les autres études (allant de 3 jours à 21 jours) a été suffisant pour induire des dysfonctions mitochondriales. Le choix des concentrations repose sur des études précédentes où les cellules HUVEC étaient exposées à des concentrations variant entre 5 et 20 mM (Risso et al., 2001) ou entre 5,5 et 22 mM (Maeda et al., 2015). Une étude plus récente sur des cellules HUVEC utilisaient deux amplitudes de fluctuation différentes : entre 5 et 16 mM et entre 5 et 25 mM ; et sur une période de 5 jours, avec des changements de milieu toutes les 4 heures (Guo et al., 2016). L'amplitude

de fluctuation la plus élevée provoquait notamment une augmentation de l'autophagie. Nous avons choisi une valeur plus faible pour la concentration basse, dans le but d'augmenter l'amplitude des fluctuations, et d'atteindre des niveaux mimant des épisodes hypoglycémiques. Certaines études vont plus loin : une étude récente a en effet travaillé sur un protocole expérimental avec pour valeur basse une concentration en glucose nulle (Quincozes-Santos et al., 2017), cette situation n'est cependant jamais observée chez des patients ou des modèles animaux. Nous avons dans un second temps augmenté le temps de traitement à 72 heures, sans changer le nombre de fluctuations, afin de déterminer si le temps d'exposition pouvait être un facteur jouant sur les paramètres étudiés.

Il est très délicat d'extrapoler des résultats *in vitro* au modèle animal ou à l'homme. Les paramètres glycémiques ne seront jamais les mêmes en fonction des individus ou selon le moment de la journée. Néanmoins nos conditions de traitement permettent d'avoir un contrôle précis sur les concentrations en glucose, ce qui est très difficile lorsque l'on utilise des modèles animaux. L'utilisation d'un modèle cellulaire permet par ailleurs d'étudier aisément de nombreuses fonctions cellulaires, ce que nous avons fait dans notre travail.

II. Signalisation et autophagie

Nous nous sommes intéressés à certaines voies de signalisation qui sont notamment impliquées dans le métabolisme énergétique du glucose. Nous avons ainsi montré que notre condition HG provoquait une activation de GSK-3 β , protéine inhibée par l'insuline qui et serait impliquée dans les mécanismes d'insulino-résistance (Henriksen and Dokken, 2006). Nos données sont également en accord avec des résultats provenant d'une étude *in vitro* sur des cellules rénales murines immortalisées, qui a montré une activation doublée de GSK-3 β lorsque les cellules étaient exposées à une concentration de glucose élevée (30 mM) pendant 24 heures ou 48 heures (Mariappan et al., 2008).

Concernant les autres voies de signalisation étudiées, nous n'avons pas été capables de montrer de différences significatives entre nos différentes conditions de traitement. Ces résultats ne sont pas en accord avec certains résultats de la littérature. Il a en effet été montré que des conditions hyperglycémiques pouvaient

provoquer une activation de la protéine p38 sur des cellules de muscle lisse d'aorte de rat ou sur des cellules HUVEC, ainsi qu'une activation de Erk 1/2 (Igarashi et al., 1999; McGinn et al., 2003).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Popov et collaborateurs ; dans leur étude menée sur des cellules de muscle lisse humaines, les auteurs ont en effet montré qu'une exposition pendant 7 jours à 22,5 mM de glucose entraînait une activation d'Erk 1/2 et une inhibition d'Akt (Popov et al., 2009). Par ailleurs, une exposition des HUVEC pendant 24 heures à 25 mM de glucose active Akt, en comparaison à des cellules exposées à 5 mM de glucose (De Nigris et al., 2015). Ces variations d'expression n'ont pas été constatées dans notre étude, et cela peut s'expliquer par la courte durée de notre traitement. Dans les études précédemment citées, les temps d'exposition étaient plus longs (1 à 7 jours contre 12 heures). Le modèle cellulaire utilisé peut également expliquer ces différences, la plupart des études in vitro utilisent des cellules HUVEC ou des cellules de muscle lisse de l'aorte, alors que nous utilisons une lignée murine de cardiomyocytes.

Impliquée dans la physiopathologie du diabète (Gonzalez et al., 2011), l'autophagie se caractérise par une conversion de LC3 I en LC3 II, avec donc une augmentation du ratio LC3 II / LC3 I. La protéine LC3 II est essentielle dans la maturation des autophagosomes et est couramment utilisé dans la détection de l'activité autophagique. Bien qu'il a déjà été montré que des fluctuations en glucose pouvaient induire une augmentation de l'autophagie sur un modèle d'HUVEC (Guo et al., 2016), nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation du ratio LC3 II / LC3 I dans notre étude. Le temps d'exposition des cellules au glucose (5 jours contre 12 heures pour notre étude) peut expliquer les différences de résultats obtenus.

III. Fonctions mitochondriales

Le glucose est un substrat important du métabolisme énergétique cardiaque tout comme les acides gras. Néanmoins, l'hyperglycémie peut provoquer des dysfonctions au niveau de la mitochondrie et participer à la cardiomyopathie diabétique (Duncan, 2011). Nous avons donc par la suite exploré diverses fonctions mitochondriales après exposition des cellules HL-1 aux différentes concentrations en glucose. Nous avons ainsi montré qu'après 12 heures de traitement, il n'y avait pas

de perturbation de la consommation d'O₂, de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire ou de l'expression de ces complexes, ni de la production d'ATP. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus sur un modèle de souris diabétiques non obèse. Les auteurs ont mesuré la consommation d'oxygène à partir de biopsies de muscle squelettique et de foie de souris âgées de 4 à 25 semaines, et n'ont montré aucune différence par rapport aux souris contrôles (Malaguti et al., 2014). Ils sont également en accord à ceux précédemment obtenus au laboratoire. En effet, des expériences similaires ont été réalisées sur des fibres cardiaques perméabilisées de patients diabétiques et non diabétiques, et n'ont pas montré de différence de consommation d'oxygène entre les groupes (Travail de thèse de R. Richer). Ces résultats sont à mettre en contraste avec ceux des études précédentes, qui avaient montré des changements mitochondriaux, notamment en cas d'hyperglycémie ou de diabète. En effet, il a été montré que des mitochondries de cœur de rats rendus diabétiques par injection de streptozotocine présentaient une baisse de la consommation d'oxygène en comparaison à des mitochondries de cœur de rats contrôles (Oliveira et al., 2003). De plus, il a été montré sur des cellules tubulaires rénales qu'une exposition à une forte concentration en glucose (25mM) pendant 4 ou 8 jours provoquait une baisse de la respiration basale d'environ 30 % par rapport à des cellules exposées à 5 mM de glucose (Czajka and Malik, 2016). Dans cette même étude, les auteurs ont utilisé des cellules mésangiales humaines, et ont montré qu'en les exposant pendant 12 jours à 25 mM de glucose, les cellules présentaient un taux de consommation d'oxygène trois fois inférieur à des cellules exposées à 5 mM de glucose (Czajka and Malik, 2016). La différence de résultats obtenus peut en partie s'expliquer par la technologie utilisée. Les auteurs (Czajka and Malik) ont en effet utilisé la technologie Seahorse (Agilent Technologies), beaucoup plus sensible que les électrodes de Clark que nous avons utilisées. Ces différences peuvent aussi s'expliquer par les conditions expérimentales utilisées dans l'étude de Czajka et Malik et la nôtre ; en effet, les cellules étaient exposées jusqu'à 12 jours en présence de 25 mM de glucose, alors que les cellules HL-1 étaient traitées pendant 12 heures en présence de 25 mM de glucose. Néanmoins, nous avons réalisé des expériences complémentaires, au cours desquelles nous avons augmenté le temps de traitement jusqu'à 72h en gardant le même nombre de fluctuations (6 au total). Dans ces conditions, nous observons une diminution significative d'environ

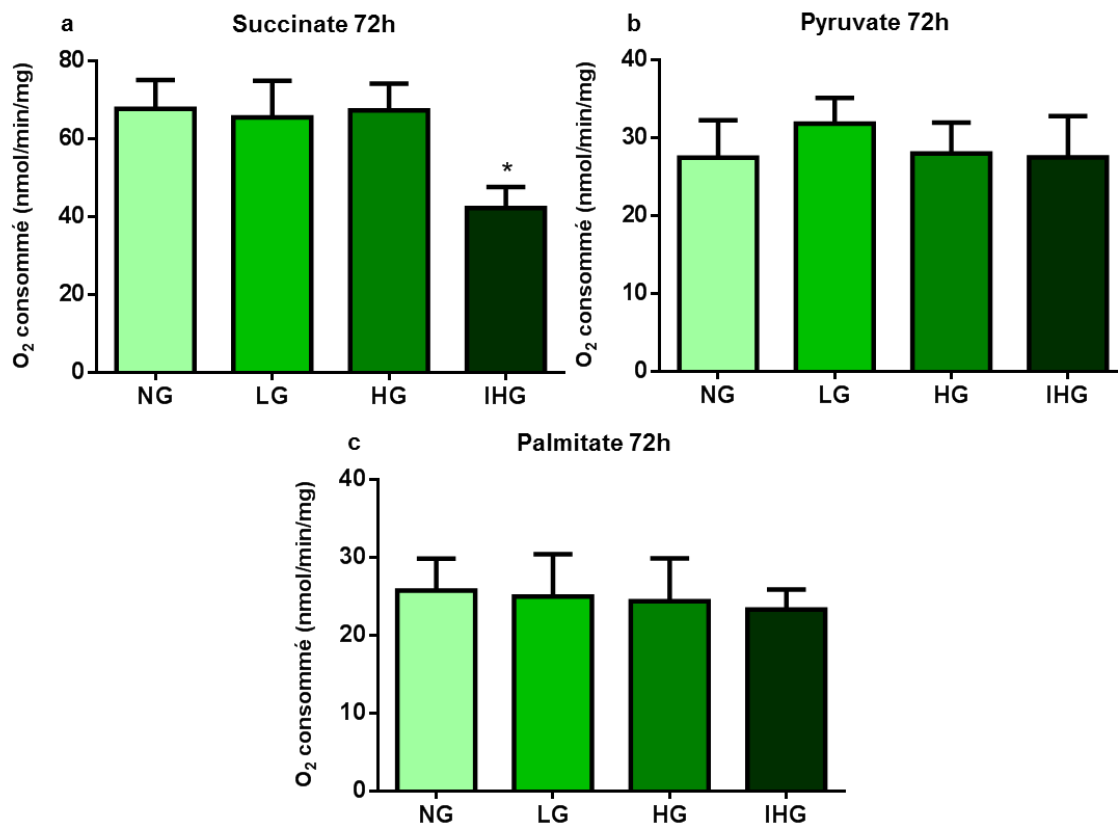


Figure 35 : Effets des fluctuations en glucose sur la consommation d'oxygène après 72 heures de traitement.

Les cellules HL-1 ont été exposées aux différentes conditions de traitement (NG, LG, HG et IHG, mimant respectivement normoglycémie, hypoglycémie, hyperglycémie et variabilité glycémique) pendant 72 heures. La consommation d'oxygène a ensuite été mesurée par polarographie grâce à une électrode de Clark. Différents substrats (a : succinate ; b : pyruvate ; c : palmitate) ont été utilisés. Les résultats représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne ($n=3$; ANOVA à un facteur suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett ; * $p<0,05$)

20 % de la consommation d'oxygène pour notre condition IHG lorsque le succinate était utilisé comme substrat (NG $67,7 \pm 7,5$ vs IHG $42,2 \pm 5,5$ nmol/min/mg ; $p<0,05$ Figure 35a). Nous n'avons cependant montré aucune différence avec les autres substrats; ces résultats suggèrent une altération du complexe II.

Néanmoins d'autres études ont pu mettre en évidence un impact délétère du diabète sur la respiration mitochondriale de cellules cardiaques humaines (Anderson et al., 2009). Le choix des substrats semble être important, puisque les résultats obtenus dans cette étude proviennent d'expériences réalisées avec du glutamate. Les auteurs ont également utilisé du succinate et du pyruvate, mais n'avaient montré aucune différence de consommation d'oxygène. Dans cette même étude, les auteurs ont également pu révéler une augmentation de la production d'H₂O₂ mitochondriale. Une seconde étude a mis en évidence l'impact délétère du diabète sur la respiration

mitochondriale de cellules cardiaques humaines (Montaigne et al., 2014). Les fibres perméabilisées de patients diabétiques présentaient une baisse de la respiration, lorsqu'elle était stimulée avec du palmitoyl-L-carnitine, pour des patients obèse, en surpoids ou de poids normal, en comparaison avec des patients non diabétiques. Les auteurs ont également stimulé la respiration avec du pyruvate et du succinate, et ont observé une diminution significative de la respiration chez les patients diabétiques de poids normal et obèses (pour le pyruvate) et chez des patients diabétiques de poids normal pour le succinate. Tout comme l'étude d'Anderson, les auteurs ont montré que les fibres de patients diabétiques, quel que soit l'état de leur poids, présentaient une augmentation de la production d'EROs associée à une augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes (Montaigne et al., 2014).

Nous nous sommes également intéressés à la production d'EROs mitochondriale, en ciblant l'anion superoxyde. Nous avons pu ainsi montrer que nos conditions HG et IHG provoquaient une augmentation de la production d'anions superoxydes après 12 heures de traitement, à la fois en conditions basale et stimulée. Nous nous étions précédemment assurés de la spécificité du marquage mitochondrial de la sonde MitoSox, grâce à un co-marquage avec la sonde MitoTracker en microscopie confocale. Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec des résultats de la littérature ; plusieurs études *in vitro* ont en effet montré qu'une exposition alternée à des concentrations faible et forte en glucose provoquait une augmentation de la production d'EROs sur des HUVEC ou des cellules pancréatiques (Maeda et al., 2015; Piconi et al., 2006; Tao et al., 2017). Bien que les conditions expérimentales soient différentes (temps d'exposition, technique de mesure utilisée, modèle cellulaire), nous arrivons à montrer une augmentation de la production d'anions superoxydes en condition HG et IHG d'environ 40 % en conditions basales et de 20 à 25 % en conditions stimulées, dès 12 heures d'exposition, ce qui indique que les conditions HG et IHG provoquent des dysfonctions mitochondriales précoces. Nous avons confirmé ces résultats en prolongeant le temps de traitement à 72 heures où nous observons une augmentation de la production d'anions superoxydes pour les conditions HG et IHG en conditions basale et stimulée (Figure 36 ; Basale : HG $141,5 \pm 4,9$ % IHG $134,7 \pm 6,4$ % vs NG $100 \pm 3,2$ % ; n=3 ; p<0,05. Stimulée : HG $131,6 \pm 1,35$ % IHG $138,7 \pm 5,2$ % vs NG $100 \pm 0,9$ % ; n=3 ; p<0,05). Par ailleurs, lorsque nous comparons les données obtenues à 12 heures à celles de 72

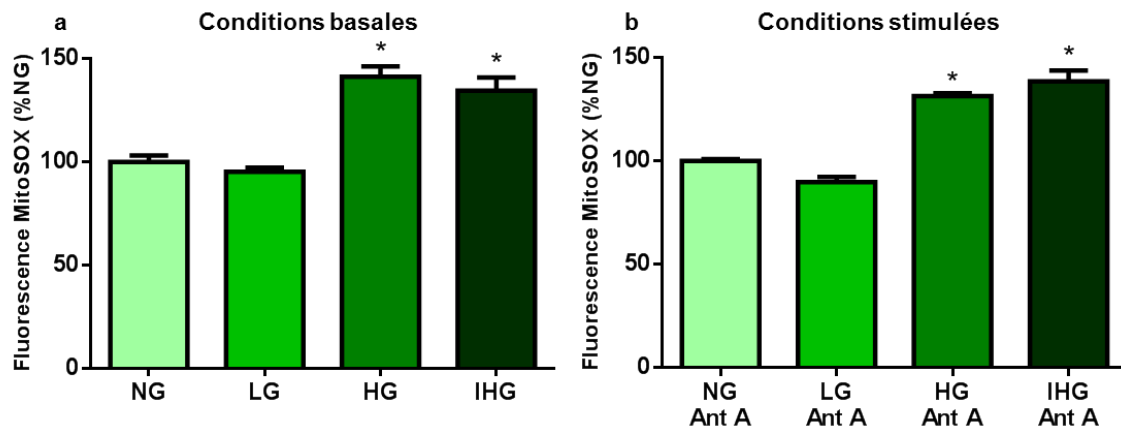


Figure 36 : Effets des fluctuations en glucose sur la production d'anions superoxydes après 72 heures de traitement

Les cellules HL-1 ont été exposées aux différentes conditions de traitement NG, LG, HG et IHG pendant 72 heures. Elles ont ensuite été exposées à la sonde MitoSox en conditions basales (a) ou stimulées (b) à l'antimycine A (Ant A). Les résultats normalisés à la condition NG représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne de 3 expériences indépendantes, chaque mesure étant réalisée en triplicat (ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett ; * $p < 0,05$).

heures, nous constatons que l'augmentation de fluorescence est significativement plus importante à 72 heures qu'à 12 heures pour la condition IHG en présence d'antimycine A (Figure 37 ; $IHG_{12h} 119,3 \pm 1,6$ vs $IHG_{72h} 138,7 \pm 5,2$ % ; $p < 0,001$). Ces résultats suggèrent que le temps d'exposition est un paramètre important qui joue sur le développement des dysfonctions mitochondriales. Il a d'ailleurs été établi que le temps (passé en hypo- et en hyperglycémie), mais aussi l'amplitude (différence entre les pics d'hypo- et d'hyperglycémie) sont des composants importants dans la mesure de la variabilité glycémique (Kovatchev and Cobelli, 2016).

Bien qu'ayant montré que les traitements HG et IHG augmentaient la production d'anions superoxydes, nous n'avons pas observé d'effet sur le stress oxydant évalué par oxyblot. Néanmoins, l'exposition des cellules HL-1 pendant 4 semaines au traitement HG induisait une augmentation d'un facteur deux des protéines oxydées. Il est donc hautement probable qu'un traitement de 12h soit insuffisant, malgré l'augmentation de production d'anions superoxydes, pour induire une oxydation suffisante des protéines afin qu'elles soient détectables par la technique utilisée. Ces résultats montrent une des limitations de notre étude, qui est le temps d'exposition. En effet, dans une étude sur des péricytes de rétine humaine et des cellules ARPE-19 (lignée de cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine humaine), les auteurs ont pu montrer une plus forte oxydation des protéines

après 14 jours d'exposition à de fortes concentrations en glucose (30 mM). Il y avait en effet 2,5 fois plus de protéines oxydées par rapport à des cellules exposées à une concentration de 5 mM en glucose. Cet effet est d'autant plus important lorsque les cellules étaient exposées de manière alternative aux deux concentrations, avec 4 fois plus de protéines oxydées par rapport aux cellules exposées à 5 mM, différence significativement supérieure par rapport aux cellules exposées à 30 mM (Ihnat et al., 2007).

Nous avons également montré que des fluctuations en glucose sur une période de 12 heures provoquaient une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial. L'effet du glucose sur le $\Delta\psi_m$ a déjà été rapporté dans la littérature. En effet, des concentrations croissantes en glucose (de 5 à 16 mM) permettaient d'augmenter le $\Delta\psi_m$ sur des cellules isolées d'îlots pancréatiques de rats (Heart, 2005). Par ailleurs, et contrairement à nos résultats, il a été montré que l'exposition d'une lignée de cellules β -pancréatiques à des fluctuations en glucose (entre 11,1 et 33,3 mM) pouvaient faire chuter le $\Delta\psi_m$ (Tao et al., 2017). L'effet du glucose sur le $\Delta\psi_m$ dépend de la localisation cellulaire des mitochondries cardiaques : inter-fibrillaires ou sous-sarcolemmales (Williamson et al., 2010). En effet, dans une étude

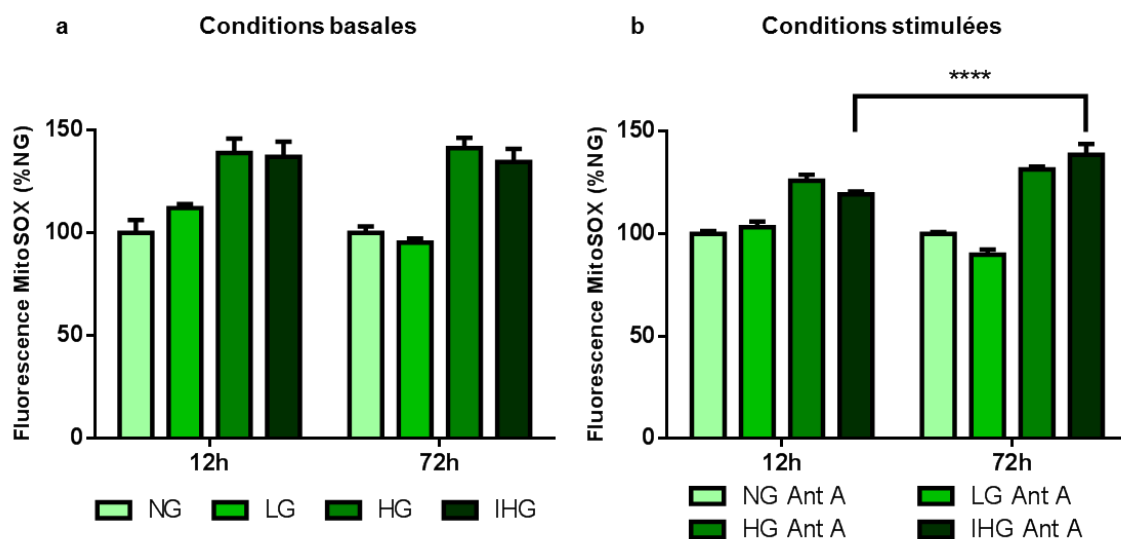


Figure 37 : Effet du temps de traitement sur la production mitochondriale d'anions superoxydes.

Comparaison des temps de traitement 12h et 72h (Résultat des Figure 28 et Figure 36) sur la production mitochondriale d'anions superoxydes. Les résultats normalisés à la condition NG représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne de 3 expériences indépendantes, chaque mesure étant réalisée en triplicat. (ANOVA à deux facteurs suivi d'un test de comparaison multiple de Bonferroni ; ****p<0,001)

sur des souris diabétiques, 10 semaines après injection de streptozotocine, le $\Delta\psi_m$ des mitochondries interfibrillaires était inférieur par rapport à des mitochondries interfibrillaires de cœurs non diabétiques. Mais cette différence n'était pas constatée pour les mitochondries sous-sarcolemmales (Williamson et al., 2010). Les résultats que nous avons obtenus sont néanmoins en accord avec nos résultats précédents concernant la production d'anions superoxydes ; il existerait en effet un lien entre le $\Delta\psi_m$ et la production d'EROs ; une augmentation du $\Delta\psi_m$ augmente la probabilité de formation d'EROs (Korshunov et al., 1997).

L'étude de Williamson et al. (2010) a également montré une augmentation d'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale dans les mitochondries cardiaques interfibrillaires issues des souris diabétiques. Sur un autre modèle préclinique de souris diabétiques non obèses et sur du tissu hépatique, Malaguti et collaborateurs ont montré une diminution de la capacité de rétention calcique mitochondriale chez les souris diabétiques dès 4 semaines d'âge avant même qu'elles développent un diabète (glycémies normales) (Malaguti et al., 2014). Contrairement à ces deux études, nous n'avons pas observé d'effet ni du traitement HG ni du traitement IHG sur l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale déclenchée par la ionomycine. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces discordances : les modèles expérimentaux utilisés (modèles murins pour les études de Williamson et Malaguti contre lignée cellulaire HL-1 pour notre étude), les tissus étudiés (tissu cardiaque pour l'étude de Williamson, tissu hépatique pour l'étude de Malaguti et lignée de cardiomyocytes pour notre étude), les temps d'exposition à l'hyperglycémie (plusieurs semaines pour l'étude de Williamson et Malaguti et 12 heures pour notre étude) ou encore les techniques permettant de mesurer l'ouverture du mPTP (Calcium green, swelling des mitochondries pour les études de Williamson et Malaguti vs calcéine/cobalt/ionomycine pour notre étude).

IV. Modèle d'hypoxie

Nous avons tout d'abord caractérisé la mort cellulaire suite à un épisode de 14 heures d'hypoxie. La libération de LDH n'était pas modifiée avec l'utilisation d'un inhibiteur apoptotique, ce qui suppose l'implication de la nécrose dans le processus de mort cellulaire, hypothèse supportée par le fait que nous n'observons pas non plus de formation de corps apoptotiques après l'épisode d'hypoxie. Ces résultats ne

sont pas en accord avec ceux de la littérature. En effet, le processus apoptotique a été démontré à la suite d'un épisode d'hypoxie de 16 heures à 1 % d'O₂ sur des cellules HL-1 (Robador et al., 2011). Néanmoins, seulement 10 % des cellules étaient en apoptose suite à l'hypoxie. La teneur en dioxygène semble jouer un rôle important dans le développement des lésions : alors que nous montrons 60 à 70 % libération de LDH après 14 heures d'hypoxie à 0,1 % d'O₂, ou après 36 heures à 1 %, il faut 48 heures d'hypoxie à 2 % d'O₂ pour qu'une augmentation de libération de LDH soit détectable sur des cellules HL-1 par rapport à des cellules en normoxie (Ambrose et al., 2014).

Nous avons également étudié certaines fonctions mitochondriales après un épisode de 7 et 14 heures d'hypoxie. Nous avons ainsi observé une baisse de la consommation d'oxygène, associée à une diminution du $\Delta\psi_m$. Cette diminution du $\Delta\psi_m$ est observée dès 7 heures d'hypoxie alors que la respiration mitochondriale n'est pas touchée (résultats non présentés). Cette forte baisse de l'activité de la chaîne respiratoire après 14 heures d'hypoxie explique nos résultats concernant le type de mort cellulaire observé. En effet nous observons un phénomène nécrotique, cohérent avec nos résultats concernant la chaîne respiratoire ; en effet le processus apoptotique est dépendant d'une présence en ATP (Kushnareva and Newmeyer, 2010).

Le risque de complications cardiovasculaires, et notamment d'infarctus du myocarde, est très présent chez les patients diabétiques. Nous avons cherché à déterminer si des fluctuations en glucose pouvaient provoquer une plus grande susceptibilité au développement de lésions suite à un épisode d'hypoxie. Nous avons pu montrer une augmentation, bien que modeste, des lésions pour nos conditions HG et IHG par rapport à notre condition NG. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les traitements HG et IHG provoquent des altérations précoces des mitochondries, avec une augmentation de la production d'anions superoxydes, et que l'hypoxie induit des dysfonctions mitochondriales avec une réduction de la phosphorylation oxydative et une altération du $\Delta\psi_m$. Lorsque ces deux expériences (traitement au glucose HG/IHG et hypoxie) sont combinées, la mort cellulaire est plus importante. Ces résultats sont en accord avec le fait que la pathologie diabétique est un facteur de co-morbidité en cas d'ischémie cardiaque, les patients diabétiques subissant un infarctus du myocarde présentent une mortalité plus élevée

que des patients non diabétiques (Norhammar et al., 2007). De plus, des patients admis en unité de soins intensifs présentant une variabilité glycémique importante ont une morbidité et mortalité plus importante (Kransley et al., 2013). Notre équipe a également montré sur un modèle de rats rendus diabétiques par injection de streptozotocine que la variabilité glycémique et l'hyperglycémie avaient un impact délétère sur les lésions cardiaques induites par un épisode d'ischémie reperfusion myocardique ; les taux de troponines plasmatiques étaient significativement plus importants chez les rats en hyperglycémie ou avec une variabilité glycémique comparés aux rats non diabétiques (Joubert et al., 2016).

Perspectives

Les perspectives que nous pouvons envisager sont nombreuses, et axées à la fois sur notre modèle cellulaire, mais aussi sur un modèle animal.

Nous pourrons ainsi développer l'exploration des fonctions mitochondriales ; nos premiers résultats nous poussent à continuer l'étude des fluctuations en glucose en exposant nos cellules pendant 72 heures de traitement. Nous avons choisi un premier temps de 12 heures avec des fluctuations toutes les 2 heures de façon arbitraire. Il semble que le temps de traitement soit important, mais nous envisageons également de modifier la fréquence des fluctuations ; ainsi en gardant le temps de 72 heures nous pourrions faire des changements toutes les 6, 12 ou 24 heures et comparer les effets sur la production d'anions superoxydes.

Nous pourrons tenter d'expliquer la baisse de consommation d'oxygène à 72 heures pour notre condition IHG en présence de succinate. Pour ce faire nous prévoyons de reconduire les mêmes expériences que celles réalisées à 12 heures d'exposition : déterminer l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire par analyse spectrophotométrique en s'intéressant plus particulièrement au complexe II, et évaluer la production d'ATP. Ces études fonctionnelles pourront être également complétées par des analyses en western blot afin d'examiner les niveaux d'expression des différentes sous-unités du complexe II. Nous souhaitons également réaliser des analyses en protéomique afin d'explorer de manière plus précise les éventuelles perturbations dues aux fluctuations en glucose. Des expériences menées au laboratoire ont permis de mettre en place un protocole d'étude du protéome mitochondrial à partir de fragments d'oreillettes humaines permettant d'étudier l'expression relative des protéines par la technique iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation). Néanmoins, nos conditions expérimentales ne nous ont permis d'analyser que 200 à 250 protéines sur les 1500 présentes dans la mitochondrie. Il sera donc nécessaire au préalable d'optimiser les conditions d'extraction des protéines à partir des mitochondries. Ces analyses nous permettront par exemple d'étudier les enzymes anti-oxydantes afin de savoir si l'augmentation de la production d'anions superoxydes que nous avons observée est liée à un déséquilibre entre la production d'EROs et l'activité des enzymes anti-oxydantes.

Il aurait également été intéressant de pouvoir utiliser des technologies plus performantes, telle que la technologie Seahorse, notamment pour les expériences concernant la phosphorylation oxydative et le métabolisme mitochondrial. Nous aurions pu ainsi déceler des différences que nous n'avons pas été capables de montrer en polarographie. De même, nous nous sommes placés dans des conditions de mesures uniques avec le ou les substrats et l'ADP. Mais il aurait été également intéressant de déterminer la respiration mitochondriale en présence d'agents découplant comme le CCCP et en présence d'inhibiteurs de la synthèse d'ATP comme l'oligomycine.

Il en est de même pour l'utilisation des sondes fluorescentes. Nous avons été capables d'observer des différences entre nos traitements (en termes de production d'anions superoxydes et de potentiel de membrane mitochondrial), et nous envisageons d'effectuer des expériences en microscopie à fluorescence en temps réel avec les sondes fluorescentes, grâce à un système permettant de placer ou non les cellules en hypoxie. Cela nous permettra de mettre en évidence des altérations mitochondriales à l'échelle de la cellule en condition de normoxie ou d'hypoxie. Il est également connu que le diabète participe à une baisse du nombre de mitochondries et une réduction de leur taille (Kelley et al., 2002). Il serait alors intéressant d'étudier le réseau mitochondrial, afin de quantifier le nombre et la taille des mitochondries, et de déterminer si des fluctuations en glucose vont influencer sur ces paramètres. Une technique permettant cette observation repose sur l'utilisation d'une sonde fluorescente en microscopie confocale, le MitoTracker® Deep Red, qui a déjà été utilisée au laboratoire. Il a également été développé des protocoles d'analyse du réseau mitochondrial, permettant une étude quantitative et qualitative du réseau (Chevrollier et al., 2012). De plus, l'analyse des mécanismes de fusion et de fission serait un complément judicieux à l'exploration du réseau mitochondrial.

Concernant les expériences d'hypoxie cellulaire, nous songeons à évaluer si des fluctuations en glucose peuvent jouer sur la récupération post-hypoxie. Nous avons montré que la mort cellulaire est augmentée en condition HG et IHG suite à l'hypoxie. Il serait donc également intéressant de caractériser et d'étudier les cellules survivantes, notamment au niveau du métabolisme mitochondrial, et ainsi

de déterminer si les fluctuations en glucose peuvent avoir un impact sur la récupération cellulaire après hypoxie.

L'exploration des paramètres cellulaires et mitochondriaux sur un modèle in vitro ne reflète que très peu ce que l'on peut constater sur un modèle animal ou chez l'homme. Un modèle de variabilité glycémique sur rats et souris est maîtrisé au laboratoire, et nous envisageons d'adapter les techniques d'exploration in vitro des fonctions mitochondriales à un modèle animal.

Durant mon travail de thèse, j'ai également pu travailler sur la thématique des mutations de l'ADN mitochondrial, à travers l'exploration des fonctions de mitochondries issues de fibroblastes de patients contrôles et d'un patient présentant une mutation originale du gène codant pour l'ATP6. Certaines mutations de l'ADN mitochondrial (comme la mutation m. 3243A>G ou mutation « MELAS ») entraînent un diabète dit mitochondrial. A partir de cellules de patients, comme des fibroblastes, ou à partir de cybrides (hybrides obtenus à partir de cellules dépourvues d'ADN mitochondrial, fusionnées avec des mitochondries de patients), nous pourrions étudier par les mêmes approches que celles développées dans mon travail de thèse l'effet de la variabilité glycémique sur les fonctions mitochondriales, afin de déterminer si cela pourrait aggraver les dysfonctions mitochondriales liées aux mutations.

Conclusion

Le rôle de la variabilité glycémique dans le développement des complications du diabète reste aujourd'hui une question sans réponse claire et un sujet à controverse, comme peuvent le montrer les contradictions entre Hirsch et Bergenstal (Bergenstal, 2015; Hirsch, 2015). Le manque d'une définition claire de la VG, et la multitude de paramètres utilisés pour l'évaluer sont des freins pour donner une réponse à la question précédente.

Nous sommes entrés dans ce débat avec pour hypothèse que la VG pourrait avoir un rôle délétère sur les fonctions cellulaires et mitochondriales cardiaques, et pourrait donc jouer un rôle dans le développement des complications cardiovasculaires du diabète. Nous avons dans un premier temps exploré certaines protéines impliquées dans les voies de signalisation cellulaire, mais n'avons pas mis en évidence de modifications dues à des fluctuations en glucose.

Nous nous sommes ensuite penchés sur l'exploration des fonctions mitochondriales. Nous avons pu ainsi montrer que 12 heures de fluctuations en glucose provoquaient une augmentation de la production d'anions superoxydes et du potentiel de membrane mitochondrial, sans pour autant perturber la respiration mitochondriale, l'activité des complexes de la chaîne respiratoire ou encore la production d'ATP. La production d'anions superoxydes ne semblait pas suffisamment intense ou longue pour pouvoir induire un stress oxydatif. Nous avons également pu montrer qu'une augmentation du temps d'exposition permettait d'accentuer les dysfonctions observées, et d'en déceler de nouvelles, avec une diminution de la respiration mitochondriale à 72 heures. Enfin, nous avons pu montrer que des fluctuations en glucose provoquaient une augmentation de la mort cellulaire à la suite d'un épisode d'hypoxie. Ces résultats sont résumés dans le Tableau IX.

Ces résultats semblent aller dans le sens de l'hypothèse selon laquelle la variabilité glycémique serait délétère et pourrait participer au développement des complications cardiovasculaires, avec une dysfonction précoce des mitochondries, qui est accentuée lorsque le temps de traitement est augmenté.

Paramètres		Résultats marquants	
		Traitement 12h	Traitement 72h
Cellulaire	Signalisation	Condition HG : ↗ P-GSK3B	
	Autophagie	∅	
Mitochondrial	Respiration mitochondriale	∅	Condition IHG : ↘ (succinate)
	Activité enzymatique des complexes de la CRM	∅	
	Production d'ATP	∅	
	Potentiel de membrane mitochondrial	Condition IHG : ↗ $\Delta\Psi_m$	
	Ouverture du mPTP	∅	
	Production d'anions superoxydes	Conditions HG et IHG : ↗	Conditions HG et IHG : ↗
	Oxydation des protéines	∅	
Hypoxie	Mort cellulaire (nécrose)	Conditions HG et IHG : ↗	

Tableau IX : Bilan des résultats obtenus concernant l'effet des fluctuations en glucose

(↗ : augmentation ; ↘ : diminution ; ∅ : aucun effet ; CRM : chaîne respiratoire mitochondriale ; mPTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale ; HG : glucose élevé ; IHG : glucose élevé intermittent)

Bibliographie

Ambrose, L.J.A., Abd-Jamil, A.H., Gomes, R.S.M., Carter, E.E., Carr, C.A., Clarke, K., and Heather, L.C. (2014). Investigating Mitochondrial Metabolism in Contracting HL-1 Cardiomyocytes Following Hypoxia and Pharmacological HIF Activation Identifies HIF-Dependent and Independent Mechanisms of Regulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 19, 574-585.

American Diabetes Association (2015). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 38, S8-S16.

American Diabetes Association (2017). 8. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment. *Diabetes Care* 40, S64-S74.

Amouyal, C., and Andreelli, F. (2017). What is the evidence for metabolic surgery for type 2 diabetes? A critical perspective. *Diabetes Metab.* 43, 9-17.

Anderson, E.J., Kypson, A.P., Rodriguez, E., Anderson, C.A., Lehr, E.J., and Neuffer, P.D. (2009). Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54, 1891-1898.

Aneja, A., Tang, W.H.W., Bansilal, S., Garcia, M.J., and Farkouh, M.E. (2008). Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options. *Am. J. Med.* 121, 748-757.

Askar, M., Daghestani, J., Thomas, D., Leahy, N., Dunn, P., Claas, F., Doran, S., Saji, H., Kanangat, S., Karoichane, M., et al. (2013). 16(th) IHIW: global distribution of extended HLA haplotypes. *Int. J. Immunogenet.* 40, 31-38.

Balsa, E., Marco, R., Perales-Clemente, E., Szklarczyk, R., Calvo, E., Landázuri, M.O., and Enríquez, J.A. (2012). NDUFA4 Is a Subunit of Complex IV of the Mammalian Electron Transport Chain. *Cell Metab.* 16, 378-386.

Banerjee, C., Moon, Y.P., Paik, M.C., Rundek, T., Mora-McLaughlin, C., Vieira, J.R., Sacco, R.L., and Elkind, M.S.V. (2012). Duration of diabetes and risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Study. *Stroke* 43, 1212-1217.

Battelli, M.G., Polito, L., Bortolotti, M., and Bolognesi, A. (2016). Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016.

Beck, R.W. (2010). Effectiveness of Continuous Glucose Monitoring in a Clinical Care Environment. *Diabetes Care* 33, 17-22.

Bergenstal, R.M. (2015). Glycemic Variability and Diabetes Complications: Does It Matter? Simply Put, There Are Better Glycemic Markers! *Diabetes Care* 38, 1615-1621.

Bergental, R.M., Bailey, C.J., and Kendall, D.M. (2010). Type 2 diabetes: assessing the relative risks and benefits of glucose-lowering medications. *Am. J. Med.* 123, 374.e 9-18.

Bonds, D.E., Miller, M.E., Bergental, R.M., Buse, J.B., Byington, R.P., Cutler, J.A., Dudl, R.J., Ismail-Beigi, F., Kimel, A.R., Hoogwerf, B., et al. (2010). The association between symptomatic, severe hypoglycaemia and mortality in type 2 diabetes: retrospective epidemiological analysis of the ACCORD study. *BMJ* 340, b4909.

Boulton, A.J. (2016). The Diabetic Foot. In *Endotext*, L.J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K.R. Feingold, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.

Bragd, J., Adamson, U., Bäcklund, L.B., Lins, P.E., Moberg, E., and Oskarsson, P. (2008). Can glycaemic variability, as calculated from blood glucose self-monitoring, predict the development of complications in type 1 diabetes over a decade? *Diabetes Metab.* 34, 612-616.

Brownlee, M. (2005). The Pathobiology of Diabetic Complications. *Diabetes* 54, 1615-1625.

Brownlee, M., and Hirsch, I.B. (2006). Glycemic Variability: A Hemoglobin A1c-Independent Risk Factor for Diabetic Complications. *JAMA* 295, 1707-1708.

Bryan, J., Crane, A., Vila-Carriles, W.H., Babenko, A.P., and Aguilar-Bryan, L. (2005). Insulin secretagogues, sulfonylurea receptors and K(ATP) channels. *Curr. Pharm. Des.* 11, 2699-2716.

Buckingham, B. (2008). Clinical Overview of Continuous Glucose Monitoring. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2, 300-306.

Buscemi, S., Re, A., Batsis, J.A., Arnone, M., Mattina, A., Cerasola, G., and Verga, S. (2010). Glycaemic variability using continuous glucose monitoring and endothelial function in the metabolic syndrome and in Type 2 diabetes. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 27, 872-878.

Callaghan, B.C., Cheng, H., Stables, C.L., Smith, A.L., and Feldman, E.L. (2012). Diabetic neuropathy: Clinical manifestations and current treatments. *Lancet Neurol.* 11, 521-534.

Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Shannon, R.J., Hirst, J., and Walker, J.E. (2006). Bovine Complex I Is a Complex of 45 Different Subunits. *J. Biol. Chem.* 281, 32724-32727.

Chance, B., and Williams, G.R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* 17, 65-134.

Chanock, S.J., el Benna, J., Smith, R.M., and Babior, B.M. (1994). The respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* 269, 24519-24522.

Chen, Y.-R., and Zweier, J.L. (2014). CARDIAC MITOCHONDRIA AND ROS GENERATION. *Circ. Res.* 114, 524-537.

Chen, H., Chomyn, A., and Chan, D.C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* 280, 26185-26192.

Chevrollier, A., Cassereau, J., Ferré, M., Alban, J., Desquirit-Dumas, V., Gueguen, N., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., and Reynier, P. (2012). Standardized mitochondrial analysis gives new insights into mitochondrial dynamics and OPA1 function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 980-988.

Chi, C., Snaith, J., and Gunton, J.E. (2017). Diabetes Medications and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *Heart Lung Circ.* 0.

Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15927-15932.

Claycomb, W.C., Lanson, N.A., Stallworth, B.S., Egeland, D.B., Delcarpio, J.B., Bahinski, A., and Izzo, N.J. (1998). HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 2979-2984.

Colberg, S.R., Sigal, R.J., Fernhall, B., Regensteiner, J.G., Blissmer, B.J., Rubin, R.R., Chasan-Taber, L., Albright, A.L., and Braun, B. (2010). Exercise and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 33, e147-e167.

Control, T.D., and Group, C.T.R. (1993). The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* 329, 977-986.

Copps, K.D., and White, M.F. (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* 55, 2565-2582.

Cosson, E., Guimfack, M., Paries, J., Paycha, F., Attali, J.-R., and Valensi, P. (2003). Prognosis for Coronary Stenoses in Patients With Diabetes and Silent Myocardial Ischemia. *Diabetes Care* 26, 1313-1314.

Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M.E., Pratipanawatr, T., DeFronzo, R.A., Kahn, C.R., and Mandarino, L.J. (2000). Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J. Clin. Invest.* 105, 311-320.

Czajka, A., and Malik, A.N. (2016). Hyperglycemia induced damage to mitochondrial respiration in renal mesangial and tubular cells: Implications for diabetic nephropathy. *Redox Biol.* 10, 100-107.

Davidson, M.M., Nesti, C., Palenzuela, L., Walker, W.F., Hernandez, E., Protas, L., Hirano, M., and Isaac, N.D. (2005). Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39, 133-147.

De Nigris, V., Pujadas, G., La Sala, L., Testa, R., Genovese, S., and Ceriello, A. (2015). Short-term high glucose exposure impairs insulin signaling in endothelial cells. *Cardiovasc. Diabetol.* 14, 114.

DeFronzo, R.A. (2009). From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes* 58, 773-795.

Degli Esposti, M. (1998). Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim. Biophys. Acta* 1364, 222-235.

Di Flaviani, A., Picconi, F., Di Stefano, P., Giordani, I., Malandrucchio, I., Maggio, P., Palazzo, P., Sgreccia, F., Peraldo, C., Farina, F., et al. (2011). Impact of Glycemic and Blood Pressure Variability on Surrogate Measures of Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care* 34, 1605-1609.

Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT, Lund University, and Novartis Institutes of BioMedical Research, Saxena, R., Voight, B.F., Lyssenko, V., Burtt, N.P., de Bakker, P.I.W., Chen, H., Roix, J.J., Kathiresan, S., Hirschhorn, J.N., et al. (2007). Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316, 1331-1336.

Duckworth, W., Abraira, C., Moritz, T., Reda, D., Emanuele, N., Reaven, P.D., Zieve, F.J., Marks, J., Davis, S.N., Hayward, R., et al. (2009). Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 360, 129-139.

Duncan, J.G. (2011). Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1351-1359.

Ehrhardt, N.M., Chellappa, M., Walker, M.S., Fonda, S.J., and Vigersky, R.A. (2011). The effect of real-time continuous glucose monitoring on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes Sci. Technol.* 5, 668-675.

Eisenbarth, G.S. (1986). Type I Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* 314, 1360-1368.

Elgass, K., Pakay, J., Ryan, M.T., and Palmer, C.S. (2013). Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 150-161.

Esposito, K., Nappo, F., Marfella, R., Giugliano, G., Giugliano, F., Ciotola, M., Quagliari, L., Ceriello, A., and Giugliano, D. (2002). Inflammatory Cytokine Concentrations Are Acutely Increased by Hyperglycemia in Humans: Role of Oxidative Stress. *Circulation* 106, 2067-2072.

Esposito, K., Maiorino, M.I., Bellastella, G., Chiodini, P., Panagiotakos, D., and Giugliano, D. (2015). A journey into a Mediterranean diet and type 2 diabetes: a systematic review with meta-analyses. *BMJ Open* 5.

Ferwana, M., Firwana, B., Hasan, R., Al-Mallah, M.H., Kim, S., Montori, V.M., and Murad, M.H. (2013). Pioglitazone and risk of bladder cancer: a meta-analysis of controlled studies. *Diabet. Med.* *30*, 1026-1032.

Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2001). The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis. *Dev. Cell* *1*, 515-525.

Gao, X., Wen, X., Yu, C., Esser, L., Tsao, S., Quinn, B., Zhang, L., Yu, L., and Xia, D. (2002). The Crystal Structure of Mitochondrial Cytochrome bc1 in Complex with Famoxadone: The Role of Aromatic-Aromatic Interaction in Inhibition. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 11692-11702.

Gegg, M.E., Cooper, J.M., Chau, K.-Y., Rojo, M., Schapira, A.H.V., and Taanman, J.-W. (2010). Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 4861-4870.

Giacco, F., and Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* *107*, 1058-1070.

Gimeno-Orna, J.A., Castro-Alonso, F.J., Boned-Juliani, B., and Lou-Arnal, L.M. (2003). Fasting plasma glucose variability as a risk factor of retinopathy in Type 2 diabetic patients. *J. Diabetes Complications* *17*, 78-81.

Gonzalez, C.D., Lee, M.-S., Marchetti, P., Pietropaolo, M., Towns, R., Vaccaro, M.I., Watada, H., and Wiley, J.W. (2011). The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy* *7*, 2-11.

Gorst, C., Kwok, C.S., Aslam, S., Buchan, I., Kontopantelis, E., Myint, P.K., Heatlie, G., Loke, Y., Rutter, M.K., and Mamas, M.A. (2015). Long-term Glycemic Variability and Risk of Adverse Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care* *38*, 2354-2369.

Group, T.A. to C.C.R. in D.S. (2008a). Effects of Intensive Glucose Lowering in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* *358*, 2545-2559.

Group, T.A.C. (2008b). Intensive Blood Glucose Control and Vascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* *358*, 2560-2572.

Grover, G.J., Marone, P.A., Koetzner, L., and Seto-Young, D. (2008). Energetic signalling in the control of mitochondrial F1F0 ATP synthase activity in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 2698-2701.

Guo, J., Sang, Y., Yin, T., Wang, B., Yang, W., Li, X., Li, H., and Kang, Y. (2016). miR-1273g-3p participates in acute glucose fluctuation-induced autophagy, dysfunction, and proliferation attenuation in human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *310*, E734-E743.

Hajhosseiny, R., Khavandi, K., Jivraj, N., Mashayekhi, S., Goldsmith, D.J., and Malik, R.A. (2014). Have we reached the limits for the treatment of diabetic nephropathy? *Expert Opin. Investig. Drugs* 23, 511-522.

Hayward, R.A., Reaven, P.D., Wiitala, W.L., Bahn, G.D., Reda, D.J., Ge, L., McCarren, M., Duckworth, W.C., Emanuele, N.V., and VADT Investigators (2015). Follow-up of glycemic control and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 372, 2197-2206.

Heart, E. (2005). Glucose-dependent increase in mitochondrial membrane potential, but not cytoplasmic calcium, correlates with insulin secretion in single islet cells. *AJP Endocrinol. Metab.* 290, E143-E148.

Hederstedt, L. (2003). Complex II Is Complex Too. *Science* 299, 671-672.

Henriksen, E.J., and Dokken, B.B. (2006). Role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr. Drug Targets* 7, 1435-1441.

Hermanides, J., Vriesendorp, T.M., Bosman, R.J., Zandstra, D.F., Hoekstra, J.B., and Devries, J.H. (2010). Glucose variability is associated with intensive care unit mortality*. *Crit. Care Med.* 38, 838-842.

Hirsch, I.B. (2015). Glycemic Variability and Diabetes Complications: Does It Matter? Of Course It Does! *Diabetes Care* 38, 1610-1614.

Hoffman, R.P., Dye, A.S., Huang, H., and Bauer, J.A. (2013). Effects of Glucose Control and Variability on Endothelial Function and Repair in Adolescents with Type 1 Diabetes. *ISRN Endocrinol.* 2013.

Holman, R.R., Paul, S.K., Bethel, M.A., Matthews, D.R., and Neil, H.A.W. (2008). 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 359, 1577-1589.

Hu, F.B. (2011). Globalization of Diabetes. *Diabetes Care* 34, 1249-1257.

Igarashi, M., Wakasaki, H., Takahara, N., Ishii, H., Jiang, Z.-Y., Yamauchi, T., Kuboki, K., Meier, M., Rhodes, C.J., and King, G.L. (1999). Glucose or diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways. *J. Clin. Invest.* 103, 185-195.

Ihnat, M.A., Kaltreider, R.C., Thorpe, J.E., Green, D.E., Kamat, C.D., Leeper, M., Shanner, A.C., Warnke, L.A., Piconi, L., Ceriello, A., et al. (2007). Attenuated Superoxide Dismutase Induction in Retinal Cells in Response to Intermittent High Versus Continuous High Glucose. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 3, 16-23.

Ilonen, J., Hammais, A., Laine, A.-P., Lempainen, J., Vaarala, O., Veijola, R., Simell, O., and Knip, M. (2013). Patterns of B-Cell Autoantibody Appearance and Genetic Associations During the First Years of Life. *Diabetes* 62, 3636-3640.

Jokinen, R., and Battersby, B.J. (2013). Insight into mammalian mitochondrial DNA segregation. *Ann. Med.* 45, 149-155.

Joubert, M., Hardouin, J., Legallois, D., Blanchart, K., Elie, N., Nowoczyn, M., Croisille, P., Coulbault, L., Bor-Angelier, C., Allouche, S., et al. (2016). Effects of glycaemic variability on cardiac remodelling after reperfused myocardial infarction: Evaluation of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats using cardiac magnetic resonance imaging. *Diabetes Metab.*

Jun, J.E., Jin, S.-M., Baek, J., Oh, S., Hur, K.Y., Lee, M.-S., Lee, M.-K., and Kim, J.H. (2015). The association between glycemic variability and diabetic cardiovascular autonomic neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* 14.

Kanamaru, Y., Sekine, S., Ichijo, H., and Takeda, K. (2012). The Phosphorylation-Dependent Regulation of Mitochondrial Proteins in Stress Responses. *J. Signal Transduct.* 2012.

Kannel, W.B., and McGee, D.L. (1979). Diabetes and Cardiovascular Disease: The Framingham Study. *JAMA* 241, 2035-2038.

Kass, G.E., Eriksson, J.E., Weis, M., Orrenius, S., and Chow, S.C. (1996). Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. *Biochem. J.* 318 (Pt 3), 749-752.

Kaufman, D.L., Erlander, M.G., Clare-Salzler, M., Atkinson, M.A., Maclaren, N.K., and Tobin, A.J. (1992). Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 89, 283-292.

Kelley, D.E., He, J., Menshikova, E.V., and Ritov, V.B. (2002). Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 51, 2944-2950.

Kilpatrick, E.S. (2012). The rise and fall of HbA(1c) as a risk marker for diabetes complications. *Diabetologia* 55, 2089-2091.

Kilpatrick, E.S., Rigby, A.S., and Atkin, S.L. (2006). The effect of glucose variability on the risk of microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 29, 1486-1490.

Kilpatrick, E.S., Rigby, A.S., and Atkin, S.L. (2008). Mean blood glucose compared with HbA1c in the prediction of cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 51, 365-371.

Kimes, B.W., and Brandt, B.L. (1976). Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp. Cell Res.* 98, 367-381.

Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445-544.

Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., and Starkov, A.A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416, 15-18.

Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305, 858-862.

Kovatchev, B., and Cobelli, C. (2016). Glucose Variability: Timing, Risk Analysis, and Relationship to Hypoglycemia in Diabetes. *Diabetes Care* 39, 502-510.

Kovatchev, B.P., Cox, D.J., Gonder-Frederick, L.A., Young-Hyman, D., Schlundt, D., and Clarke, W. (1998). Assessment of risk for severe hypoglycemia among adults with IDDM: validation of the low blood glucose index. *Diabetes Care* 21, 1870-1875.

Kovatchev, B.P., Otto, E., Cox, D., Gonder-Frederick, L., and Clarke, W. (2006). Evaluation of a new measure of blood glucose variability in diabetes. *Diabetes Care* 29, 2433-2438.

Krinsley, J.S., Egi, M., Kiss, A., Devendra, A.N., Schuetz, P., Maurer, P.M., Schultz, M.J., van Hooijdonk, R.T.M., Kiyoshi, M., Mackenzie, I.M.J., et al. (2013). Diabetic status and the relation of the three domains of glycemic control to mortality in critically ill patients: an international multicenter cohort study. *Crit. Care Lond. Engl.* 17, R37.

Krüger, M., Kratchmarova, I., Blagoev, B., Tseng, Y.-H., Kahn, C.R., and Mann, M. (2008). Dissection of the insulin signaling pathway via quantitative phosphoproteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2451-2456.

Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* 13.

Kushnareva, Y., and Newmeyer, D.D. (2010). Bioenergetics and cell death. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1201, 50-57.

Lachin, J.M., Bebu, I., Bergenstal, R.M., Pop-Busui, R., Service, F.J., Zinman, B., Nathan, D.M., and DCCT/EDIC Research Group (2017). Association of Glycemic Variability in Type 1 Diabetes With Progression of Microvascular Outcomes in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 40, 777-783.

Lan, M.S., Wasserfall, C., Maclaren, N.K., and Notkins, A.L. (1996). IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6367-6370.

Lemasters, J.J. (2005). Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Rejuvenation Res.* 8, 3-5.

Lind, M., Bounias, I., Olsson, M., Gudbjörnsdottir, S., Svensson, A.-M., and Rosengren, A. (2011). Glycaemic control and incidence of heart failure in 20,985 patients with type 1 diabetes: an observational study. *Lancet Lond. Engl.* 378, 140-146.

Maeda, M., Hayashi, T., Mizuno, N., Hattori, Y., and Kuzuya, M. (2015). Intermittent High Glucose Implements Stress-Induced Senescence in Human Vascular Endothelial Cells: Role of Superoxide Production by NADPH Oxidase. *PLOS ONE* 10, e0123169.

Malaguti, C., Guardia, P.G.L., Leite, A.C.R., Oliveira, D.N., Zollner, R.L. de L., Catharino, R.R., Vercesi, A.E., and Oliveira, H.C.F. (2014). Oxidative stress and susceptibility to mitochondrial permeability transition precedes the onset of diabetes in autoimmune non-obese diabetic mice. *Free Radic. Res.* 48, 1494-1504.

Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombès, A., and Rojo, M. (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep.* 6, 853-859.

Maréchal, A., Meunier, B., Lee, D., Orengo, C., and Rich, P.R. (2012). Yeast cytochrome c oxidase: A model system to study mitochondrial forms of the haem-copper oxidase superfamily. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 620-628.

Mariappan, M.M., Shetty, M., Sataranatarajan, K., Choudhury, G.G., and Kasinath, B.S. (2008). Glycogen Synthase Kinase 3 β Is a Novel Regulator of High Glucose- and High Insulin-induced Extracellular Matrix Protein Synthesis in Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 283, 30566-30575.

McDonnell, C. m., Donath, S. m., Vidmar, S. i., Werther, G. a., and Cameron, F. j. (2005). A Novel Approach to Continuous Glucose Analysis Utilizing Glycemic Variation. *Diabetes Technol. Ther.* 7, 253-263.

McGinn, S., Saad, S., Poronnik, P., and Pollock, C.A. (2003). High glucose-mediated effects on endothelial cell proliferation occur via p38 MAP kinase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E708-717.

Medja, F., Allouche, S., Frachon, P., Jardel, C., Malgat, M., Mousson de Camaret, B., Slama, A., Lunardi, J., Mazat, J.P., and Lombès, A. (2009). Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* 9, 331-339.

Meeusen, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305, 1747-1752.

Meunier, B., Fisher, N., Ransac, S., Mazat, J.-P., and Brasseur, G. (2013). Respiratory complex III dysfunction in humans and the use of yeast as a model organism to study mitochondrial myopathy and associated diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1827, 1346-1361.

Miki, T., Yuda, S., Kouzu, H., and Miura, T. (2013). Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. *Heart Fail. Rev.* 18, 149-166.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.

Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G., and Lippincott-Schwartz, J. (2009). A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 11960-11965.

Mokdad, A.H., Ford, E.S., Bowman, B.A., Nelson, D.E., Engelgau, M.M., Vinicor, F., and Marks, J.S. (2000). Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998. *Diabetes Care* *23*, 1278-1283.

Molnar, G.D., Taylor, W.F., and Ho, M.M. (1972). Day-to-day variation of continuously monitored glycaemia: A further measure of diabetic instability. *Diabetologia* *8*, 342-348.

Monnier, L., Mas, E., Ginet, C., Michel, F., Villon, L., Cristol, J.-P., and Colette, C. (2006). Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* *295*, 1681-1687.

Monnier, L., Colette, C., Wojtusciszyn, A., Dejager, S., Renard, E., Molinari, N., and Owens, D.R. (2016). Toward Defining the Threshold Between Low and High Glucose Variability in Diabetes. *Diabetes Care* *dc161769*.

Montaigne, D., Marechal, X., Coisne, A., Debry, N., Modine, T., Fayad, G., Potelle, C., El Arid, J.-M., Mouton, S., Sebti, Y., et al. (2014). Myocardial contractile dysfunction is associated with impaired mitochondrial function and dynamics in type 2 diabetic but not in obese patients. *Circulation* *130*, 554-564.

Nakamura, N., Kimura, Y., Tokuda, M., Honda, S., and Hirose, S. (2006). MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep.* *7*, 1019-1022.

Nathan, D.M., and Group, for the D.R. (2014). The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study at 30 Years: Overview. *Diabetes Care* *37*, 9-16.

Nejentsev, S., Sjöroos, M., Soukka, T., Knip, M., Simell, O., Lövgren, T., and Ilonen, J. (1999). Population-based genetic screening for the estimation of Type 1 diabetes mellitus risk in Finland: selective genotyping of markers in the HLA-DQB1, HLA-DQA1 and HLA-DRB1 loci. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* *16*, 985-992.

Nerup, J., Platz, P., Andersen, O.O., Christy, M., E, J.L. *ø*, Poulsen, J.E., Ryder, L.P., Thomsen, M., Nielsen, L.S., and Svejgaard, A. (1974). HL-A ANTIGENS AND DIABETES MELLITUS. *The Lancet* *304*, 864-866.

Nordwall, M., Abrahamsson, M., Dhir, M., Fredrikson, M., Ludvigsson, J., and Arnqvist, H.J. (2015). Impact of HbA1c, followed from onset of type 1 diabetes, on the development of severe retinopathy and nephropathy: the VISS Study (Vascular Diabetic Complications in Southeast Sweden). *Diabetes Care* *38*, 308-315.

Norhammar, A., Lindbäck, J., Rydén, L., Wallentin, L., and Stenestrand, U. (2007). Improved but still high short- and long-term mortality rates after myocardial infarction in patients with diabetes mellitus: a time-trend report from the Swedish

Register of Information and Knowledge about Swedish Heart Intensive Care Admission. *Heart* 93, 1577-1583.

Oliveira, P.J., Seica, R., Coxito, P.M., Rolo, A.P., Palmeira, C.M., Santos, M.S., and Moreno, A.J.M. (2003). Enhanced permeability transition explains the reduced calcium uptake in cardiac mitochondria from streptozotocin-induced diabetic rats. *FEBS Lett.* 554, 511-514.

Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., and Mihara, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 191, 1141-1158.

Palmer, J.P., Asplin, C.M., Clemons, P., Lyen, K., Tatpati, O., Raghu, P.K., and Paquette, T.L. (1983). Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 222, 1337-1339.

Petronilli, V., Miotto, G., Canton, M., Brini, M., Colonna, R., Bernardi, P., and Di Lisa, F. (1999). Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys. J.* 76, 725-734.

Piconi, L., Quagliari, L., Da Ros, R., Assaloni, R., Giugliano, D., Esposito, K., Szabó, C., and Ceriello, A. (2004). Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and interleukin-6 expression in human umbilical endothelial cells in culture: the role of poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Thromb. Haemost. JTH* 2, 1453-1459.

Piconi, L., Quagliari, L., Assaloni, R., Da Ros, R., Maier, A., Zuodar, G., and Ceriello, A. (2006). Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 22, 198-203.

Popov, D., Nemezc, M., Dumitrescu, M., Georgescu, A., and Böhmer, F.D. (2009). Long-term high glucose concentration influences Akt, ERK1/2, and PTP1B protein expression in human aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 51-55.

Qian, W., Choi, S., Gibson, G.A., Watkins, S.C., Bakkenist, C.J., and Houten, B.V. (2012). Mitochondrial hyperfusion induced by loss of the fission protein Drp1 causes ATM-dependent G2/M arrest and aneuploidy through DNA replication stress. *J Cell Sci* 125, 5745-5757.

Quagliari, L., Piconi, L., Assaloni, R., Martinelli, L., Motz, E., and Ceriello, A. (2003). Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation. *Diabetes* 52, 2795-2804.

Quagliari, L., Piconi, L., Assaloni, R., Da Ros, R., Maier, A., Zuodar, G., and Ceriello, A. (2005). Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct

role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production. *Atherosclerosis* 183, 259-267.

Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., de Assis, A.M., Gonçalves, C.-A., and Souza, D.O. (2017). Fluctuations in glucose levels induce glial toxicity with glutamatergic, oxidative and inflammatory implications. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1-14.

Raman, R., Gupta, A., Krishna, S., Kulothungan, V., and Sharma, T. (2012). Prevalence and risk factors for diabetic microvascular complications in newly diagnosed type II diabetes mellitus. Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology And Molecular Genetic Study (SN-DREAMS, report 27). *J. Diabetes Complications* 26, 123-128.

Rasola, A., and Bernardi, P. (2011). Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* 50, 222-233.

Ravona-Springer, R., Heymann, A., Schmeidler, J., Moshier, E., Guerrero-Berroa, E., Soleimani, L., Sano, M., Leroith, D., Preiss, R., Tzukran, R., et al. (2017). Hemoglobin A1c Variability Predicts Symptoms of Depression in Elderly Individuals With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*.

Rewers, M., Bugawan, T.L., Norris, J.M., Blair, A., Beaty, B., Hoffman, M., McDuffie, R.S., Hamman, R.F., Klingensmith, G., Eisenbarth, G.S., et al. (1996). Newborn screening for HLA markers associated with IDDM: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *Diabetologia* 39, 807-812.

Rhee, S.G. (1999). Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.* 31, 53-59.

Risso, A., Mercuri, F., Quagliaro, L., Damante, G., and Ceriello, A. (2001). Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E924-930.

Robador, P.A., San José, G., Rodríguez, C., Guadall, A., Moreno, M.U., Beaumont, J., Fortuño, A., Díez, J., Martínez-González, J., and Zalba, G. (2011). HIF-1-mediated up-regulation of cardioprotectin-1 is involved in the survival response of cardiomyocytes to hypoxia. *Cardiovasc. Res.* 92, 247-255.

Rogers, S.C., Zhang, X., Azhar, G., Luo, S., and Wei, J.Y. (2013). Exposure to high or low glucose levels accelerates the appearance of markers of endothelial cell senescence and induces dysregulation of nitric oxide synthase. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 68, 1469-1481.

Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rötig, A., Saudubray, J.M., and Munnich, A. (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* 228, 35-51.

Ryan, E.A., Shandro, T., Green, K., Paty, B.W., Senior, P.A., Bigam, D., Shapiro, A.M.J., and Vantyghem, M.-C. (2004). Assessment of the Severity of

Hypoglycemia and Glycemic Lability in Type 1 Diabetic Subjects Undergoing Islet Transplantation. *Diabetes* 53, 955-962.

Schlichtkrull, J., Munck, O., and Jersild, M. (1965). The M-Value, an Index of Blood-sugar Control in Diabetics. *Acta Med. Scand.* 177, 95-102.

Seaquist, E.R., Anderson, J., Childs, B., Cryer, P., Dagogo-Jack, S., Fish, L., Heller, S.R., Rodriguez, H., Rosenzweig, J., and Vigersky, R. (2013). Hypoglycemia and Diabetes: A Report of a Workgroup of the American Diabetes Association and The Endocrine Society. *Diabetes Care* 36, 1384-1395.

Selvin, E., Marinopoulos, S., Berkenblit, G., Rami, T., Brancati, F.L., Powe, N.R., and Golden, S.H. (2004). Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 141, 421-431.

Serrano-Rios, M., Goday, A., and Martínez Larrad, T. (1999). Migrant populations and the incidence of type 1 diabetes mellitus: an overview of the literature with a focus on the Spanish-heritage countries in Latin America. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 15, 113-132.

Service, F.J., Molnar, G.D., Rosevear, J.W., Ackerman, E., Gatewood, L.C., and Taylor, W.F. (1970). Mean Amplitude of Glycemic Excursions, a Measure of Diabetic Instability. *Diabetes* 19, 644-655.

Shah, A.D., Langenberg, C., Rapsomaniki, E., Denaxas, S., Pujades-Rodriguez, M., Gale, C.P., Deanfield, J., Smeeth, L., Timmis, A., and Hemingway, H. (2015). Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1.9 million people. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 3, 105-113.

Siegelaar, S.E., Kerr, L., Jacober, S.J., and Devries, J.H. (2011a). A decrease in glucose variability does not reduce cardiovascular event rates in type 2 diabetic patients after acute myocardial infarction: a reanalysis of the HEART2D study. *Diabetes Care* 34, 855-857.

Siegelaar, S.E., Barwari, T., Kulik, W., Hoekstra, J.B., and DeVries, J.H. (2011b). No relevant relationship between glucose variability and oxidative stress in well-regulated type 2 diabetes patients. *J. Diabetes Sci. Technol.* 5, 86-92.

Stevens, R.J., Coleman, R.L., Adler, A.I., Stratton, I.M., Matthews, D.R., and Holman, R.R. (2004). Risk Factors for Myocardial Infarction Case Fatality and Stroke Case Fatality in Type 2 Diabetes: UKPDS 66. *Diabetes Care* 27, 201-207.

Stratton, I.M., Adler, A.I., Neil, H.A., Matthews, D.R., Manley, S.E., Cull, C.A., Hadden, D., Turner, R.C., and Holman, R.R. (2000). Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 321, 405-412.

Suen, D.-F., Norris, K.L., and Youle, R.J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* 22, 1577-1590.

Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., and Rao, Z. (2005). Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. *Cell* 121, 1043-1057.

Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., and Mihara, K. (2007). Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* 282, 11521-11529.

Takao, T., Ide, T., Yanagisawa, H., Kikuchi, M., Kawazu, S., and Matsuyama, Y. (2010). The effect of fasting plasma glucose variability on the risk of retinopathy in type 2 diabetic patients: retrospective long-term follow-up. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 89, 296-302.

Tao, S., Ren, Y., Zheng, H., Zhao, M., Zhang, X., Zhu, Y., Yang, J., and Zheng, S. (2017). Salvianolic acid B inhibits intermittent high glucose-induced INS-1 cell apoptosis through regulation of Bcl-2 proteins and mitochondrial membrane potential. *Eur. J. Pharmacol.* 814, 56-62.

Taskinen, M.-R., and Borén, J. (2015). New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 239, 483-495.

TEDDY Study Group (2007). The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) study: study design. *Pediatr. Diabetes* 8, 286-298.

The Emerging Risk Factors Collaboration (2010). Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* 375, 2215-2222.

Tormos, K.V., and Chandel, N.S. (2010). Inter-connection between mitochondria and HIFs. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 795-804.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84.

Vantyghem, M.-C., Defrance, F., Quintin, D., Leroy, C., Raverdi, V., Prévost, G., Caiazzo, R., Kerr-Conte, J., Glowacki, F., Hazzan, M., et al. (2014). Treating diabetes with islet transplantation: Lessons from the past decade in Lille. *Diabetes Metab.* 40, 108-119.

Vasilakou, D., Karagiannis, T., Athanasiadou, E., Mainou, M., Liakos, A., Bekiari, E., Sarigianni, M., Matthews, D.R., and Tsapas, A. (2013). Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 159, 262-274.

Vigersky, R.A. (2015). The benefits, limitations, and cost-effectiveness of advanced technologies in the management of patients with diabetes mellitus. *J. Diabetes Sci. Technol.* 9, 320-330.

Vinothkumar, K.R., Zhu, J., and Hirst, J. (2014). Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature* 515, 80-84.

Virk, S.A., Donaghue, K.C., Cho, Y.H., Benitez-Aguirre, P., Hing, S., Pryke, A., Chan, A., and Craig, M.E. (2016). Association Between HbA1c Variability and Risk of Microvascular Complications in Adolescents With Type 1 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *101*, 3257-3263.

Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., and Reichert, A.S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* *175*, 237-247.

Walker, J.E. (2013). The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.* *41*, 1-16.

Wallace, D.C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* *283*, 1482-1488.

Wang, H., and Oster, G. (1998). Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature* *396*, 279-282.

Way, K.L., Hackett, D.A., Baker, M.K., and Johnson, N.A. (2016). The Effect of Regular Exercise on Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diabetes Metab. J.* *40*, 253-271.

Wenger, R.H., Stiehl, D.P., and Camenisch, G. (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* *2005*, re12.

Wentholt, I.M.E., Kulik, W., Michels, R.P.J., Hoekstra, J.B.L., and DeVries, J.H. (2008). Glucose fluctuations and activation of oxidative stress in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* *51*, 183-190.

Wenzlau, J.M., Juhl, K., Yu, L., Moua, O., Sarkar, S.A., Gottlieb, P., Rewers, M., Eisenbarth, G.S., Jensen, J., Davidson, H.W., et al. (2007). The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 17040-17045.

White, S.M., Constantin, P.E., and Claycomb, W.C. (2004). Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *286*, H823-H829.

Williamson, C.L., Dabkowski, E.R., Baseler, W.A., Croston, T.L., Alway, S.E., and Hollander, J.M. (2010). Enhanced apoptotic propensity in diabetic cardiac mitochondria: influence of subcellular spatial location. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *298*, H633-H642.

Wong, B.W., Kuchnio, A., Bruning, U., and Carmeliet, P. (2013). Emerging novel functions of the oxygen-sensing prolyl hydroxylase domain enzymes. *Trends Biochem. Sci.* *38*, 3-11.

Wong, N.D., Zhao, Y., Patel, R., Patao, C., Malik, S., Bertoni, A.G., Correa, A., Folsom, A.R., Kachroo, S., Mukherjee, J., et al. (2016). Cardiovascular Risk

Factor Targets and Cardiovascular Disease Event Risk in Diabetes: A Pooling Project of the Atherosclerosis Risk in Communities Study, Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis, and Jackson Heart Study. *Diabetes Care* 39, 668-676.

Xu, W., Zhu, Y., Yang, X., Deng, H., Yan, J., Lin, S., Yang, H., Chen, H., and Weng, J. (2016). Glycemic variability is an important risk factor for cardiovascular autonomic neuropathy in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Int. J. Cardiol.* 215, 263-268.

Yoon, Y., Krueger, E.W., Oswald, B.J., and McNiven, M.A. (2003). The Mitochondrial Protein hFis1 Regulates Mitochondrial Fission in Mammalian Cells through an Interaction with the Dynamin-Like Protein DLP1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5409-5420.

Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47-59.

Ziegler, A.G., Hummel, M., Schenker, M., and Bonifacio, E. (1999). Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes* 48, 460-468.

Zoppini, G., Verlato, G., Targher, G., Casati, S., Gusson, E., Biasi, V., Perrone, F., Bonora, E., and Muggeo, M. (2009). Is fasting glucose variability a risk factor for retinopathy in people with type 2 diabetes? *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* 19, 334-339.

Annexes

Les annexes comprennent la liste des communications orales et affichées réalisées lors de ma thèse, ainsi que les articles acceptés, soumis ou en cours de ré-écriture et un curriculum vitae.

Liste des communications

Orale : Effects of glucose fluctuations on cellular and mitochondrial functions in HL-1 cardiac cell line. 9th annual meeting of D&CVD 2016, Paris.

Affichées sous forme de poster : - Mitochondrial dysfunctions upon glucose variability: an in vitro study on the HL-1 cardiac cell line. Congrès Meetochondrie 2017, Hossegor.

- Mitochondrial dysfunctions and signaling pathways upon glucose variability: an in vitro study on the HL-1 cardiac cell line. Printemps de la cardiologie 2017, Nantes.

- An in vitro model to study impact of glucose fluctuations on cellular and mitochondrial cardiac functions. Journées européennes de la Société Française de Cardiologie 2017, Paris.

- Impact des fluctuations en glucose sur les fonctions mitochondriales et cellulaires de cardiomyocytes. Journée de la recherche biomédicale normande 2016, Rouen.

- HL-1 cells : a cellular model to investigate cardioprotective mechanisms in ischemia/reperfusion context. Printemps de la cardiologie 2016, Dijon.

Liste des articles

Article accepté dans Biochemical and Biophysical Research Communications : Mordel, P., Schaeffer, S., Dupas, Q., Laville, M.-A., Gérard, M., Chapon, F., and Allouche, S. (2017). A 2 bp deletion in the mitochondrial ATP 6 gene responsible for the NARP (neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa) syndrome.

Article soumis à Diabetes & Metabolism : Glucose fluctuation promotes early mitochondrial dysfunctions in the cardiomyocyte cell line HL-1.

Article en ré-écriture : Time-course of simulated ischemia-induced cell death and mitochondrial dysfunctions in HL-1 and H9c2 cell lines.

**Article accepté pour publication dans Biochemical and Biophysical
Research Communications :**

Mordel, P., Schaeffer, S., Dupas, Q., Laville, M.-A., Gérard, M.,
Chapon, F., and Allouche, S. (2017). A 2 bp deletion in the
mitochondrial ATP 6 gene responsible for the NARP (neuropathy,
ataxia, and retinitis pigmentosa) syndrom.



A 2 bp deletion in the mitochondrial ATP 6 gene responsible for the NARP (neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa) syndrome

Patrick Mordel^a, Stéphane Schaeffer^b, Quentin Dupas^a, Marie-Alice Laville^c, Marion Gérard^d, Françoise Chapon^{b, e}, S. Allouche^{a, f, *}

^a Normandie Univ, UNICAEN, CHU Caen, Signalisation, électrophysiologie et imagerie des lésions d'ischémie-reperfusion myocardique, Caen, F-14032, France

^b CHU de Caen, Neuromuscular Competence Center, Caen, F-14032, France

^c CHU de Caen, Department of ophthalmology, Caen, F-14032, France

^d CHU de Caen, Department of medical genetics, Caen, F-14032, France

^e CHU de Caen, Department of Pathology, Caen, F-14032, France

^f CHU de Caen, Department of biochemistry, Caen, F-14032, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2017

Accepted 13 October 2017

Available online xxx

Keywords:

Mitochondrial disease
Complex V deficiency
Next generation sequencing
ATP6 deletion
NARP syndrome

ABSTRACT

Mitochondrial (mt) DNA-associated NARP (neurogenic muscle weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa) syndrome is due to mutation in the MT-ATP6 gene.

We report the case of a 18-year-old man who presented with deafness, a myoclonic epilepsy, muscle weakness since the age of 10 and further developed a retinitis pigmentosa and ataxia. The whole mtDNA analysis by next-generation sequencing revealed the presence of the 2 bp microdeletion m.9127–9128 del AT in the ATP6 gene at 82% heteroplasmy in muscle and to a lower load in blood (10–20%) and fibroblasts (50%). Using the patient's fibroblasts, we demonstrated a 60% reduction of the oligomycin-sensitive ATPase hydrolytic activity, a 40% decrease in the ATP synthesis and determination of the mitochondrial membrane potential using the fluorescent probe tetramethylrhodamine, ethyl ester indicated a significant reduction in oligomycin sensitivity.

In conclusion, we demonstrated that this novel AT deletion in the ATP6 gene is pathogenic and responsible for the NARP syndrome.

© 2017.

1. Introduction

The oxidative phosphorylation corresponds to the ATP synthesis from ADP and inorganic phosphorus (Pi) by the complex V or ATP synthase of the mitochondrial respiratory chain. The formation of a high-energy bond between the beta group of ADP and Pi is provided by the electrons transfer throughout the complexes I-IV to dioxygen which creates a proton motive force.

The mitochondrial ATP synthase is composed by two portions F₀ and F₁ that are connected by a peripheral stalk composed by subunits b, d, F6 and the oligomycin sensitivity-conferring protein [1]. The F₀ portion is embedded into the mitochondrial inner membrane and contains 8 c subunits, which form an oligomeric ring, associated with subunits a, A6L, b, e, f and g. The F₁ portion is composed of 3 subunits α , 3 subunits β , associated with subunits, δ , γ and ϵ . Upon protons translocation from the intermembrane space to the mitochondrial matrix due to the proton motive force, the rotor (c8 subunits, δ , γ and ϵ) moves and causes conformational changes of $\alpha\beta\beta_3$ hexamer where ATP synthesis occurs. Among all the proteins of the ATP synthase,

only two are encoded by the mitochondrial DNA (mtDNA): subunits a (ATP6 gene) and A6L (ATP8 gene) [2]. The assembly of the F₁F₀ ATP synthase is complex and requires auxiliary factors [3]. The F₀ portion is assembled independently of the F₁ portion that requires the chaperones ATP 11 and 12. The oligomerization of the c subunits to form the ring of the F₀ portion is probably an early step and involves several accessory factors including the ATP23 which cleaves the N-terminus region of the a subunit and causes interaction with the c ring. Then, the peripheral stalk enables stable interactions between the c ring and the F₁ portion. Subunits e and g are critical for the supramolecular organization of the ATP synthase into dimers/oligomers [4]; down-regulation of these subunits reduces both the ATP synthase activity and alters the organization of mitochondrial cristae and the network as observed in transmission electron microscopy. Those data indicate that this structural organization of the complex V has both a functional role and is involved in the mitochondrial dynamics.

Isolated complex V deficiency is a rare dysfunction of the respiratory chain [5] and is due to mutation either in the nuclear or the mitochondrial genomes. However, from a retrospective study, Honzik et al. showed that complex V deficiency represents about 25% of mitochondrial diseases with neonatal onset and mutation in the MT-ATP6 gene only 5% [6].

* Corresponding author. Department of biochemistry, CHU de Caen, Avenue de la côte de nacre, CS 30001, 14033 CAEN cedex 9, France.

Email address: allouche-s@chu-caen.fr (S. Allouche)

In complex V deficiencies, mutations in the mtDNA were the first to be reported and the most frequent is the m. 8993 T > C/G in the MT-ATP 6 gene that causes the Leigh or the NARP (neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa) syndrome (see www.mitomap.org [7]; [8]). Other mutations of the MT-ATP 6 have been described and were associated with encephalopathy [9], hypertrophic cardiomyopathy [10], motor development delay and lactic acidosis [11] with a neonatal or infancy onset. Recently, the m. 9185 T > C in the MT-ATP 6 gene was demonstrated to be responsible for more than 1% of genetically undefined cases of Charcot-Marie-Tooth type 2 [12]. A mutation in the other mitochondrial DNA-encoded gene MT-ATP 8 was shown to cause exercise intolerance, sensory and motor axonal neuropathy and cardiomyopathy [13].

In 1999, Houstek and collaborators suggested that a deficiency of the complex V found in liver and heart of a newborn should be due to an unidentified mutation in the nuclear genome [14]. Hitherto, pathogenic mutations in the nuclear genome-encoded genes ATP12 [15], ATP5E [16], TMEM70 [17] and ATP5A1 [18] were found responsible for complex V deficiency.

In the present study, we identified a novel mutation in the MT-ATP 6 gene in a 18-year-old man who presented symptoms compatible with the NARP syndrome. Functional experiments performed in the patient's fibroblasts demonstrated that this 2 bp deletion is pathogenic and responsible for a complex V deficiency.

2. Material and methods

2.1. Case report

The patient is the first child of healthy and non-consanguineous parents. The family history is unremarkable except a hearing loss in a grandmother and a cousin suggestive of maternal inheritance. At the age of 10 years, a bilateral hearing loss was diagnosed and one year later he received valproic acid for myoclonic epilepsy. At that time, he reported weakness and exercise intolerance with cramps. A cerebral magnetic resonance imaging showed cerebellar atrophy, bilateral and symmetric lesions of the basal ganglia and pituitary atrophy. Blood test revealed endocrine impairments with hypogonadism, hypothyroidism and adrenal insufficiency. A short stature was also observed. At the age of 22 years, he was hospitalized for vomiting, digestive distensions, epigastralgia and a loss of weight (8 kg). A gastroparesis was diagnosed which spontaneously resolved. On blood test, it was also noted a moderate hyperkalemia at 5.5 mM (N: 3.3–4.8 mM) with a normal glomerular filtration rate (glomerular filtration rate > 90 mL·min⁻¹·1.73 m⁻²) but a deficiency of renine and aldosterone. A strong proteinuria (3 g/L) was detected on several urine samples. As his mother reported visual difficulties under low light conditions, the patient had a close ophthalmological examination which revealed a reduced visual acuity, an optic atrophy and a "salt-and-pepper" retinopathy. He is now 24-year-old and still treated for epilepsy (perampanel and levetiracetam), he developed an unsteady walk and his main complaints are weakness and fatigue.

We ensure that the study was carried out with respect of ethical considerations and that patients gave their written consent for all analyses.

The patient underwent muscle and skin biopsies and blood sample.

2.2. Cell culture

Skin-derived fibroblast cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glu-

tamine, 0.2 mM uridine, 5 mM sodium pyruvate and 100 U/ml penicillin/streptomycin.

2.3. Molecular genetic analyses

Molecular studies were conducted on muscle, fibroblasts and blood of the patient as specified below. Analysis of the whole mtDNA genome was conducted as described previously [19]. Briefly, the gDNA was first amplified by long range PCR and libraries were prepared following the manufacturer's instructions (Ion Xpress plus Fragment Library Kit; Life Technologies) for 200 bp single-end reads. Amplifications were purified using NucleoMag[®] (Macherey-Nagel), and concentration and length were determined using a Qubit[™] (Invitrogen, Merelbeke, Belgium). After ligation of barcoded adaptors to amplicons, products were purified on E-gel (SizeSelect[™] agarose gel, Life Technologies). After an emulsion PCR followed by a purification step, pooled samples are loaded on an Ion 316 chip and sequenced on an Ion PGM system (Life Technologies). Data analysis was performed using Nextgene and Ion reporter and the NC_12920.1 as the mtDNA reference sequence.

Mutation was confirmed by bidirectional Sanger sequencing on a 3500 Genetic Analyzer sequencer using the BigDye[™] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem).

2.4. Complex V assay

Complex V and citrate synthase activity were measured on isolated mitochondria of fibroblasts as previously described [20] [21].

2.5. ATP measurement

ATP assay was conducted on fibroblasts. The ATP quantitation was determined using the ATP Determination Kit (A22066, Molecular Probes) according to the instructions of the manufacturer. Results are expressed in $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein after determination of protein concentration using the BCA protein assay.

2.6. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) assay

Determination of the mitochondrial membrane potential was conducted on fibroblasts. Twenty-four hours before the experiment, fibroblasts were seeded in 96-well black plate (Greiner bio-one) at a density of 10,000 cells per well. Before measurement, the culture media were removed and replaced by HBSS (Thermo Fischer), fibroblasts were incubated with 200 nM tetramethyl-rhodamine ethyl ester (TMRE) in the absence (control) or in the presence of 10 μM carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) or 10 μM oligomycin for 30 min at 37 °C. After three washes with HBSS, TMRE fluorescence was measured with a multilabel plate reader (VICTOR[™] X4) using excitation filter of 544 nm and emission filter of 572 nm. Results are normalized to fluorescence level obtained for each fibroblast in the presence of TMRE.

3. Results

First explorations were conducted on the muscle biopsy with biochemical (determination of all the respiratory chain complex activities except complex V), histological and histoenzymological analyses but we failed to detect any abnormality which could be suggestive of a mitochondrial disease: no enzymatic deficiency, no ragged-red or cytochrome *c* oxidase-negative fibers (data not shown). Then, the entire mtDNA was sequenced by NGS and we found a deletion of 2 bp

in the MT-ATP 6 gene (NC_012920.1: m.9127–9128 del AT) at 82% heteroplasmy level in the muscle. This mutation was confirmed by Sanger sequencing in blood and in fibroblasts of the patient at about 10 and 50% heteroplasmy load, respectively (Fig. 1).

Since this mutation has not been reported before, we undertook functional and biochemical studies on the fibroblasts of the patient to determine the consequences on mitochondria. First, we measured the oxygen consumption in the presence of different substrates (pyruvate, succinate and glutamate), but we failed to evidence any decrease of the mitochondrial respiratory rate compared to controls (data not shown). Second, mitochondria were isolated from the patient and control fibroblasts, then the activity of the complex V was measured spectrophotometrically. As shown in Fig. 2, the ratio complex V/citrate synthase (CS) was reduced by 60%. Third, we determined the ATP production and showed a decrease by 55% in the patient fibroblasts compared to controls (Fig. 3). In a last experiment, we measured the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) using the fluorescent probe TMRE in the presence of carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) or oligomycin. While CCCP greatly reduced the $\Delta\Psi$ by about 90% without significant difference between the patient fibroblasts and controls (data not shown), we could observe that oligomycin was significantly less potent to increase $\Delta\Psi$ in the patient compared to controls (114.5 ± 4.8 vs 129.9 ± 3.4) (Fig. 4).

4. Discussion

Our data strongly suggest that the novel mutation in the MT-ATP 6 gene is pathogenic for the following reasons:

- This AT deletion leads to a truncated protein at the C-terminus region (201 amino acids vs 226 for the wild type) with a premature stop codon: p. Ile201Pro fs X2.
- We found this deletion at different levels of heteroplasmy with the highest load in muscle biopsy; precisely, muscle weakness and exercise intolerance were the chief complaints of the patient.

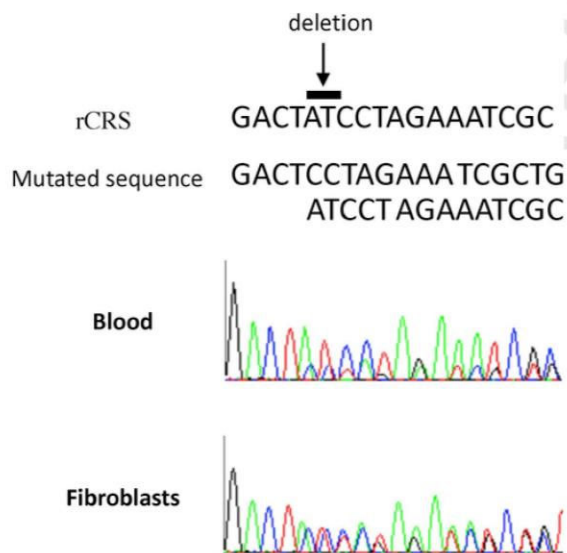


Fig. 1. Molecular analysis of blood and fibroblasts. Sanger sequencing showed a heteroplasmic AT deletion in the ATP6 gene at about 10–20% in blood and 50% in fibroblasts compared to the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS).

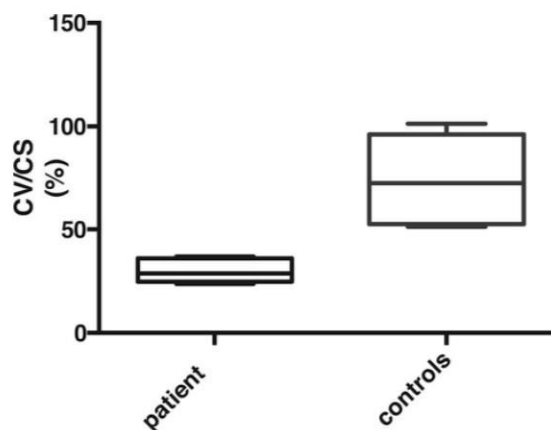


Fig. 2. Enzymatic analysis of complex V on mitochondria isolated from fibroblasts. The activities of the complex V (oligomycin-sensitive ATPase) (CV) and the citrate synthase (CS) were determined from patient fibroblasts ($n = 5$) and controls ($n = 6$). Data are the median, the 5th and the 95th percentile of the ratio CV/CS.

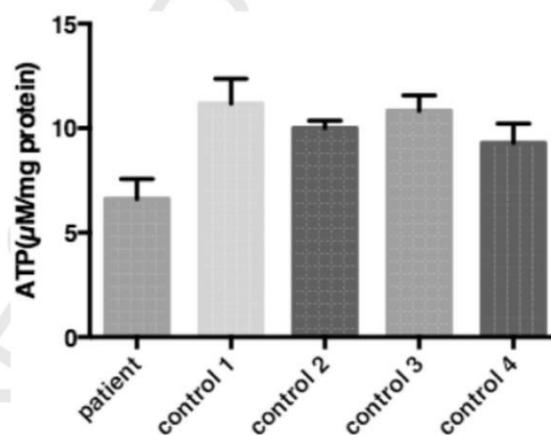


Fig. 3. Measurement of ATP production in fibroblasts. ATP production was determined by a bioluminescent assay in the patient fibroblasts and controls ($n = 4$). Data are the means \pm SD of 3 independent experiments performed in triplicate.

Both enzymatic assays of the complex V, ATP hydrolysis and ATP production performed on the patient fibroblasts showed a decrease by 55–60% compared to controls which is in good agreement with the heteroplasmy level of about 50% of the deletion that we observed. The absence of OXPHOS deficiency in polarographic recordings is not surprising since the mutation load is not high enough in fibroblasts to impair the coupling between electrons transfer and ATP synthesis. However, in spectrophotometric analyses, where maximal catalytic activities are obtained, the experimental conditions are quite different from polarographic study and from physiology in terms of pH, osmolarity, substrate concentrations, which allow detection of low enzymatic dysfunction.

From a model established by cryo-electronic microscopy of the bovine ATP synthase, the a subunit appears to consist in 6 alpha helix including the C-terminus tail on the matrix side [1]. Furthermore, this model predicts that the 6th alpha helix (residues 194–223) of the a subunit interacts with a portion of the helix 2 of the c8-ring including

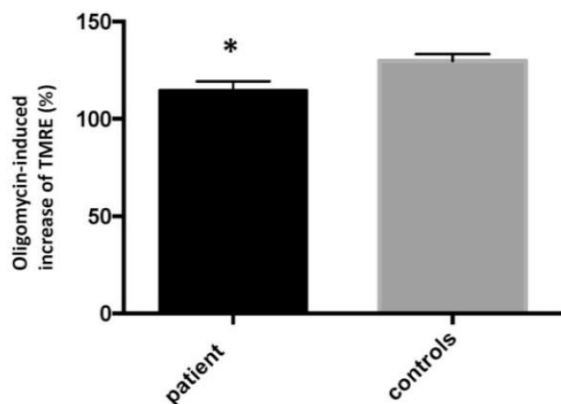


Fig. 4. Oligomycin induced an increase in the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$). The $\Delta\Psi$ was determined by the fluorescent probe TMRE in the patient fibroblasts and controls (n = 5) under oligomycin stimulation. Data are the means \pm SD of 3 independent experiments performed in triplicate. *, p < 0.05 unpaired t-test.

the conserved Glu58 which plays a crucial role in the proton translocation and the movement of the rotor. Cryomicroscopy experiments performed from mitochondria isolated from the alga *Polytomella* Sp. [22], from the yeast *Yarrowia lipolytica* [23] or from *E. Coli* [24] suggested the existence of two half channels at the interface of a and c subunits that would conduct protons from the intermembrane space to matrix. Conserved polar and charged amino acids located in the helices 3, 5 and 6 would enable proton entrance through Fo ATP synthase to a conserved glutamic acid (E59) of the c-ring. It's noteworthy that the E229 (E202 in *Homo Sapiens*) and Q236 (Q210 in *Homo sapiens*) residues of the a subunit plays a role in proton translocation [23]. Once protonated, the c subunit of the c-ring moves in a counter-clockwise (view from the matrix side). The second half channel, involving the hydrophilic domain of the carboxy-terminal region of the a subunit, enables the proton to move from the cE59 to the matrix. So from those models, the deletion of the last 25 amino acids of the carboxy-terminal region of the a subunit is expected to impair proton translocation and consequently ATP synthesis.

We also evaluated the ability of oligomycin, an antibiotic known to inhibit the proton translocation by interacting with the carboxyl group of the cE59 [25], to increase the $\Delta\Psi$ using TMRE. In the patient fibroblasts, we showed that oligomycin was less efficient to increase the $\Delta\Psi$ compared to controls. Similar conclusions were reported by Kucharczyk and collaborators when analysing the consequences of the human m. 9176 T > C mutation (p. Leu217Pro) in a yeast model [26]. Our results are in good agreement with data obtained in *Saccharomyces cerevisiae* where oligomycin resistance was due to mutations in the two last membrane-spanning domains (C-terminus) of the ATP 6 gene (corresponding to the a subunit for mammalian) [27].

To the best of our knowledge, the only study reporting a short deletion in the MT-ATP 6 gene was published by Jesina et al. who observed a 2 bp deletion at the junction of MT-ATP 6 and MT-COX III genes [28]. This deletion affects the stop codon of the ATP 6 gene and produces a profound deficiency in COX with normal ATP synthase activity in fibroblasts containing a high mutational load (>98%). The phenotype associated with this deletion was rather a Leigh syndrome with an infant onset. The 8618–8619 Ins T in the MT-ATP 6 gene was reported to cause a truncated a subunit (63 amino acids vs 226 and a different sequence from amino acid 32 to 63 compared to wild type sequence) [29] as reported by our study and

was demonstrated to cause a NARP syndrome. In a recent study, the different mutations published and reported in the MT-ATP 6 gene were summarized [30]; the phenotypic spectrum of these mutations included the NARP syndrome, the Leigh syndrome, bilateral striatal necrosis, infantile cardiomyopathy, adult-onset spinocerebellar ataxia, Leber hereditary optic neuropathy and Charcot-Marie-Tooth neuropathy. From the structure dimeric F₁F₀ ATP synthase of the yeast and the sequence alignment [23], the reported mutations of the MT-ATP 6 are located in the N-terminal tail, the predicted helices 4, 5 and 6. The N terminal region is in the intermembrane space, while the residues in the predicted helices 4 to 6 both participate in the secondary structure of the a subunit and in the interaction with the c-ring [1]. Collectively, these data suggest that region spanning from helices 4 to 6 is critical for the function of ATP synthase and mutations in those regions would cause enzyme impairment and mitochondrial diseases. Our patient fulfills some criteria for the NARP syndrome (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1173/>): the first symptoms began in childhood, he presented muscle weakness, ataxia and pigmentary retinopathy. It's noteworthy that electromyography (EMG) test didn't evidence peripheral neuropathy but such result was previously reported in patients harbouring the m. 8993 T > G mutation [31]. Lastly, learning difficulties were also noted in our patient.

In conclusion, we identified a novel pathogenic mutation in the MT-ATP 6 gene that is responsible for a truncated a subunit and the NARP syndrome. This is probably a de novo mtDNA mutation, as described for the m.8611_8612 InsC in the MT-ATP 6 [11], since genetic analysis performed in the mother's patient in different tissues (blood, buccal and uroepithelial cells) failed to detect this deletion in Sanger sequencing.

Acknowledgements

The authors thank Ms Besnard-Degand, Cacheux, Haubois and Lohier for their helpful technical assistance polarographic studies.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.066>.

References

- [1] A. Zhou, A. Rohou, D.G. Schep, J.V. Bason, M.G. Montgomery, J.E. Walker, N. Grigorieff, J.L. Rubinstein, Structure and conformational states of the bovine mitochondrial ATP synthase by cryo-EM, *Elife* 4 (2015), e10180.
- [2] S. Anderson, A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H. de Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J. Smith, R. Staden, I.G. Young, Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature* 290 (1981) 457–465.
- [3] T. Rühle, D. Leister, Assembly of F1F0-ATP synthases, *Biochim. Biophys. Acta* 1847 (2015) 849–860.
- [4] J. Habersetzer, I. Larricu, M. Priault, B. Salin, R. Rossignol, D. Brethes, P. Pau-mard, Human F1F0 ATP synthase, mitochondrial ultrastructure and OXPHOS impairment: a (super-)complex matter?, *PLoS One* 8 (2013), e75429.
- [5] R.J. Rodenburg, Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders, *J. Inherit. Metab. Dis.* 34 (2011) 283–292.
- [6] T. Honzik, M. Tesarova, M. Magner, J. Mayr, P. Jesina, K. Vesela, L. Wenchik, K. Szentivanyi, H. Hansikova, W. Sperl, J. Zeman, Neonatal onset of mitochondrial disorders in 129 patients: clinical and laboratory characteristics and a new approach to diagnosis, *J. Inherit. Metab. Dis.* 35 (2012) 749–759.
- [7] B. Parfait, P. de Lonlay, J.C. von Kleist-Retzow, V. Cormier-Daire, D. Chretien, A. Rotig, D. Rabier, J.M. Saudubray, P. Rustin, A. Munnich, The neurogenic weakness, ataxia and retinitis pigmentosa (NARP) syndrome mtDNA mutation (T8993G) triggers muscle ATPase deficiency and hypocitrullinaemia, *Eur. J. Pediatr.* 158 (1999) 55–58.
- [8] E. Morava, R.J. Rodenburg, F. Hol, M. de Vries, A. Janssen, L. van den Heuvel, L. Nijtmans, J. Smeitink, Clinical and biochemical characteristics in patients

- with a high mutant load of the mitochondrial T8993G/C mutations, *Am. J. Med. Genet. A* 140 (2006) 863–868.
- [9] X. Hao, S. Liu, X. Wu, Y. Hao, Y. Chen, Infantile mitochondrial disorder associated with subclinical hypothyroidism is caused by a rare mitochondrial DNA 8691A>G mutation: a case report, *Neuroreport* 26 (2015) 588–592.
- [10] A. Imai, S. Fujita, Y. Kishita, M. Kohda, Y. Tokuzawa, T. Hirata, Y. Mizuno, H. Harashima, A. Nakaya, Y. Sakata, A. Takeda, M. Mori, K. Murayama, A. Ohtake, Y. Okazaki, Rapidly progressive infantile cardiomyopathy with mitochondrial respiratory chain complex V deficiency due to loss of ATPase 6 and 8 protein, *Int. J. Cardiol.* 207 (2016) 203–205.
- [11] C.B. Jackson, D. Hahn, B. Schroter, U. Richter, B.J. Battersby, T. Schmitt-Mechelke, P. Martinen, J.M. Nuoffer, A. Schaller, A novel mitochondrial ATP6 frameshift mutation causing isolated complex V deficiency, ataxia and encephalomyopathy, *Eur. J. Med. Genet.* 60 (2017) 345–351.
- [12] R.D. Pitceathly, S.M. Murphy, E. Cottenie, A. Chalasani, M.G. Sweney, C. Woodward, E.E. Mudanohwo, I. Hargreaves, S. Heales, J. Land, J.L. Holton, H. Houlden, J. Blake, M. Champion, F. Flinter, S.A. Robb, R. Page, M. Rose, J. Palacc, C. Crowe, C. Longman, M.P. Lunn, S. Rahman, M.M. Reilly, M.G. Hanna, Genetic dysfunction of MT-ATP6 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease, *Neurology* 79 (2012) 1145–1154.
- [13] A.J. Jonckheere, M. Hogeveen, L.G. Nijtmans, M.A. van den Brand, A.J. Janssen, J.H. Diepstra, F.C. van den Brandt, L.P. van den Heuvel, F.A. Hol, T.G. Hofste, L. Kapusta, U. Dillmann, M.G. Shamdeen, J.A. Smeitink, R.J. Rodenburg, A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hyper-trophic cardiomyopathy and neuropathy, *J. Med. Genet.* 45 (2008) 129–133.
- [14] J. Houstek, P. Klement, D. Floryk, H. Antonicka, J. Hermanska, M. Kalous, H. Hansikova, H. Houtkova, S.K. Chowdhury, T. Rosipal, S. Kmoch, L. Stratilova, J. Zeman, A novel deficiency of mitochondrial ATPase of nuclear origin, *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999) 1967–1974.
- [15] L. De Meirleir, S. Seneca, W. Lissens, I. De Clercq, F. Eyskens, E. Gerlo, J. Smet, R. Van Coster, Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12, *J. Med. Genet.* 41 (2004) 120–124.
- [16] J.A. Mayr, V. Havlickova, F. Zimmermann, I. Magler, V. Kaplanova, P. Jesina, A. Pecinova, H. Nuskova, J. Koch, W. Sperl, J. Houstek, Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 epsilon subunit, *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) 3430–3439.
- [17] J.M. Cameron, V. Levandovskiy, N. Mackay, C. Ackerley, D. Chitayat, J. Raiman, W.H. Halliday, A. Schulze, B.H. Robinson, Complex V TMEM70 deficiency results in mitochondrial nucleoid disorganization, *Mitochondrion* 11 (2011) 191–199.
- [18] A.J. Jonckheere, G.H. Renkema, M. Bras, L.P. van den Heuvel, A. Hoischen, C. Gilissen, S.B. Nabuurs, M.A. Huynen, M.C. de Vries, J.A. Smeitink, R.J. Rodenburg, A complex V ATP5A1 defect causes fatal neonatal mitochondrial encephalopathy, *Brain* 136 (2013) 1544–1554.
- [19] S. Seneca, K. Vancampenhout, R. Van Coster, J. Smet, W. Lissens, A. Vanlander, B. De Paep, A. Jonckheere, K. Stouffs, L. De Meirleir, Analysis of the whole mitochondrial genome: translation of the Ion Torrent Personal Genome Machine system to the diagnostic bench?, *Eur. J. Hum. Genet.* 23 (2015) 41–48.
- [20] P. Rustin, D. Chretien, T. Bourgeron, B. Gerard, A. Rotig, J.M. Saudubray, A. Munnich, Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies, *Clin. Chim. Acta* 228 (1994) 35–51.
- [21] F. Medja, S. Allouche, P. Frachon, C. Jardel, M. Malgat, B. Mousson de Camaret, A. Slama, J. Lunardi, J.P. Mazat, A. Lombes, Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis, *Mitochondrion* 9 (2009) 331–339.
- [22] M. Allegretti, N. Klusch, D.J. Mills, J. Vonck, W. Kuhlbrandt, K.M. Davies, Horizontal membrane-intrinsic alpha-helices in the stator a-subunit of an F-type ATP synthase, *Nature* 521 (2015) 237–240.
- [23] A. Hahn, K. Parey, M. Bublit, D.J. Mills, V. Zickermann, J. Vonck, W. Kuhlbrandt, T. Meier, Structure of a complete ATP synthase dimer reveals the molecular basis of inner mitochondrial membrane morphology, *Mol. Cell* 63 (2016) 445–456.
- [24] J. Martin, J. Hudson, T. Hornung, W.D. Frasch, Fo-driven rotation in the ATP synthase direction against the force of F1 ATPase in the FoF1 ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 10717–10728.
- [25] J. Symersky, D. Osowski, D.E. Walters, D.M. Mueller, Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109 (2012) 13961–13965.
- [26] R. Kucharczyk, N. Ezkurdia, E. Couplan, V. Procaccio, S.H. Ackerman, M. Blondel, J.P. di Rago, Consequences of the pathogenic T9176C mutation of human mitochondrial DNA on yeast mitochondrial ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 1105–1112.
- [27] U.P. John, P. Nagley, Amino acid substitutions in mitochondrial ATPase subunit 6 of *Saccharomyces cerevisiae* leading to oligomycin resistance, *FEBS Lett.* 207 (1986) 79–83.
- [28] P. Jesina, M. Tesarova, D. Formuskova, A. Vojtiskova, P. Pecina, V. Kaplanova, H. Hansikova, J. Zeman, J. Houstek, Diminished synthesis of subunit a (ATP6) and altered function of ATP synthase and cytochrome c oxidase due to the mtDNA 2 bp microdeletion of TA at positions 9205 and 9206, *Biochem. J.* 383 (2004) 561–571.
- [29] E. Lopez-Gallardo, A. Solano, M.D. Herrero-Martin, I. Martinez-Romero, M.D. Castano-Perez, A.L. Andreu, A. Herrera, M.J. Lopez-Perez, E. Ruiz-Pesini, J. Montoya, NARP syndrome in a patient harbouring an insertion in the MT-ATP6 gene that results in a truncated protein, *J. Med. Genet.* 46 (2009) 64–67.
- [30] E. Lopez-Gallardo, S. Emperador, A. Solano, L. Llobet, A. Martin-Navarro, M.J. Lopez-Perez, P. Briones, M. Pineda, R. Artuch, E. Barraquer, I. Jerico, E. Ruiz-Pesini, J. Montoya, Expanding the clinical phenotypes of MT-ATP6 mutations, *Hum. Mol. Genet.* 23 (2014) 6191–6200.
- [31] G. Ziel, I. oroni, E. amantea, G.M. ratta, E. iceri, F. arrara, M. cviani, Itochondrial disease associated with the T8993G mutation of the mitochondrial ATPase 6 gene: a clinical, biochemical, and molecular study in six families, *Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 3 6–22.

Article soumis à Diabetes & Metabolism :

Glucose fluctuation promotes early mitochondrial dysfunctions in the cardiomyocyte cell line HL-1.

Cover letter

Caen, France 12/10/17

Dear Pr F. Bonnet,

Please find enclosed our manuscript entitled “Glucose fluctuation promotes early mitochondrial dysfunctions in the cardiomyocyte cell line HL-1” by Mordel and collaborators.

In our paper, we investigated the impact of glucose fluctuation on cellular signaling pathways and on mitochondrial functions using the cardiac cell line HL-1. Glucose variability is a recent concept that was suggested to cause deleterious effects on the myocardium of diabetic patients, in different settings.

To answer to this question, HL-1 cells were exposed to low (LG, 2 mmol/l), normal (NG, 5 mmol/l), high (HG, 25 mmol/l) and intermittent high glucose (IHG, swing between low and high, every 2h) during 12h and we studied signaling pathways and different mitochondrial functions (mitochondrial respiration, ATP production, superoxide anions production, oxidative stress, mitochondrial membrane potential and the opening of the mitochondrial permeability transition pore). We also examined whether glucose variability would be deleterious upon a simulated hypoxia.

Our results indicated that glucose fluctuation promoted early mitochondrial dysfunctions revealed by an increase of superoxide anions production and the mitochondrial membrane potential. Furthermore, we demonstrated that glucose fluctuation also increased susceptibility to hypoxia-induced cellular injuries, suggesting a deleterious role of glucose fluctuations in diabetic patients.

To the best of our knowledge, our study is the first that examined and demonstrated impact of glucose fluctuation on a cardiac cell line, and more specifically on mitochondrial functions. We are convinced that our original study fits with the topics of your journal, which publishes high impact articles in the field of diabetes.

We confirm that this manuscript has not been published elsewhere and is not under consideration by any other journal. All of the authors agree with submission to Diabetes and Metabolism and have no conflicts of interest to declare.

Looking forward to reading your response.

Yours sincerely,

Pr Stéphane Allouche

Manuscript Number:

Title: Glucose fluctuation promotes early mitochondrial dysfunctions in the cardiomyocyte cell line HL-1

Article Type: Original Article

Keywords: mitochondria; glucose fluctuation; HL-1 cardiomyocyte cell line; superoxide anion; Oxidative phosphorylation; Hypoxia.

Corresponding Author: Professor stephane Allouche, Ph.D., M.D.

Corresponding Author's Institution: Université de Caen

First Author: Patrick Mordel, PhD

Order of Authors: Patrick Mordel, PhD; Quentin Dupas; Michael Joubert, MD, PhD; stephane Allouche, Ph.D., M.D.

Manuscript Region of Origin: FRANCE

Abstract: Aims: Diabetes is associated with an elevated risk of cardiovascular disease but the precise role of glucose toxicity on the cardiomyocyte remains elusive. The aim of the study was to evaluate the impact of glucose fluctuations on cellular pathways and mitochondrial functions in the cardiomyocyte cell line HL-1.

Methods: HL-1 cells were exposed to low (LG, 2 mmol/l), normal (NG, 5 mmol/l), high (HG, 25 mmol/l) and intermittent high glucose (IHG, swing between low and high, every 2h) during 12h. Signaling pathways were studied by western-blot, mitochondrial respiration was evaluated by polarography, mitochondrial complex activities by spectrophotometry, ATP production by luminescence. Superoxide anions, mitochondrial membrane potential and the opening of the mitochondrial permeability transition pore were analyzed using fluorescent probes. Oxidative stress was studied using oxyblot protein oxidation detection kit. Cellular lesions induced by hypoxia were measured by LDH release.

Results: Only HG increased the glycogen synthase kinase 3 β activity without any effect on the other signaling pathways studied (mitogen-activated protein kinases, Akt, or autophagy). While HG or IHG promoted neither modification in the activity of the oxidative phosphorylation nor in the ATP production, we observed an increase in the mitochondrial membrane potential and in the basal and antimycin A-stimulated superoxide anion production upon IHG. Furthermore, IHG treatment potentiated lesions induced by 36h hypoxia.

Conclusion/interpretation: Our results demonstrated that exposure of HL-1 cells to glucose fluctuation promoted early mitochondrial dysfunctions and increased susceptibility to hypoxia-induced cellular injuries, suggesting a deleterious role of glucose fluctuations in diabetic patients.

Suggested Reviewers: Louis Monnier

nstitute of Clinical Research , University of Montpellier, Montpellier,
France

louis.monnier@inserm.fr

He published numerous papers about glucose variability

Paul Valensi

Department of Endocrinology-Diabetology-Nutrition, AP-HP, Jean Verdier
Hospital, Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité

paul.valensi@jvr.aphp.fr

Pr Valensi published numerous works on diabetes

Antonio Ceriello

Department of Cardiovascular and Metabolic Diseases, IRCCS Multimedica,
Sesto San Giovanni, Milan, Italy.

aceriell@clinic.ub.es

Prof. Antonio Ceriello is a specialist in diabetes and published original
works and reviews on glucose variability

Opposed Reviewers:

Title: Glucose fluctuation promotes early mitochondrial dysfunctions in the cardiomyocyte cell line HL-1

Authors: Patrick Mordel¹, Quentin Dupas¹, Michael Joubert^{1,3}, Stéphane Allouche^{1,2}

Institutions: ¹ Normandie Univ, UNICAEN, CHU Caen, Signalisation, électrophysiologie et imagerie des lésions d'ischémie-reperfusion myocardique, Caen, F-14032, France.

² CHU de Caen, Department of biochemistry, Caen, F-14032, France.

³ CHU de Caen, Diabetes care unit, Caen, F-14032, France.

Corresponding author: Pr. Stéphane Allouche, Department of biochemistry, CHU de Caen, Avenue de la côte de nacre, CS 30001 14033 CAEN cedex 9, France, Tel: +33 06231065419, Fax: +33 06231065172.

E-mail: allouche-s@chu-caen.fr

Abstract

Aims: Diabetes is associated with an elevated risk of cardiovascular disease but the precise role of glucose toxicity on the cardiomyocyte remains elusive. The aim of the study was to evaluate the impact of glucose fluctuations on cellular pathways and mitochondrial functions in the cardiomyocyte cell line HL-1.

Methods: HL-1 cells were exposed to low (LG, 2 mmol/l), normal (NG, 5 mmol/l), high (HG, 25 mmol/l) and intermittent high glucose (IHG, swing between low and high, every 2h) during 12h. Signaling pathways were studied by western-blot, mitochondrial respiration was evaluated by polarography, mitochondrial complex activities by spectrophotometry, ATP production by luminescence. Superoxide anions, mitochondrial membrane potential and the opening of the mitochondrial permeability transition pore were analyzed using fluorescent probes. Oxidative stress was studied using oxyblot protein oxidation detection kit. Cellular lesions induced by hypoxia were measured by LDH release.

Results: Only HG increased the glycogen synthase kinase 3 β activity without any effect on the other signaling pathways studied (mitogen-activated protein kinases, Akt, or autophagy). While HG or IHG promoted neither modification in the activity of the oxidative phosphorylation nor in the ATP production, we observed an increase in the mitochondrial membrane potential and in the basal and antimycin A-stimulated superoxide anion production upon IHG. Furthermore, IHG treatment potentiated lesions induced by 36h hypoxia.

Conclusion/interpretation: Our results demonstrated that exposure of HL-1 cells to glucose fluctuation promoted early mitochondrial dysfunctions and increased susceptibility to hypoxia-induced cellular injuries, suggesting a deleterious role of glucose fluctuations in diabetic patients.

Keywords: mitochondria; glucose fluctuation; HL-1 cardiomyocyte cell line; superoxide anion; Oxidative phosphorylation; Hypoxia.

Abbreviations:

GV Glycemic Variability

CVD Cardiovascular Disease

NG Normal glucose

HG High glucose

LG Low glucose

IHG Intermittent high glucose

Introduction:

The diabetes prevalence all over the world is continuously rising and it's now well demonstrated that this health condition is associated with a two to three-fold increase in risk of cardiovascular disease (CVD), and CVD remains the primary cause of death in diabetic patients [1]. In patients with type 2 diabetes, reduction of hyperglycemic episodes, reflected by the glycated hemoglobin HbA1c level, significantly decreased death related to diabetes and myocardial infarction [2]. Similar conclusions were obtained in patients with type 1 diabetes treated by intensive diabetes therapies [3]. Such data confirm that HbA1c level, used to monitor the glycemic control in diabetes, correlates with the risk of cardiovascular complications [4]. In addition, cardiac ischemia/reperfusion, which is characterized by deficient oxygen supply and subsequent restoration of blood flow, can cause irreversible myocardial damages, and is exacerbated in patients with diabetes mellitus, through complex and multifactorial mechanisms [5].

However, HbA1c only reflects the mean glycemia without taking into account the glycemic variability (GV). GV refers to oscillations of blood glucose concentration (hypo- and hyperglycemia) that occurs throughout the day (intra-day variability) but also between days (inter-day variability). GV can be determined by many different indexes, but one of the most used is the standard deviation of the average glycemia [6]. Subjects with impaired glucose regulation showed a higher intraday GV compared to subjects with normal glucose tolerance [7]. A pioneer work reported that, in a type 2 diabetic population, GV but not HbA1c level, was highly correlated with the urinary 8-iso prostaglandin F_{2α}, a stress oxidative marker; those results suggest that GV increases oxidative stress which could contribute to cardiovascular dysfunctions [8]. However, such results were not further confirmed by another study in a type 1 diabetic population [9]. Glucose variability was also demonstrated to be positively associated with an increased risk of vascular events and mortality in type 2 but not in type 1 diabetes mellitus [10]. High GV measured early after the onset of first-episode of acute coronary syndrome is associated with a higher risk of major adverse cardiac and cerebrovascular events at 30

days [11] and a thinner fibrous cap thickness [12]. All those data suggest a deleterious role of GV on cardiovascular diseases but the cellular and molecular mechanisms are not clearly understood. While exposure of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) to glucose fluctuations resulted in an increase of apoptosis, and a greater expression of adhesion molecules dependent from mitochondrial free radicals over-production [13,14], to the best of our knowledge, no data on cardiomyocytes are available.

Since mitochondria provide the major part of ATP for the energy needs of cardiomyocytes and diabetes was demonstrated to cause mitochondrial dysfunctions [15], we examined whether permanent high glucose levels or glucose fluctuations would result in cellular and mitochondrial alterations and a higher susceptibility to hypoxia injuries in the cardiomyocyte cell line HL-1. Our data showed that intermittent high glucose (IHG) exposure for 12h increased both the mitochondrial membrane potential $\Delta\psi_m$ and superoxide anion production, and cellular injuries-induced by hypoxia. This demonstrates a deleterious role of glucose fluctuations on cardiomyocytes.

Methods:

Cell culture and treatment

HL-1 mouse atrial cardiomyocyte-derived cells, provided by Dr. William C. Claycomb (Louisiana State University Medical Center, USA), were cultured as previously described [16] except that the glucose concentration was modified at 5 mmol/l.

Cells were subjected to treatments for 12h or 72h with different glucose concentrations: 2 mmol/l (low glucose, LG), 5 mmol/l (normal glucose, NG), 25 mmol/l (high glucose, HG) and glucose swing between 2 and 25 mmol/l (intermittent high glucose, IHG) every 2h for 12h-treatment or every 12h for 72h-treatment. Osmolarity was measured in the different media (LG, NG and HG) and didn't show any significant difference (data not shown).

Isolation of the mitochondria-rich fraction

Cells were harvested and centrifuged for 2 min at 300 g. Pellets were resuspended in ice-cold mitochondria isolation buffer (in mmol/l: HEPES-KOH 20 (pH 7.5), sucrose 250, KCl 10, MgCl₂ 1.5, EDTA 1, EGTA 1, dithiothreitol 1, and protease inhibitor cocktail). Cells were passed through a needle (26 gauge) 20 times and centrifuged 15 min at 14,000 g at 4°C. The pellets were once again suspended in the mitochondria isolation buffer, then disrupted by sonication (10 s, 3×) and centrifuged as indicated above.

Western blotting

Western-blot experiments were conducted either on the mitochondria-rich fraction or on whole cell after lysis with ice-cold RIPA buffer (in mmol/l: Tris-HCl 50, NaCl 150, EGTA 1, IGEPAL 1% (w/v), NaF 0,25% (w/v), and protease inhibitor cocktail, pH 7.5). Lysates were centrifuged 15 min at 14,000 g at 4°C. Protein concentrations were determined by the Bicinchronic acid (BCA) protein assay (Sigma). Equal amounts of proteins (20 µg) were separated by SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose membrane. Antibodies were rabbit anti-p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Erk1/2), anti-phospho-p44/42 MAPK (P-Erk1/2), anti-p38MAPK, anti-phospho-p38MAPK, anti-Akt, anti-phospho-Akt, anti-LC3 A/B, anti-GSK3B, anti-phospho-GSK3B (Cell signaling), anti-tubulin (Santa Cruz) and Total OXPHOS human Antibody Cocktail (Abcam). Immunoreactive bands were visualized using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Cell signaling) and visualized by enhanced chemiluminescence (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer). Densitometry analyses were performed using ImageJ software.

Assessment of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)

Twenty-four hours before experiment, 20,000 cells per well were seeded in 96-well black plate (Greiner bio-one). At the end of the 12h treatments, the culture media were replaced by Hank's balanced salt solution (HBSS) (Thermo Fischer). To measure $\Delta\psi_m$, HL-1 cells were incubated with 200 nmol/l tetramethyl-rhodamine ethyl ester (TMRE) for 30 min at 37°C. As control (with NG condition),

10 $\mu\text{mol/l}$ carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) was used to dissipate the $\Delta\psi\text{m}$. After three washes with HBSS, TMRE fluorescence was measured with a multilabel plate reader (VICTOR™ X4) using excitation filter of 544 nm and emission filter of 572 nm.

Measurement of mitochondrial superoxide anion

The superoxide anion generation was assessed using the mitochondrial fluorescent red probe MitoSOX₂ (Molecular Probes). Twenty-four hours before experiment, 20,000 cells per well were seeded in 96-well black plate. At the end of the treatments, the culture media were removed and HL-1 cells were loaded with 5 $\mu\text{mol/l}$ MitoSOX₂ in HBSS for 1h at 37°C. For each treatment condition, cells were incubated in the absence (basal superoxide anion production) or in the presence of 10 $\mu\text{mol/l}$ antimycin A (stimulated superoxide anion production) for 2h before loading with the fluorescent probe. Cells were washed with HBSS, then fluorescence was measured using a multilabel plate reader (VICTOR™ X4) using excitation filter of 485 nm and emission filter of 572 nm.

Assessment of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening

The mPTP opening was assessed by the quenching of the calcium-sensitive fluorescent probe calcein acetomethoxyester (calcein AM) by cobalt, as previously described [17]. After treatments for 12h, cells were rinsed with PBS and incubated with calcein AM 2 $\mu\text{mol/l}$ (Life Technologies) in HBSS for 15 min at 37°C. For some conditions, cells were exposed to calcein-AM in combination with 400 $\mu\text{mol/l}$ CoCl_2 (CaCo) and either 500 nmol/l ionomycin to induce mPTP opening or 10 $\mu\text{mol/l}$ ciclosporin A (CsA, Novartis Pharma, Rueil-Malmaison, France). Cells were then rinsed again, harvested, centrifuged, and fluorescence of 20,000 events was measured with a flow cytometer Gallios with a 488 nm laser excitation/ 517 nm emission (Beckman Coulter). Data were processed with the Kaluza software.

Determination of protein oxidation

After the 12h treatment, whole cell lysates were prepared as described above using ice-cold lysis RIPA buffer. Carbonyled proteins content was evaluated according to manufacturer protocol (OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit, Merck Millipore). Results were expressed as a ratio of immunoreactive bands and total proteins detected on Stain Free gels (BioRad).

Oxygen consumption

After treatments for 12h or 72h, HL-1 cells were harvested and centrifuged for 2 min at 300 g. The oxygen consumption was measured at 37°C on 0.2% (w/v) digitonin-permeabilized cells using a Clark-type oxygen electrode (Oxytherm system, Hansatech Instruments, Cergy Saint Christophe, France). Pellets were resuspended in the respiration buffer (in mmol/l: K-MES 100, KH₂PO₄ 5, EGTA 1, EDTA 3, ADP 1 and bovine serum albumin 1mg/ml, pH 7.4), then cells were placed in the incubation chamber. Several substrates were used: 25 mmol/l succinate combined with 25 µmol/l rotenone, 80 µmol/l palmitate + 5 mmol/l malate or 10 mmol/l pyruvate + 5 mmol/l malate. Respiration rate was measured using the Oxygraph Plus software, and results were expressed as nmolO₂.min⁻¹.mg⁻¹ of protein.

Enzymatic activity study

The enzymatic activities of each complex of the respiratory chain were determined on isolated mitochondria from HL-1 exposed for 12h to different treatments. Activities of the different complexes were all determined as previously described [18,19] and were normalized to the citrate synthase activity.

ATP measurements

The ATP quantitation was determined using the ATP Determination Kit (A22066, Molecular Probes). After the different treatments for 12h, HL-1 cells were permeabilized with 0.2% (w/v) digitonin for 5 min then exposed or not to 80 µmol/l palmitate + 5 mmol/l malate or 10 mmol/l pyruvate + 5 mmol/l malate for 15 min at 37°C. Cells were centrifuged and lysed using the Cell Culture Lysis Reagent (Promega). Supernatants were collected after centrifugation at 12,000 g at 4°C for 2 min. ATP

production was determined using a multiplate luminometer after determination of a calibration curve according to the instructions of the manufacturer. Results were expressed in $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein.

Simulated Hypoxia

HL-1 cells were placed in a hypoxic buffer containing in mmol/l: NaCl 140, KCl 3.6, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.3, HEPES 20, pH 7.0. Then, cells were subjected or not to hypoxia for 36 hours in a hypoxic chamber with controlled atmosphere (1 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂) at 37°C. Cell death under normoxic and hypoxic conditions was evaluated by measuring the LDH release. LDH activity was measured in both supernatant and cell content, using a spectrophotometric technique on a DXC analyzer (Beckman Coulter, Villepinte, France). Results were expressed as percentage of total LDH.

Statistical analysis

All results were normalized to the normal glucose (NG) condition and data were expressed as mean \pm SEM. Multiple comparisons between groups were calculated by one-way repeated ANOVA followed by Dunnett's comparison test or by two-way ANOVA followed by the Bonferroni's post hoc test using the GraphPad Prism™ version 6.00 software. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results:

High glucose increased GSK 3 β phosphorylation

We first investigated the influence of glucose fluctuations on selected signal transduction pathways. HL-1 cells were exposed to low (LG), normal (NG), high (HG) or intermittent high glucose (IHG) concentrations for 12h, then the ratio of the phosphorylated form / total of p38, Erk 1/2, Akt and GSK-3 β were determined. No significant change on these transduction pathways was observed with IHG treatment. However we found that HG significantly increased GSK-3 β compared to NG (HG $159.5 \pm 16.6\%$ vs NG $100 \pm 9.9\%$; $p < 0.05$) (Fig. 1a-d). We also evaluated the autophagy pathway using LC3-II / LC3-I ratio. While chloroquine treatment promoted a robust increase of the LC3-II / LC3-I ratio, such effect was not demonstrated for cells exposed to LG, HG or IHG (Fig. 1e).

Mitochondrial respiration was not modified by glucose fluctuation

In a second set of experiments, we examined whether glucose fluctuations would impact mitochondrial functions in HL-1 cells. We measured the oxygen consumption by polarography. Cells were exposed to 12h treatments as described above, then oxygen consumption was measured using three different substrates: succinate, palmitate and pyruvate. As depicted on the figure 2a-c, no significant difference in mitochondrial respiration was observed between various glucose exposures whatever the substrate used.

ATP production was not altered by glucose fluctuation

Since glucose is a major energy substrate, we measured ATP production after 12h treatment with the different glucose concentrations in the absence (basal production) or in the presence of pyruvate or palmitate (stimulated production). Upon substrate stimulation, we were able to observe a 10-fold increase in ATP production without any significant impact of glucose fluctuation treatment compared to NG either in basal or stimulated condition (Fig. 2d-f).

Electron transport chain (ETC) activity was not modified by glucose fluctuation

In addition, we measured the activity of each mitochondrial complex spectrophotometrically (complexes I to V plus II+III). As shown on the figure 3a-f, no significant change in complexes activity was observed, whatever glucose exposure (LG, HG, IHG), compared to NG. This lack of change was further corroborated by western blot which revealed no modification of the expression mitochondrial subunits of the OXPHOS (Fig. 3g).

Glucose fluctuation increased mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) under basal conditions

We measured the $\Delta\psi_m$ with the mitochondrial specific dye TMRE under basal and stimulated conditions (succinate, pyruvate or palmitate) in HL-1 cells pretreated with the different glucose concentrations. First, we showed that CCCP, a well-described uncoupling agent of the mitochondrial oxidative phosphorylation, decreased $\Delta\psi_m$ (Fig. 4a). Then under basal condition, we observed that the $\Delta\psi_m$ was significantly more elevated in IHG condition compared to control (IHG $130 \pm 5.3\%$ vs. NG $100 \pm 4.2\%$; $p < 0.05$) but no difference was found under substrate stimulation.

The mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening triggered by ionomycin was not modified by glucose fluctuation

As mPTP is a well-known critical component of the mitochondrial dysfunction and cell death under pathological conditions [20], we measured its opening by using the calcein-cobalt assay. Calcein-AM passively diffuses into intracellular compartments including mitochondria while cobalt does not. So, the specific mitochondrial fluorescence was determined by measuring the signal in the absence and in the presence of cobalt but no significant difference between HL-1 cells exposed to different glucose concentrations was observed (data not shown). Next, cells were exposed to ionomycin, an ionophore known to increase intracellular calcium concentration which in turn increases the probability of mPTP opening and the cobalt influx inside mitochondria which quenches the calcein fluorescence. Upon $100 \mu\text{mol/l}$ ionomycin exposure, no difference between IHG and NG in the opening of mPTP was observed (Fig. 4c).

Glucose fluctuation increased mitochondrial superoxide production but not protein oxidation

Next, HL-1 cells were exposed to the different glucose concentrations for 12h followed by incubation with MitoSOX, to measure mitochondrial superoxide anion production. In those conditions, we

observed a significant increase of superoxide anion production in both HG and IHG compared to NG (HG $139 \pm 6.9\%$, IHG $137.1 \pm 7.4\%$ vs NG $100 \pm 6.3\%$; $p < 0.05$; Fig. 5a). The same experiment was conducted in the presence of the specific complex III inhibitor, antimycin A (Ant A), and similar results were obtained: HG and IHG treatments increased the level of superoxide anion compared to NG (HG $125.9 \pm 2.9\%$, IHG $119.3 \pm 1.6\%$ vs NG $100 \pm 1.5\%$; $p < 0.05$; Fig. 5b). We further evaluated whether this condition was accompanied by an increase of protein oxidation detected by the oxyblot assay. As shown on the Fig. 5c, neither HG nor IHG stimulated protein oxidation compared to other conditions. We checked that this assay enabled detection of oxidized proteins ; when HL-1 cells were exposed to HG for 4 weeks (chronic high glucose, cHG), we showed a significant increase of oxidized protein level compared to NG (cHG $201 \pm 1.4\%$ vs NG $100 \pm 1.1\%$; $p < 0.01$; Fig. 5c).

Glucose fluctuation increased susceptibility to hypoxia-induced cell death

In a last series of experiments, we determined whether glucose fluctuations would modify the susceptibility of HL-1 to cell death induced by hypoxia. Cells were exposed to different glucose concentrations for 12h, then placed in a hypoxic buffer either in hypoxia or in normoxia (control) for 36h, a condition which promoted submaximal cellular lesions (data not shown). Then, cell death was evaluated by LDH release in the medium, and expressed as a percentage of total LDH. In normoxia, cell death was about 10-15% for the different conditions of glucose exposure (data not shown). As shown on the Fig. 6, we found a significant higher cell death for both HG and IHG conditions in comparison to NG condition (HG $55 \pm 0.2\%$; IHG $57.8 \pm 0.39\%$ vs NG $48.79 \pm 0.75\%$; $p < 0.05$).

Discussion:

The major cardiovascular events occurring in diabetic patients are due to coronary artery disease, but also to diabetic cardiomyopathy (CD). The pathophysiological mechanisms involved in CD are complex

and include a deleterious role of hyperglycemia but the precise role of GV in such processes is currently unknown. The present study was designed to evaluate mitochondrial functions and signaling pathways under glucose fluctuation on a cardiac cellular model. Our experimental protocol was designed to mimic daily glycemic variability in diabetic patients and HL-1 cells were exposed alternatively to a high (25 mmol/l) and a low (2 mmol/l) glucose concentration every 2h during 12h. The choice of the high glucose concentration was based on previous in vitro studies [13,21]. Regarding the low glucose concentration level, 2 mmol/l was chosen to mimic serious hypoglycemia, a frequent issue in patients with intensive insulin therapy. Of note, in some other studies on GV, glucose concentrations fluctuated between high to either normal (5 mmol/l) or to no glucose [21,22].

Since hyperglycemia was reported to activate p38 kinase, Akt and ERK 1/2 [23,24], GSK-3 β [25], we studied those signaling pathways and found that only HG condition promoted GSK-3 β activation compared to NG condition, which is in agreement with data obtained in diabetic patients [26]. No significant result was shown regarding the other pathways above-mentioned. This finding is not consistent with previous studies that showed an activation of p38 with hyperglycemia and /or ROS [23,27], phospho-Akt inhibition and phospho-ERK 1/2 activation on human aortic smooth muscle cells submitted to long-term hyperglycemia (7 days) [24]. Hyperglycemia and diabetes were demonstrated to up-regulate autophagy process [28], but in our study, none of our experimental conditions showed an increase in LC3-II expression. Discrepancies between those reports and our study are probably due to the short time of exposure in our experiments and related to the different experimental models (endothelial cells vs cardiomyocytes derived from atrium).

Surprisingly, our results showed that neither HG nor IHG were able to induce alteration of the OXPHOS (oxygen consumption, respiratory chain complexes) and ATP production. In contrast, previous laboratories reported that HG exposure resulted in a decrease of the oxygen respiratory rate in mesangial and tubular cells [29], but also in cardiac mitochondria isolated from type 2 diabetic patients [30]. Such discrepancies would result from the different duration of glucose exposure (12h vs several

days) and experimental conditions to measure the mitochondrial respiration (ADP and substrate concentrations). However, our in vitro data are in good agreement with another study from our laboratory where no difference in oxygen consumption and respiratory chain complex activity was demonstrated in cardiac mitochondria from diabetic and non-diabetic patients (R. Richer, S. Lemoine, J.L. Hanouz, B. Bernay, M. Nowoczyn, S. Allouche and L. Coulbault, Submitted).

As observed for the HG condition, we showed that IHG increased mitochondrial superoxide anion production both in basal and antimycin-stimulated conditions, which was suggested to be related to diabetic complications [31]. Although the methods were different, our results are consistent with other in vitro studies which showed that IHG promoted ROS production on a HUVEC model and pointed the role of NADPH oxidase [32,33]. While the glucose treatment in those latter studies extended between 3 to 14 days, we were able to show a significant rise in superoxide anion production only after 12 hours of treatment indicating that this is an early mitochondrial dysfunction. Mitochondria are the major source of ROS production especially when the proton gradient is high and the electron transfer cofactors (FAD, FMN and NAD) are in a reduced form [34]. Precisely, we found that IHG enhanced $\Delta\psi_m$, and high glucose exposure was previously demonstrated to increase $\Delta\psi_m$ in islet cells [35]. However, IHG treatment rather decreases mitochondrial membrane potential in INS-1 cells [36] or has no effect in the hepatic L02 cells [21]. Since there is a close relationship between $\Delta\psi_m$ and mPTP [37], we examined the opening of this pore but we didn't show any effect of the different glucose treatments. This indicates that the IHG-induced increase of $\Delta\psi_m$ was not linked to a regulation of the mPTP. Surprisingly, in our study, oxidative stress using the oxyblot was not demonstrated neither under HG nor IHG exposure while these two conditions increased superoxide anion production. We hypothesize that the duration of this oxygen species production would be too low to observe any impact on protein oxidation since after 4 weeks, oxidized proteins are increased with HG.

We also showed that both HG and IHG induced a modest but significant increase in cellular damages after hypoxia. These results are in line with the increased mortality rate in patient presenting

hyperglycemia during an acute myocardial infarction [38]. Our data are in agreement with a previous report from our laboratory showing that glucose variability and permanent hyperglycemia conditions were associated with higher plasma troponin levels compared to controls after an experimental ischemia/reperfusion in a streptozotocin rat model [39].

The strength of our study is the precise control of the glucose concentration and fluctuation compared to experimental animal models of diabetes where classification in the hyperglycemia or the glucose fluctuation groups remains challenging. Furthermore, this in-vitro study allowed us to assess many cellular parameters and mitochondrial functions that are more difficult to explore in animal models. However, there are also several drawbacks: we arbitrarily chose experimental conditions (glucose concentrations, time of exposure) to mimic what happens in diabetic patients but extrapolations to patients would be hazardous. For practical reasons, we selected 12h but it clearly does not reflect clinical situations where glucose fluctuations last over longer time. In complementary experiments, we extended treatments to 72h (Complementary Fig. 1 and 2). In these conditions, we observed that antimycin-induced superoxide anion production was significantly greater at 72h compared to 12h exposure for the IHG condition. In addition, in this condition, we observed a significant reduction of OXPHOS with succinate (Complementary Fig.2). As mentioned by others concerning glucose variability [40], time exposure is a crucial parameter that clearly influences deleterious effects of IHG treatment on mitochondria, since extension of treatment from 12 to 72h increased mitochondrial dysfunctions.

In summary, to the best of our knowledge, our study is the first that examined the effects of glucose fluctuation on a cardiac cell line, and more specifically on mitochondrial functions. Our results indicate that glucose fluctuation induces early mitochondrial alterations through an increase in both membrane potential and anion superoxide generation after only 12 hours exposure to glucose variability. These dysfunctions increased when exposure time was extended to 72h. Additionally, glucose fluctuation potentiates cellular lesions induced by hypoxia. Glucose fluctuation could be involved in cardiac complications of diabetes through mitochondrial dysfunctions and as hyperglycemia, glycemic

variability should be considered in the management of diabetes to prevent oxidative stress and potential ischemic damages.

Acknowledgements: We thank Marilynne GUILLAMIN (SFR 146 ICORE, Unicaen, Caen), for technical assistance for cytometry experiments, and Karim Boumediene (BioConnect, Unicaen, Caen, France) for using his hypoxia incubator.

Funding: This work was supported by Université Caen Normandie

Duality of interest: The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

References:

- [1] Collaboration TERF. Diabetes Mellitus, Fasting Glucose, and Risk of Cause-Specific Death. *N. Engl. J. Med.* 2011;364:829–41.
- [2] Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ.* 2000;321:405–12.
- [3] Lachin JM, Orchard TJ, Nathan DM, Group for the DR. Update on Cardiovascular Outcomes at 30 Years of the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study. *Diabetes Care.* 2014;37:39–43.
- [4] International Expert Committee Report on the Role of the A1C Assay in the Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care.* 2009;32:1327–34.
- [5] Lejay A, Fang F, John R, Van JAD, Barr M, Thaveau F, et al. Ischemia reperfusion injury, ischemic conditioning and diabetes mellitus. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2016;91:11–22.
- [6] Tay J, Thompson CH, Brinkworth GD. Glycemic Variability: Assessing Glycemia Differently and the Implications for Dietary Management of Diabetes. *Annu. Rev. Nutr.* 2015;35:389–424.
- [7] Wang C, Lv L, Yang Y, Chen D, Liu G, Chen L, et al. Glucose fluctuations in subjects with normal glucose tolerance, impaired glucose regulation and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus: CGM in NGT, IGR and newly-diagnosed DM-2. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 2012;76:810–5.
- [8]. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol J-P, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA.* 2006;295:1681–7.
- [9]. Wentholt IME, Kulik W, Michels RPJ, Hoekstra JBL, DeVries JH. Glucose fluctuations and activation of oxidative stress in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2008;51:183–90.
- [10]. Nalysnyk L, Hernandez-Medina M, Krishnarajah G. Glycaemic variability and complications in patients with diabetes mellitus: evidence from a systematic review of the literature. *Diabetes Obes. Metab.* 2010;12:288–98.
- [11] Tokue M, Iijima R, Imamura T, Niikura H, Hayashi F, Yazaki Y, et al. Impact of glycemic variability in patients with ST-elevated myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 2015;187:660–2.
- [12] Gohbara M, Hibi K, Mitsuhashi T, Maejima N, Iwahashi N, Kataoka S, et al. Glycemic Variability on Continuous Glucose Monitoring System Correlates With Non-Culprit Vessel Coronary Plaque Vulnerability in Patients With First-Episode Acute Coronary Syndrome - Optical Coherence Tomography Study. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 2016;80:202–10.
- [13] Risso A, Mercuri F, Quagliari L, Damante G, Ceriello A. Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001;281:E924-930.
- [14] Quagliari L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, et al. Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production. *Atherosclerosis.* 2005;183:259–67.
- [15] Duncan JG. Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011;1813:1351–9.

- [16] Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, et al. HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998;95:2979–84.
- [17] Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, et al. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys. J.* 1999;76:725–34.
- [18] Medja F, Allouche S, Frachon P, Jardel C, Malgat M, Mousson de Camaret B, et al. Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion.* 2009;9:331–9.
- [19] Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta.* 1994;228:35–51.
- [20] Bernardi P, Rasola A, Forte M, Lippe G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 2015;95:1111–55.
- [21] Yin X, Zheng F, Pan Q, Zhang S, Yu D, Xu Z, et al. Glucose fluctuation increased hepatocyte apoptosis under lipotoxicity and the involvement of mitochondrial permeability transition opening. *J. Mol. Endocrinol.* 2015;55:169–81.
- [22] Quincozes-Santos A, Bobermin LD, de Assis AM, Gonçalves C-A, Souza DO. Fluctuations in glucose levels induce glial toxicity with glutamatergic, oxidative and inflammatory implications. *Biochim. Biophys. Acta.* 2017;1863:1–14.
- [23] Igarashi M, Wakasaki H, Takahara N, Ishii H, Jiang Z-Y, Yamauchi T, et al. Glucose or diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways. *J. Clin. Invest.* 1999;103:185–95.
- [24] Popov D, Nemezc M, Dumitrescu M, Georgescu A, Böhmer FD. Long-term high glucose concentration influences Akt, ERK1/2, and PTP1B protein expression in human aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;388:51–5.
- [25] Mariappan MM, Shetty M, Sataranatarajan K, Choudhury GG, Kasinath BS. Glycogen Synthase Kinase 3 β Is a Novel Regulator of High Glucose- and High Insulin-induced Extracellular Matrix Protein Synthesis in Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 2008;283:30566–75.
- [26] Henriksen EJ, Dokken BB. Role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr. Drug Targets.* 2006;7:1435–41.
- [27] Flores-López LA, Díaz-Flores M, García-Macedo R, Ávalos-Rodríguez A, Vergara-Onofre M, Cruz M, et al. High glucose induces mitochondrial p53 phosphorylation by p38 MAPK in pancreatic RINm5F cells. *Mol. Biol. Rep.* 2013;40:4947–58.
- [28] Gonzalez CD, Lee M-S, Marchetti P, Pietropaolo M, Towns R, Vaccaro MI, et al. The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy.* 2011;7:2–11.
- [29] Czajka A, Malik AN. Hyperglycemia induced damage to mitochondrial respiration in renal mesangial and tubular cells: Implications for diabetic nephropathy. *Redox Biol.* 2016;10:100–7.
- [30] Anderson EJ, Kypson AP, Rodriguez E, Anderson CA, Lehr EJ, Neuffer PD. Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;54:1891–8.
- [31] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* 2010;107:1058–70.

- [32] Piconi L, Quagliaro L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, et al. Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2006;22:198–203.
- [33] Maeda M, Hayashi T, Mizuno N, Hattori Y, Kuzuya M. Intermittent High Glucose Implements Stress-Induced Senescence in Human Vascular Endothelial Cells: Role of Superoxide Production by NADPH Oxidase. Saretzki G, editor. *PLOS ONE.* 2015;10:e0123169.
- [34] Patti M-E, Corvera S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 2010;31:364–95.
- [35] Heart E. Glucose-dependent increase in mitochondrial membrane potential, but not cytoplasmic calcium, correlates with insulin secretion in single islet cells. *AJP Endocrinol. Metab.* 2005;290:E143–8.
- [36] Tao S, Ren Y, Zheng H, Zhao M, Zhang X, Zhu Y, et al. Salvianolic acid B inhibits intermittent high glucose-induced INS-1 cell apoptosis through regulation of Bcl-2 proteins and mitochondrial membrane potential. *Eur. J. Pharmacol.* 2017;814:56–62.
- [37] Kowaltowski AJ, Smaili SS, Russell JT, Fiskum G. Elevation of resting mitochondrial membrane potential of neural cells by cyclosporin A, BAPTA-AM, and bcl-2. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 2000;279:C852–C859.
- [38] Kosiborod M, Inzucchi SE, Krumholz HM, Xiao L, Jones PG, Fiske S, et al. Glucometrics in Patients Hospitalized With Acute Myocardial Infarction: Defining the Optimal Outcomes-Based Measure of Risk. *Circulation.* 2008;117:1018–27.
- [39] Joubert M, Hardouin J, Legallois D, Blanchart K, Elie N, Nowoczyn M, et al. Effects of glycaemic variability on cardiac remodelling after reperfused myocardial infarction: Evaluation of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats using cardiac magnetic resonance imaging. *Diabetes & Metabolism.* 2016;42:342–50.
- [40] Kovatchev B, Cobelli C. Glucose Variability: Timing, Risk Analysis, and Relationship to Hypoglycemia in Diabetes. *Diabetes Care.* 2016;39:502–10.

Legends for figures:

Figure 1: Effect of glucose fluctuation on signaling pathways.

HL-1 cells were exposed to low (LG), normal (NG), high (HG) or intermittent high glucose (IHG) concentrations for 12h then harvested. Proteins were subjected to western blotting, the level of total and phosphorylated p38 (a), Akt (b), GSK-3 β (c), and ERK 1/2 (d) were measured. Autophagy was assessed by measuring the increase of LC3-II form compared to LC3-I (e). As a positive control, cells were pretreated for 4h with 30 μ M chloroquine. Data are the means \pm S.E.M. of 3-6 independent experiments. *, $p < 0.05$ one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test.

Figure 2: Effects of glucose fluctuation on the oxygen consumption and ATP production.

HL-1 cells were exposed to different glucose concentrations (LG or low glucose, NG or normal glucose, HG or high glucose and IHG intermittent high glucose) for 12h treatment then oxygen consumption was recorded on digitonin-permeabilized cells using a Clark electrode in the presence of succinate (a), pyruvate (b) or palmitate (c). ATP production was evaluated using a bioluminescence assay with (e-f, 10 mmol/l pyruvate, or 80 μ mol/l palmitate) or without substrate stimulation (d, basal production). Data are the means \pm S.E.M. of 3-5 independent experiments. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test didn't reveal any significant difference compared to NG.

Figure 3: Effects of glucose fluctuation on the electron transport chain.

HL-1 cells were exposed to different glucose concentrations (LG or low glucose, NG or normal glucose, HG or high glucose and IHG intermittent high glucose) for 12h treatment then the activity of the different mitochondrial respiratory chain complexes was determined on isolated mitochondria (a to f). The expression of ATP5A (complex V), UQCRC2 (complex III), SDHB (complex II) and COX II (complex IV) was evaluated by western blot (g). Data are the means \pm S.E.M. of 3 independent experiments.

One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test didn't reveal any significant difference compared to NG.

Figure 4: Effects of glucose fluctuation on the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening.

HL-1 cells were exposed to different glucose concentrations (LG or low glucose, NG or normal glucose, HG or high glucose and IHG intermittent high glucose) for 12h treatment then $\Delta\psi_m$ was measured using the fluorescent probe TMRE under basal (a) or stimulated (b) conditions in the presence of succinate, pyruvate or palmitate. CCCP was used as control to dissipate the $\Delta\psi_m$. mPTP opening (c) was assessed using calcein AM whose fluorescence was determined by flow cytometry. Mitochondria specific fluorescence was determined using CoCl_2 (which quenches calcein fluorescence except in mitochondria) and mPTP opening was triggered by addition of 100 $\mu\text{mol/l}$ ionomycin. Data are the means \pm S.E.M. of 3 independent experiments. *, $p < 0.05$ one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test.

Figure 5: Effects of glucose fluctuation on mitochondrial superoxide anion production and protein oxidation.

HL-1 cells were exposed to different glucose concentrations (LG or low glucose, NG or normal glucose, HG or high glucose and IHG intermittent high glucose) for 12h treatment then superoxide anion production was measured using the fluorescent probe MitoSOX under basal (a) or stimulated (b) conditions in the presence of antimycin A (Ant A). Whole cell lysates were prepared from HL-1 cells pretreated with different glucose concentrations and chronic high glucose (4 weeks in HG, cHG). Proteins were derivatized (+) or not (-) with DNPH then separated by SDS-PAGE (c). Oxidized proteins

were revealed by anti-DNP antibody. Data are the means \pm S.E.M. of 3-5 independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test.

Figure 6: Effects of glucose fluctuation on hypoxia-induced cell death.

HL-1 cells were exposed to different glucose concentrations (LG or low glucose, NG or normal glucose, HG or high glucose and IHG intermittent high glucose) for 12h treatment then cells were placed in a hypoxic buffer under normoxia (control cells) or hypoxia for 36h. Results are expressed as the percentage of LDH released from cells into the medium compared to total LDH activity. Data are the means \pm S.E.M. of 3 independent experiments. *, $p < 0.05$ one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test.

Legends for complementary figures:

Complementary Figure 1: Effects of glucose fluctuation on mitochondrial superoxide anion production after 72h of treatment.

HL-1 cells were exposed to different glucose concentrations (LG or low glucose, NG or normal glucose, HG or high glucose and IHG intermittent high glucose) for 72h treatment then superoxide anion production was measured using the fluorescent probe MitoSOX under basal (A) or stimulated (B) conditions in the presence of antimycin A (Ant A). Fluorescence increase between 12h and 72h treatment is represented for each condition for basal (C) and stimulated (D) condition. Data are represented as the means \pm S.E.M of 3-5 independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; One way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test (A and B). **** $p < 0.0001$ vs 12h; Two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test (C and D).

Complementary Figure 2: Effects of glucose fluctuation on the oxygen consumption after 72h of treatment.

HL-1 cells were exposed to different glucose concentrations (LG or low glucose, NG or normal glucose, HG or high glucose and IHG intermittent high glucose) for 72h treatment then oxygen consumption was recorded on digitonin-permeabilized cells using a Clark electrode in the presence of succinate (A), pyruvate (B) or palmitate (C). Data are the means \pm S.E.M. of 3 independent experiments. *, $p < 0.05$; One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test.

Figure 1 Mordel et al.

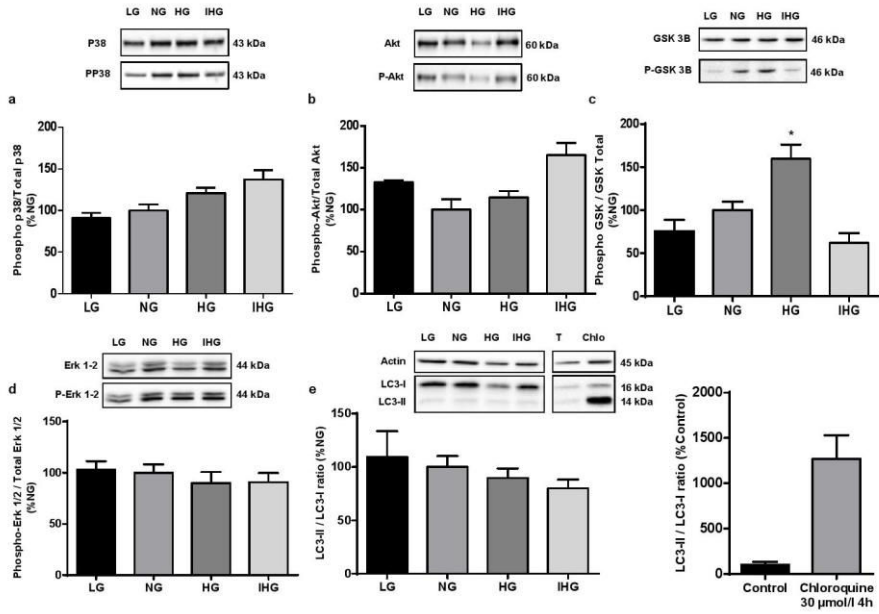


Figure 2

Figure 2 Mordel et al.

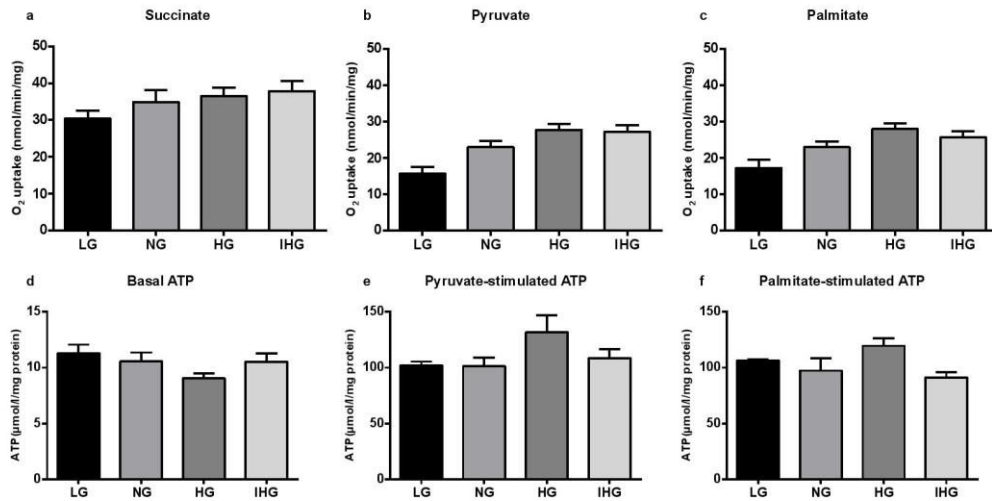


Figure 3 Mordel et al.

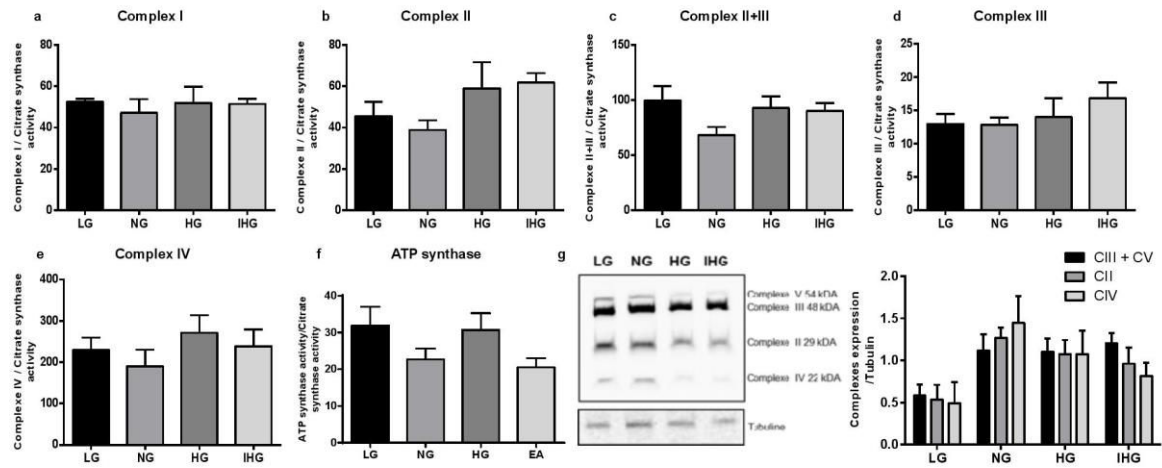


Figure 4 Mordel et al.

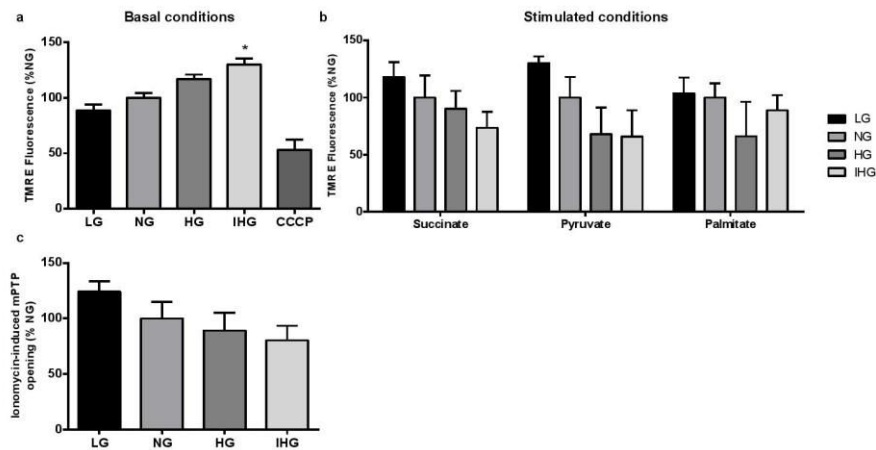


Figure 5
Figure 5 Mordel et al.

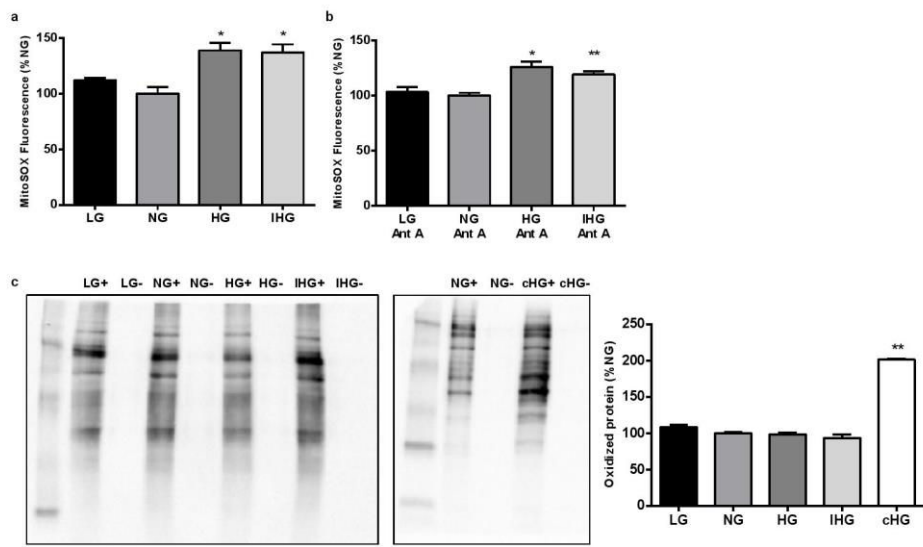
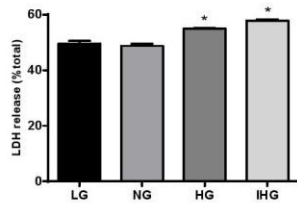


Figure 6

Figure 6 Mordel et al.



Article en ré-écriture :

Time-course of simulated ischemia-induced cell death and mitochondrial dysfunctions in HL-1 and H9c2 cell lines.

Basic Research in Cardiology

Time-course of simulated ischemia-induced cell death and mitochondrial dysfunctions in HL-1 and H9c2 cell lines

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Time-course of simulated ischemia-induced cell death and mitochondrial dysfunctions in HL-1 and H9c2 cell lines
Article Type:	Original Contribution
Keywords:	HL-1 cell line; H9c2 cell line; simulated ischemia; reoxygenation; mitochondria; cell death
Corresponding Author:	stephane Allouche, M.D., Ph.D. Normandie Universite Caen, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Normandie Universite
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Marie Nowoczyn, Pharm.D., Ph.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Marie Nowoczyn, Pharm.D., Ph.D. Patrick Mordel, Ph.D. student Quentin Dupas Laurent Coulbault, Pharm.D., Ph.D. stephane Allouche, M.D., Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	<p>Mitochondrial dysfunctions play a central role in the pathogenesis of myocardial ischemia/reperfusion (I/Rep) injuries and understanding these alterations at the molecular level is a crucial step to discover and assess new cardioprotective strategies. In this study we aimed to validate an experimental in vitro protocol and a cellular model to study I/R mechanisms. First, we compared cell death time-course during simulated ischemia (SI) and reoxygenation (R) in H9c2 and HL-1 cell lines. Cells were exposed to hypoxia (0.1% O₂) in a glucose-free buffer for 4 to 22h and we evaluated cell injury by lactate dehydrogenase (LDH) release ; we observed different kinetics of cell death induction during SI but the same extent of about 70% of loss in cell viability after 14 h in both models. Nevertheless, reoxygenation lesions were only evidenced in H9c2 cell line, whereas no additional cell death was found in HL-1 cells. Then, we aimed to study several mitochondrial functions after SI in HL-1 cell line. Using the double-staining technique with Hoechst 33258 and ethidium bromide (EB), western-blot of pro-caspase 3 and the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK, we found no evidence for apoptosis involvement in SI-induced HL-1 cell death. Upon 7h SI, where no cell death is detected, we evidenced fragmentation of the mitochondrial network stained with Mitotracker®, a mitochondrial calcium overload measured by calcein and a decrease of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) evaluated by the fluorescent probe tetramethylrhodamine ethyl ester (TRME). When SI was prolonged until 14h, where massive cell death is observed, we evidenced additional mitochondrial dysfunctions : a total depolarization of mitochondria, a decrease of the mitochondrial respiration rate, measured by a Clark electrode, and an increase in superoxide anion production measured by the fluorescent mitochondrial probe MitoSOX™. In conclusion, using the HL-1 and H9c2 cell lines as cellular models, we defined</p>

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

experimental conditions mimicking in vitro I/Rep injury. Furthermore, we were able to evidence sequential mitochondrial dysfunction in HL-1 cells upon SI both before and during cell death.

Caen, 08/05/17

Dear Editor-in-Chief,

Please find enclosed our manuscript entitled **“Time-course of simulated ischemia-induced cell death and mitochondrial dysfunctions in HL-1 and H9c2 cell lines”** by Nowoczyn and collaborators.

In our paper, we studied mitochondrial dysfunctions upon simulated ischemia (SI) in the HL-1 cell line. First, we defined experimental conditions to induce cell death upon hypoxia. Second, we showed that SI promoted cell death independently of apoptosis. Third, we selected two time points, 7 h and 14h, where we observed no death and a massive cell death, respectively. Then, we examined the organization of mitochondrial network, we measured the respiration rate, the mitochondrial membrane potential, the reactive oxygen species production and the opening of the mitochondrial permeability transition pore.

The originality of our work is that we observed sequential mitochondrial alterations even before cell death occurred; a fragmentation of the mitochondrial network, a mitochondrial calcium overload and a decrease of the mitochondrial membrane potential. When the SI was prolonged until 14 h, we detected reactive oxygen species production and a decrease of the respiration rate. All these events are summarized in our figure 8. To the best of our knowledge, such a complete study of mitochondrial alterations leading to cell death in HL-1 cell line following hypoxia has not been done yet.

We are convinced that our study fits with the topics of your journal, which publishes high impact articles in the field of the cellular cardiology.

We confirm that this manuscript has not been published elsewhere and is not under consideration by any other journal. All of the authors agree with submission to Basic Research in Cardiology. We have no conflicts of interest to declare. Appropriate ethical standards were followed in this study.

Looking forward to reading your response.

Your sincerely,

Pr Stéphane Allouche

Time-course of simulated ischemia-induced cell death and mitochondrial dysfunctions in HL-1 and H9c2 cell lines

M Nowoczyn^{1,2}, P Mordel¹, Q Dupas¹, L Coulbault^{1,2}, S Allouche^{1,2}

¹ Normandie Univ, UNICAEN, CHU Caen, Signalisation, électrophysiologie et imagerie des lésions d'ischémie-reperfusion myocardique, Caen, F-14032, France.

² CHU de Caen, Department of biochemistry, Caen, F-14032, France.

Correspondance : Pr. Stéphane Allouche, Department of biochemistry, CHU de Caen, Avenue de la côte de nacre, CS 30001 14033 CAEN cedex 9, France, Tel: +33 06231065419, Fax: +33 06231065172.

E-mail: allouche-s@chu-caen.fr

Number of words : 326 (abstract) + 5521 (bibliography excluded)

Number of figures : 8 + 1 supplemental data

Number of references : 53

Abstract

Mitochondrial dysfunctions play a central role in the pathogenesis of myocardial ischemia/reperfusion (I/Rep) injuries and understanding these alterations at the molecular level is a crucial step to discover and assess new cardioprotective strategies. In this study we aimed to validate an experimental in vitro protocol and a cellular model to study I/R mechanisms. First, we compared cell death time-course during simulated ischemia (SI) and reoxygenation (R) in H9c2 and HL-1 cell lines. Cells were exposed to hypoxia (0.1% O₂) in a glucose-free buffer for 4 to 22h and we evaluated cell injury by lactate dehydrogenase (LDH) release ; we observed different kinetics of cell death induction during SI but the same extent of about 70% of loss in cell viability after 14 h in both models. Nevertheless, reoxygenation lesions were only evidenced in H9c2 cell line, whereas no additional cell death was found in HL-1 cells. Then, we aimed to study several mitochondrial functions after SI in HL-1 cell line. Using the double-staining technique with Hoechst 33258 and ethidium bromide (EB), western-blot of pro-caspase 3 and the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK, we found no evidence for apoptosis involvement in SI-induced HL-1 cell death. Upon 7h SI, where no cell death is detected, we evidenced fragmentation of the mitochondrial network stained with Mitotracker®, a mitochondrial calcium overload measured by calcein and a decrease of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) evaluated by the fluorescent probe tetramethylrhodamine ethyl ester (TRME). When SI was prolonged until 14h, where massive cell death is observed, we evidenced additional mitochondrial dysfunctions : a total depolarization of mitochondria, a decrease of the mitochondrial respiration rate, measured by a Clark electrode, and an increase in superoxide anion production measured by the fluorescent mitochondrial probe MitoSOX™. In conclusion, using the HL-1 and H9c2 cell lines as cellular models, we defined experimental conditions mimicking in vitro I/Rep injury. Furthermore, we were able to evidence sequential mitochondrial dysfunction in HL-1 cells upon SI both before and during cell death.

Keywords : HL-1 cell line, H9c2 cell line, simulated ischemia, reoxygenation, mitochondria, cell death

List of abbreviations : AM, acetomethoxyester ; AMI, acute myocardial infarction ; $\Delta\Psi_m$, mitochondrial membrane potential ; EB, ethidium bromide ; H, hypoxia ; I, ischemia ; LDH, lactate dehydrogenase ; mPTP, mitochondrial permeability transition pore ; R, reoxygenation ; Rep, reperfusion ; ROS, reactive oxygen species ; SI, simulated ischemia ; TMRE, tetramethylrhodamine ethyl ester

Introduction

Ischemic heart disease is one of the leading death cause worldwide. During acute myocardial infarction (AMI), the lesion size is a major determinant for patient survival and results from damages occurring during ischemia (I) (Lønborg et al., 2013). The revascularization of obstructed coronary artery, the only treatment of AMI, enables reperfusion (Rep) of hypoxic tissue which also paradoxically contributes up to half of lesions (Garcia-Dorado and Piper, 2006). The molecular mechanisms involved in I/Rep-induced cell death have been extensively studied and revealed that necrosis, programmed necrosis (called necroptosis) (Luedde et al., 2014), apoptosis (see for review Whelan et al., 2010) and autophagy (see for review Nemchenko et al., 2011) all participate to cell death during I and Rep. However, their relative contributions and their setting during I and Rep are still debated.

To prevent development of excessive cellular lesions, cardioprotective strategies have been investigated for more than 30 years and are grouped under the term “conditioning”. Aside from ischemic conditioning (Murry et al., 1986, Vinten-Johansen et al., 2005), conditioning can also be stimulated using pharmacological agents. The use of cardioprotective drugs represents a very large field of promising research for human as these protocols are less invasive and thus easier to handle in clinical practice (see for review Hausenloy and Yellon, 2009 ; Brooks and Andrews, 2013).

Understanding of the underlying mechanisms responsible for I/Rep injury, which are complex and only partially understood (see above), might lead to development of new therapeutic strategies to protect and preserve myocardium following AMI and improve life expectancy. Some proteins have been identified to play a decisive role to counteract cell death, including Reperfusion Injury Salvage Kinases (RISK pathway, Hausenloy and Yellon, 2004), glycogen synthase kinase 3- β (GSK3- β , Gomez et al., 2008), protein kinase C (PKC, Inagaki et al., 2006), ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP} , see for review Garlid et al., 2009). Preventing excessive production of free radicals formed from oxygen (see for review Kalogeris et al., 2014) and nitrogen (Krolkowski et al., 2006) is also beneficial. Interestingly, all the above-cited pathways seem to converge on mitochondria.

As mitochondria participate in energy production, reactive oxygen species (ROS) generation and release of pro-apoptotic molecules, they are considered as key players in cell death induction following I/Rep. Formation and opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP, see for review Murphy and Steenbergen, 2011), whose molecular structure is still controversial (Bernardi and Di Lisa, 2015), enables the transfer of small molecules through the normally impermeable inner mitochondrial membrane ; this results into dissipation of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), uncoupling of electron transport chain and major perturbations of calcium homeostasis. Irreversible opening of mPTP finally leads to swelling and rupture of mitochondria, and induction of cell death (Halestrap, 1994 ; Saotome et al., 2005).

Developing in vitro experimental models that mimic some of the features of heart I/Rep lesions is of particular importance to evaluate new potential cardioprotective molecules. While primary culture of cardiomyocytes is challenging and time-consuming, cardiomyocytes derived-cell lines provide an interesting alternative. Among those in vitro models, mice immortalized atrial cells (HL-1) and rat immortalized ventricular cardiomyocytes (H9c2) are widely used but only HL-1 cells can spontaneously contract (Claycomb et al., 1998). Even though these cell lines cannot reproduce the in vivo tissue environment precisely, in vitro cell based models provide sufficient reliable and authentic data for further in vivo analysis. Nevertheless, experimental protocols are not standardized and thus results may not be reproducible from one study to another. Furthermore, cell death is not

systematically evaluated and hypoxia duration might be too long to evaluate cardioprotective strategies.

The aim of our study was first to establish an experimental protocol mimicking in vitro both simulated ischemia (SI) and reoxygenation (R) episodes and to compare time-course of SI/R-induced cell death in two immortalized cell lines which exhibit a cardiac phenotype. We then studied mitochondrial damages (decrease of mitochondrial respiration, alteration of the mitochondrial network, increase in ROS production and decrease of the $\Delta\Psi_m$) in HL-1 cells at two different times : after 7 h of SI, when no significant cell death was reported and after 14 h of SI when we observed significant necrotic cell death. In conclusion, we evidenced sequential and different mitochondrial dysfunctions in HL-1 cells upon SI both before and during cell death. Targeting early mitochondrial alterations could represent a promising cardioprotective strategy.

Material and methods

Chemicals

All chemicals mentioned were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) unless otherwise specified.

Cell culture

The HL-1 cell line, derived from the AT-1 mouse atrial myocyte tumour lineage, is a kind gift from Pr. W. Claycomb (Louisiana State University) (Claycomb et al., 1998). Cells were grown on 0.02% (w/v) gelatin / 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ fibronectin coated-flasks in Claycomb medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 1% (v/v) antibiotic/antimycotic mixture (PAA Laboratories, Les Mureaux, France), 2 mM L-glutamine (PAA Laboratories) and 0.1 mM norepinephrine. The rat cardiomyocyte-derived H9c2 cells were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) and were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) antibiotic/antimycotic mixture and 2 mM L-glutamine. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 95% air and 5% CO₂.

Cells were harvested at 100% confluence using a 0.05% trypsin/ 0.02% EDTA solution (GE Healthcare, Buc, France), mechanically dissociated with a Pasteur pipette, and seeded at the desired density for further experiments.

Simulated ischemia /reoxygenation (SI/R)

To simulate ischemia, the culture medium was replaced by a buffer without glucose containing 99 mM NaCl, 7.4 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, pH = 7.0 (H buffer). Cells were then transferred into a hypoxic chamber (Baker Ruskinn, Guipry, France) (94.9% N₂, 5% CO₂ and 0.1% O₂) and subjected to SI for different times (4-22 h) at 37°C. Control cells were also placed into the H buffer but under normoxic conditions (95% air, 5% CO₂). For the reoxygenation episode, the H buffer was withdrawn and cells were placed in a Tyrode solution (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM NaH₂PO₄, 12 mM NaHCO₃, 1.8 mM CaCl₂, 5.5 mM glucose, pH = 7.4) at 37°C in an atmosphere containing 95% air and 5% CO₂.

Study of cell death

Quantification of cell death

Cells were seeded in 24-well plates at a density of 5.10⁴ cells per well and incubated overnight. Cells were then exposed or not to hypoxia or reoxygenation and cell death was evaluated by measuring

lactate dehydrogenase (LDH) release in the supernatant, using a spectrophotometric technique on a DXC analyser (Beckman Coulter, Villepinte, France).

For some experiments, we also determined the percentage of LDH release (LDH supernatant / (LDH supernatant + LDH intracellular)) X100) after lysis of adherent cells (viable) by using the following buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1% (v/v) triton X-100, pH 7.4).

Study of mechanisms of cell death

Cell death was studied using the double-staining technique with Hoechst 33258 and ethidium bromide (EB) (Van Laer et al., 2004). Briefly, $5 \cdot 10^4$ cells were seeded on alcohol-cleaned glass coverslips. After exposure to either normoxia or SI, cells were incubated during 1h with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Hoechst 33258 followed by a 2-min incubation with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of EB. Cells were then fixed using a fresh solution of 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) for 10 min, rinsed with PBS and mounted. Images were acquired using an epifluorescence microscope (Olympus, Rungis, France; lens x40) and analyzed using ImageJ software. Based on the staining, we distinguish viable cells (faint Hoechst 33258 staining in blue), apoptotic cells (intense blue staining with the presence of apoptotic bodies), necrotic cells (strong EB staining in red) and late apoptotic cells (double staining with Hoechst 33258 and EB in orange).

To examine the involvement of apoptosis in cell death, HL-1 cells were pretreated or not with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK (Enzo Life Science) for 30 min before placing cells either under hypoxia or normoxia.

The caspase 3 activation was evaluated by western-blot. Cells were exposed to normoxia (control cells) or SI for 7 or 14 h, then harvested by centrifugation. The pellet was dissolved in lysis buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail, sonicated and then clarified by centrifugation for 15 min at 20,000 g and 4 °C. Total protein concentration was determined by the Bradford assay and equal amounts of supernatant protein were separated on 12% (w/v) acrylamide gels by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. The pro-caspase 3 and β -actin were detected by immunoblotting with a 1:5,000 dilution of the polyclonal antibody (Enzo Life Science, Villeurbanne, France) and a 1:500 dilution of the monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Nanterre, France), respectively. Immunoreactive proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer). Densitometric analysis was performed using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories). For each condition, we determined the ratio pro-caspase 3 / β -actin and normalized results to control cells.

Study of mitochondrial functions

Mitochondrial network

HL-1 cells were seeded at a density of $3 \cdot 10^5$ cells on small glass bottom Petri dishes and incubated overnight to allow adherence. Then, cells were incubated in H buffer and subjected either to hypoxia or normoxia during 7 h and stained with 500 nM Mitotracker Deep red during 9 min (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France). Images were obtained using a FluoView confocal laser microscope (Olympus), lens x60.

Respiration measurements

HL-1 cells were incubated in H buffer under normoxic conditions or subjected to SI for 7 or 14 h. Cells were harvested and centrifuged for 5 min at 100 g, suspended in a respiration buffer (100 mM K-MES, 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA, 3 mM EDTA, 1 mM ADP, 1 mg/mL BSA, pH 7.4) and permeabilized

with 0.2% (w/v) digitonin. Oxygen consumption was measured using a Clark-type oxygen electrode (Oxytherm system, Hansatech Instruments, Cergy Saint Christophe, France) in presence of different substrates (2 mM succinate, 80 μ M palmitate + 5 mM malate, 10 mM pyruvate + 5 mM malate). Respiration rate was measured using the Oxygraph Plus software, protein concentration was determined as previously described and results were expressed as nmol O₂/min/mg of protein.

Measurements of the $\Delta\Psi_m$ and ROS production

HL-1 cells were seeded in 96-well plates at a density of 10⁴ cells per well and subjected to normoxia or SI for 7 or 14 h. To analyze the $\Delta\Psi_m$, cells were further incubated for 30 min at 37°C with 50 nM tetramethylrhodamine ethyl (TMRE, Life Technologies) (excitation 549 nm / emission 574 nm) in H buffer. For measurement of superoxide anion production, HL-1 cells were loaded with 5 μ M MitoSOX[®] Red (excitation 510 nm / emission 580 nm) (Life Technologies) for 30 min in H buffer. Fluorescence intensity was measured spectrofluorometrically with a Victor X4 multilabel plate reader (Perkin Elmer). All experiments were carried out in triplicate. Results were expressed as arbitrary units (a.u.) per 10⁴ cells.

In order to visualize superoxide anion production, HL-1 cells were seeded at a density of 5.10⁴ cells on alcohol-cleaned glass coverslips and incubated overnight to allow adherence. Cells were stained for 30 min at 37°C with 500 nM Mitotracker Deep Red[®] and 5 μ M MitoSOX[®], rinsed with PBS and treated with 50 μ M rotenone for various times up to 90 min ; then, cells were fixed using a fresh solution of 4% PFA for 10 min, rinsed with PBS and mounted. Images were obtained using a FluoView confocal laser microscope (Olympus), lens x60. Images were merged after treatment by ImageJ software.

Monitoring of mPTP opening

Mitochondrial PTP opening was assessed by the quenching of the calcium-sensitive fluorescent probe calcein acetomethoxyester (calcein AM) by cobalt, as previously described in Petronilli et al., 1999. Briefly, after cleavage by esterases calcein accumulates into different organelles including mitochondria and its fluorescence increases upon calcium binding. As cobalt can't cross mitochondrial membrane, addition of this compound enables measurement of mitochondrial calcium. However, when mPTP opens, calcein is released in cytoplasm and is quenched by cobalt thus calcein fluorescence decreases. HL-1 cells were seeded on 6-well plates at a density of 1.10⁶ cells per well, incubated overnight and then subjected in H buffer to normoxia (control cells) or to SI for 7 h. Buffer was discarded, cells were rinsed with PBS and incubated with 2 μ M calcein AM (Life Technologies) in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS – 137.9 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.4 mM MgSO₄, 0.3 mM Na₂HPO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 4.2 mM NaHCO₃, 1.3 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose) for 15 min at 37°C in the dark. For some conditions, cells were exposed to calcein-AM in combination with 400 μ M CoCl₂ (CaCo) and either 500 nM ionomycin to determinate fluorescence baseline or 10 μ M ciclosporin A (CsA, Novartis Pharma, Rueil-Malmaison, France). Cells were then rinsed again, harvested, centrifuged, and fluorescence of 20,000 cells was measured with a flow cytometer Gallios with a 488 nm laser excitation/ 517 nm emission (Beckman Coulter). Data were processed with the Kaluza software. Results were expressed either as the specific mitochondrial calcein fluorescence or as a ratio of CaCo fluorescence in presence or in absence of CsA (CaCoCsA / CaCo) to evaluate the potency of CsA to inhibit mPTP opening, resulting in a lower release of calcein and an increase of fluorescence.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM of n experiments. The statistical differences between groups were calculated using t-test, one-way ANOVA followed by Bonferroni's test or Dunnett's test when appropriate. Differences were considered to be statistically significant when $p < 0,05$, using GraphPad Prism™ software.

Results

Time-course study of cell death following SI/R in H9c2 and HL-1 cell line

We first investigated the effect of SI/R on cell death in HL-1 and H9c2 cell lines. Cells were placed in the H buffer then incubated in a hypoxic chamber and LDH release in supernatants was measured after various times of SI and R. Our results showed that a significant cell death can be observed in HL-1 cells from 10 h of SI ($26.1 \pm 7.2\%$) and increased until 16 h where it reached a maximal value ($82.3 \pm 7.2\%$) (Figure 1.A.) ; we observed a quite different profile in H9c2 cell line, with a sharp increase in cell death reaching maximal value ($71.1 \pm 15.4\%$) (Figure 1.C.) after 14 h of SI without any lesions noticed before. To obtain sub-maximal lesions ($69.2 \pm 3.2\%$ in HL-1 cell line), we selected 14 h of SI in our further experiments. After 14 h of SI, HL-1 and H9c2 cells were placed in Tyrode solution and then incubated in normoxic conditions. Significant reoxygenation-induced cell death was observed in H9c2 cell line (Figure 1.D.), reaching up to one third of total cell death. However, despite 10 h of reoxygenation, we were unable to detect any additional lesions in HL-1 cell line (Figure 1.C.).

Role of necrosis in SI-induced cell death in HL-1 cell line

To define the molecular mechanisms involved in SI-induced HL-1 cell death, we first performed a double staining technique using EB and Hoechst 33258. As shown in Figure 2.A. (control, normoxia), we observed a very weak EB staining under normoxic conditions. After 14 h of SI, EB positive cells without apoptotic bodies were evidenced (Figure 2.A., control, SI) and corresponded to $79,3 \pm 6,9\%$ of total cells (Figure 2.B., SI); this correlates well with the increase of LDH release normalized to total LDH ($54.6 \pm 4.4\%$ vs. $13.9 \pm 1.1\%$ in HL-1 cells incubated in normoxia, Figure 2.B.).

To study the potential role of apoptosis in SI-induced cell death, HL-1 cells were pretreated during 1 h with $10 \mu\text{g/mL}$ of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK. This inhibitor didn't significantly modify cell death promoted by hypoxia both evaluated using EB and Hoechst 33258 staining ($74.3 \pm 10.0\%$ SI vs. $68.6 \pm 3.7\%$ SI + Z-VAD-FMK) (Figures 2.A. and B.) and LDH release ($54.6 \pm 4.4\%$ SI vs. $53.8 \pm 5.1\%$ SI + Z-VAD-FMK) (Figure 2.B.).

During apoptosis, executioner pro-caspases, including pro-caspase 3, are processed into shorter and active forms. We evaluated the pro-caspase 3 levels by western-blot in HL-1 cells exposed to normoxia or SI during 7 and 14 h. As shown in Figure 2.C., we found that hypoxia didn't not promote any significant reduction of the pro-caspase 3 when reported to the β -actin level. It's noteworthy that the decrease of both pro-caspase 3 and the β -actin levels, observed after 14 h of SI, is probably due to cell death.

Study of mitochondria in HL-1 cells following SI

We studied mitochondrial morphology and functions following SI. The mitochondrial morphology was evaluated with the fluorescent dye Mitotracker® whose accumulation in mitochondria depends on the membrane potential. In HL-1 cells incubated in normoxia, we observed a dense mitochondrial network with a preferential perinuclear localization (Figure 3.A.). When incubated for 7 h in H buffer

under hypoxia conditions, the mitochondrial network was largely disrupted with a less intense but more diffuse staining (Figure 3.B.).

$\Delta\Psi_m$ was measured using TMRE fluorescent probe after 7 and 14 h of incubation in H buffer either in hypoxia or normoxia (control). First, we checked that incubation of HL-1 cells with 50 μ M of the uncoupling reagent carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) was able to decrease $\Delta\Psi_m$. As shown in Figure 4, SI promoted a significant decrease of $\Delta\Psi_m$ compared to normoxia but without a significant difference between 7 and 14h hypoxia ($56.2 \pm 5.2\%$ vs. $44.9 \pm 5.9\%$). While CCCP was still effective to decrease TMRE fluorescence in HL-1 cells after 7h of SI ($63.2 \pm 5.0\%$ vs. $38.1 \pm 2.8\%$), this effect was not observed anymore when SI was extended to 14 h ($44.9 \pm 5.9\%$ hypoxia 14 h vs. $39.9 \pm 4.7\%$ for hypoxia 14 h + CCCP).

We evaluated the impact of hypoxia on the mitochondrial oxidative metabolism using different substrates. We compared the respiration rates between HL-1 cells placed in H buffer under normoxia and under hypoxia. While no significant difference was measured between all those conditions after 7 h (Supplemental data 1), a strong reduction of oxygen consumption was evidenced after 14 h hypoxia for the three different substrates (Figure 5).

Then, we evaluated superoxide anion production by measuring spectrofluorimetrically the MitoSOX[®] Red fluorescence after SI. Preliminary fluorescent microscopy experiments indicated that addition of rotenone, a potent complex I inhibitor, increased fluorescence that colocalized with Mitotracker[®] indicating that MitoSOX[®] Red could therefore specifically measure superoxide anion production by mitochondria (Figure 6.A.). When cells were incubated in H buffer under normoxia or SI for 7h, no significant difference in fluorescence levels was observed, whereas a marked increase by 300 % was noticed following 14 h of incubation at 0.1% O₂ (Figure 6.B.).

Finally, we evaluated mPTP opening in HL-1 cells incubated in H buffer under normoxia or after 7 h of hypoxia using the cobalt-calcein fluorescence-quenching assay. When cells are loaded with calcein AM, the highly lipophilic dye diffuses in all cellular compartments including mitochondria. Addition of cobalt quenches cytoplasmic fluorescence but cobalt can't cross mitochondrial inner membrane which is impermeable to water and ions ; measured fluorescence represents only mitochondrial fluorescence. Ionomycin is an ionophore which cause a strong calcium influx in cell thus favours opening of mPTP. When the pore is open, cobalt can reach the mitochondrial matrix and quench all calcein fluorescence, the remaining fluorescence is considered as baseline.

When data were normalized to control conditions, we observed an increase of fluorescence after 7 h SI compared to normoxia ($209.0 \pm 28.2\%$ vs. $125.7 \pm 17.6\%$), indicating that hypoxia promoted mitochondrial calcium overload (Figure 7.A.). We also determined the mitochondrial calcium content in the presence or in absence of CsA, a potent inhibitor of mPTP opening and results were expressed as a ratio of CaCoCsA/CaCo. We showed that HL-1 cells exposed to hypoxia displayed a significantly lower ratio of CaCoCsA/CaCo compared to cells exposed to normoxia ($241.5 \pm 22.0\%$ for hypoxia vs. $351.8 \pm 49.9\%$ for normoxia) (Figure 7.B.).

Discussion

The goal of our study was to setup an in vitro model to mimic heart lesions induced by I/R to further study mitochondrial dysfunctions.

To reproduce ischemia, we performed preliminary experiments with different protocols (buffer bubbled with nitrogen, systems producing anaerobic conditions, hypoxic chamber) during different times, but we obtained reliable data only with the hypoxic chamber where oxygen concentration was

maintained at 0.1% ; in such conditions, we were able to observe cell death evidenced by LDH release. Experiments were also conducted in this apparatus but under 1% of oxygen during 14 h but we didn't observe any significant cell death (data not shown). While most of studies of hypoxia on the HL-1 cell line were conducted under a low oxygen concentration (0.1-0.4%) (see for example Streng et al., 2014, Kuznetsov et al., 2015), others studied the impact of hypoxia after 2 h using 1% of oxygen concentration (Munk et al., 2012); however, in such condition the cell death was not evaluated.

To reproduce pathological background observed during ischemia (nutrients and glucose deprivation, increase of potassium, proton excess, reduced oxygen), we optimized our experimental protocol in order to induce significant cell death during hypoxia. While very few data about disruption of ion and acid-base homeostasis in myocardium during AMI are available in literature, we designed our own hypoxic buffer and chose to equilibrate pH at 7.0, which correlates with recent studies (Schroeder et al., 2010, Duan et al., 2011). More acidic buffer can be used, but this could inhibit the formation and the opening of mPTP (see for review Ferdinandy et al., 2007) and thus cell death (Sarri et al., 2006). When incubating HL-1 cells in the H buffer under normoxia, we observed a limited toxicity by itself on mitochondrial network and the respiratory chain (data not shown). Anyway, we systematically compared data obtained from cells exposed to hypoxic H buffer with normoxic H buffer.

Some studies tried to mimic ischemia using chemical reagents such as cobalt chloride or deferoxamine (see for example Bartolome et al., 2009), but signaling pathways activated by these compounds may be different to those implicated during hypoxia ; furthermore, they can also induce additional metabolic disorders (Borcar et al., 2013). In our study, we tested dithionite to reduce dissolved dioxygen in our buffer, as described in literature (Cheng et al., 2008; Quayle et al., 2006), but we observed that this compound was toxic by itself on HL-1 cell line (data not shown). Although immortalized cells possess a number of disadvantages, they are the only cell lines able to substitute primary cardiomyocytes, which was not suitable for us due to the large amount of cells needed for our experiments. In order to choose the best cellular model, we compared two cell lines widely used in literature, mouse atrial cardiomyocytes that may spontaneously contract (HL-1 cells, Claycomb et al., 1998) and rat ventricular myoblasts (H9c2 cells, Hescheler et al., 1991) which both present a cardiac phenotype. From time-course studies of cell death, we showed that 14h hypoxia was able to promote about 60% of LDH release in the HL-1 cell line which is in good agreement with the decrease of cell viability by 70% observed by others as soon as 12 h of hypoxia in the same cell line (Åström-Olsson et al., 2012). In another study performed on HL-1 cells, hypoxia promoted LDH release from 5h (Streng et al., 2014), but the difference between cell death kinetics can be explained by the different buffers and apparatus used to promote hypoxia. Surprisingly, after 22h hypoxia we rather observed a decrease in LDH activity from the supernatant that could reflect a massive release of proteases, which could degrade proteins. Our results obtained on H9c2 cell line after SI are also consistent with literature data, notably with a recent work which reported about 30% decrease of H9c2 viability after 16h at 0.4% O₂ (Kuznetsov et al., 2015). However, others found that 4h hypoxia was enough to reduce significantly but modestly (20%) H9c2 viability (Liang et al., 2015) ; again, this variability can be due to different experimental protocols. It is important to point out that long durations of SI are required to trigger cell death in both cell lines in vitro ; this is highly different from short time periods of ischemia that provoke irreversible lesions in human. Such differences are probably linked to a lower aerobic metabolism of immortalized cell lines than myocardium. It has notably been shown that neonatal cells, such as HL-1 cells, are more dependent on cytoplasmic sources of ATP (glycolysis) than adult cells such as H9c2 cells (Milerova et al., 2010) and thus are more resistant to hypoxia. This could explain the quite different cell death time-course during SI : cell

death occur abruptly between 10 and 14 h of SI in H9c2 cells, whereas in HL-1 cell line, we observed a gradual loss of cell viability from 10 to 20 h.

Even if cell death reached the same extent in both cell lines after 14 h, we observed significant additional lesions upon reoxygenation in H9c2 cells but not in HL-1 cell line. This could limit the relevance of our experimental model and conditions since myocardial reperfusion is known to contribute to substantial proportion of heart damages (see for review Hausenloy and Yellon, 2013). Reperfusion-induced cell death has been evidenced in HL-1 cells but cell viability is assessed only at the end of H/R protocols and not at the end of hypoxia (see for example Shao et al., 2015). Thus, in those conditions it's difficult to precisely know the proportion of dead cells due to reperfusion. While we evidenced additional cell death after reoxygenation in H9c2 cell line and that some existing data suggest that this cellular model could be more suitable for studying H/R lesions mechanisms (Kuznetsov et al., 2015), further experiments in our study were only conducted on the HL-1 cell line because of its preserved cardiac phenotype and technical problems on the H9c2 cells.

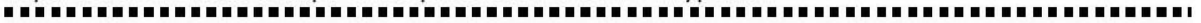
Different types of cell death, that are not exclusive, were reported following hypoxia or simulated ischemia : necrosis, apoptosis (see for review Lenihan and Taylor, 2013) and deregulated autophagy (see for review Fang et al., 2015). Hypoxia was also demonstrated to trigger apoptosis, evidenced by Annexin V/PI assay and/or caspase activity, in HL-1 cells after 16h (Robador et al., 2011) or 48h (Xiong et al., 2016) hypoxia under 1% oxygen concentration. However, it's worthy to note that even if this increase in apoptosis is statistically significant, it's quite modest (from 3 to ~ 15%). To get more insight about cell death mechanisms, we evaluated the implication of apoptosis using the pan caspase inhibitor Z-VAD-FMK. In double staining experiments and LDH analysis, we failed to observe apoptotic bodies or any impact of Z-VAD-FMK on cell death. Our data are in good agreement with the report of Zhang et al. (2015) who observed about 50% of PI positive HL-1 cells after 12h hypoxia and 1h reperfusion. Furthermore, we did not observe any activation of pro-caspase 3 either after 7 or 14h hypoxia whereas a massive cell death was evidenced by LDH release (about 60% of total LDH at 14h). Considering these results, we can reasonably affirm that apoptosis is not implicated in the development of cellular lesions observed in HL-1 cells after hypoxia.

As mitochondria play a central role in cell death induction and are subjected to dysfunctions upon hypoxia/ischemia, we focused on this organelle and studied their distribution within HL-1 cells and their functions following hypoxia. For a better insight about the mechanisms involved in mitochondrial dysfunctions, we selected two time points : 7 and 14h hypoxia where no significant and a massive cell death were observed, respectively.

Following 7h hypoxia, we observed a significant alteration of the mitochondrial network using the Mitotracker® Deep Red : the short rod-like shapes observed in non-treated cells were replaced by fragmented mitochondria as revealed by a punctuate distribution within the cytosol. Such dynamic change of the mitochondrial network is under control of numerous proteins (see for review (Wai and Langer, 2016) and dynamin-related protein 1 (Drp 1) was shown to play a major role in the transition between reticular to punctuate mitochondria phenotypes of neonatal cardiomyocytes during simulated ischemia (Din et al., 2013). Furthermore, Ong and colleagues (2010) showed that after 2h of simulated ischemia, HL-1 cells displayed fragmented mitochondria. Concomitantly, we evidenced that 7h hypoxia promoted a mitochondrial calcium overload revealed by an increase of fluorescence of the calcium probe calcein. An increase in cytosolic and mitochondrial calcium concentration is known to occur during ischemia in cardiomyocytes (Lemasters et al., 2009) and results from the decrease in ATP content, and consequently the reduction of Ca²⁺-dependent ATPase activities, and an increase in intracellular Na⁺ (Javadov et al., 2009). We can also suggest that transient opening of the mPTP could regulate calcium concentration within mitochondria as previously reported (Hüser and

Blatter, 1999). Indeed, when those experiments were conducted in the presence of CsA, a well-known mPTP inhibitor, we showed a major increase of calcein fluorescence in cells exposed to normoxic conditions. So, under hypoxia, which increases proton accumulation and consequently reduces transient mPTP opening, it's not surprising to observe calcium overload in mitochondria. Nevertheless, this rise in mitochondrial calcium concentration would be limited by the lowered mitochondrial $\Delta\Psi_m$. Indeed, we showed a partial decrease of TMRE fluorescence by 45% after 7h hypoxia since addition of the CCCP could further reduce $\Delta\Psi_m$. During hypoxia, the decrease in oxygen and substrates availability slows down the electron transfer, the proton pumping and promotes ATP depletion that can be exacerbated by the inverse mode of ATP synthase to avoid mitochondrial depolarization. In such conditions, ADP concentration increases and would act as an allosteric activator for cytochrome c oxidase and would explain why we failed to detect any alteration of the mitochondrial respiration rate after 7h hypoxia. During heart hypoxia/ischemia, $\Delta\Psi_m$ depolarization was demonstrated both in vitro (Zhang et al., 2015) and ex vivo (Sulkin et al., 2014). Decrease of $\Delta\Psi_m$ could result from other mechanisms : inhibition of mitochondrial fusion as demonstrated using a mitofusin double mutant (Chen and Chan, 2005) and also mPTP opening (see for review Halestrap et al., 2002). However, this latter is unlikely since hypoxia promoted a calcium overload without mitochondrial swelling. Following 7h hypoxia, the mitochondrial respiration rate was not affected. This could be explained by limited damages to respiratory chain complexes that are in excess and the decrease in $\Delta\Psi_m$ that stimulates the substrates oxidation and the O₂ consumption (Brand and Nicholls, 2011). Limited hypoxia was also demonstrated to increase ATP synthase activity to maintain adequate ATP production by the expression of the hypoxia-inducible protein G0/G1 switch gene 2 (G0s2) (Kioka et al., 2014).

Interestingly, when hypoxia was prolonged until 14h we observed additional mitochondrial dysfunctions. While we didn't evidence significant difference in $\Delta\Psi_m$ between 7 and 14h hypoxia, CCCP didn't further decrease the membrane potential anymore after 14h hypoxia indicating that mitochondria were totally depolarized. In this situation, we should have expected an increase in respiration rate to restore the mitochondrial membrane potential. However, we rather observed a strong decrease in respiration rate when using various energy substrates that are oxidized by different pathways. A similar decrease in oxygen consumption but to a lower extent was also demonstrated after 12h hypoxia (Zhang et al., 2015). Since we evidenced a mitochondrial calcium overload after 7h hypoxia, we can suppose that this situation would activate calpains. Those calcium-dependent cytosolic cysteine proteases would play a major role in myocardial lesions upon ischemia/hypoxia (see for review (Neuhof and Neuhof, 2014). We can suppose that after 14h hypoxia calpains would have damaged the respiratory chain complexes as previously demonstrated in an isolated rabbit heart model subjected to a global ischemia (Neuhof et al., 2003). ROS generation is generally reported to occur during reperfusion/reoxygenation but in our experimental model and conditions, we rather observed a strong superoxide production after 14h hypoxia. As we employed a mitochondrial-targeted fluorescence probe for superoxide anion, we can reasonably assume that ROS production is mediated by mitochondria. When HL-1 cells were exposed to the complex I inhibitor rotenone to enhance ROS production, we observed a colocalization of the fluorescence probes MitoSOX™ and Mitotracker® indicating a mitochondrial ROS production (supplemental data 3). However, Näpänkangas et al., 2012 showed that the increase of ROS formation during hypoxia/ischemia using dihydroethidine is due to a release from depolarized mitochondria. If such a situation would have occurred in our conditions, we should have also observed ROS formation after 7h hypoxia; but this was not the case. Using experimental conditions close to ours (HL-1 cells, the ROS fluorescent probe MitoSOX™ but with a different hypoxic buffer), Zhang et al., 2015 also reported an increase in superoxide production after 12h hypoxia.



Conclusion

When subjecting HL-1 cells to different periods of hypoxia we observed gradual mitochondrial dysfunctions and cellular damages (Figure 8) : a decrease of $\Delta\Psi$ and calcium overload associated with a disruption of the mitochondrial network. When hypoxia was prolonged, we showed mitochondrial depolarization, increase of ROS production, a decrease of ETC activity associated with a massive cell death by necrosis. In conclusion, our results indicate that the HL-1 cell line is a relevant model in which we can recapitulate in vitro some deleterious events responsible for cell death upon heart ischemia

Acknowledgements

We would like to thank Nicolas Elie (Centre de Microscopie Appliquée à la BIOlogie, Université de Caen, France), Maryline Guillamin (BioTICLA, UMR INSERM 1199, France) for technical assistance concerning respectively confocal microscopy and flow cytometry. We also thank Dr Laurent Poulain (BioTICLA, UMR INSERM 1199, France) for access to fluorescence microscope and Pr William Claycomb (Department of Biochemistry and Molecular Biology, LSU Health Sciences Center, New Orleans, LA, USA) for providing HL-1 cell line and detailed protocol for cell culture. Pr Puddu for his critical reading of the manuscript.

Conflicts of interest

On behalf of all authors, I, as the corresponding author, declare that there is no conflict of interest.

Bibliography

- Åström-Olsson, K., Li, L., Olofsson, C.S., Borén, J., Öhlin, H., and Grip, L. (2012). Impact of hypoxia, simulated ischemia and reperfusion in HL-1 cells on the expression of FKBP12/FKBP12.6 and intracellular calcium dynamics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **422**, 732–738.
- Bartolome, S., Dhillon, N.K., Buch, S., Casillan, A.J., Wood, J.G., and O'Brien-Ladner, A.R. (2009). Deferoxamine mimics the pattern of hypoxia-related injury at the microvasculature. *Shock Augusta Ga* **31**, 481–485.
- Bernardi, P., and Di Lisa, F. (2015). The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **78**, 100–106.
- Borcar, A., Menze, M.A., Toner, M., and Hand, S.C. (2013). Metabolic preconditioning of mammalian cells: mimetic agents for hypoxia lack fidelity in promoting phosphorylation of pyruvate dehydrogenase. *Cell Tissue Res.* **351**, 99–106.
- Brand, M.D., and Nicholls, D.G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* **435**, 297–312.
- Brooks, M.J., and Andrews, D.T. (2013). Molecular mechanisms of ischemic conditioning: translation into patient outcomes. *Future Cardiol.* **9**, 549–568.
- Chen, H., and Chan, D.C. (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum. Mol. Genet.* **14 Spec No. 2**, R283-289.

- Cheng, Y., Gu, X.Q., Bednarczyk, P., Wiedemann, F.R., Haddad, G.G., and Siemen, D. (2008). Hypoxia increases activity of the BK-channel in the inner mitochondrial membrane and reduces activity of the permeability transition pore. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *22*, 127–136.
- Claycomb, W.C., Lanson, N.A., Stallworth, B.S., Egeland, D.B., Delcarpio, J.B., Bahinski, A., and Izzo, N.J. (1998). HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 2979–2984.
- Din, S., Mason, M., Völkens, M., Johnson, B., Cottage, C.T., Wang, Z., Joyo, A.Y., Quijada, P., Erhardt, P., Magnuson, N.S., et al. (2013). Pim-1 preserves mitochondrial morphology by inhibiting dynamin-related protein 1 translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 5969–5974.
- Duan, X., Ji, B., Yu, K., Liu, J., Hei, F., and Long, C. (2011). Acidic buffer or plus cyclosporine a postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury. *Perfusion*.
- Fang, Y., Tan, J., and Zhang, Q. (2015). Signaling pathways and mechanisms of hypoxia-induced autophagy in the animal cells. *Cell Biol. Int.*
- Ferdinandy, P., Schulz, R., and Baxter, G.F. (2007). Interaction of Cardiovascular Risk Factors with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, Preconditioning, and Postconditioning. *Pharmacol. Rev.* *59*, 418–458.
- Garcia-Dorado, D., and Piper, H.M. (2006). Postconditioning: reperfusion of “reperfusion injury” after hibernation. *Cardiovasc. Res.* *69*, 1–3.
- Garlid, K.D., Costa, A.D.T., Quinlan, C.L., Pierre, S.V., and Dos Santos, P. (2009). Cardioprotective signaling to mitochondria. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *46*, 858–866.
- Gomez, L., Paillard, M., Thibault, H., Derumeaux, G., and Ovize, M. (2008). Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation* *117*, 2761–2768.
- Halestrap, A.P. (1994). Regulation of mitochondrial metabolism through changes in matrix volume. *Biochem. Soc. Trans.* *22*, 522–529.
- Halestrap, A.P., McStay, G.P., and Clarke, S.J. (2002). The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* *84*, 153–166.
- Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2004). New Directions for Protecting the Heart Against Ischaemia–reperfusion Injury: Targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-Pathway. *Cardiovasc. Res.* *61*, 448–460.
- Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2009). Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis* *204*, 334–341.
- Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* *123*, 92–100.
- Hescheler, J., Meyer, R., Plant, S., Krautwurst, D., Rosenthal, W., and Schultz, G. (1991). Morphological, Biochemical, and Electrophysiological Characterization of a Clonal Cell (H9c2) Line from Rat Heart. *Circ. Res.* *69*, 1476–1486.

- Hüser, J., and Blatter, L.A. (1999). Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore. *Biochem. J.* *343 Pt 2*, 311–317.
- Inagaki, K., Churchill, E., and Mochly-Rosen, D. (2006). Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart. *Cardiovasc. Res.* *70*, 222–230.
- Javadov, S., Karmazyn, M., and Escobales, N. (2009). Mitochondrial permeability transition pore opening as a promising therapeutic target in cardiac diseases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *330*, 670–678.
- Kalogeris, T., Bao, Y., and Korthuis, R.J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol.* *2*, 702–714.
- Kioka, H., Kato, H., Fujikawa, M., Tsukamoto, O., Suzuki, T., Imamura, H., Nakano, A., Higo, S., Yamazaki, S., Matsuzaki, T., et al. (2014). Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 273–278.
- Krolikowski, J.G., Weihrauch, D., Bienengraeber, M., Kersten, J.R., Wartier, D.C., and Pagel, P.S. (2006). Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo. *Can. J. Anaesth. J. Can. Anesth.* *53*, 174–182.
- Kuznetsov, A.V., Javadov, S., Sickinger, S., Frotschnig, S., and Grimm, M. (2015). H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochim. Biophys. Acta* *1853*, 276–284.
- Lemasters, J.J., Theruvath, T.P., Zhong, Z., and Nieminen, A.-L. (2009). Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim. Biophys. Acta* *1787*, 1395–1401.
- Lenihan, C.R., and Taylor, C.T. (2013). The impact of hypoxia on cell death pathways. *Biochem. Soc. Trans.* *41*, 657–663.
- Lønborg, J., Vejlsstrup, N., Kelbæk, H., Holmvang, L., Jørgensen, E., Helqvist, S., Saunamäki, K., Ahtarovski, K.A., Bøtker, H.E., Kim, W.Y., et al. (2013). Final infarct size measured by cardiovascular magnetic resonance in patients with ST elevation myocardial infarction predicts long-term clinical outcome: an observational study. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging* *14*, 387–395.
- Luedde, M., Lutz, M., Carter, N., Sosna, J., Jacoby, C., Vucur, M., Gautheron, J., Roderburg, C., Borg, N., Reisinger, F., et al. (2014). RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* *103*, 206–216.
- Milerova, M., Charvatova, Z., Skarka, L., Ostadalova, I., Drahotka, Z., Fialova, M., and Ostadal, B. (2010). Neonatal cardiac mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Mol. Cell. Biochem.* *335*, 147–153.
- Munk, M., Memon, A.A., Goetze, J.P., Nielsen, L.B., Nexø, E., and Sørensen, B.S. (2012). Hypoxia changes the expression of the epidermal growth factor (EGF) system in human hearts and cultured cardiomyocytes. *PLoS One* *7*, e40243.
- Murphy, E., and Steenbergen, C. (2011). What makes the mitochondria a killer? Can we condition them to be less destructive? *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 1302–1308.
- Murry, C.E., Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with Ischemia: A Delay of Lethal Cell Injury in Ischemic Myocardium. *Circulation* *74*, 1124–1136.

- Näpänkangas, J.P., Liimatta, E.V., Joensuu, P., Bergmann, U., Ylitalo, K., and Hassinen, I.E. (2012). Superoxide production during ischemia-reperfusion in the perfused rat heart: a comparison of two methods of measurement. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *53*, 906–915.
- Nemchenko, A., Chiong, M., Turer, A., Lavandero, S., and Hill, J.A. (2011). Autophagy as a therapeutic target in cardiovascular disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *51*, 584–593.
- Neuhof, C., and Neuhof, H. (2014). Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury. *World J. Cardiol.* *6*, 638–652.
- Neuhof, C., Götte, O., Trumbeckaite, S., Attenberger, M., Kuzkaya, N., Gellerich, F., Möller, A., Lubisch, W., Speth, M., Tillmanns, H., et al. (2003). A novel water-soluble and cell-permeable calpain inhibitor protects myocardial and mitochondrial function in postischemic reperfusion. *Biol. Chem.* *384*, 1597–1603.
- Petronilli, V., Miotto, G., Canton, M., Brini, M., Colonna, R., Bernardi, P., and Di Lisa, F. (1999). Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys. J.* *76*, 725–734.
- Quayle, J.M., Turner, M.R., Burrell, H.E., and Kamishima, T. (2006). Effects of hypoxia, anoxia, and metabolic inhibitors on KATP channels in rat femoral artery myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *291*, H71-80.
- Robador, P.A., San José, G., Rodríguez, C., Guadall, A., Moreno, M.U., Beaumont, J., Fortuño, A., Díez, J., Martínez-González, J., and Zalba, G. (2011). HIF-1-mediated up-regulation of cardiotrophin-1 is involved in the survival response of cardiomyocytes to hypoxia. *Cardiovasc. Res.* *92*, 247–255.
- Saotome, M., Katoh, H., Satoh, H., Nagasaka, S., Yoshihara, S., Terada, H., and Hayashi, H. (2005). Mitochondrial membrane potential modulates regulation of mitochondrial Ca²⁺ in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *288*, H1820-1828.
- Sarri, E., Garcia-Dorado, D., Abellan, A., and Soler-Soler, J. (2006). Effects of hypoxia, glucose deprivation and acidosis on phosphatidylcholine synthesis in HL-1 cardiomyocytes. CTP:phosphocholine cytidyltransferase activity correlates with sarcolemmal disruption. *Biochem. J.* *394*, 325–334.
- Schroeder, M.A., Swietach, P., Atherton, H.J., Gallagher, F.A., Lee, P., Radda, G.K., Clarke, K., and Tyler, D.J. (2010). Measuring intracellular pH in the heart using hyperpolarized carbon dioxide and bicarbonate: a ¹³C and ³¹P magnetic resonance spectroscopy study. *Cardiovasc. Res.* *86*, 82–91.
- Shao, J., Peng, Y., Wang, L., Wang, J., and Chen, X. (2015). Activation of SphK1 by K6PC-5 Inhibits Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation-Induced Myocardial Cell Death. *DNA Cell Biol.* *34*, 669–676.
- Streng, A.S., Jacobs, L.H.J., Schwenk, R.W., Cardinaels, E.P.M., Meex, S.J.R., Glatz, J.F.C., Wodzig, W.K.W.H., and van Dieijen-Visser, M.P. (2014). Cardiac troponin in ischemic cardiomyocytes: intracellular decrease before onset of cell death. *Exp. Mol. Pathol.* *96*, 339–345.
- Sulkin, M.S., Boukens, B.J., Tetlow, M., Gutbrod, S.R., Ng, F.S., and Efimov, I.R. (2014). Mitochondrial depolarization and electrophysiological changes during ischemia in the rabbit and human heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *307*, H1178-1186.

Van Laer, L., Vrijens, K., Thys, S., Van Tendeloo, V.F.I., Smith, R.J.H., Van Bockstaele, D.R., Timmermans, J.-P., and Van Camp, G. (2004). DFNA5: hearing impairment exon instead of hearing impairment gene? *J. Med. Genet.* *41*, 401–406.

Vinten-Johansen, J., Zhao, Z.-Q., Zatta, A.J., Kin, H., Halkos, M.E., and Kerendi, F. (2005). Postconditioning--A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res. Cardiol.* *100*, 295–310.

Wai, T., and Langer, T. (2016). Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* *TEM 27*, 105–117.

Whelan, R.S., Kaplinskiy, V., and Kitsis, R.N. (2010). Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 19–44.

Xiong, H., Luo, T., He, W., Xi, D., Lu, H., Li, M., Liu, J., and Guo, Z. (2016). Up-regulation of miR-138 inhibits hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis via down-regulating lipocalin-2 expression. *Exp. Biol. Med.* *Maywood NJ 241*, 25–30.

Zhang, P., Lu, Y., Yu, D., Zhang, D., and Hu, W. (2015). TRAP1 Provides Protection Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Ameliorating Mitochondrial Dysfunction. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *36*, 2072–2082.

Figure legends

Figure 1. Cell death induced by SI/R in HL-1 and H9c2 cells

A. and C. Equal quantity of HL-1 cells (A., plain bars) or H9c2 cells (C., open bars) were seeded in 6-well plates and placed in hypoxic (H) buffer under normoxia (control cells) or hypoxia for 4 to 22 h. For each time, LDH activity was determined in the supernatant. Differences between values obtained in hypoxic and normoxic cells were calculated and normalized to maximal release.

B. and D. HL-1 cells (B., plain bars) or H9c2 cells (D., open bars) were placed in hypoxia or normoxia (control cells) for 14 h. Then, Tyrode replaced the H buffer and cells were incubated for 1 to 10 h in a normoxic atmosphere. Supplemental release of LDH was measured between hypoxic and control cells and results were normalized to values obtained after 14 h of hypoxia.

Data are the means \pm S.E.M. of 3 independent experiments performed in triplicate. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, [§], $p < 0,05$ compared to 20 h of hypoxia, one-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

Figure 2. Study of cell death following 14 h of SI in HL-1 cells

A. HL-1 cells were exposed either to normoxia or SI for 14 h in presence or in absence of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Z-VAD-FMK, stained both with Hoechst 33342 (blue) and EB (orange), then observed by fluorescence microscopy at a 40x lens (scale bar : 25 μm). Images were merged after treatment by ImageJ software ; presented images are representative of 3 independent experiments.

B. Cell death was measured both by LDH release (normalized to total LDH, left ordinate axis, white bars) and by count of dead cells after Hoechst 33342 / EB double staining (cell death expressed as a percentage of cells with intense EB nuclear staining on total cells count, right ordinate axis, black bars).

C. Cleavage and activation of pro-caspase 3 was determined by western blot as described in material and methods section. Results are expressed as ratios of pro-caspase 3 / β -actin, and normalized to those obtained in control cells. A representative pro-caspase 3 and β -actin western blot is shown.

Data are the means \pm S.E.M. of 3 independent experiments. n.s., non significant ; ** and ^{§§}, $p < 0,01$ compared to control cells with or without Z-VAD-FMK, one-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

Figure 3. Modification of mitochondrial network in HL-1 cells following SI

Cells were incubated for 7 h in H buffer either under normoxia (control cells, A) or under hypoxia (B), then mitochondria were visualized after Mitotracker[®] Deep Red staining. Images were obtained after 9 minutes of incubation by confocal microscopy at a 60x lens (top, scale bar : 30 μm) and magnified 3 times (bottom, scale bar : 10 μm). Data are representative of 3 independent experiments.

Figure 4. Measurement of $\Delta\Psi_m$ in HL-1 cells following SI

HL-1 cells were incubated in H buffer under normoxia (control cells) or hypoxia for 7 or 14 h. $\Delta\Psi_m$ was measured spectrofluorimetrically using TMRE in presence or in absence of the uncoupling agent

CCCP. Results are normalized to values obtained in control cells for each duration of hypoxia (7 h : white bars, 14 h : black bars).

Data are the means \pm S.E.M. of 3 independent experiments, *** and ^{sss}, p<0,001 compared to control cells for each duration of hypoxia, n.s., non significant variation, one-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

Figure 5. Measurement of oxygen consumption in HL-1 cells following SI

HL-1 cells were incubated for 14 h in H buffer under normoxia (control cells, white bars) or under hypoxia (black bars). Oxygen consumption by mitochondrial respiratory chain in the presence of different substrates was recorded on digitonin-permeabilized cells using a Clark electrode.

Data are the means \pm S.E.M. of 4 independent experiments, *, p<0,05, **, p<0,01, ***, p<0,001 compared to control cells, two-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

Figure 6. Measurement of ROS production in HL-1 cells following SI

A. HL-1 cells were incubated with Mitotracker[®] Deep Red (red fluorescence) and MitoSOX[®] (green fluorescence) then treated with rotenone for various times. Cells were observed by fluorescence microscopy at a 60x lens (scale bar : 30 μ m) ; presented images are representative of 3 independent experiments.

Images were merged after treatment by ImageJ software, a yellow merge indicates co-localization of Mitotracker[®] Deep Red and MitoSOX[®]; presented images are representative of 3 independent experiments.

B. HL-1 cells were incubated in H buffer under normoxia (control cells) or under hypoxia for 7 or 14 h. ROS production was measured using MitoSOX[®] Red. Fluorescence was measured spectrofluorimetrically and results were normalized to values obtained in control cells for each duration of hypoxia (7 h : white bars, 14 h : black bars).

Data are the means \pm S.E.M. of 3 independent experiments, **, p<0,01 compared to control cells, n.s., non significant variation, one-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

Figure 7. Evaluation of mPTP opening and calcium flux in HL-1 cells following SI

HL-1 cells were incubated for 7 h in H buffer under normoxia (control cells) or under hypoxia in H buffer. We performed two sets of experiments in the presence (B.) or in the absence (A.) of cyclosporin A. Calcein AM (Ca) fluorescence for each condition was determined by flow cytometry. Mitochondria specific fluorescence was determined using CoCl₂ (which quenches calcein fluorescence except in mitochondria) and 100 μ M ionomycin to determinate the fluorescence baseline. A. Results were normalized to those obtained in control cells. B. Results are expressed as the percentage of the ratio between cells exposed to calcein, cobalt and cyclosporine A (CaCoCsA) and cells exposed to calcein and cobalt (CaCo).

Data are the means \pm S.E.M. of 5 independent experiments, *, p<0,05 and **, p<0,01, paired t-test.

Figure 8. A recapitulative scheme of cellular and mitochondrial dysfunctions occurring during SI of HL-1 cells.

Supplemental data 1. Measurement of oxygen consumption in HL-1 cells following SI

HL-1 cells were incubated for 7 h in H buffer under normoxia (control cells, white bars) or under hypoxia (black bars). Oxygen consumption by mitochondrial respiratory chain in the presence of different substrates was recorded on digitonin-permeabilized cells using a Clark electrode.

Data are the means \pm S.E.M. of 3-4 independent experiments, n.s., non-significant variation compared to control cells, two-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

Figure 1

Figure 1. Nowoczyn et al.

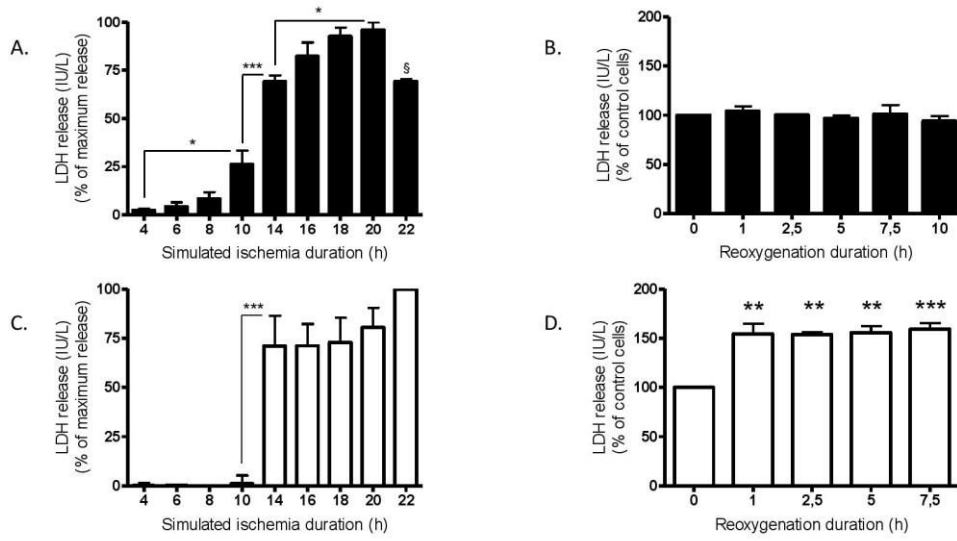


Figure 2A

Figure 2. Nowoczyn et al.

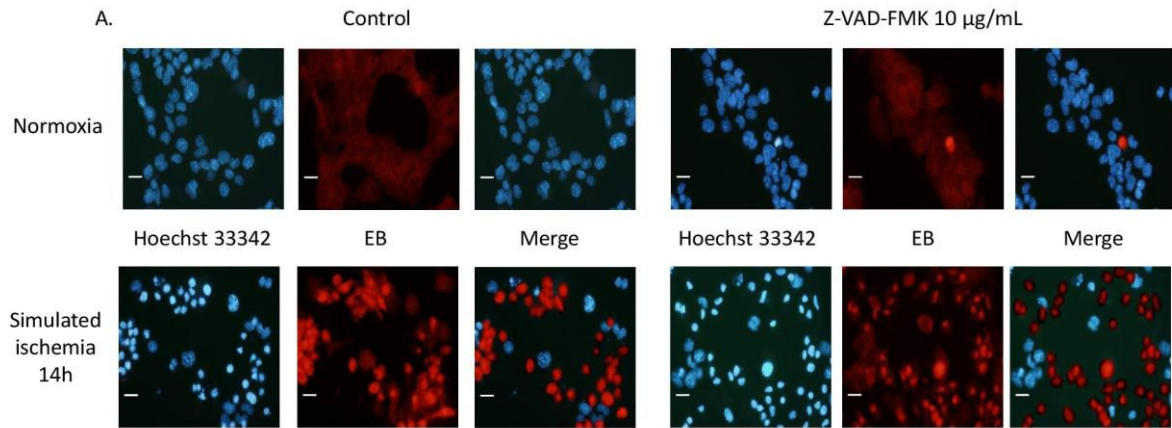


Figure 2B
 Figure 2. Nowoczyn et al.

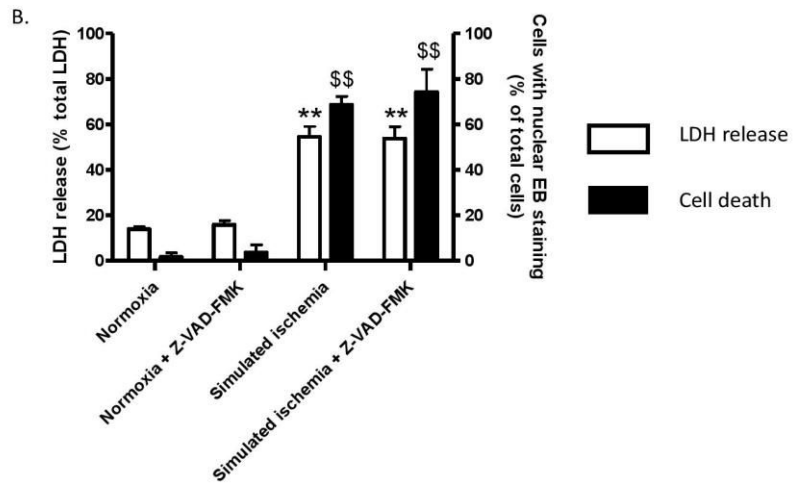


Figure 2C
 Figure 2. Nowoczyn et al.

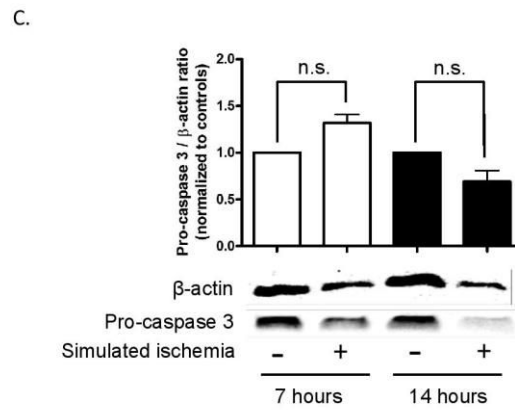


Figure 3

Figure 3. Nowoczyn et al.

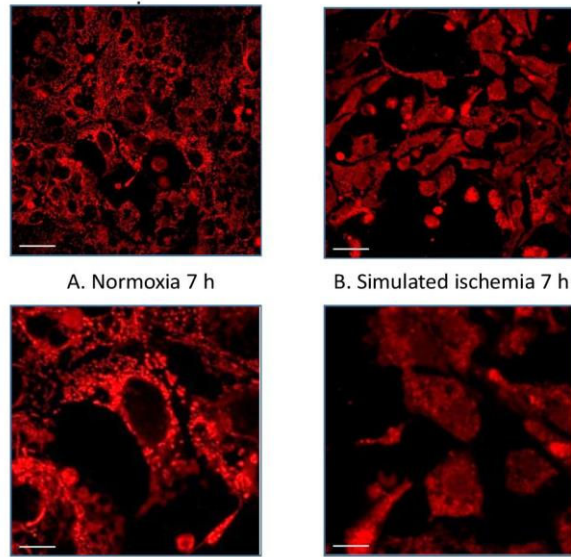


Figure 4

Figure 4. Nowoczyn et al.

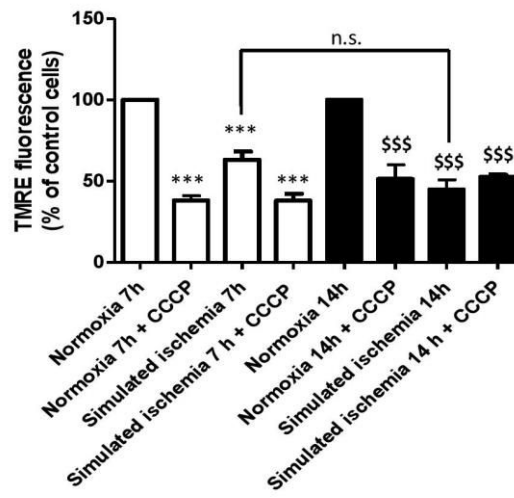


Figure 5

Figure 5. Nowoczyn et al.

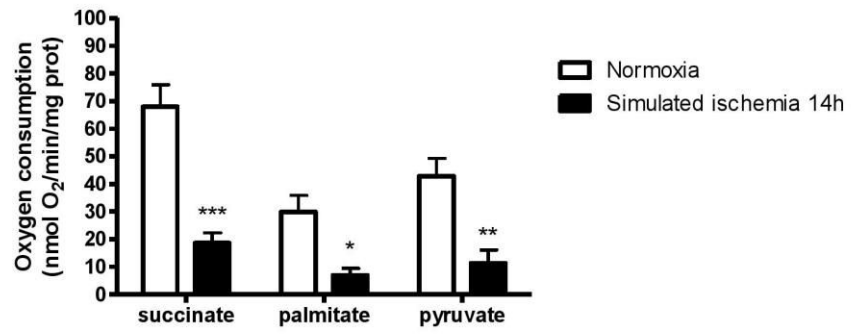


Figure 6

Figure 6. Nowoczyn et al.

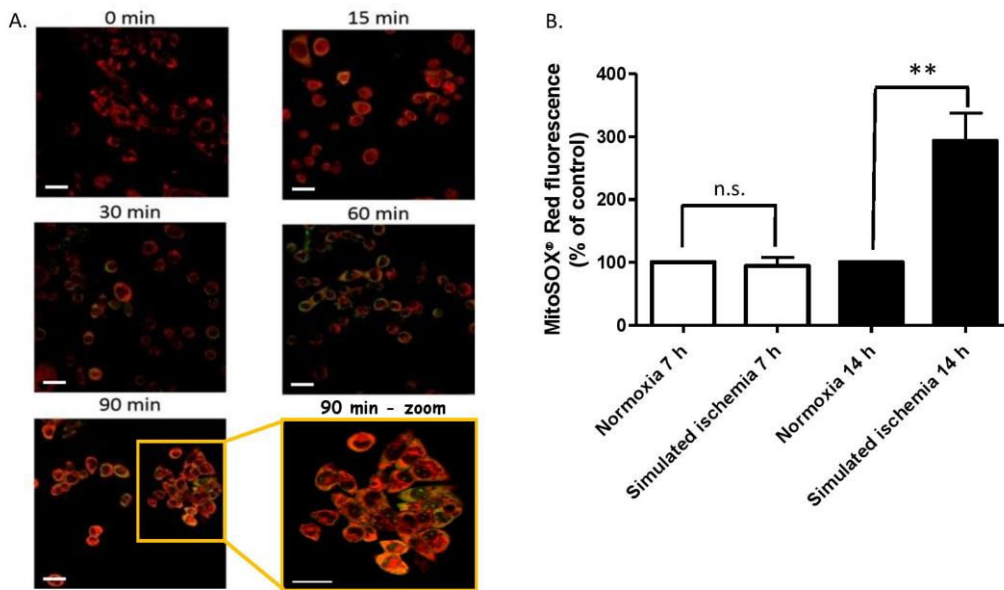


Figure 7
Figure 7. Nowoczyn et al.

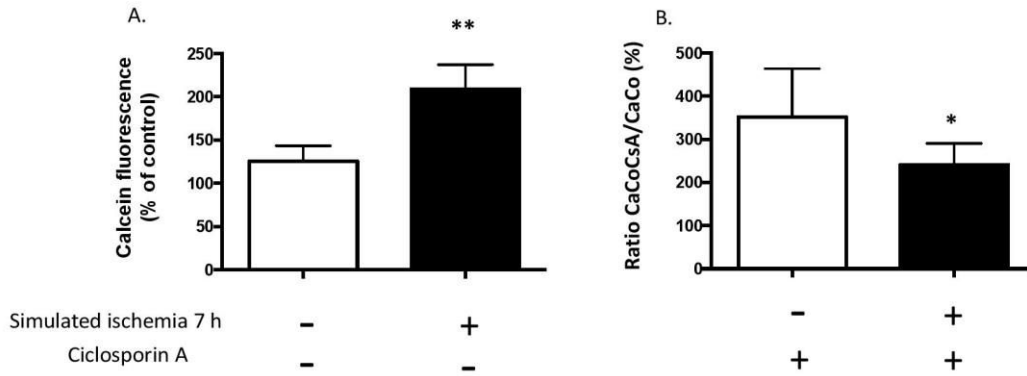
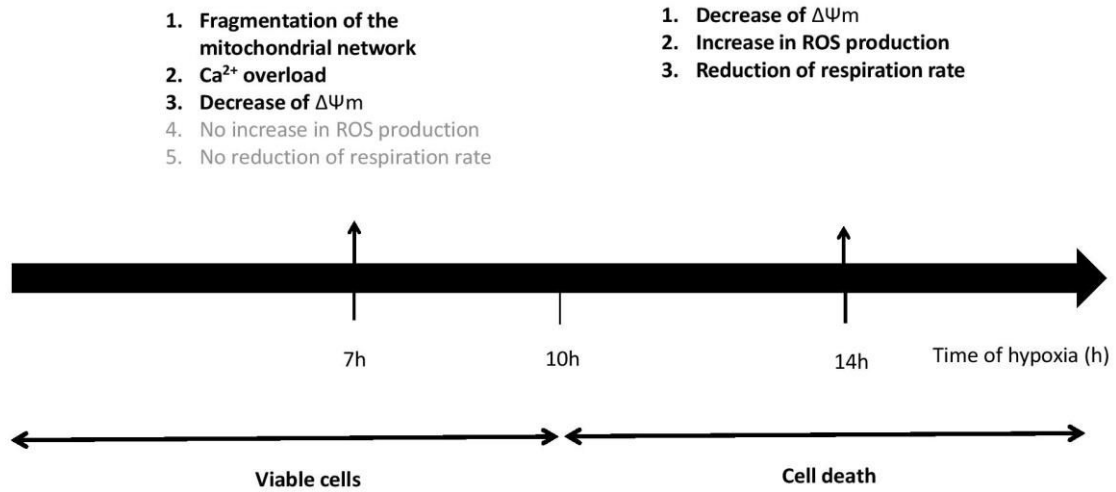


Figure 8
Figure 8. Nowoczyn et al.



Curriculum Vitae

Patrick MORDEL

12 place de la Mare – 14000 Caen
06 87 45 91 94
patrick.mordel1@gmail.com
26 ans

Expériences professionnelles :

Janvier 2015-aujourd'hui	- Doctorant au laboratoire EA4650, Université Caen Normandie (UCN). Impact de la variabilité glycémique sur les fonctions mitochondriales cardiaques : étude cellulaire sur la lignée HL-1. Directeur de thèse : Pr. Stéphane Allouche - Encadrement de travaux pratiques Physiologie animale (64 heures). Niveau Licence 2. - Encadrement d'étudiants en stage de Master 1 et Licence 3
Septembre-Décembre 2014	Equipier polyvalent McDonald's.
Janvier-Juin 2014	Master 2 Recherche : Exposition de cardiomyocytes à différentes concentrations en glucose : Impact de la variabilité d'exposition sur la fonction mitochondriale et la cardioprotection in vitro. EA4650, UCN, encadré par Pr. Stéphane Allouche
Juillet 2012 et juillet 2013	Auxiliaire de bureau à la Trésorerie de l'office HLM d'Argenteuil.
Mai-Juin-Août 2011	Stage de Licence : Etude de l'expression de la protéine MgcRacGAP dans le testicule chez le modèle murin, Institut Cochin, département Génétique et Développement, encadré par Pr. Aminata Touré
Août 2009 et août 2010	Auxiliaire de bureau à la Trésorerie de Corneilles-en-Parisis.

Formations et diplômes :

2013-2014	Master 2 Recherche Physiologie, Immunité, Différenciation, Génétique, parcours Physiopathologie des grands systèmes, UCN. Mention Bien.
2012-2013	Master 1 Biochimie Biologie cellulaire, Université de Cergy-Pontoise (UCP).
2009-2012	Licence de Biologie Biochimie et Biologie cellulaire, UCP.

Formations suivies :

Formation à la mission d'enseignement (5 jours) ,2016.
Diplôme Universitaire d'Expérimentation Animale (10 jours), 2015.
Formation théorique et pratique à l'utilisation du cytomètre Gallios, 2016
Module «Gérer les flux d'informations, Initiation logiciel gestion de références bibliographiques Zotero» (6 heures).
Module «Règles et techniques de rédaction, création et structuration des documents scientifiques» (12 heures).
Module «Règles de publication de documents scientifiques » (12 heures).
Module «Recherche d'emploi, insertion professionnelle, e-recrutement sur le marché du travail» (15 heures).
Module «Financement et management de projets de recherche» (12 heures).

Compétences techniques :

Biochimie	Extraction protéique, électrophorèse, western-blotting, polarographie, dosages enzymatique par spectrophotométrie, purification de mitochondries.
Biologie cellulaire	Culture de lignées cellulaires, hypoxie cellulaire, spectrométrie.
Biologie moléculaire	Purification d'ADN, Polymerase Chain Reaction, design d'amorces.
Immunologie	Immunofluorescence (coupes paraffine, cryocoupes), immunocytochimie.
Microscopie	Microscopie confocale, épifluorescence.
Langues	Anglais scientifique, allemand scolaire
Informatique	Pack Office, Zotero, ImageJ, GraphPad Prism

Publications scientifiques

Article accepté :

Mordel P, Schaeffer S, Dupas Q, Laville M, Gérard M, Chapon F Allouche S. A 2 bp deletion in the mitochondrial ATP 6 gene responsible for the NARP (Neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa) syndrome. Biochemical and Biophysical Research Communications

Article soumis :

Mordel P, Dupas Q, Joubert M, Allouche S. Glucose fluctuation promotes mitochondrial dysfunctions in the cardiomyocyte cell line HL-1.

Communication scientifique :

Communication orale : Effects of glucose fluctuations on cellular and mitochondrial functions in HL-1 cardiac cell line. 9th annual meeting of D&CVD 2016, Paris.

Communication sous forme de poster : - Mitochondrial dysfunctions upon glucose variability: an in vitro study on the HL-1 cardiac cell line. Congrès Meetochondrie 2017, Hossegor.

- Mitochondrial dysfunctions and signaling pathways upon glucose variability: an in vitro study on the HL-1 cardiac cell line. Printemps de la cardiologie 2017, Nantes.

- An in vitro model to study impact of glucose fluctuations on cellular and mitochondrial cardiac functions. Journées européennes de la Société Française de Cardiologie 2017, Paris.

- Impact des fluctuations en glucose sur les fonctions mitochondriales et cellulaires de cardiomyocytes. Journée de la recherche biomédicale normande 2016, Rouen.

- HL-1 cells : a cellular model to investigate cardioprotective mechanisms in ischemia/reperfusion context. Printemps de la cardiologie 2016, Dijon.

Centres d'intérêts :

Sports : Escalade (diplôme Initiateur SAE), slackline, cyclisme

Loisirs : jonglage, cinéma, jeux de société

Résumé/Abstract

Variabilité glycémique : exploration in vitro des fonctions cellulaires et mitochondriales sur la lignée de cardiomyocytes HL-1.

Le diabète est associé à une augmentation de risque de maladie cardiovasculaire et une dérégulation du métabolisme. Il a été suggéré que la variabilité glycémique (VG) pouvait avoir un rôle dans le développement des complications du diabète. Afin d'étudier et de caractériser les dysfonctions induites par la VG, nous avons mis au point un modèle in vitro mimant la VG sur la lignée de cardiomyocytes HL-1. Nous avons ainsi développé un traitement de 12 heures, mimant hypoglycémie, normoglycémie, hyperglycémie et VG. L'étude de la signalisation cellulaire par Western blot ne nous a pas permis de montrer un rôle délétère de la VG. Nous avons toutefois mis en évidence que la VG participait à des dysfonctions mitochondriales. En effet en situation de fluctuations en glucose, les mitochondries des cellules HL-1 présentent une augmentation de leur potentiel de membrane (évaluée par la fluorescence du TMRE), ainsi qu'une augmentation de la production d'anions superoxydes (évaluée par la fluorescence du MitoSOX). Bien que nous n'ayons pas réussi à montrer de perturbation de la chaîne respiratoire par polarographie ou de différence d'activité des complexes de la chaîne respiratoire par spectrophotométrie après 12 heures d'exposition, nous avons pu montrer que 72 heures d'exposition provoquaient une baisse de la respiration mitochondriale. Nous avons enfin étudié l'impact des fluctuations en glucose sur la susceptibilité au développement de lésions d'hypoxie, et avons montré que les lésions sont majorées après 36 heures d'hypoxie en cas d'exposition à des fluctuations en glucose. Nos résultats montrent un rôle délétère de la VG, néanmoins des expériences complémentaires sont nécessaires afin de caractériser de manière plus précise les mécanismes impliqués.

Mots clés : variabilité glycémique, mitochondrie, cardiomyocyte, hypoxie

Glycemic variability: in vitro exploration of mitochondrial and cellular functions on HL-1 cardiomyocyte cell line

Diabetes mellitus is associated with higher risk of cardiovascular disease and metabolism dysregulation. Glycemic variability (GV) has been suggested as a risk factor in diabetic complication. In order to characterize dysfunctions induced by GV, we developed an in vitro model that transpose GV on the cardiac cell line HL-1. We exposed our cells to a treatment of 12 hours miming hypoglycemia, normoglycemia, hyperglycemia and GV. The exploration of signaling pathways by Western blot didn't allow us to show a deleterious effect of glucose fluctuation. However we were able to point mitochondrial alteration under glucose fluctuation. HL-1 cells mitochondria exhibit a higher membrane potential (evaluated with TMRE fluorescent probe) and an increase of superoxide anion production (evaluated with MitoSOX fluorescent probe). Although we didn't show any alteration in mitochondrial respiration with polarography neither any alteration of respiratory chain complexes activity with spectrophotometry after 12 hours of exposition, we showed that after 72 hours of glucose fluctuation, HL-1 cells showed a decrease in mitochondrial respiration. We finally studied the impact of glucose fluctuation on the susceptibility to develop hypoxic injuries. We showed that after 36 hours of hypoxia, injuries were higher for cells exposed to glucose fluctuation. Our results indicate a deleterious effect of GV, but additional experiments are needed to better characterize the mechanisms.

Key words: glycemic variability, mitochondria, cardiomyocyte, hypoxia