



HAL
open science

Rôle de la Sélénoprotéine T dans le remodelage cardiaque post-infarctus et le développement de l'insuffisance cardiaque.

Ines Boukhalfa

► **To cite this version:**

Ines Boukhalfa. Rôle de la Sélénoprotéine T dans le remodelage cardiaque post-infarctus et le développement de l'insuffisance cardiaque.. Immunothérapie. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR107 . tel-01744180

HAL Id: tel-01744180

<https://theses.hal.science/tel-01744180>

Submitted on 27 Mar 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

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Physiologie et Biologie des Organismes – Populations - Interactions

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Rôle de la Sélénoprotéine T dans le remodelage cardiaque post-infarctus et le développement de l'insuffisance cardiaque

**Présentée et soutenue par
Inès Boukhalfa**

**Thèse soutenue publiquement le 14 décembre 2017 à 14h
devant le jury composé de**

Mme le Pr. Chantal GAUTHIER	PU – Université de Nantes	Rapporteur
M. le Dr. Claude DELCAYRE	DR – Université Paris 7	Rapporteur
Mme la Dr. Sandrine PONS	MCU – Université de Créteil	Examineur
M. le Dr. Youssef ANOUAR	DR – Université de Rouen Normandie	Examineur
M. le Pr. Vincent RICHARD	PU-PH – Université de Rouen Normandie	Directeur de laboratoire
M. le Pr. Paul MULDER	PU – Université de Rouen Normandie	Directeur de Thèse

**Thèse dirigée par le Pr. Paul MULDER, laboratoire Inserm U1096
Endothélium, Valvulopathies & Insuffisance Cardiaque.**



Je tiens en premier lieu à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse, **Mme le Pr. Chantal Gauthier, M. le Pr. Claude Delcayre, Mme la Dr. Sandrine Pons et M. le Pr. Youssef Anouar**. Je mesure pleinement l'honneur que vous me faites en acceptant de juger mon travail et je vous adresse mes plus sincères remerciements.

Avant de commencer à remercier l'ensemble des personnes qui, au quotidien, grâce à leur présence, leur savoir, leurs mots, et leurs choix, ont permis la réalisation de ce travail, quelques petites lignes s'imposent à moi. Il est vrai que je suis bavarde, et c'est une qualité (un défaut ?) que l'on ne peut retirer de ma personnalité, voire même de ma personne. Nul besoin de me connaître par cœur pour le deviner et je pense que ceci transparaîtra dans ce manuscrit. Alors par avance, je tiens à m'excuser pour les longues lignes que vous vous apprêtez à lire.

Par ces remerciements, je souhaite notamment faire paraître qu'un travail de thèse, en plus d'être un accomplissement professionnel, est un accomplissement personnel. Parce qu'un laboratoire, au quotidien, ce sont avant tout des personnes, avec qui nous vivons l'immense majorité de notre temps, et avec qui nous partageons, beaucoup, et même plus qu'on ne le pense. J'ai laissé beaucoup de ma personne durant ces six années passées à l'U1096. Je n'en garderai que d'excellents souvenirs, et je tiens tout d'abord à vous remercier tous, dans votre ensemble, pour m'avoir permis de me construire, de grandir, de m'épanouir, et de m'accomplir durant tout ce temps passé avec vous. Merci.

Tout d'abord, je tiens à remercier le **Pr. Vincent Richard**. Merci de m'avoir accueilli et de m'avoir permis de réaliser l'ensemble des défis que nous nous étions fixés, de nous avoir fait confiance dans notre folie avec Paul et d'avoir su nous épauler du mieux que tu pouvais, notamment en me permettant de présenter mon travail en congrès nationaux et internationaux. Je tiens également à te remercier pour m'avoir fait confiance dans l'organisation des réunions de laboratoire. J'y ai pris beaucoup de plaisir, et ça a permis à mon âme organisatrice de s'épanouir au quotidien.

Je tiens tout particulièrement à remercier **Pr. Paul Mulder**, mon directeur de thèse et ami. Merci pour ces années passées à travailler ensemble. C'est souvent avec le recul que l'on sait apprécier les vraies qualités des gens et plus le temps passe, plus je remarque que j'adore et ai adoré travailler avec toi. J'ai beaucoup apprécié notre complicité dans ce travail, et l'énergie que nous y avons déployé. Merci également de m'avoir fait confiance, d'avoir su déléguer, d'avoir su m'épauler et me guider dans mes choix, qu'ils soient quotidiens ou tournés vers le futur. Je te remercie aussi pour ta bonne humeur et ta gaieté quotidienne, nos caractères optimistes ont bien su se rencontrer !

De plus, j'aimerais remercier le **Dr. Antoine Ouvrard-Pascaud** sans qui je n'aurais probablement jamais touché une pipette de ma vie ! Merci de m'avoir permis de faire mes premiers pas dans la recherche, dès la Licence 3 ; merci de m'avoir donné goût à ce métier, et de m'avoir poussé à réaliser ma thèse, et avec Paul en plus ! Je tiens également à te remercier pour toute l'aide dans la réalisation de mon projet. Tu n'étais jamais très loin, et tu as su m'écouter et m'épauler durant tout mon parcours. Bien évidemment, je tiens à te remercier pour ta confiance, notamment dans les projets collaboratifs, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi.

Je souhaiterais également remercier le **Dr. Ebba Brakenhielm** pour son savoir incroyable, son dynamisme, sa dévotion à la science et bien sûr son énergie débordante et contagieuse. Merci d'être si optimiste et de croire en le pouvoir fabuleux de la science. C'est un réel bonheur de travailler à tes côtés, tu représentes une mine d'or d'informations et de culture et j'ai beaucoup appris en travaillant avec toi. Je tiens tout particulièrement à te remercier pour la confiance que tu m'as accordée à la fois pour les projets d'Orianne et de Mahmoud. C'était un réel honneur et bonheur de travailler pour ton équipe et j'en garderai d'excellents souvenirs !

Merci également à tous les chercheurs de l'U1096, qui, grâce à leur présence, apportent une âme si particulière à ce laboratoire. Merci au **Pr. Dominique Guerrot**, au **Pr. Jérémy Bellien** et au **Dr. Sylvain Fraisneau**. Je tiens infiniment à remercier le **Pr. Christian Thuillez**, pour ses attentions à chacune de nos rencontres. Merci pour votre intérêt, et pour votre optimisme et confiance en l'avenir. J'ai été honorée de croiser votre route.

La majeure partie de mes remerciements ira, tout naturellement, à l'équipe technique de ce laboratoire, qui m'a, du mieux qu'elle pouvait et avec brillo, aidé durant toute la réalisation de ce projet.

Tout d'abord, un immense merci à **Anaïs Dumesnil**. Bon, non ce n'est pas naturel : merci merci merci à ma Nanais d'amour !!!!! Mon dieu, comment aurai-je pu faire sans toi ? Merci pour ta présence au

quotidien, merci d'être celle que tu es, merci d'avoir su m'épauler, m'écouter (hyper dur ça !!), me comprendre (encore plus !!), merci pour tous ces messages à 10h10, merci pour nos interminables discussions au microscope, merci pour nos fous rires et nos pleurs... Merci d'être tout simplement une amie extraordinaire ! Et bien évidemment merci pour ton professionnalisme au quotidien, pour ton aide si précieuse et si incroyable en histo ! Merci de m'avoir sorti de bons nombres de galères, d'avoir su bosser dans l'urgence et de t'être montrée toujours compréhensive ! Je ne sais pas comment appréhender mon futur boulot sans toi à mes côtés, ça va être mission impossible !!

Merci également à **Sylvanie Renet**, j'ai adoré travailler avec toi ! Merci pour ta spontanéité, ton sourire sans faille et ton optimisme. Merci pour ton aide si précieuse en BM (des souvenirs avec le tissu adipeux ? Un enfer !!!!). Merci également pour nos immenses fous rires et nos angoisses communes en Western-Blot, on sera des pros un jour ou l'autre, j'en suis certaine !

Merci à **Jean-Paul Henry** ! Tu m'as énormément fait rire durant toutes ces années et c'était un bonheur de travailler avec toi ! Merci d'avoir d'abord accepté de me former à la chirurgie, c'était un véritable challenge et sans toi, je n'aurais jamais réussi ! Mais enfin, bien vite, j'ai compris que sans toi je n'y arriverai jamais, alors merci d'avoir accepté de m'aider et de réaliser l'ensemble des 473 ligatures coronaires qui ont été nécessaires à ce projet.

Merci également au **Dr. Lionel Nicol** pour toute son expertise technique à l'IRM. Merci d'avoir passé de longues heures à t'occuper de mes rats et de mes souris. Je t'en suis infiniment reconnaissante.

Par ailleurs, merci au **Dr. Isabelle Rémy-Jouet** pour m'avoir formée à la RPE. Merci de m'avoir transmis ta passion pour les radicaux libres et le NO !

Je tiens également à remercier **Annie Lejeune**, ma petite Annie ! Merci pour ce que tu es et représente dans ce laboratoire ! Merci de rendre le quotidien si agréable et de nous gratifier de ton sourire à chaque fois que nos chemins se croisent ! Merci également pour tous les excellents œufs que j'ai pu manger grâce à toi, mon estomac en réclame toujours plus ! Merci aussi pour toutes tes excellentes initiatives au labo, les sorties à l'Ours Noir, les riz sénégalais, les raclettes qui déclenchent l'alarme incendie... J'en passe ! Reste comme tu es, c'est tellement appréciable !

Merci également à Laetitia Depardieu, pour ta bonne humeur quotidienne, pour nos discussions sans fin à l'animalerie et notre complicité. Je te souhaite beaucoup de bonheur et d'épanouissement dans ta vie future, pour toi et pour toute ta petite (plus tant que ça) famille !

Comment pourrai-je écrire des remerciements sans citer l'âme, le cœur de ce laboratoire : ma petite **Khedi** ! Merci pour tout ce que tu es et représentes ! Ce laboratoire ne pourrait exister sans toi, alors merci pour toute ton aide au quotidien, et par là, je n'entends pas simplement les questions administratives... J'entends aussi, et surtout, ton écoute, ton soutien, ton conseil, ta présence au quotidien, les tutos Khedi... Merci d'avoir toujours été présente dans les bons comme dans les mauvais moments. J'ai énormément apprécié et profité de notre complicité et du fait que nous nous comprenions sans même nous parler. C'était un bonheur de partager ton quotidien et tu vas énormément me manquer... Tout le monde s'entend à dire que tu es notre maman au labo, c'est vrai, mais tu es surtout une amie, et je sais que nous saurons fortifier ça plus tard. Merci pour tout Khedi, vraiment !

Bien évidemment, un laboratoire de recherche ne pourrait avancer sans la présence de jeunes pépites qui s'accomplissent au quotidien. Avant de rentrer dans les détails, je tiens à remercier l'ensemble des étudiants de ce laboratoire, à la fois ceux qui sont passés par là, ceux qui y résident encore, et ceux qui viennent tout juste d'arriver. Merci pour votre présence, pour les nombreux échanges scientifiques que nous avons eu, merci de faire en sorte que nous soyons un socle solide de ce laboratoire, uni et fort. Mais aussi un immense merci pour tous les énormes fous rires que nous avons eu dans ce fabuleux bureau des étudiants ! Nous avons partagé d'excellents moments (et c'est peut-être le moment de demander pardon à nos voisins de bureaux, Vincent, Antoine et Paul qui nous subissent au quotidien, en silence... Merci pour votre patience !!!) !

Je m'adresserai tout d'abord aux anciens étudiants, de qui j'ai beaucoup appris.

Merci tout d'abord à **Orianne**. Nous avons été très proches et très présentes l'une pour l'autre alors merci beaucoup ! Merci d'avoir permis notre collaboration mutuelle et de m'avoir aidé dans mes projets. Merci également pour notre complicité et notre amitié durant toutes ces années. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci également à **Najah** pour ton aide précieuse au Mulvany. Les coronaires n'ont jamais eu de secret pour toi, et je pense que tu resteras à jamais une légende de la coronaire dans ce laboratoire ! Merci d'avoir toujours répondu présente pour m'aider quand j'en avais besoin et merci pour nos fous rires lors des injections des rats.

Merci à **Alexandre**, avec qui j'ai beaucoup travaillé en arrivant au laboratoire. Merci pour la patience que tu as su avoir à l'époque et pour tout ce que tu m'as appris. Merci également pour ta présence au quotidien et pour les discussions que nous avons eues, notamment avec nos projets d'école. En suivant les mêmes voies, qui sait nos chemins se recroiseront probablement dans le futur.

Eugénie, Julie, Clothilde, le trio de choc ! Sans oublier le grand **Pierre-Alain**. Merci pour les moments que nous avons passé ensemble. J'ai des souvenirs avec chacun de vous quatre, je repense notamment à cette fameuse soirée à la Fée avec Eugénie, qui m'a valu un joli cœur sur mon bureau, à l'organisation des JED, où nous avons donné de notre personne. C'est cet événement qui nous a rapproché, et qui m'a fait vous découvrir, alors merci pour ces bons moments ! Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite dans votre vie, à la fois personnelle et professionnelle, vous le méritez !

La famille de l'U1096, c'est aussi et surtout les étudiants actuels, ces nouveaux arrivants (plus si nouveaux pour certains) qui y vivent au quotidien.

J'ai une immense pensée tout d'abord pour **Mouad**, le p'tit Hamzaoui ! J'ai adoré travailler avec toi, vous soutenir au Mulvanos avec Jean, réfléchir aux solutions, aux tenants et aboutissants des projets. Ton cerveau fuse dans tous les sens, et c'est génial de débattre avec toi sur la science. On a su se comprendre et se soutenir dans bon nombre de situations et c'est ce qui rend une amitié sincère. Merci d'être ce que tu es, merci pour ces checks qui déboitent le poignet, merci pour ton énergie débordante, ton optimisme et ton sérieux sans faille. Il est maintenant clair dans mon esprit que les néphrologues ne sont pas des fruits, même si je n'en doutais pas ! Je te souhaite bon courage pour la suite, même si je sais que tout ce que tu entreprendras se réalisera avec brillo, parce que c'est ce que tu es, quelqu'un qui transforme tout en or.

Je pense aussi et surtout à **Jean** ! Je me sens obligée de remercier ton chef, sans qui tu n'aurais jamais mis les pieds au laboratoire et sans qui nous ne nous serions jamais rencontrés. Je le remercie aussi de t'avoir mis sur un sujet aussi tordu et compliqué, ça nous a valu des discussions interminables et tellement constructives. Je tiens d'ailleurs à te remercier pour la confiance que tu m'as accordée, étant une simple doctorante et ne détenant pas le savoir absolu, tu as su me faire confiance et m'écouter quand je te conseillais, même si c'était une pure folie de faire ça quand on y repense ! Merci également pour ton soutien sans faille pour tout, pour tous nos fous rires (#F), pour notre amitié sans faille et pour tous les excellents moments que nous avons passés et que nous passerons par la suite ! Miss my pitch !

Il y a aussi **Mahmoud**, le discret Mahmoud... J'aimerais te remercier pour ta bonne humeur quotidienne, pour nos discussions sur l'astrologie (#astromahmoud), pour les fous rires que tu as provoqué dans le bureau des étudiants. Je pense que tu as su montrer à tout le monde que tu avais ta personnalité, et je trouve ça formidable ! Je te souhaite beaucoup de réussite dans ta vie future (j'entends par là le travail, mais aussi l'amouuuuuuur), j'espère vraiment que le futur te sourira !

Marianne, le petit poulain de Paul qui est grande maintenant ! Je te souhaite beaucoup de courage et de force pour la suite. J'espère que tu accompliras tes rêves (des tartes à la myrtille ?) et que tu t'épanouiras autant que tu le mérites. En tant que doyenne de la Team Paul, tu as désormais une grande mission : prendre soin de lui maintenant !

Aux thésards plus « jeunes », **Bérénice, Matthieu Emmanuel, Sébastien, Maëlle, Sarah et Paul**, bon courage dans l'accomplissement de cette thèse. Vous verrez, il y a des hauts et des bas, mais l'essentiel est qu'il faut tout croquer au quotidien. A posteriori, ça n'était que du bonheur !

A mes petits chouchous qui grandissent, **Marie et Matthieu** (enfin Rima et Nobru) que j'adore tant. Merci d'être ce que vous êtes, merci d'être présents et même si je suis partie du labo, je reste présente si vous avez besoin de quoi que ce soit ! De toute façon, on se verra toujours le jeudi soir !! ;-)

Il est vrai que la majeure partie de mon temps a été consacrée au laboratoire ces dernières années, mais malgré tout, j'ai pu compter sur mes amis et ma famille qui ont toujours répondu présents. Je tiens tout d'abord à m'excuser, désolée de ne pas avoir été très disponible, désolée d'avoir souvent reporté nos entrevues et enfin désolée des plaintes et des moments grognons. Au moins, à partir de maintenant, à la question « Alors, la thèse ? », je ne vous répondrai plus « Et toi, ça va ? » !!

Merci à tous les coupains, **Arthur, Aude, Allan, Emy, Jérèm, Omar, Sabine**, merci de m'avoir tant soutenue, tant épaulée dans ce long marathon... Merci d'avoir toujours répondu présent lorsque je sortais de mon terrier, et merci d'avoir passé de loooooonngues heures à jouer aux cartes !! Je vous aime et vous admire tellement, vous êtes à mes yeux une source inépuisable de d'épanouissement ! Merci également à **Jean-Marc**. Merci pour ton écoute sans égal, pour tes conseils, ta constance et pour tout ce que tu es ! Merci aussi pour tous ces concerts au 106, grâce à toi, j'ai beaucoup décompressé, c'était génial !

Je ne peux évidemment pas oublier mes amis du MMD, et surtout **Les girls** ! Merci les filles de votre soutien sur la dernière ligne droite ! Le changement de cap avec l'Essec m'a permis de vous rencontrer et je ne pourrai rêver de mieux comme amies pour cette dernière étape ! Vous êtes au top !!

Je tiens tout particulièrement à remercier la **famille Fermey**, Christian, Caro, Nico, Julie et Paulo (mais aussi la petite Clara) pour tout tout tout ! Merci pour votre aide, votre générosité et votre bienveillance. Je ne pourrai rêver mieux comme belle-famille, vous êtes des êtres en or !

Merci également à mes cousins que j'aime tant, **Bab' et Larbi**. C'est un bonheur de vivre avec vous maintenant, la famille s'agrandit et je ne pourrai rêver de mieux ! Merci d'être aussi importants à mes yeux, merci pour votre soutien et vos attentions au quotidien. Bien évidemment, j'en profite pour remercier également toute ma famille, au sens le plus large du terme, qui m'a toujours épaulée, compris et qui a toujours su être présente pour moi.

Mes parents, que dire ? Je vous remercie du plus profond de mon être de m'avoir permis de réaliser mes rêves, mes ambitions. Merci de m'avoir constamment soutenu dans mes choix, aussi absurdes et insensés soient-ils. Merci d'avoir toujours su employer les mots qu'il fallait au bon moment, vous êtes pour moi la plus immense, irremplaçable et inépuisable source d'inspiration. Merci pour tous les moments où j'étais perdue et où vous avez su me guider et m'aiguiller, toujours avec le souci de mon épanouissement. J'imagine que cette thèse a du susciter bien des angoisses alors j'espère que vous serez fiers de moi. La route est encore longue et fastidieuse, mais le chemin vaut plus que la peine d'être emprunté, alors merci infiniment de me permettre de l'apprécier au quotidien.

Merci également à **mon frère**, Mehdi, sans qui j'aurai probablement tout laissé tomber il y a quelques années déjà. Merci d'avoir toujours su être là pour moi, dès le plus jeune âge, merci pour tous tes conseils, pour ta présence, merci d'entretenir notre complicité si importante à mes yeux. Tu es un modèle au quotidien pour moi, toi qui sais tant croire en tes rêves et tes ambitions, j'espère un jour avoir le courage que tu as au quotidien et m'accomplir personnellement comme tu le fais. Merci de me donner tant d'étoiles dans les yeux.

Enfin, je terminerai en remerciant **Pierre**, merci pour tout, tout simplement. Merci de supporter mes humeurs, mes tracas, mes bonheurs, mes fous rires, merci d'apprécier notre bulle. Merci d'avoir su canaliser mon énergie, à des moments où j'étais incapable de le faire, tant je suis à 200%. Merci d'être l'être le plus positif et le plus rêveur au monde, je ne peux qu'avoir les yeux qui brillent pendant toute ma vie.

PS : Bien sûr, merci à la boutique Mère et Fille, le plus sublime et extraordinaire magasin que vous pourrez découvrir dans votre vie ! Merci de m'avoir habillé durant toutes ces années, soutenance comprise, merci de m'avoir fait souffler tous les samedis et de m'avoir permis de m'épanouir dans un domaine tout autre que la science !

Table des matières

RESUME	13
ABSTRACT	1
LISTE DES ABBREVIATIONS	2
LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES TABLEUX	13
LE SELENIUM ET LES SELENOPROTEINES	16
I . Une biosynthèse atypique	22
1 . Le sélénium.....	22
2 . Biosynthèse de la sélénocystéine	23
3 . Incorporation de la Sec dans les protéines.....	26
4 . Rôles chez l'homme.....	29
II . Les sélénoprotéines : implication en santé humaine	32
1 . Sélénoprotéines et sélénoprotéome	32
2 . Caractérisation structurale des sélénoprotéines mammifères	33
3 . Rôles principaux et mécanismes d'action des GPx, TrxR et DIO.....	34
4 . Rôle des autres sélénoprotéines	36
III . La sélénoprotéine T.....	38
1 . Caractéristiques structurales de la Selt.....	38
2 . Expression tissulaire de la Selt	41
3 . Rôles biologiques.....	42
L'INFARCTUS DU MYOCARDE ET L'INSUFFISANCE CARDIAQUE.....	44
I . Définition et épidémiologie de l'insuffisance cardiaque chronique.....	45
II . L'infarctus du myocarde.....	48
III . Le remodelage ventriculaire gauche.....	52
1 . Définition.....	52
2 . Altérations fonctionnelles et structurales du myocarde suite à l'I/R	53
IV . Evolution vers l'insuffisance cardiaque chronique.....	75
V . Sélénium, sélénoprotéines et pathologies cardiovasculaires	75
LA THERAPIE GENIQUE	78

I . Introduction à la thérapie génique	79
II . Principes de la thérapie génique	82
1 . Stratégies de transduction <i>in vivo</i>	83
2 . Les vecteurs viraux	84
III . Exemples d'application de la thérapie génique	92
LA THERAPIE GENIQUE ET L'INSUFFISANCE CARDIAQUE	94
I . Intérêt de la thérapie génique.....	95
II . Les vecteurs viraux et l'insuffisance cardiaque	95
III . Modalités d'administration du transgène	96
IV . Ciblage et régulation de l'expression des gènes	99
1 . Le système β -adrénergique	99
2 . Circulation du calcium	100
OBJECTIFS DE LA THESE	102
MATERIEL & METHODES.....	104
I . Modèles animaux	105
1 . Modèle de thérapie protéique par la SelT chez le rat Wistar.....	105
2 . Modèle de thérapie génique par un rAAV9-SelT dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le rat	106
3 . Modèle de thérapie génique par un rAAV8-SelT dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le rat	108
II . Protocole expérimental	111
1 . Modèles chirurgicaux	111
2 . Evaluation de la fonction cardiaque	112
3 . Evaluation du remodelage cardiaque.....	115
4 . Evaluation de la fonction vasculaire	118
5 . Biologie moléculaire et biochimie	120
III . Statistiques.....	123
RÉSULTATS	126
I . Evaluations cardiaques	127
1 . Mesures échocardiographiques	127
2 . Evaluations hémodynamiques.....	133
3 . Evaluation de la perfusion myocardique et de la densité capillaire.....	137
II . Evaluations de la morphologie cardiaque.....	140

1 . Evaluation de l'hypertrophie et de la fibrose	140
2 . Evaluation de la taille d'infarctus	144
III . Evaluation de la fonction vasculaire	145
1 . Modèle de thérapie protéique par la SelT.....	145
2 . Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV9.....	146
3 . Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV8.....	147
IV . Evaluation du remodelage cardiaque	148
1 . Mesure du stress oxydant cardiaque	148
2 . Evaluations des propriétés contractiles des cardiomyocytes.....	150
DISCUSSION	154
CONCLUSION & PERSPECTIVES	162
BIBLIOGRAPHIE	166
ANNEXES.....	206

RESUME

La sélénoprotéine T (SelT) est une protéine thiorédoxine-like abondamment exprimée au cours du développement embryonnaire chez le rat, mais son expression tend à disparaître après la naissance, notamment dans le cœur, suggérant un rôle limité de la SelT à l'âge adulte. Néanmoins, nous avons pu montrer que la SelT est réexprimée au niveau cardiaque suite à une ligature de l'artère coronaire (LC), suggérant le rôle potentiellement protecteur de cette protéine au cours des pathologies cardiovasculaires. Le but de notre projet fut donc d'évaluer les effets cardiaques d'une thérapie par la SelT au cours de l'insuffisance cardiaque, moyennant soit une thérapie protéique, soit une thérapie génique visant à surexprimer la SelT au niveau cardiaque ou au niveau systémique.

La supplémentation en SelT (15µg/kg/jour, minipompes ip) a permis d'améliorer significativement le débit cardiaque et la fraction de raccourcissement du VG, mais également d'améliorer les pressions télé-systoliques et télé-diastoliques du ventricule gauche ainsi que la perfusion coronaire. Ces changements sont associés à une diminution du stress oxydant cardiaque ainsi qu'à une répression des mécanismes inflammatoires cardiaques. L'ensemble de ces améliorations a été observé sans modification de la taille d'infarctus.

En parallèle, nous avons pu montrer qu'une injection intraveineuse d'un rAAV9-SelT (1.10^{11} vg) une semaine après la LC permettait de diminuer significativement la dilatation ventriculaire gauche 3 mois après la LC. De manière concomitante, la thérapie génique par la SelT améliore le débit cardiaque ainsi que la perfusion cardiaque. Ces changements sont associés à une amélioration de la compliance et de l'élastance cardiaque.

Par ailleurs, l'injection intramusculaire d'un rAAV8-SelT suivant le même protocole que précédemment. Nous avons pu montrer que le traitement par cet AAV permettait de diminuer significativement la dilatation du VG et d'améliorer la fraction de raccourcissement. De plus, la thérapie génique a permis d'améliorer la perfusion cardiaque ainsi que la relaxation coronaire endothélium-dépendante. Nous avons également pu montrer que l'ensemble des effets de la SelT sont médiés par le résidu Sec, dès lors que la modification de ce résidu par une alanine, annihile totalement l'ensemble des effets positifs observés au cours de notre étude.

Ainsi, nos résultats ont permis de montrer clairement que le rôle bénéfique d'un traitement par la SelT au cours de l'ICC, et ce, grâce à un mécanisme sélénocystéine-dépendant. La SelT semble donc être une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement de cette pathologie.

Mots-clés : Insuffisance cardiaque, Sélénoprotéine T, Thérapie génique, Thérapie protéique

ABSTRACT

Selenoprotein T (SelT) is a thioredoxin-like protein, which is abundantly but transiently expressed in the heart during the embryonic development, suggesting that SelT plays a limited role during adulthood. However, data from our laboratory show that cardiac SelT expression increases after myocardial infarction. This suggests that SelT may play a yet unrevealed role in cardiovascular diseases but SelT's potential protective role is unknown. Thus, we sought to investigate the cardiac effects of a SelT-mediated therapy in chronic heart failure (CHF) using either a protein or gene therapy through either a protein supplementation, or rAAV encoding for different forms of SelT.

SelT supplementation (15µg/kg/day, IP, administered for 1 month starting 7 days after MI) resulted in a restoration of cardiac output and LV fractional shortening (sham: 178,1±14,8; MI: 161,1±7,7; MI+SelT: 177,6±8,0 and sham: 44,5±5,1; MI: 17,1±0,8; MI+SelT: 25,6±2,4, respectively), in association with an improvement of LV end-diastolic and end-systolic pressures as well as LV tissue perfusion. These changes were associated with a lower oxidative status and with a decrease in inflammation pathways (-32,7% vs MI for oxidative stress and -27,2% and -31,4% for inflammation, measured by electron paramagnetic resonance and western blotting analyses of IL1β and IL6 expressions, respectively). All these effects were observed at identical infarct sizes.

In parallel, a single intravenous injection of rAAV9-SelT (1.10¹¹ virus-genome copies) one week after MI resulted in an increased cardiac SelT expression 3 weeks after injection (+150%, p<0.05). This SelT-overexpression reduced HF-induced increase in left ventricular diameters in both systole and diastole (at 1 and 3 months post-MI). Simultaneously, SelT improved stroke volume and cardiac output, without change in heart rate or body weight. Moreover, cardiac perfusion was improved by rAAV9-SelT in both interventricular septum and in the border zone of the infarct. These changes were associated with an improvement in cardiac compliance and elastance parameters assessed by invasive pressure/volume curves (compliance: sham: 18.2±1.5; HF: 11.0±1.0; HF+rAAV9-SelT: 15.3±0.5 and elastance: sham: 1.3±0.2; HF: 2.8±0.2; HF+rAAV9-SelT: 1.4±0.2, respectively; p<0.05 vs. HF).

The third part of this project consisted in a single intramuscular injection of rAAV8-SelT (1.10¹¹ virus-genome copies, 7 days after CAL) of either the normal form (rAAV8-SelT^{Sec}), either the modified form in which the Sec residue is replaced by an Ala (rAAV8-SelT^{Ala}). rAAV8-SelT^{Sec} administration resulted in a significant increase in cardiac SelT levels as soon as 3 weeks post-administration. After 3 months, SelT^{Sec} reduced LV dilation and restored cardiac output. Simultaneously SelT improved both LV elastance and compliance. In contrast, administration of the rAAV8-SelT^{Ala} did not modify the CHF-related cardiac dysfunction, suggesting that the selenocysteine residue is essential to the normal protein function.

Our results clearly show that increasing SelT to supra-normal levels reduces CHF-induced cardiac dysfunction through a selenium-dependent pathway. These results suggest that SelT might be a promising therapeutic option in the treatment of CHF.

Keywords: heart failure, selenoprotein T, gene therapy, protein therapy

LISTE DES ABBREVIATIONS

AA	Acide aminé
AAA	Anévrisme de l'aorte abdominale
AAV	<i>Adeno-associated virus</i>
ACC/AHA	<i>American College of Cardiology/American Heart association</i>
Ach	Acétylcholine
ADA-SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine TriPhosphate
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
CaMKII	Protéine kinase II calcium-calmoduline dépendante
CD (-4, 45)	Cluster de différenciation 4, 45
CE	Cellule endothéliale
CEC	Couplage excitation-contraction
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane regulator</i>
CICR	<i>Calcium-induced-calcium-released</i>
CMLV	Cellule musculaire lisse vasculaire
Cys	Cystéine
DC	Débit cardiaque

DIO	Iodothyronine désiodase
DT2	Diabète de type 2
eEFSec	<i>Eukaryotic elongation factor for Sec</i>
EMA	<i>European Medicine Agency</i>
eNOS	NO synthase endothéliale
EPATD-VG	Epaisseur de la paroi antérieure du VG en télé-diastole
EPATS-VG	Epaisseur de la paroi antérieure du VG en télé-systole
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FC	Fréquence cardiaque
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FEVG	Fraction d'éjection du ventricule gauche
FR	Fraction de raccourcissement
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GPCRs	Récepteurs couplés aux protéines G
GPx	Glutathion peroxydase
H₂O	Eau
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HTA	Hypertension artérielle
I/R	Ischémie/reperfusion
ICC	Insuffisance cardiaque chronique
IDM	Infarctus du myocarde
IL (-1β, 6, 10, 8)	Interleukine – 1 β , -6, -10, -8
iNOS	NO synthase inductible
ITR	<i>Inverted terminal repeats</i>
ITV	Intervalle temps-vitesse
kDA	kilo Dalton

LC	Ligature coronaire
LNNA	N ω -Nitro-L-Arginine
LPL	Lipoprotéine lipase
MEC	Matrice extracellulaire
MPO	Myéloperoxydase
mPTP	<i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i>
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCX	Echangeur Na ⁺ /Ca ²⁺
NF-κB	Nucleolar factor – kappa B
NILV	<i>Non integrating lentiviruses</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Monoxyde d'azote
NPS	Nitroprussiate de sodium
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
O₂⁻	Anion superoxyde
ONOO⁻	Peroxynitrite
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase activating peptide</i>
PAD	Pression artérielle diastolique
PAS	Pression artérielle systolique
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PECAM-1	<i>Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1</i>
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PKA	Protéine kinase A
PLB	Phospholamban
PP1	Protéine phosphatase 1
PSTK	Phosphoséryl ARNt kinase
PTD-VG	Pression télé-diastolique du VG
PTS-VG	Pression télé-systolique du VG

r-AAV	<i>Recombinant adeno-associated virus</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RLO	Radicaux libres dérivés de l'oxygène
RPVTD-VG	Relation pression-volume télé-diastolique du VG
RPVTS-VG	Relation pression-volume télé-systolique du VG
RS	Réticulum sarcoplasmique
RyR	Récepteur à la ryanodine
SBP2	<i>SECIS Binding protein 2</i>
SCL	Sélénocystéine lyase
Se	Selenium
Se –Alb	Sélénium - albumine
Sec	Sélénocystéine
SECIS	<i>Selenocystein insertion sequence</i>
Sel	Sélénoprotéine
SELECT	<i>Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial</i>
SelT	Sélénoprotéine T
SeMet	Sélénométhionine
SEPP1	Sélénoprotéine P
SERCA	<i>Sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase</i>
SerS	séryl ARNt synthétase
SIN	<i>Self-inactivating lentivirus</i>
SPS2	Sélénophosphate synthétase 2
Th-1	<i>T-helper 1</i>
Th-2	<i>T-helper 2</i>
TnC	Troponine C
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TrxR	Thiorédoxine réductase
UCP-1	<i>Uncoupling protein 1</i>

UGGT	UDP-glucose glycoprotein-glucosyl-transférase
VES	Volume d'éjection systolique
VG	Ventricule Gauche
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photographie de la première publication portant sur le sélénium dans laquelle la découverte faite par Berzelius en 1817 est décrite.....	17
Figure 2 : Biodistribution du sélénium dans le sol des provinces de Chine.....	19
Figure 3 : Evolution des publications scientifiques relatives aux recherches sur le sélénium entre 1945 et 2010	21
Figure 4 : Schématisation globale du métabolisme du sélénium chez les mammifères.	23
Figure 5 : Mécanisme de biosynthèse de la sélénocystéine chez les eucaryotes.....	25
Figure 6 : Modèle d'insertion de la sélénocystéine lors de la traduction des protéines chez les eucaryotes. Adapté de Allmang et al. 2009 et Chavatte et al., 2005.	26
Figure 7 : Famille des sélénoprotéines.....	29
Figure 8 : Mécanismes d'action des GPx et TrxR.....	35
Figure 9 : Structures de la SeIT	40
Figure 10 : Taux d'expression tissulaire de la SeIT au stade embryonnaire et chez le rat adulte.	42
Figure 11 : Cinétique d'extension de la taille d'infarctus après ischémie-reperfusion myocardique (Jennings et al. 1983).....	49
Figure 12 : Altération de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire au cours de l'ischémie.....	50
Figure 13 : Représentation schématique des différentes phases du remodelage ventriculaire gauche. <i>La zone infarctée est représentée en rose clair</i>	53
Figure 14 : Effets de la surcharge calcique et du stress oxydant sur les troubles de la reperfusion myocardique.	61
Figure 15 : Cycle d'activation du Ca^{2+} D'après Bers et al., 2006	64

Figure 16 : Relations entre fibres de collagène de la matrice extracellulaire et cardiomyocytes. D'après Mann, Braunwald's Heart Disease, 8ème édition, 2008.	67
Figure 17 : Schématisation du système rénine – angiotensine – aldostérone. D'après Levine et al., 2002.....	69
Figure 18 : Domaines d'application de la thérapie génique.....	79
Figure 19 : Nombre d'essais cliniques en thérapie génique par vecteur.	83
Figure 20 : Cycle de vie des rétrovirus d'après Spencer et Plamarini (2012).	85
Figure 21 : Découverte de particules AAV contaminants une préparation adénovirale. (Atchison et al., 1965)	87
Figure 22 : Topologie de la capsid de l'AAV2. (Tiré de Samulski & Muzyczka, 2014).....	88
Figure 23 : Techniques de perfusion via les artères ou les veines coronaires, d'après Hajjar et al., 2013	97
Figure 24 : Techniques d'injection locale, d'après Hajjar et al., 2013	98
Figure 25 : Schéma expérimental de l'étude de thérapie protéique par la SelT moyennant l'utilisation de minipompes osmotiques.....	106
Figure 26 : Schéma expérimental résumant le principe de l'étude de thérapie génique cardiaque par la SelT moyennant l'utilisation d'un rAAV9-SelT.....	108
Figure 27 : Schéma expérimental résumant le principe de l'étude de thérapie génique systémique par la SelT moyennant l'utilisation d'un rAAV8-SelT contenant soit la forme sauvage de la protéine, le rAAV8-SelT ^{Sec} , soit la forme modifiée dans laquelle le résidu Sec est remplacé par un résidu Ala, le rAAV8-SelT ^{Ala}	110
Figure 28 : Photographies d'un cœur après ligature de l'artère coronaire gauche descendante.....	112
Figure 29 : Exemple d'un enregistrement en mode Temps-Mouvements.....	113
Figure 30 : Exemple d'un enregistrement en mode Doppler pulsé.....	114

Figure 31 : Photographie représentant la technique de mesure de l'aire des cardiomyocytes sur ImageJ.	118
Figure 32 : Montage de l'artère coronaire sur le myographe de Mulvany.	119
Figure 33 : Effets d'une thérapie protéique par la SelT sur l'épaisseur de la paroi antérieure du VG dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar	127
Figure 34 : Effets d'une thérapie protéique par la SelT sur la fonction cardiaque dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar.....	128
Figure 35 : Effets d'un traitement par un rAAV9-SelT sur l'épaisseur de la paroi antérieure du VG dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar	129
Figure 36 : Effets d'un traitement par un rAAV9-SelT sur la fonction cardiaque dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar.....	130
Figure 37 : Effets d'un traitement par un rAAV8-SelT sur l'épaisseur de la paroi antérieure du VG dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar	131
Figure 38 : Effets d'un traitement par un rAAV8-SelT sur la fonction cardiaque dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar.....	132
Figure 39 : Effets d'une thérapie protéique par la SelT sur l'hémodynamique cardiaque dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar.....	133
Figure 40 : Effets d'un traitement par rAAV9-SelT sur l'hémodynamique cardiaque dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar.	134
Figure 41 : Effets d'un traitement par rAAV8-SelT sur l'hémodynamique cardiaque dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar.	136
Figure 42 : Effets d'une thérapie protéique par la SelT sur la perfusion cardiaque et la densité capillaire cardiaque dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar	137
Figure 43 : Effets d'un traitement par rAAV9-SelT sur la perfusion cardiaque et la densité capillaire cardiaque dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar	138

Figure 44 : Effets d'un traitement par rAAV8-SelT sur la perfusion cardiaque et la densité capillaire cardiaque dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar	139
Figure 45 : Effets d'une thérapie protéique par la SelT sur l'hypertrophie cardiaque, la fibrose cardiaque et l'hypertrophie des cardiomyocytes dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar	140
Figure 46 : Effets d'un traitement par rAAV9-SelT sur l'hypertrophie cardiaque, la fibrose cardiaque et l'hypertrophie des cardiomyocytes dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar.....	142
Figure 47 : Effets d'un traitement par rAAV8-SelT sur l'hypertrophie cardiaque, la fibrose cardiaque et l'hypertrophie des cardiomyocytes dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar.....	143
Figure 48 : Effets des différents traitements utilisés sur la taille d'infarctus	144
Figure 49 : Effets d'une thérapie protéique par la SelT sur la fonction vasculaire coronaire dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar	145
Figure 50 : Effets d'un traitement par rAAV9-SelT sur la fonction vasculaire coronaire dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar	146
Figure 51 : Effets d'un traitement par rAAV8-SelT sur la fonction vasculaire coronaire dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar	147
Figure 52 : Effets d'une thérapie protéique par la SelT sur les taux d'ARNm de différentes molécules impliquées dans le stress oxydatif dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar	148
Figure 53 : Effets d'un traitement par rAAV9 sur les taux d'ARNm de différentes molécules impliquées dans le stress oxydatif dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar	149
Figure 54 : Effets d'un traitement par rAAV8-SelT sur les taux d'ARNm de différentes molécules impliquées dans le stress oxydatif dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar.....	150
Figure 55 : Effets d'un traitement par rAAV9-SelT sur différents paramètres d'évaluation des propriétés contractiles des cardiomyocytes dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar.....	151
Figure 56 : Effets d'un traitement par rAAV8-SelT sur différents paramètres d'évaluation des propriétés contractiles des cardiomyocytes dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar.....	152

Figure 57 : Evolution de la mortalité dans les jours suivant une ligature coronaires chez les animaux

Tie2-SelT^{-/-}156

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tableau représentant les classifications NYHA et ACC/AHA de l'insuffisance cardiaque...47

Tableau 2 : Tableau représentant les caractéristiques majeures des principaux vecteurs viraux.84

LE SELENIUM ET LES SELENOPROTEINES

Le sélénium est un micronutriment essentiel chez l'Homme. Découvert en 1817 par Jöns Jacob Berzelius, l'histoire raconte que ce chimiste avait entrepris des recherches afin d'identifier l'agent responsable d'une maladie mystérieuse chez les ouvriers d'une usine de fabrication d'acide sulfurique¹. Cette découverte ayant eu lieu peu après celle du tellurium (Te^{52}), qui fut nommé par rapport à *tellus*, la Terre en latin, Berzelius nomma cet élément en rapport avec *Selene*, la déesse grecque de la Lune (Figure 1).

a Afhandlingar
i
Fysik, Kemi
och
Mineralogi.

Utgåfne

af

J. AFZELIUS, N. W. ALMROTH, A. ARFVEDSON,
J. BERZELIUS, H. P. EGGERTZ, J. AF FORSELLES,
J. G. GAHN, W. HISINGER, P. LAGERHJELM,
M. AF PONTIN, E. ROTHOFF, N. G. SEFSTRÖM,
P. STRÖM, E. T. SVEDENSTIERNA,
P. WALMSTEDT.

—••••—
SJETTE DELEN.

STOCKHOLM,

Tryckte hos Direct. H. A. NORDSTRÖM,

1818.

b Det bruna ämnet, som vid ammoniakfalternas fonderdelning afskiljt sig, blef nu ett föremål för underfökningen, och befanns, genom de förlök, som i det följande skola beskrivas, vara en egen, hittills okänd, brännbar mineralkropp, hvilken jag, för att utmärka dess släktkap i egenskaper med tellurium, kallat Selenium, af Σελήνη, måna.

Figure 1 : Photographie de la première publication portant sur le sélénium dans laquelle la découverte faite par Berzelius en 1817 est décrite.

Historiquement, le sélénium a longtemps été considéré comme agent toxique, dès lors qu'il entraînait des effets néfastes pour le bétail et pour l'Homme². En effet, la plupart des dérivés du sélénium sont des poisons, plus dangereux encore que certains cyanures et présentant une odeur alliagée particulièrement tenace. Les premières observations de cette toxicité remontent à plusieurs siècles avant sa découverte par Berzelius. En effet, en 1295, lorsque Marco Polo arriva en Chine occidentale, sa progression vers l'Est fut rapidement compromise par la perte des sabots de ses chevaux, conduisant les animaux vers une mort certaine. Les chevaux indigènes évitaient, contrairement aux chevaux malades, la consommation d'une herbe dangereuse appelée l'astragale. Bien connue aujourd'hui, cette plante possède la particularité d'accumuler le sélénium, notamment dans les régions où le sol est très sélénifère, comme dans l'Ouest de la Chine. Ce syndrome est désormais connu sous le nom d'« Alkali disease ». L'empoisonnement par le sélénium en est la cause principale et a pu être reproduit expérimentalement chez des animaux d'élevage^{3,4}.

Ce n'est que plus d'un siècle après sa découverte que l'image du sélénium a évolué, pour en arriver au rôle essentiel qu'on lui confère aujourd'hui. En 1954, il fut démontré que certaines bactéries se développaient plus rapidement dans un milieu enrichi en sélénium⁵. Toutefois, ce sont les travaux pionniers de l'allemand Schwarz qui ont permis en 1957 la définition du sélénium comme oligo-élément essentiel. En effet, ses travaux ont montré qu'une carence en sélénium pouvait entraîner une nécrose hépatique fatale chez le rat⁶. Par la suite, ils ont démontré qu'une légère supplémentation en sélénium permettait de prévenir cette même nécrose, mettant ainsi en exergue les effets potentiellement bénéfiques du sélénium⁷. Dans les années 1960, ce rôle essentiel fût confirmé chez plusieurs animaux d'élevage^{8,9}.

Au début des années 1970, dans le cadre d'études chez l'Homme, des scientifiques chinois ont suggéré que des carences en sélénium pouvaient être la source de deux pathologies graves¹⁰ (Figure 2). En effet, durant les années 1930, une cardiomyopathie endémique aux multiples foci fût décrite en Chine, portant le nom de maladie de Keshan (d'après la localisation dans cette province de Chine). Celle-ci avait une incidence supérieure chez les femmes en âge de procréer ainsi que chez les jeunes enfants. Ce n'est que 40 ans plus tard que cette maladie fût associée à des carences en sélénium, dès lors qu'elle était induite par une prise de moins de 12 µg/jour. D'autres syndromes associés à une déficience en sélénium furent découverts comme la maladie de Kashin-Beck qui est une forme d'ostéo-arthropathie découverte dans différentes régions de Chine et du Tibet. Par la suite, il a été montré que les déficiences en sélénium étaient associées à des cas de retard mental, d'infertilité masculine, de déficience immunitaire, de myopathies, et notamment de maladies

cardiovasculaires. Ces mêmes carences sont également impliquées dans l'apparition de plusieurs types de cancers, dans la recrudescence de certaines infections virales, ainsi que dans l'accélération des processus de vieillissement.

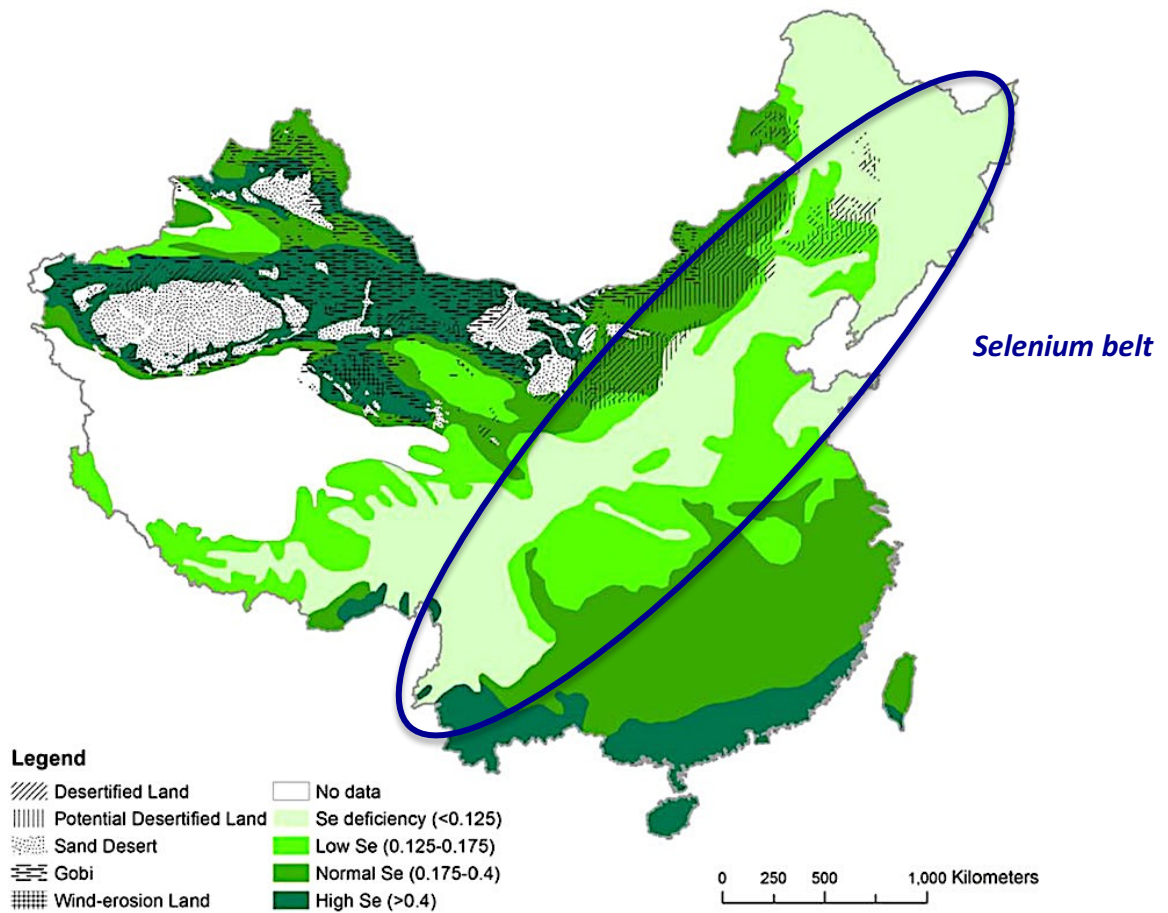


Figure 2 : Biodistribution du sélénium dans le sol des provinces de Chine.

Cette figure montre l'existence d'une zone en Chine dans laquelle le sol est totalement dépourvu de sélénium. Ce sont dans ces provinces que de nombreuses maladies, telles que la maladie de Keshan et celle de Kashin-Beck se sont développées. D'après Sun et al., 2016¹¹.

L'ensemble de ces données suggère que le sélénium est indispensable à la vie, au même titre que les quatorze autres oligo-éléments essentiels. En Europe, les besoins journaliers en sélénium chez l'Homme adulte sont estimés à 40 µg. Le seuil maximal journalier avant toxicité est quant à lui estimé à 450 µg. Ce nutriment est essentiellement apporté par l'alimentation, et les teneurs en sélénium varient en fonction de la disponibilité et de l'abondance de l'oligo-élément dans l'environnement d'origine. Il existe dans la nature sous deux formes principales, organique et inorganique. La forme organique est la plus abondante et est représentée par deux formes de sélénium, la sélénocystéine (Sec) et la sélénométhionine (SeMet). Ces dernières sont probablement absorbées par l'intestin grêle, principalement via un phénomène de diffusion cellulaire. La seconde forme, inorganique, est représentée par le sélénite et le sélénate, qui sont faiblement présents dans la nature. On retrouve le sélénium sous ses différentes formes dans l'alimentation générale, à savoir la viande et ses dérivés, les poissons, les féculents comme les pâtes et le riz, mais également le pain et les céréales. En revanche, les concentrations les plus élevées de sélénium sont retrouvées dans les noix brésiliennes¹².

Il n'a été montré que plus tard que l'une des voies majeures d'assimilation du sélénium consiste en son incorporation spécifique dans des protéines particulières. Ainsi, Rotruck et ses collaborateurs ont pu montrer que le sélénium protège la membrane cellulaire, ainsi que l'hémoglobine, contenue dans les érythrocytes des différents dommages causés par le stress oxydatif via l'utilisation du glutathion¹³. Le glutathion s'est avéré être un cofacteur essentiel de la glutathion peroxydase (GPx), qui permet le clivage du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques. De manière intéressante, l'activité enzymatique de la GPx est sélénium-dépendante^{14,15}. Par ailleurs, d'autres études ont prouvé que le sélénium est un facteur essentiel à l'activité de différentes protéines, telles que la sélénoprotéine A du système glycine réductase et la formiate déshydrogénase eubactérienne^{16,17}.

Depuis cette découverte, les études se sont multipliées afin d'élucider les mécanismes d'insertion du sélénium dans ces protéines (Figure 3). Il a pu être montré que le sélénium y était présent sous sa forme biologique principale, l'acide aminé sélénocystéine (Sec), qui est intégré à la chaîne polypeptidique^{18,19} selon un mécanisme complexe qui sera détaillé par la suite. La sélénocystéine, considérée alors comme le 21^e acide aminé protéinogène, confère ainsi aux sélénoenzymes des avantages catalytiques. Ces protéines se sont alors vu attribuer des activités biochimiques diverses, souvent liées à des mécanismes d'oxydoréduction, expliquant, en partie, le rôle fondamental du sélénium²⁰.

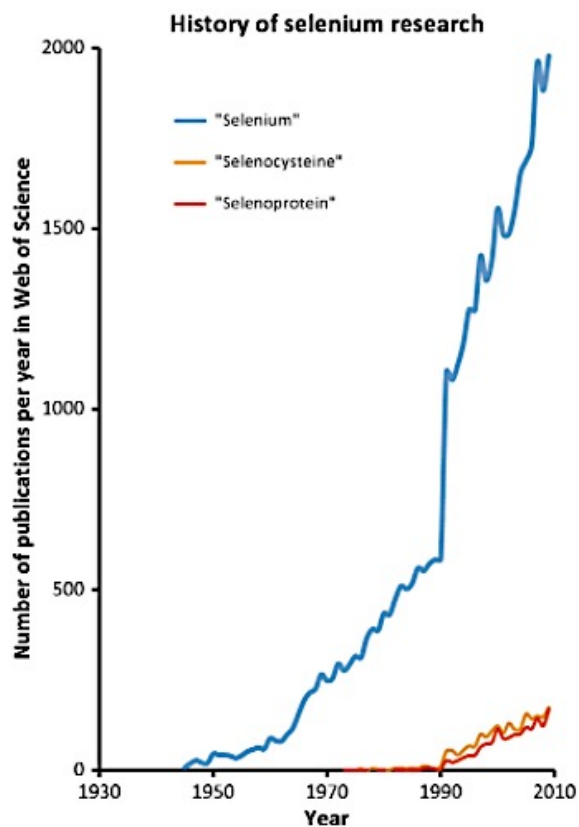


Figure 3 : Evolution des publications scientifiques relatives aux recherches sur le sélénium entre 1945 et 2010

Selon la database ISI Web of Science moyennant les mots clés « Selenium », « Selenocysteine » et « Selenoprotein », d'après le livre Selenium : Its molecular biology and role in human health.

I. Une biosynthèse atypique

1. Le sélénium

Le sélénium est le 34^e élément de la classification périodique de Mendeleïev et représente le 69^e élément en termes d'abondance sur Terre. Il est principalement apporté par l'alimentation – majoritairement dans le pain et les céréales, mais également dans les produits d'origine animale –, sa présence dans l'eau étant négligeable. Les taux de Se dans les racines sont directement corrélés aux taux présents dans le sol, dès lors que la biodisponibilité de l'oligo-élément est directement influencée par le statut physicochimique du sol (pH, état rédox etc.). La principale voie d'assimilation du sélénium a été proposée par Ip²¹ et consiste en la réduction des différents dérivés séléniés. L'absorption des dérivés du sélénium se passe majoritairement dans la partie basse du petit intestin via différentes voies. La plupart des formes, qu'elles soient organiques ou non, sont absorbées, en condition physiologique, avec une efficacité avoisinant les 90%, à l'exception du sélénite dont l'absorption est plus compliquée²².

Le Se existe sous différents degrés d'oxydation (représentés en figure 4). Tous les organismes peuvent assimiler cet oligo-élément sous ses formes sélénite SeO_3^{2-} ou sélényde H_2Se , mais l'assimilation de sa forme sélényde SeO_4^{2-} n'est possible que chez les plantes et les eubactéries. Une fois absorbées dans le tractus gastro-intestinal, les espèces séléniées sont transportées dans le foie. La SeMet est habituellement transformée en Se-Albumine (SeAlb)²³ alors que le sélényde et les autres espèces organiques sont plutôt transportées sous leur forme propre. Alors que les mécanismes sous-jacents à ce transport ne sont pas encore clairement élucidés, il est cependant désormais avéré que le foie est l'organe pivot du métabolisme du Se. En effet, il est le siège de la synthèse des protéines à sélénium et permet également la régulation de l'excrétion de ses métabolites.

La sélényde (Sec) est un analogue de la cystéine dans lequel l'atome de soufre du groupement thiol est remplacé par un atome de sélénium, constituant un groupement sélényde. Par son mécanisme d'incorporation spécifique dans les sélénydeprotéines, la Sec est considérée comme le 21^e acide aminé protéinogène et se distingue donc de la sélénydeéthionine qui est incorporée aléatoirement. Depuis la découverte de cet acide aminé, de nombreuses avancées ont permis de mieux apprivoiser les mécanismes sous-jacents à la synthèse mais également à l'insertion de la Sec dans la séquence des sélénydeprotéines, permettant ainsi de mieux comprendre le fonctionnement de

cette famille de protéines particulières. Ainsi, nous développerons dans le chapitre suivant les mécanismes sous-jacents à l'insertion de la Sec dans la séquence des sélénoenzymes.

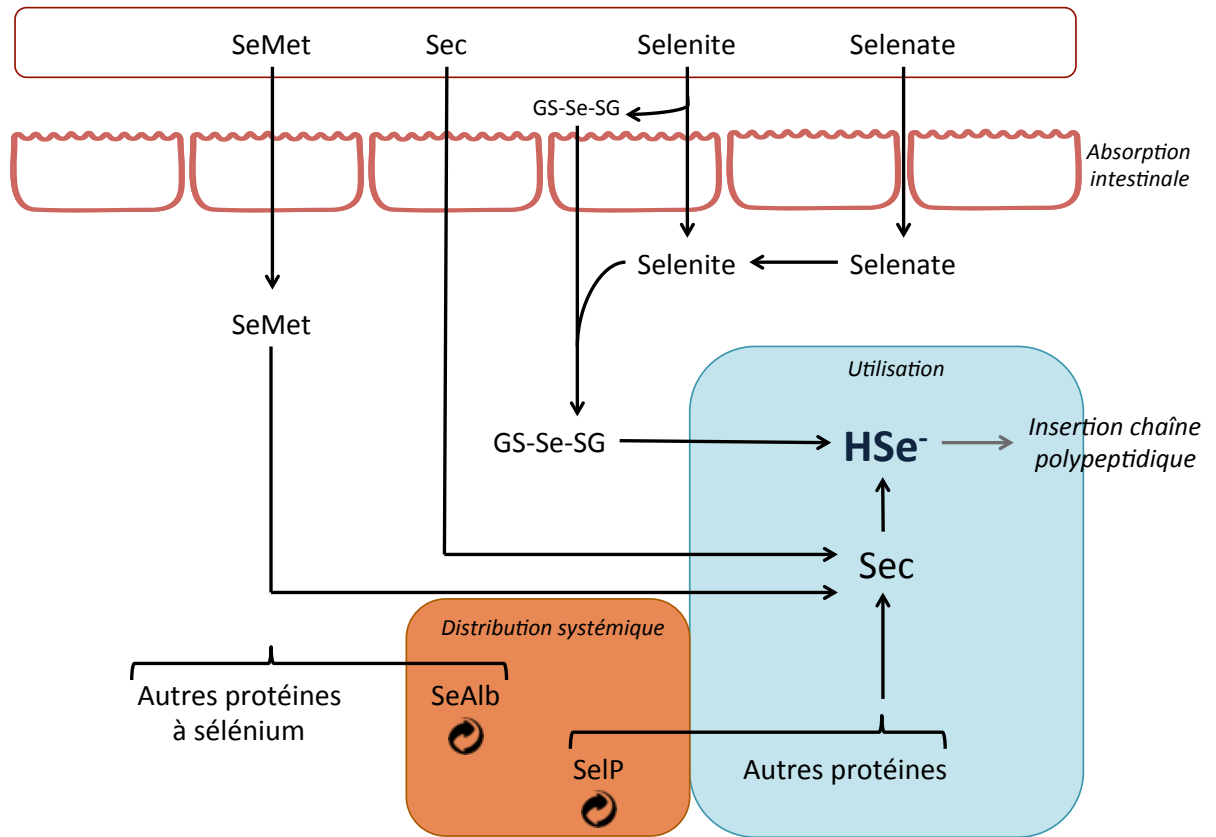


Figure 4 : Schématisation globale du métabolisme du sélénium chez les mammifères.

L'absorption des espèces sélénées a principalement lieu dans l'intestin grêle via différents mécanismes. Quasi toutes les formes de sélénium, organiques ou inorganiques, sont absorbées avec une efficacité avoisinant les 90%. Les différentes formes sont ensuite transformées, via différents mécanismes en sélényde d'hydrogène qui sera ensuite utilisé pour s'intégrer à la chaîne polypeptidique des sélénoprotéines.

2. Biosynthèse de la séléncystéine

La Sec est présente dans les trois lignées d'évolution du vivant. Il s'agit de l'unique acide aminé dont la synthèse a lieu sur son propre ARN de transfert (ARNt). Même si les mécanismes de biosynthèse de cet acide aminé ont été établis chez les bactéries en 1991 par Bock et ses

collaborateurs, ceux impliqués chez les eucaryotes sont longtemps restés énigmatiques. En effet, il a été découvert que le sélénium était un composant essentiel des glutathion peroxydases (GPx) et qu'il y était présent sous la forme de Sec. Ce n'est que plus tard qu'une étude de séquençage a révélé qu'à chaque Sec présente dans la séquence des GPx et de la formiate déshydrogénase eubactérienne correspondait un codon UGA, reconnu ailleurs comme un codon stop^{24,25}. La relecture de ce codon UGA par rapport au code génétique classique n'est pas exclusive. En effet, il a également été montré que le codon UGA dicte également l'incorporation du tryptophane dans les mitochondries de mammifères et de levures, ou de la cystéine dans le génome nucléaire de l'*Euplote*²⁶.

Cependant, l'incorporation spécifique de la Sec de manière co-translationnelle chez les bactéries et les eucaryotes nécessite une machinerie complexe et constitue une particularité du monde vivant dont les mécanismes moléculaires ne sont pas encore totalement élucidés²⁷.

La Sec est un acide aminé naturel qui n'existe pas sous forme libre chez les archéobactéries et les eucaryotes. Sa synthèse est effectuée en deux étapes, directement sur son ARN de transfert, appelé ARNt^{Sec}, à partir de la sérine. Il s'agit d'un analogue de la cystéine dans lequel le groupement thiol est remplacé par un groupement séléniol. Ce dernier lui confère un pouvoir nucléophile plus important et un pKa plus faible²⁸. Cette réactivité accrue constitue probablement la raison d'être des sélénoprotéines, malgré la faible efficacité et le coût énergétique élevé de leur synthèse.

L'ARNt^{Sec} est commun aux différentes sélénoprotéines et est codé par le gène *trsp*. L'invalidation de ce gène chez la souris entraîne une absence totale de production de sélénoprotéines et est associée à un développement anormal du squelette et du cartilage, mais également à une mort précoce des embryons²⁹. Brièvement, la biosynthèse de la Sec chez les eucaryotes commence par l'association d'une sérine à l'ARNt^{Sec}, réaction catalysée par la séryl ARNt synthétase (SerS), puis par sa modification en phosphosérine grâce à la phosphoséryl ARNt kinase (PSTK). En parallèle de ces réactions, le sélénium, transformé en sélénophosphate par la sélénophosphate synthase 2 (SPS2), est transformé en P-Ser-ARNt^{[Ser]Sec} grâce à la Sec synthétase (SecS, codée par le gène *SeI/A*), aboutissant ainsi à la formation du Sec-ARNt^{[Ser]Sec}^{30,31} (Figure 5).

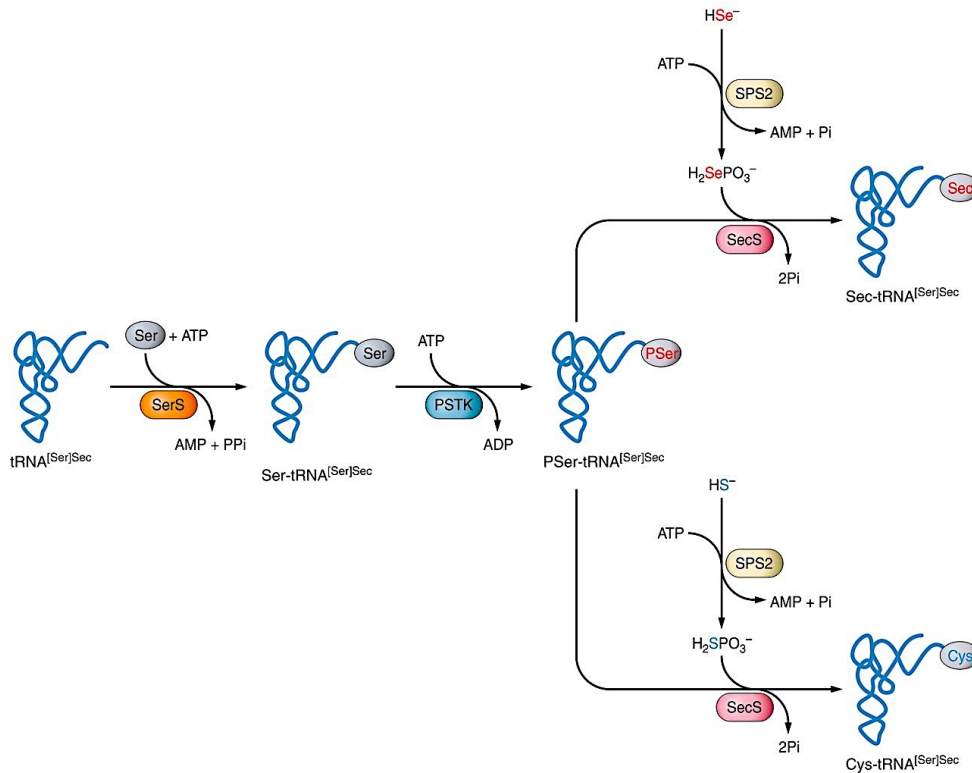


Figure 5 : Mécanisme de biosynthèse de la sélénocystéine chez les eucaryotes.

De manière indépendante, le mécanisme par lequel la Sec est métabolisée a récemment été identifié. Ce dernier nécessite une enzyme nommée Sec lyase (SCL) qui catalyse la dégradation de la Sec en L-alanine et sélénium. L'enzyme SCL a tout d'abord été identifiée dans des homogénats hépatiques de rat³², puis la SCL du cochon fût isolée et caractérisée biochimiquement. Chez les mammifères, cette enzyme est présente dans de nombreux tissus, malgré une activité particulièrement importante dans le foie et les reins et une quasi absence dans le sang et le tissu adipeux. Les rôles physiologiques de la SCL restent peu voire pas connus. Il a été proposé qu'elle pourrait être impliquée dans le recyclage du sélénium à partir de la Sec durant la dégradation des sélénoprotéines. De ce fait, cette enzyme pourrait être une source alternative de sélénium pour les cellules. En effet, il a récemment été montré dans un modèle de culture cellulaire que la SCL était impliquée dans la synthèse des sélénoprotéines.

Malgré quelques études qui ont visé à élucider le rôle physiologique de la SCL, peu de données existent à l'heure actuelle. Dans un modèle d'inactivation de l'expression de son gène, les souris présentent une altération de l'homéostasie glucidique et lipidique, associée à un dérèglement de la

signalisation insulinique, et ce, lors d'un régime alimentaire classique³³. Ces effets sont exacerbés lorsque les animaux sont assujettis à un régime pauvre en sélénium, suggérant des perturbations métaboliques majeures causées par la déficience en sélénoprotéines³⁴. En revanche, la nature des sélénoprotéines impliquées dans la signalisation de la SCL reste à clarifier.

3. Incorporation de la Sec dans les protéines

L'incorporation de la Sec dans les protéines est dictée par le codon UGA qui est présent dans l'ARNm des sélénoprotéines. En effet, cet ARNm contient une séquence repliée en épingle à cheveux, la *Selenocysteine Insertion Sequence* (SECIS), située dans la région 3' non-codante, à une distance variant de 300 à plusieurs milliers de nucléotides du codon UGA devant être recodé³⁵. L'élément SECIS permet la liaison d'un complexe protéique de 500kDa, essentiel à l'insertion de la Sec³⁶. Ce complexe est assemblé sur l'ARNm dans le noyau, puis l'ensemble est exporté à travers un pore nucléaire vers le cytoplasme, où auront lieu la traduction et l'incorporation de la Sec^{37,38} (Figure 6)

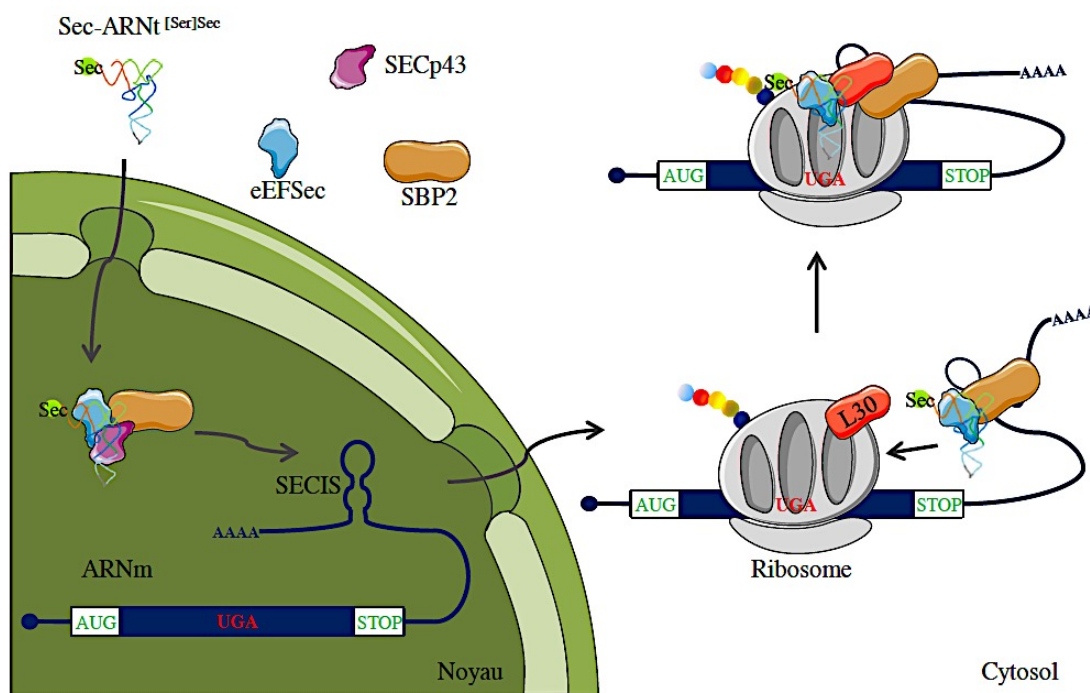


Figure 6 : Modèle d'insertion de la sélénocystéine lors de la traduction des protéines chez les eucaryotes. Adapté de Allmang et al. 2009 et Chavatte et al., 2005.

Les premières protéines identifiées dans ce complexe sont le facteur *SECIS Binding Protein 2* (SBP2) et le facteur d'élongation de la Sec (eEFSec : *eukaryotic Elongation Factor for Sec*). SBP2 est un facteur limitant de la traduction des sélénoprotéines. En effet, la mutation de son gène chez l'homme cause de nombreuses manifestations cliniques associées à une déficience en sélénoprotéines, telles que l'azoospermie, la dystrophie musculaire, une déficience immunitaire et l'augmentation de la sensibilité à l'insuline³⁹. SBP2 est recruté sur la séquence SECIS *via* son domaine C-terminal^{40,41} et recrute lui-même le facteur d'élongation eEFSec. Ce dernier assure alors l'élongation de la chaîne protéique et l'incorporation de la Sec en apportant spécifiquement, *via* son domaine N-terminal, le Sec-ARNt^{[Ser]^{Sec}} au niveau du codon UGA à décoder. La protéine ribosomique L30 s'ajoute également à la machinerie de synthèse des sélénoprotéines et permet l'interaction entre le complexe lié à SECIS et le site « A » du ribosome^{42,43}. De plus, d'autres facteurs ont été identifiés comme régulateurs négatifs (eIF4A3) ou positifs (nucléoline) de l'expression des sélénoprotéines^{44,45}. Jusqu'à présent, la somme des masses moléculaires des différents éléments identifiés dans le complexe reste inférieure à la masse moléculaire du complexe de 500 kDa^{37,46}, suggérant l'identification probable de facteurs supplémentaires dans les années à venir. Enfin, la sélection du codon UGA comme site d'incorporation de la Sec n'est pas due au hasard. En effet, la présence d'une structure tige-boucle adjacente (côté 3') à l'UGA est nécessaire pour son identification en tant que site d'insertion de Sec⁴⁷. Il a été montré que des mutations dans cette partie de l'ARNm étaient responsables d'une inhibition de l'insertion de la Sec⁴⁸.

En examinant plus précisément le mécanisme de synthèse des sélénoprotéines, on comprend alors que la diminution de la biodisponibilité en sélénium entraînera une baisse de quantité d'ARNt formé et donc l'arrêt prématuré de la traduction des sélénoprotéines⁴⁹⁻⁵². Cependant, tout constituant de la machinerie traductionnelle est, en soi, un facteur limitant du système. Il a ainsi été observé que la surexpression sélective d'un seul des facteurs impliqués déstabilisait l'équilibre et par conséquent l'ensemble de la synthèse des sélénoprotéines⁵³⁻⁵⁵. De plus, il est intéressant de souligner l'existence d'une hiérarchie de synthèse des sélénoprotéines. En effet, malgré des mécanismes peu élucidés, cela consiste en une réponse différente pour chaque sélénoprotéine en cas de carence en sélénium^{56,57}. Il semblerait d'ailleurs que SBP2 définisse la capacité maximale de biosynthèse des sélénoprotéines chez les mammifères, pouvant expliquer, au moins en partie, la hiérarchisation de cette synthèse. L'importance fonctionnelle de SBP2 chez l'homme a pu être illustrée par deux observations. Des patients, présentant une mutation du gène codant pour SBP2 développent un défaut de maturation de l'hormone thyroïdienne dû à la chute d'activité d'une

sélénoprotéine⁵⁸. Le second exemple correspond à une mutation pathologique dans le quartet de paires de bases non-canoniques de l'élément SECIS du gène de la sélénoprotéine N observée chez des patients atteints de dystrophie musculaire congénitale. Cette mutation empêche la fixation de SBP2 sur la tige-boucle, donnant lieu à la synthèse d'une sélénoprotéine tronquée non fonctionnelle. Des expériences complémentaires ont montré que le messenger correspondant était déstabilisé, suggérant que SBP2 empêche l'adressage du messenger vers les voies de dégradation⁵⁹.

C'est par ce mécanisme de régulation que les sélénoprotéines ont été découvertes et caractérisées. Brièvement les sélénoprotéines procaryotes peuvent être classées en deux groupes : un premier dans lequel le sélénium est présent sous forme coordonnée ou sous forme de résidu sélénométhionine incorporé aléatoirement ; un second, majoritaire, dans lequel l'atome de sélénium est retrouvé sous forme de sélénocystéine.

Nous nous consacrerons exclusivement aux sélénoprotéines eucaryotes qui feront l'objet de cet exposé. Chez l'homme, on dénombre 25 sélénoprotéines différentes. Les premières identifiées le furent chez les mammifères durant les années 1970. De plus, des approches *in silico* ont permis de déterminer un répertoire exhaustif de sélénoprotéines humaines⁶⁰⁻⁶⁴. Les sélénoprotéines partagent peu de similitudes de séquence et leur grande diversité reflète leur implication dans des fonctions biologiques diverses qui n'ont pas encore été déterminées pour certaines d'entre elles. Les sélénoprotéines ne constituent pas une famille de protéines au sens strict du terme dès lors qu'elles ne dérivent pas d'un ancêtre commun. En revanche, elles partagent des propriétés physico-chimiques communes.

A l'heure actuelle, la majorité des sélénoprotéines ont été découvertes par des approches génomiques, laissant imaginer que les avancées dans ce domaine d'expertise permettront la découverte d'autres protéines de cette famille. Leur distribution varie de manière importante selon les espèces. En effet, même si les sélénoprotéines sont présentes dans les trois domaines de la vie, le nombre de sélénoprotéines varie énormément selon les familles d'organismes (Figure 7).

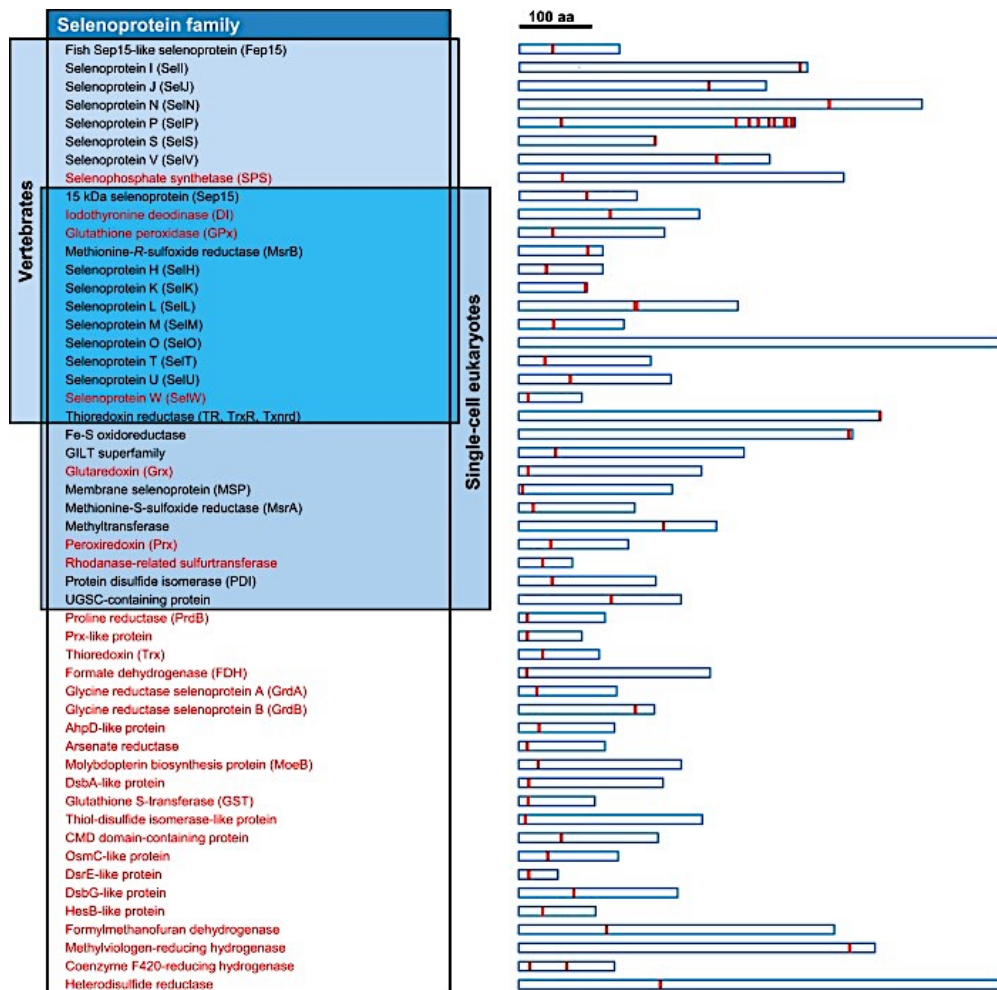


Figure 7 : Famille des sélénoprotéines.

Les sélénoprotéines sont retrouvées dans les trois lignées du vivant. La taille relative de chaque sélénoprotéine est montrée sur la partie droite de la figure et la localisation du/des résidu(s) Sec sont représentés par un trait rouge. D'après Labunskyy et al., 2014.

4. Rôles chez l'homme

Chez l'homme, les fonctions du sélénium sont exercées par les 25 sélénoprotéines. Celles-ci sont exprimées dans de nombreux tissus et types cellulaires et exercent des fonctions diverses et variées⁶⁵ sur lesquelles nous reviendrons par la suite. Néanmoins, le sélénium exerce, en soi, des rôles qui lui sont propres.

Tout d'abord le sélénium semble jouer un rôle essentiel sur la survie. En effet, au moins trois études prospectives ont démontré que de forts taux de sélénium étaient associés avec une faible mortalité⁶⁶⁻⁶⁸. Il existe une association non-linéaire entre le statut en sélénium et la mortalité toutes causes confondues chez plus de 13 000 adultes suivis pendant 12 ans (jusqu'à la fin des années 2000). De plus, l'étude « 9-year longitudinal Epidemiology of Vascular Ageing » (EVA) réalisée en France a montré que de faibles taux basaux de sélénium (en moyenne 87 µg/L) étaient associés avec une augmentation des taux de mortalité toutes causes confondues.

Par ailleurs, malgré de nombreuses études montrant l'importance du sélénium sur l'immunité à la fois *in vitro et in vivo*⁶⁹⁻⁷¹, très peu d'études ont été réalisées chez l'homme. La supplémentation en sélénium chez des individus rechargés en sélénium a montré des effets immunostimulants, avec notamment une majoration de la prolifération des cellules T activées, une augmentation de l'activité des cellules natural killer (NK)^{69,72-76}. Seule une étude clinique a montré l'intérêt d'une supplémentation en sélénium sur le système immunitaire⁷⁵. Réalisée en Angleterre, cette étude a montré que des adultes avec de faibles teneurs en sélénium mais supplémentés avec deux doses, à savoir 50 et 100 µg de sodium sélénite par jour, guérissaient plus rapidement suite à une infection par un poliovirus que ceux qui recevaient le placebo⁷⁶. Cette supplémentation en sélénium semble promouvoir la différenciation des cellules T CD4+ en cellules T-helper-1 (Th1) par rapport à celle en Th2.

Le sélénium semble également être crucial au niveau cérébral. Ainsi, lors d'une déplétion en sélénium, les taux cérébraux de l'oligo-élément sont maintenus aux dépens des autres tissus, dès lors qu'une déficience cérébrale entraîne des dommages irréversibles. La sélénoprotéine P (SEPP1) joue un rôle primordial dans l'apport cérébral de sélénium au cerveau, en se liant à un récepteur apoER2, membre de la famille des récepteurs aux lipoprotéines⁷⁷. Il a en effet été montré que les souris ne pouvant pas synthétiser la SEPP1 développaient une spasticité, présentaient des lésions spontanées et réalisaient des mouvements anormaux et incontrôlés. De nombreuses études chez l'homme laissent penser que le sélénium aurait un rôle à jouer dans différentes pathologies cérébrales, incluant la maladie de Parkinson, des lésions de coordination et de cognition notamment. Les troubles épileptiques et les lésions fébriles chez l'enfant sont associés à une diminution des taux sériques de sélénium⁷⁸⁻⁸¹. Par ailleurs, il a été montré que le turnover de certains neurotransmetteurs était altéré en cas de déficience en sélénium⁸². L'étude clinique InCHIANTI, réalisée sur plus de 1000 adultes âgés de 65 ans et plus a permis de mettre en évidence que les personnes ayant des taux de sélénium bas présentaient une coordination des mouvements altérée

par rapport aux personnes ayant un statut sérique normal⁸³. Par ailleurs, les chercheurs ont noté une augmentation de la prévalence de la maladie de Parkinson dans le quartile ayant les plus faibles taux de sélénium.

Brièvement, le sélénium joue également un rôle bénéfique sur l'humeur. En effet, au moins trois études ont montré que de faibles concentrations en sélénium étaient associées avec une augmentation de la dépression et d'autres troubles de l'humeur, à savoir l'anxiété et la confusion notamment⁸⁴⁻⁸⁷. Ainsi, un questionnaire réalisé aux États-Unis a montré que les individus carencés en sélénium présentaient une modification de la thymie (humeur dépressive, angoisse, anxiété etc.)⁸⁴. Pour autant, le simple fait que la séléniémie soit normale suffit à contrebalancer ces effets.

Par ailleurs, la glande thyroïdienne est le tissu le plus concentré en sélénium dans le corps humain (0,2-2 µg/g)⁸⁸. En effet, les taux de sélénium ont été mesurés dans différents tissus lors d'autopsies en Norvège et ont pu révéler que les taux intrathyroïdiens de sélénium étaient significativement plus élevés que les taux hépatiques (0,72 µg/g dans la thyroïde contre 0,45 µg/g dans le foie)⁸⁹. Cet oligo-élément y joue des rôles divers et variés, notamment par le biais d'une famille de sélénoprotéines particulières, les iodothyronine déiodinases dont nous exposerons les fonctions dans le chapitre suivant. Nous pouvons cependant noter que de nombreuses études ont visé à prouver l'implication de la séléniémie dans différentes infections thyroïdiennes telles que la thyroïdite d'Hashimoto notamment. Récemment, une étude clinique conduite par l'European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO) a visé à évaluer l'impact d'une supplémentation en sélénite (200 µg/jour) pendant six mois sur des patients atteints de la maladie de Basedow, une hyperthyroïdie auto-immune. Ainsi, après six mois de traitement, les patients traités par le sélénium exclusivement ont une atteinte oculaire moins prononcée, une qualité de vie améliorée ainsi qu'une diminution de la progression de la maladie⁹⁰. Ces résultats sont concordants avec ceux observés dans une étude plus récente, qui a montré que les patients récemment diagnostiqués pour cette pathologie présentaient une séléniémie inférieure à la normale, supportant l'hypothèse de l'implication du sélénium dans cette pathologie⁹¹.

Un autre champ d'investigation où le sélénium semble être impliqué est le diabète de type 2 (DT2). Ceci n'est néanmoins pas clairement établi dès lors qu'une controverse est née d'une étude clinique qui a révélé qu'une forte séléniémie était associée à une augmentation de la prévalence du DT2⁹². Les auteurs ont ainsi conclu que le sélénium devait être exclu des recommandations lors de la

prise en charge des patients diabétiques aux Etats-Unis. D'un autre point de vue, l'étude Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT), dans laquelle plus de 35 000 américains ont été supplémentés en sélénium et/ou en vitamine E pendant 5 ans et demi en moyenne, n'a montré aucun effet sur l'incidence du diabète⁹³. De plus, il a été montré dans l'étude française EVA qu'une séléniémie élevée était associée à une diminution du risque d'hyperglycémie pendant les 9 ans de l'étude⁹⁴.

Ainsi, l'ensemble de ces données montre le rôle essentiel et central que semble jouer le sélénium en santé humaine. Néanmoins, malgré de nombreuses études réalisées en modulant la séléniémie (supplémentation orale ou déprivation), seul un faible nombre mène à des conclusions non-sujettes à controverses. Les études récemment conduites ont plutôt visé à caractériser les fonctions des protéines à sélénium, nommées sélénoprotéines, qui semblent médier la majeure partie des effets de l'oligo-élément. De ce fait, nous nous intéresserons dans le chapitre suivant à la grande famille des sélénoprotéines. Nous nous attacherons à définir leur essence, leurs fonctions et leurs implications en santé humaine.

II. Les sélénoprotéines : implication en santé humaine

Au regard de l'immense diversité des fonctions exercées par le sélénium en santé humaine et du nombre important de facteurs impliqués dans la synthèse et la régulation des sélénoprotéines, celles-ci doivent participer à des fonctions essentielles et être finement régulées. L'utilisation d'outils bioinformatiques basés sur la reconnaissance des codons UGA et des éléments SECIS dans les génomes a permis d'identifier un grand nombre de sélénoprotéines, contribuant ainsi à mieux appréhender leur importance et leur phylogénèse⁶².

1. Sélénoprotéines et sélénoprotéome

L'émergence des techniques de séquençage génomique a permis l'identification de près de 3600 gènes regroupés en plus d'une centaine de familles de sélénoprotéines⁹⁵. L'ensemble de ces enzymes est retrouvé chez près de la moitié des eucaryotes, 15% des archées, 25% des bactéries et également chez les virus, malgré de grandes disparités. Pour exemple, chez les eucaryotes, le

sélénoprotéome peut varier entre 59 protéines distinctes chez l'algue unicellulaire *aureococcus anophagefferens* et aucune sélénoprotéine chez les plantes supérieures⁹⁶. Par ailleurs, les organismes marins ont le plus large sélénoprotéome et à l'inverse, les organismes terrestres, à l'exception des mammifères et de quelques espèces de vertébrés, possèdent le sélénoprotéome le plus restreint⁹⁷. Chez les mammifères, on dénombre de 24 à 25 protéines selon les espèces, issues pour la plupart du groupe ancestral de sélénoenzymes de vertébrés, ayant lui-même une grande homologie avec celui des eucaryotes unicellulaires, montrant ainsi l'immense conservation de ces protéines entre les espèces⁹⁸.

Malgré cela, et de manière remarquable, l'existence des sélénoprotéines tend à diminuer voire à disparaître au cours de l'évolution des espèces eucaryotes, comme c'est le cas chez les plantes terrestres⁹⁷. Ce déclin est associé à une conversion de la Sec en Cys par mutation du codon UGA en UGC ou UGG. Nous retrouvons ainsi une douzaine de conversions au cours de l'évolution des vertébrés et huit pendant l'expansion des mammifères. Réciproquement, seule une conversion de Cys en Sec a été observée chez les eucaryotes, en partie à cause de la machinerie d'incorporation. Néanmoins, lors de l'évolution des bactéries et des archées, nous pouvons souligner que cette conversion est plutôt fréquente, mais n'est possible que si l'organisme avait auparavant porté des sélénoprotéines, possédant ainsi la machinerie associée, ou si un transfert horizontal de gène a eu lieu pour l'apporter⁹⁹. Une étude portant sur la composition des sélénoprotéomes a suggéré l'hypothèse que cette diminution d'utilisation de la Sec pouvait être associée à la colonisation de l'environnement terrestre par les organismes. En effet, le sélénium y étant moins disponible et les taux d'oxygène étant élevés, les sélénoprotéines deviendraient très réactives, ce qui semble être délétère pour les organismes¹⁰⁰.

2. Caractérisation structurelle des sélénoprotéines mammifères

Chez les mammifères, on dénombre environ 25 gènes codant pour des sélénoprotéines différentes. Pour rappel, leur acide aminé sélénié – la Sec – est inséré de manière co-translationnelle dans les protéines en synthèse en réponse à un codon UGA, traditionnellement désigné comme un codon de terminaison de la traduction. A l'heure actuelle, la plupart des sélénoenzymes ont été classées en fonction de leur activité enzymatique principale telle que les GPx, les TrxR, mais également les idothyronine désiodases (DIO) qui sont les plus caractérisées à l'heure actuelle¹⁰¹. Le

reste des protéines de cette famille regroupe les SelH, I, K, M, N, O, P, R, S, T, V, W, 15 et la sélénophosphate synthétase 2 (SPS2). L'ensemble des sélénoprotéines chez l'homme et les rongeurs ne possède qu'un seul résidu Sec, situé à l'extrémité C- ou N-terminale, à l'exception de la DIO2 et de la SelP qui possèdent 2 et 10 résidus, respectivement. Pour autant, malgré qu'ils soient basés quasi exclusivement sur le pouvoir oxydo-réducteur de la Sec, les mécanismes d'action de ces enzymes peuvent différer selon les types cellulaires.

3. Rôles principaux et mécanismes d'action des GPx, TrxR et DIO

Les GPx sont des composants essentiels du système antioxydant. Elles sont en effet impliquées dans l'élimination des hydroperoxydes afin de maintenir l'homéostasie rédox de la cellule. Les GPx mammifères sont sous-classées en différentes sous-familles, numérotés consécutivement de 1 à 8^{102,103}. Les GPx 1, 2 et 3 forment des homotétramères capables de réduire les hydroperoxydes en eau. Dans le but de revenir à l'état réduit, ces protéines utilisent le tripeptide glutathion (figure 8A)¹⁰⁴. De manière opposée, la GPx4 agit sous forme monomérique et peut inhiber la peroxydation des phospholipides membranaires¹⁰⁵. Les GPx agissent indirectement sur des processus métaboliques comme la sécrétion d'insuline, la prolifération ou encore la mort cellulaire, et ce, en régulant les taux d'hydroperoxydes comme le H₂O₂¹⁰⁶. Ainsi, le H₂O₂ intracellulaire oxyde la protéine PTEN, l'inactivant et provoquant une augmentation de phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃), un régulateur important de la prolifération et de la survie cellulaire notamment. La réduction de ces espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les GPx permet ainsi de réguler ces processus¹⁰⁷.

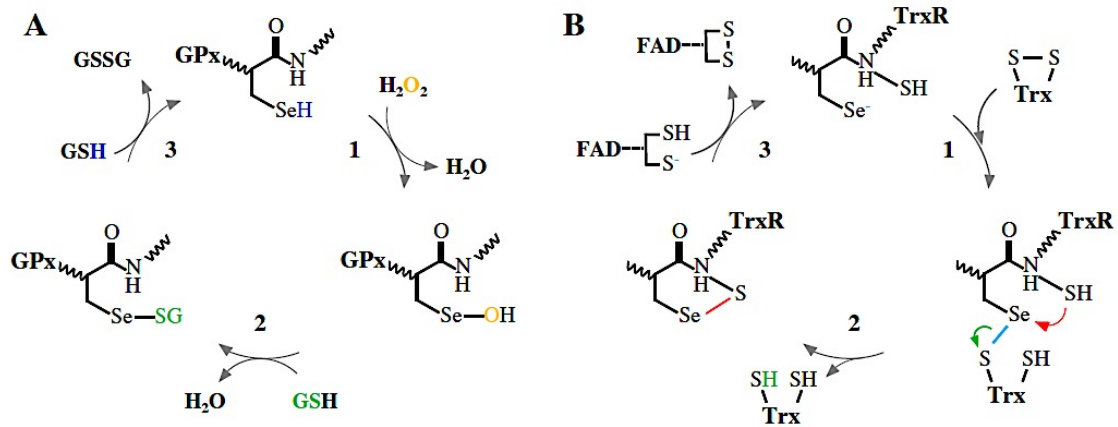


Figure 8 : Mécanismes d'action des GPx et TrxR.

A) La réduction du H_2O_2 en eau s'effectue par l'oxydation du sélénel en un intermédiaire instable – $SeOH$ (1). Ensuite, ce groupement attaque une molécule de glutathion GSH pour créer un pont thioséléniure – $SeSG$ (2). L'utilisation d'un autre glutathion permet la régénération de la GPx (3). Le glutathion oxydé $GSSG$ est réduit par les enzymes glutathion réductases (non illustré).

B) La thiorédoxine Trx subit une attaque nucléophile du Se sur son pont disulfure (1). Le caractère électrophile du Se en fait une cible du soufre adjacent (flèche rouge) générant un pont thioséléniure ($-SeS$) et provoquant la libération de la Trx réduite (flèche verte, 2). Au niveau de la sous-unité $TrxR$ associée, le cofacteur $NADPH$ apporte les électrons au pont disulfure via la fonction FAD (non illustré). Ces électrons permettent de régénérer le groupement sélénel (3).

D'après Sarma & Mugesh, 2008 et Lothrop et al., 2014.

Les thiorédoxine réductases ($TrxR$) sont essentielles à la réduction des thiorédoxines, enzymes majeures impliquées dans la réduction des ponts disulfures de nombreuses cibles (liaison covalente entre deux cystéines, induite par oxydation)¹⁰⁸. Ces sélénoenzymes présentent des domaines de liaison pour les coenzymes $NADPH$ et FAD , un pont disulfure à l'extrémité C-terminale et le groupement sélénié en N-terminal. Ce sont des homodimères en conformation « tête à queue » et leur extrémité C-terminale est située à proximité de la région N-terminale de l'autre sous-unité. Au sein de la cellule, le groupement sélénel régénère la Trx par réduction de son pont disulfure. Une fois oxydées, les $TrxR$ retrouvent leur conformation initiale par ajout d'électrons issus de leurs cofacteurs (à savoir FAD et $NADPH$) (Figure 8B). Les $TrxR$, de manière semblable aux GPx , sont impliquées indirectement dans la réparation de l'ADN ou encore dans le maintien de l'homéostasie rédox¹⁰⁹.

Les DIO sont des sélénoprotéines membranaires qui modulent les taux d'hormones thyroïdiennes, soit par activation de la prohormone thyroxine (T_4) en 3,3',5-triiodothyronine (T_3) grâce à DIO1/DIO2, soit par inactivation de cette dernière via DIO3. Ces enzymes agissent par désiodation (clivage d'un atome d'iode). La DIO3 inactive la T_3 en T_2 (3,3'-diiodothyronine) et participe, avec la DIO2, à la régulation tissu-spécifique des concentrations intracellulaires locales de T_3 ¹¹⁰. Les DIO, via la régulation de ces hormones, sont ainsi impliqués dans divers processus physiologiques. En effet, il a été montré en condition d'hypothermie, que la T_3 était produite en grandes quantités par la DIO2 dans les adipocytes bruns, ce qui permettait l'expression de la protéine découplante UCP-1 (*Uncoupling protein 1*). Cette dernière pourra ainsi inhiber la formation d'ATP dans la mitochondrie et ainsi détourner l'énergie produite par la β -oxydation lipidique, pour produire de la chaleur¹¹¹.

4. Rôle des autres sélénoprotéines

Néanmoins, malgré une caractérisation globale de ces trois sous-familles de sélénoenzymes, les autres sélénoprotéines sont bien moins connues et ont fait l'objet de nombreuses études depuis une quinzaine d'années.

Parmi elles, la SPS2 joue un rôle prépondérant dans la biosynthèse de la Sec, dès lors qu'elle produit le monosélénophosphate à partir du sélénide et intervient également dans la régulation spécifique des sélénoprotéines¹¹². La SelR, ou méthionine sulfoxyde réductase B1 est une enzyme dont l'activité principale consiste en la réduction de la méthionine, le second acide aminé le plus susceptible d'être oxydé (après la Cys). Ainsi, cette sélénoprotéine participe, par son action, à l'activation/inactivation de protéines¹¹³.

Certaines sélénoprotéines sont principalement exprimées dans le réticulum endoplasmique. C'est le cas notamment de la sélénoprotéine 15-kDa (Sep15), de la SelK et de la SelS. Une étude publiée récemment a suggéré que la Sep15 jouait un rôle dans le contrôle qualité des glycoprotéines et dans la formation des ponts disulfure, via son association avec la protéine chaperonne UGGT (*UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase*)¹¹⁴. Parallèlement, deux protéines analogues, SelS et SelK sont impliquées quant à elles dans la dégradation des protéines mal repliées dans le réticulum¹¹⁵. En effet, SelK et SelS interagissent avec deux protéines, Derlin-1 et Derlin-2

respectivement, qui forment ensemble un canal permettant de rétro-transférer les protéines mal-conformées et ainsi entraînent leur dégradation dans le cytosol par le protéasome¹¹⁶.

Certaines sélénoprotéines jouent également un rôle dans le cycle cellulaire. Pour exemple, la SelW est une protéine cytosolique abondamment exprimée et est capable de relancer le cycle cellulaire suite à un arrêt en phase G2. Cette enzyme agit en réduisant le pont disulfure de la phosphatase CDC25B, ce qui a pour conséquence de la libérer de son complexe avec la protéine 14-3-3. Ainsi, cette phosphatase élimine un phosphate inactivateur de la kinase cdk1, permettant l'entrée en mitose de la cellule¹¹⁷. Récemment, Bang et ses collaborateurs ont publié un travail montrant le rôle de la Sep15 dans l'arrêt du cycle en phase G1, via la régulation des protéines p21 et p27. Cette même protéine semblerait également jouer un rôle dans la réorganisation du cytosquelette¹¹⁸.

Ceci n'est pas l'unique exemple d'interaction entre les sélénoprotéines et d'autres partenaires. En effet, la SelN s'associe avec le récepteur de la ryanodine au cours de la contraction des cellules musculaires. Ce récepteur permet la formation d'un canal qui assure la libération du calcium séquestré dans le réticulum sarcoplasmique. En l'absence de SelN, l'affinité de liaison de la ryanodine pour son récepteur diminue fortement et la libération du calcium est altérée, notamment à cause de l'oxydation des résidus Cys du récepteur¹¹⁹. Cette défaillance calcique a pour conséquence un dysfonctionnement musculaire majeur, associé à une rigidité de la colonne vertébrale et à une insuffisance respiratoire, ces symptômes étant couramment retrouvés dans les myopathies congénitales.

Par ailleurs, la SelP est l'unique sélénoenzyme contenant dix résidus Sec chez l'Homme et les rongeurs¹²⁰. La SelP est synthétisée dans le foie, puis est libérée dans le plasma où elle exerce sa fonction principale de pool corporel de sélénium. Cependant, elle semble également synthétisée dans d'autres tissus tels que le cœur ou le cerveau où elle exercerait des fonctions similaires. Différentes études ont montré l'implication de la SelP dans le transport et le maintien de l'homéostasie du sélénium¹²¹. Il a été montré que les animaux invalidés pour la SelP souffraient de déficits sévères en sélénium dans le cerveau, les testicules, mais également chez les fœtus, ces déficits étant associés à des pathologies sévères¹²².

Malgré le grand nombre d'études qui ont visé à caractériser les sélénoprotéines, que ce soit de manière fonctionnelle ou en santé humaine, un grand nombre d'entre elles reste néanmoins peu

caractérisé. Nous nous focaliserons dans cette étude sur une séléno-enzyme particulière, peu caractérisée à l'heure actuelle : la sélénoprotéine T (SelT).

III. La sélénoprotéine T

En 1999, Kryukov et ses collaborateurs ont identifié deux nouvelles sélénoprotéines dont la SelT grâce au logiciel SECISearch qui se base sur la reconnaissance d'une séquence SECIS au sein du génome⁶². Une étude phylogénétique a révélé que sa séquence nucléotidique est la plus conservée chez les vertébrés. En effet, la séquence humaine possède 97 à 100% d'homologie avec celle des mammifères, 95% avec le poulet mais également 89% avec la grenouille^{98,123}. De plus, l'analyse de plusieurs organismes modèles a dévoilé la présence d'homologues contenant la Cys en lieu et place de la Sec chez les protozoaires, des plantes terrestres et aquatiques et des insectes, ce qui laisse suggérer que la SelT pourrait avoir une origine plus ancienne au sein du règne vivant¹²³.

1. Caractéristiques structurelles de la SelT

L'épissage de la séquence nucléotidique de la SelT génère un ARN messager de six exons qui contient la région 3' non codante où est situé l'élément SECIS, nécessaire à l'incorporation de l'acide aminé Sec dont le codon est situé dans l'exon 2 (Figure 10-A). Suite à la transcription de l'ARNm, une protéine de 195 aa est formée, contenant différentes structures secondaires, essentielles à la caractérisation de la protéine (Figure 10-B). En effet, son extrémité N-terminale est composée d'un peptide signal en position 1-19 qui permet son transfert intracellulaire¹²⁴. A l'instar de la SelW et des GPx, la SelT possède un centre rédox compris dans un motif de type thiorédoxine. Celui-ci est présent sous la forme d'une séquence en acide aminé particulière : Cys-X-X-Sec pour la SelT, homologue à la séquence Cys-X-X-Cys de la thiorédoxine^{125,126}. Le motif thiorédoxine permet à la protéine d'exercer une activité oxydoréductase en formant un pont disulfure. Ceci est permis par le repliement particulier de la structure protéique avec la présence d'un cœur de feuillets β entouré de plusieurs hélices α . Bien que la structure tertiaire de la SelT ne soit pas encore caractérisée, l'homologie de ses structures secondaires suggère un repliement similaire à celui de la thiorédoxine et de la SelW (Figure 10-C). La SelT contient également deux domaines hydrophobes en positions 87-102 et 125-143, à cheval sur 4 hélices α , qui prédisent une localisation transmembranaire^{124,125,127}. L'analyse

récente de la séquence protéique de la SelT murine par le serveur I-Tasser a permis de prédire plusieurs modèles de repliement tertiaire à l'aide des structures protéiques caractérisées et présentes dans la *Protein Data Bank* (données non publiées obtenues par nos collaborateurs de l'U982). Cette étude a permis de montrer que la SelT avait une structure similaire à la DsbA bactérienne (75%), mais également à la thiorédoxine (67%) et à la SelW (64%).

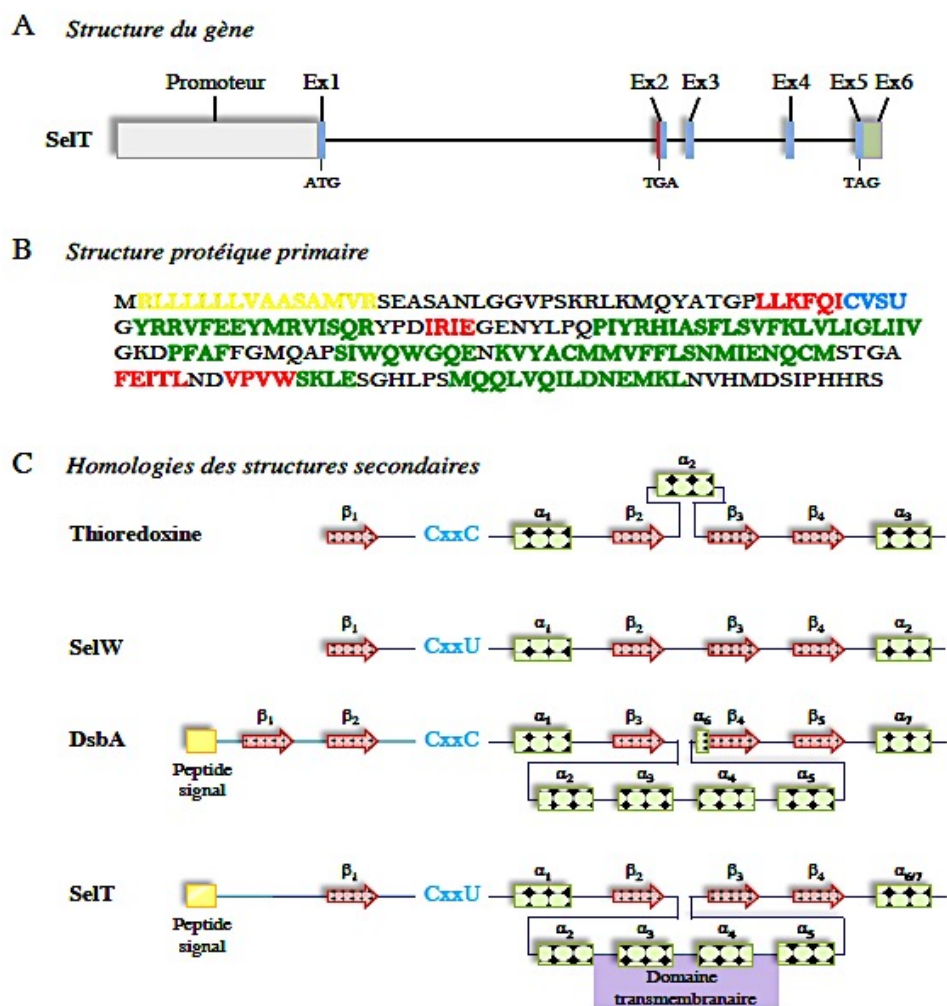


Figure 9 : Structures de la SelT

A) Structure du gène de la SelT de la souris qui après épissage, donne un ARNm formé de 6 exons (Ex). Les codons initiateur (ATG), stop (TAG) et le codon de la Sec (TGA) sont annotés. L'exon 6 constitue la région 3' non codante de l'ARNm où est situé l'élément SECIS. B) Structure primaire de la SelT présentant le peptide signal (jaune), les feuillets β (rouge), le motif CVSU (bleu) et les hélices α (vert). C) Comparaison des structures secondaires de quatre protéines homologues (Thiorédoxine, SelT/W et DsbA). Ces enzymes ont en commun un motif de type thiorédoxine (Trx) : β - α - β - β - α . La Trx possède une troisième hélice α_2 localisée entre les brins β_2 et β_3 tandis que la SelT et la DsbA possèdent quatre à cinq hélices supplémentaires. Ces données sont fournies par SelenoDB 2.0, le serveur I-Tasser et d'après Shouldice *et al.*, 2011; Moustafa and Antar, 2012.

2. Expression tissulaire de la SelT

Chez les mammifères, la SelT est exprimée dans de nombreux tissus durant l'embryogenèse, et ce, dès les premiers stades de développement¹²⁴. Au 20^e jour embryonnaire (E20) et jusqu'à la naissance, son expression est maximale durant l'organogenèse, notamment au niveau du système nerveux, du foie, du cœur, des poumons et du testicule (Figure 11-A et B). Toutefois, dès la fin de la première semaine postnatale et à l'âge adulte, l'expression de la SelT décroît fortement puis s'éteint dans la majorité des organes, à l'exception du cerveau, du foie et du cœur où elle est détectée en concentration résiduelle. Elle reste néanmoins fortement exprimée dans quelques tissus qui possèdent une activité endocrine, à savoir le testicule, le pancréas et la glande pituitaire (Figure 11-C et D)^{124,128,129}.

Par ailleurs, il a été montré que l'inactivation de la SelP chez la souris entraînait une chute de plus de 60% de l'expression de la SelT dans le testicule. De plus, malgré une diminution importante des taux de SelT lors d'une carence en Se, ces derniers sont maintenus dans le cerveau et le cœur, suggérant un rôle potentiel de cette protéine dans ces organes, même à l'âge adulte¹³⁰. De plus, la SelT peut être fortement réexprimée lors de pathologie, notamment d'ordre ischémique, dès lors que l'étude d'Ikematsu a montré qu'elle était surexprimée dans le cerveau suite à une ischémie cérébrale¹³¹. De surcroît, il a été montré que la SelT est principalement localisée dans l'appareil de Golgi et dans le réticulum endoplasmique, ce qui pourrait l'impliquer dans les diverses fonctions de ces organites¹²⁴.

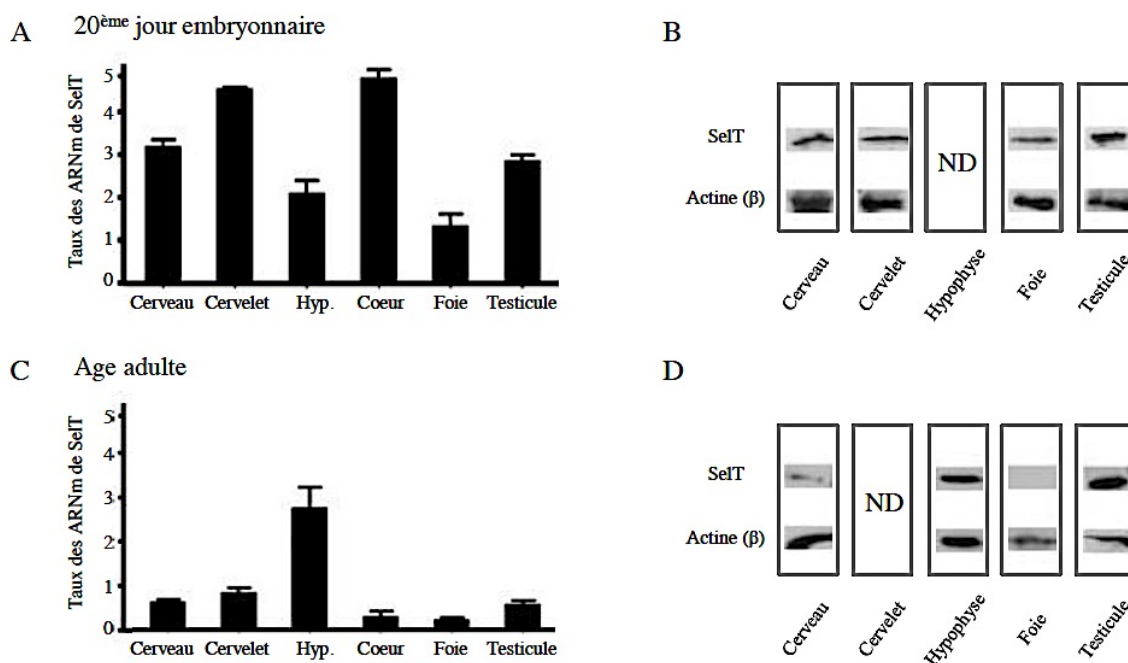


Figure 10 : Taux d'expression tissulaire de la SeIT au stade embryonnaire et chez le rat adulte.

A-C) Taux relatifs des ARN messagers de la SeIT au sein de différents tissus prélevés à E20 (A) et à l'âge adulte (C) chez le rat. B-D) Expression de la protéine SeIT à E20 (B) et à l'âge adulte (D), détectée par western blot. Pit. : glande pituitaire, ND : non déterminé. Adapté de Tanguy *et al.*, 2011.

3. Rôles biologiques

Une étude visant à élucider le rôle de la SeIT lors de la différenciation neuroendocrine fut publiée en 2008 par Grumolato *et al.* En effet, les chercheurs mirent en évidence l'effet du facteur neurotrophique PACAP sur l'expression de la SeIT au sein d'une lignée PC2, issue d'un phéochromocytome de rat. Cette étude suggéra également l'hypothèse d'un rôle important de la SeIT dans l'action du PACAP sur la mobilisation du calcium intracellulaire, nécessaire à la sécrétion des catécholamines par ces cellules¹²⁴. Ce rôle supposé dans la sécrétion hormonale a également été souligné dans un second modèle cellulaire dans lequel la libération d'insuline, également induite par le PACAP, était atténuée en l'absence de sélénoprotéine¹²⁸. Les auteurs ont ainsi confirmé le rôle de la SeIT dans la modulation de la production d'insuline *in vivo* et ainsi sur l'homéostasie glucidique via l'invalidation de son gène dans les cellules β pancréatiques murines.

D'un point de vue moléculaire, d'autres travaux, réalisés au sein de la même équipe, ont souligné l'importance de la SelT dans le réticulum endoplasmique au cours de la production de protéines destinées à être sécrétées (Hamieh et al., soumis). Les auteurs ont ainsi montré que la SelT hypophysaire ferait partie d'un complexe oligosaccharyltransférase qui est impliqué dans la N-glycosylation de protéines, comme la pro-opiomélanocortine par exemple, qui est un précurseur de plusieurs hormones peptidiques. Il faut souligner que la formation de ponts disulfures est essentielle lors de ce processus.

Par ailleurs, il a été montré que l'adhésion des fibroblastes murins était altérée suite à la répression de l'expression de la SelT par utilisation d'ARN interférent¹³². Au sein de ces cellules, la perte de la SelT provoque une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la morphologie cellulaire, qui peuvent être à l'origine de ce phénotype. En parallèle de cela, l'absence de SelT accroît l'expression génique de différentes oxydoréductases, telles que la SelW, la SOD1 ou encore la DIO2, suggérant la mise en place d'un mécanisme compensatoire, mais également d'une fonction oxydoréductase de la SelT au cours de l'adhésion cellulaire.

Ainsi, quelques études évoquent des fonctions de la SelT au cours de processus cellulaires impliquant des mécanismes d'oxydoréduction. De plus, une approche d'invalidation génique de la SelT a été entreprise chez la souris dans le but d'appréhender son rôle de manière plus globale. Il s'est rapidement avéré que son extinction provoque une mort de l'organisme dès les premiers stades embryonnaires (Anouar et al., résultats non publiés). L'ensemble de ces résultats plaide en faveur d'un rôle majeur de cette protéine dans l'ensemble des processus d'oxydoréduction. Toutefois, le rôle de la SelT dans des pathologies à fort stress oxydatif, notamment au niveau cardiaque, n'a pas encore été caractérisé.

De ce fait, nous nous focaliserons dans la prochaine partie sur une pathologie majeure de nos jours, qui implique un remodelage oxydatif sans égal, à savoir l'insuffisance cardiaque chronique.

L'INFARCTUS DU MYOCARDE ET L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

I. Définition et épidémiologie de l'insuffisance cardiaque chronique

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les maladies cardiovasculaires sont à l'origine d'environ un tiers des décès dans le monde (soit 17 millions de personnes). En 2020, elles deviendront a priori les premières causes d'invalidité et de mortalité dans le monde^{133,134}. Le taux grandissant de ces maladies est dû à des facteurs de risque que l'étude des populations a permis de mettre en exergue. En effet, certaines pathologies cardiovasculaires sont liées à l'hérédité¹³⁵ ou à des maladies congénitales^{136,137}, alors que d'autres facteurs de risques sont considérés comme modifiables car ils sont influencés par l'hygiène de vie (tabagisme, sédentarisation, régime alimentaire par exemple) ou par une condition pathologique (hypertension artérielle, obésité, hypercholestérolémie etc.)¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Plus de la moitié des décès dus aux maladies cardiovasculaires sont provoqués par des maladies coronariennes. En effet, depuis la fin du XXe siècle, les maladies coronariennes représentent la première cause de mortalité dans le monde et dans les pays développés¹³⁴. Ainsi, près de 90% des patients développant des affections coronariennes ont été exposés à au moins un facteur de risque majeur, comprenant l'HTA, le diabète, le tabagisme ou l'hypercholestérolémie¹⁴¹. De plus, du fait du vieillissement des populations, les épidémiologistes tablent sur une augmentation de plus de 80% de ces maladies dans les pays en voie de développement^{134,142}.

L'insuffisance cardiaque chronique (ICC) est maintenant considérée comme une maladie aux proportions endémiques^{143,144}. Il s'agit d'une maladie cardiovasculaire qui peut se définir comme un état physiopathologique où une anomalie de la structure ou de la fonction cardiaque entraîne une incapacité du cœur à maintenir un taux d'oxygène suffisant pour couvrir les besoins métaboliques et fonctionnels des différents organes à l'effort mais également au repos¹⁴⁵. Il s'agit d'un problème de santé majeur et croissant. En Europe, la prévalence de ce syndrome dans la population générale est estimée entre 0,4 et 2%^{146,147}. En effet, les estimations donnent au moins 10 millions de personnes atteintes. En France, il y aurait un million d'insuffisants cardiaques et l'ICC est en passe de devenir la maladie cardiovasculaire la plus fréquente en France avec près de 120 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année¹⁴⁸.

De manière générale, l'ICC se développe lentement après une lésion cardiaque. Lors du diagnostic, la mesure de la fraction d'éjection du VG (FEVG) permet de discriminer deux types d'insuffisances cardiaques. En cas de FEVG inférieure à 40-50%, on parle d'IC systolique. Si la FEVG est préservée, l'IC est dite à fraction d'éjection préservée¹⁴⁵.

La *New York Heart Association* (NYHA) ou l'*American College of Cardiology/American Heart Association* (ACC/AHA) ont proposé une classification de l'ICC définie par quatre stades évolutifs, respectivement d'un point de vue symptomatique ou structurel. Ces classifications sont résumées dans le tableau 1. Brièvement, l'ICC est une pathologie qui évolue naturellement et progressivement d'un stade asymptomatique où l'IC est dite « compensée » vers un stade symptomatique où elle ne l'est plus. L'ICC est une pathologie de très mauvais pronostic. En effet, aux stades III et IV, le pronostic de l'ICC est sombre, dès lors qu'un patient sur deux décède dans les cinq ans qui suivent le diagnostic. En France, on estime à 32 000 le nombre de décès par an. En termes de coûts, l'impact économique de l'ICC est non négligeable puisqu'il avoisine les 1% des dépenses de santé publique. Ce syndrome constitue la première cause d'hospitalisation chez l'adulte. Les dépenses directes dues à l'ICC représentent ainsi 39 millions d'euros par million d'habitants en France. La prévention de l'ICC représente donc une priorité de santé publique car ce syndrome grave évolue généralement vers une forme lourde de handicap.

NYHA classification fonctionnelle		ACC/AHA grades de l'IC	
Classes basées sur la sévérité des symptômes et l'aptitude physique		Grades de l'IC basés sur la structure et les dommages du muscle cardiaque	
Classe I	Pas de limitation : les efforts physiques habituels ne provoquent pas de fatigue, dyspnée ou palpitations inhabituelles	Grade A	Haut risque de développer une IC. Pas de modifications structurelle et fonctionnelle ; pas de symptômes.
Classe II	Il existe une petite limitation des capacités physiques : le patient n'a pas de symptômes au repos mais des efforts normaux provoquent fatigue, palpitation ou dyspnée.	Grade B	Atteinte structurelle du cœur associée au développement de l'IC mais sans symptômes.
Classe III	Il existe une limitation évidente de la capacité d'effort : le patient se sent toujours bien au repos mais un effort minime provoque déjà des symptômes.	Grade C	IC symptomatique associée à des modifications structurelles au niveau cardiaque.
Classe IV	Le patient ne peut plus effectuer aucun effort sans éprouver de symptômes : les symptômes de l'IC sont déjà présents au repos et s'aggravent au moindre effort.	Grade D	Modifications structurelles à un stade avancé et symptômes au repos en dépit d'une thérapie médicale

Tableau 1 : Tableau représentant les classifications NYHA et ACC/AHA de l'insuffisance cardiaque.

Le tableau ci-dessus résume les quatre stades de l'IC selon deux méthodes : la première basée sur la sévérité des symptômes et l'aptitude physique du patient et la seconde basée sur la structure et les dommages subis par le myocarde.

L'infarctus du myocarde (IDM) est le facteur de risque de l'IC le plus important¹⁴⁹. Il a été mis en évidence qu'environ 30% des patients développent une IC dans les 7 à 8 ans après un infarctus, en particulier les patients présentant une dysfonction VG au moment de l'IDM¹⁴³. Ce défaut de contractilité myocardique va engendrer une augmentation du travail cardiaque qui, pour maintenir le débit cardiaque va s'hypertrophier. De nos jours, plus de 60 % des patients ayant souffert d'un infarctus du myocarde développent un remodelage myocardique, en particulier du ventricule gauche, pouvant conduire à une insuffisance cardiaque^{150,151}.

II. L'infarctus du myocarde

Les pathologies cardiaques ischémiques demeurent aujourd'hui encore la première cause de mortalité dans les pays industrialisés. L'infarctus du myocarde se définit comme une mort cellulaire induite par une ischémie myocardique prolongée provoquée par une diminution ou une interruption du débit coronaire. L'IDM peut avoir de lourdes conséquences sur la contractilité cardiaque en entraînant la nécrose d'une partie plus ou moins importante du muscle cardiaque. Néanmoins, cette définition n'a cessé d'évoluer. La troisième et dernière définition universelle en date, communiquée en 2012, regroupe à la fois les symptômes cliniques, des changements significatifs de l'électrocardiogramme, mais également des modulations du niveau des biomarqueurs cardiaques^{152,153}.

L'ischémie myocardique est un processus dynamique à l'origine de lésions cellulaires et moléculaires d'ampleur variable selon la taille, la durée et la sévérité de l'épisode ischémique¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Il est ainsi possible de distinguer les ischémies dites de courtes durées, responsables de lésions myocardiques ischémiques réversibles, des ischémies prolongées dont les lésions sont irréversibles. En effet, en deçà d'une quinzaine de minutes d'ischémie, les dommages cellulaires sont considérés comme totalement réversibles, puisque la reperfusion coronaire permet de rétablir un métabolisme et une fonction normale, sans apparition de nécrose cardiomyocytaire¹⁵⁷. A l'inverse, si l'ischémie est prolongée au-delà de 15-20 minutes, une partie du tissu myocardique peut être irréversiblement lésée¹⁵⁸. Ces lésions sont notamment caractérisées, à l'échelle tissulaire, par la présence d'inclusions intra-mitochondriales denses et de ruptures membranaires pouvant mener à la fuite de composants cellulaires et à une anarchie architecturale¹⁵⁹. La nécrose associée à l'agression ischémie est alors d'autant plus importante que la durée de l'ischémie est longue, s'étendant progressivement de

l'endocarde vers l'épicarde^{160,161}. Par ailleurs, au niveau cellulaire, la restriction des apports en nutriments et en oxygène induite par l'ischémie est responsable de modifications métaboliques et d'altérations ioniques principalement responsables d'une surcharge calcique¹⁶²⁻¹⁶⁴.

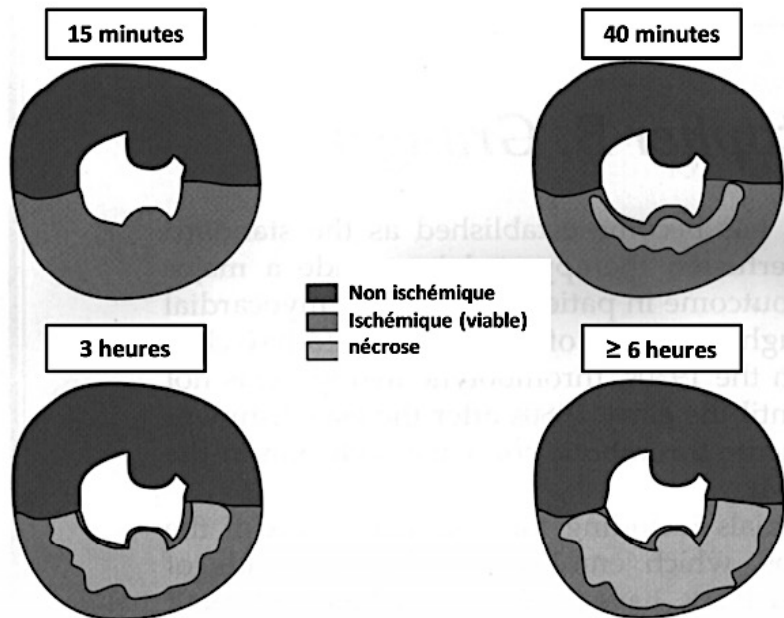


Figure 11 : Cinétique d'extension de la taille d'infarctus après ischémie-reperfusion myocardique (Jennings et al. 1983).

En effet, en condition physiologique, lorsque le flux sanguin coronaire assure un apport adéquat en O₂ et nutriments aux tissus cardiaques, la principale source énergétique des cardiomyocytes est l'adénosine triphosphate (ATP) issue de la β -oxydation des acides gras. Cette transformation métabolique nécessite une forte consommation en oxygène. Lors d'une obstruction, partielle ou totale, des artères coronaires, l'ischémie provoquée est à l'origine d'une souffrance myocardique dans le tissu. Le manque brutal d'oxygène contraint le métabolisme myocardique, normalement exclusivement aérobie, à passer en mode anaérobie par utilisation préférentielle de la voie de la glycolyse, non consommatrice d'oxygène. Cette voie métabolique est responsable d'une

déplétion myocardique en ATP due à sa faible rentabilité, mais également d'une production massive de protons H^+ , à l'origine d'une acidose cellulaire^{159,165,166}. Dans le but de restaurer le pH, l'échangeur Na^+/H^+ (isoforme NHE-1 pour les cardiomyocytes) est activé, permettant ainsi l'élimination des H^+ en excès, mais provoquant un important flux entrant de Na^+ ¹⁶⁷. Par ailleurs, la déplétion en ATP réduit l'activité des pompes Na^+/K^+ ATPase, favorisant ainsi l'accumulation des Na^+ intracellulaires. La diminution du gradient transmembranaire sodique a pour conséquence l'activation inversée de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX), ainsi responsable d'une surcharge calcique intracellulaire¹⁵⁹. Cette activité inversée des NCX semble être la cause principale de la surcharge calcique générée au cours de l'ischémie¹⁶⁸, malgré qu'elle soit renforcée par l'inactivation des pompes calcium-dépendantes, normalement responsables de la diminution de la concentration intracellulaire de calcium¹⁶⁹.

Ainsi, dans de telles conditions de déplétion en ATP, d'acidose et de surcharge calcique, l'activité contractile cardiaque est fortement altérée et la survie du myocarde dépend de la survenue de la reperfusion.

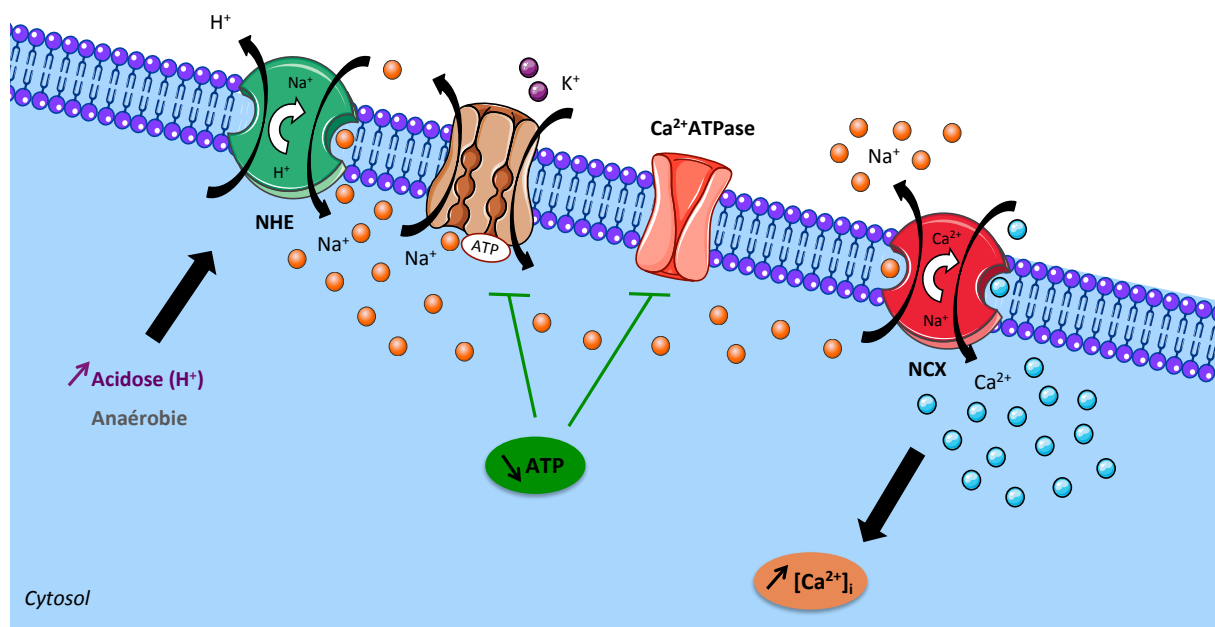


Figure 12 : Altération de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire au cours de l'ischémie.

La reperfusion coronaire est reconnue comme étant le seul moyen de sauver le myocarde ischémié. En effet, il est désormais clairement établi que la taille de l'infarctus est l'un des déterminants majeurs du pronostic vital du patient et que celle-ci dépend principalement de la durée de l'ischémie. De ce fait, la stratégie majeure pour en limiter la taille est la reperfusion cardiaque^{170,171}. Son objectif principal est de permettre la réouverture de l'artère responsable de l'infarctus, principalement en éliminant le thrombus responsable de l'occlusion coronaire, et ainsi, de rétablir le flux sanguin. De manière évidente, les cardiomyocytes situés au centre de la zone ayant subi l'infarctus étant déjà nécrosés, ils ne pourront être récupérés mais le maintien de la circulation sanguine permet de stabiliser la progression de l'infarctus, de prévenir la perte additionnelle de cellules au niveau des zones bordantes, de modérer la dilatation du ventricule gauche et de préserver la fonction cardiaque en limitant le processus de remodelage¹⁷². Néanmoins, bien qu'elle soit indispensable à la survie du myocarde, la reperfusion et la ré-oxygénation qui l'accompagne sont responsables de nombreux dommages tissulaires qui lui sont propres, regroupés sous le terme de « lésions de reperfusion », qualifiant ainsi la reperfusion d'« épée à double tranchant »¹⁵⁷ et faisant d'elle une cible clé dans le développement de stratégies de cardioprotection. En effet, de nombreuses études, à la fois cliniques^{170,173-175} et expérimentales¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ ont mis en évidence que la reperfusion s'accompagne d'effets délétères propres, et d'une accélération du processus de mort cellulaire initié par l'ischémie, aboutissant au concept du « syndrome de reperfusion »^{154,179,180}.

Ainsi, le retour soudain du flux sanguin entraîne la réintroduction d'oxygène dans la zone ischémiée. Ce « burst d'oxygène » est responsable d'une production massive de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO) impliqués de manière majeure dans l'aggravation de la surcharge calcique amorcée en période ischémique, ainsi que dans l'apparition des lésions de reperfusion. L'ensemble des mécanismes mis en place va aboutir à différentes altérations cardiaques, à la fois structurelles et fonctionnelles, regroupées sous le terme de remodelage ventriculaire gauche.

Ce processus, qui sera détaillé dans le chapitre suivant, se met en place très précocement après l'épisode ischémique et se poursuit plusieurs semaines voire plusieurs mois.

III. Le remodelage ventriculaire gauche

1. Définition

Le remodelage cardiaque est un processus réactionnel adaptatif à court terme, mais délétère à long terme¹⁸¹. Ce mécanisme existe dans des situations physiologiques, notamment chez les sportifs de haut niveau, et est dans ce cas de figure, réversible et sans fibrose cicatricielle¹⁸². Ce processus peut également être pathologique lorsqu'il survient en réponse à une surcharge volumique (comme lors d'insuffisance aortique par exemple), ou dans des situations de surcharge pressives (comme dans l'hypertension artérielle par exemple)¹⁸².

L'IDM est une situation complexe associant surcharge volumique et pressive. Dans le cadre de cette pathologie, le remodelage ventriculaire gauche (RVG) se définit comme l'ensemble des modifications géométriques et structurales conduisant, entre autres, à l'hypertrophie du VG en réponse à l'amputation d'une partie des capacités contractiles¹⁸³. Cette hypertrophie vise à normaliser les contraintes pariétales, toujours en suivant la loi de Laplace (pression pariétale = $k \times \pi \times \text{diamètre} / \text{épaisseur}$) qui montre que le niveau des contraintes pariétales est proportionnel au diamètre du VG et inversement proportionnel à l'épaisseur de la paroi. L'hypertrophie du VG est généralement associée à une dilatation de ce dernier, ce qui permet d'augmenter initialement le volume d'éjection systolique et d'assurer le maintien du débit cardiaque malgré la baisse de contractilité¹⁸⁴. A long terme, cette dilatation devient délétère pour le myocarde car elle est à l'origine d'une augmentation des contraintes pariétales et crée un cercle vicieux conduisant à une dysfonction diastolique et à une ICC.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous intéresserons principalement au RVG consécutif à un IDM, qui débute très précocement après l'épisode ischémique. Il est le fruit des modifications de la contrainte ventriculaire et de l'activation des systèmes d'adaptations neuro-hormonaux, et est un élément central dans la progression de l'ICC. Il s'agit d'un phénomène continu et évolutif que l'on peut schématiquement diviser en deux phases (Figure 15). Il se caractérise par une modification de la géométrie et de l'architecture du ventricule, une altération du couplage excitation-contraction (CEC), une hypertrophie des cardiomyocytes et une modification des éléments non-myocytaires du muscle cardiaque.

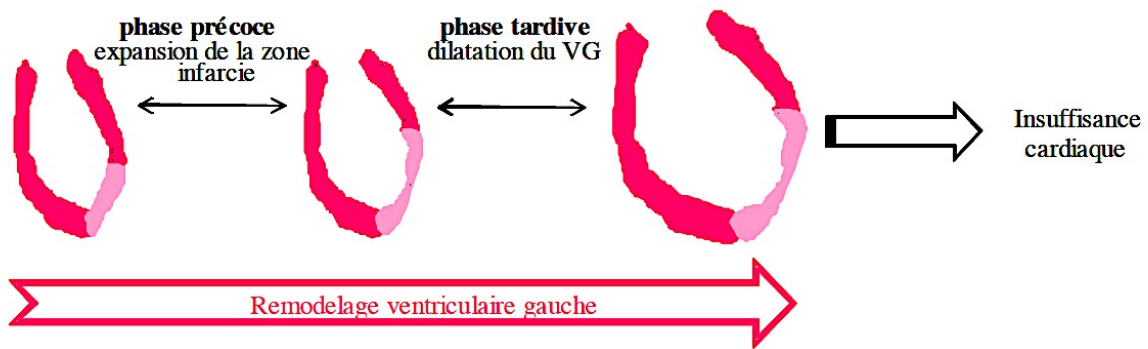


Figure 13 : Représentation schématique des différentes phases du remodelage ventriculaire gauche.
La zone infarctée est représentée en rose clair.

2. Altérations fonctionnelles et structurelles du myocarde suite à l'I/R

Comme évoqué précédemment, l'I/R cardiaque est à l'origine d'une diminution brutale des apports en oxygène et en nutriments, ce qui va avoir pour conséquence l'activation des voies anaérobies et ainsi engendrer différents dommages au niveau cardiaque qui se propagent de l'endocarde jusqu'à l'épicarde. La mort cellulaire ainsi engendrée est à l'origine de nombreuses modifications fonctionnelles et structurelles au niveau cardiaque qui sont regroupées sous le terme « remodelage cardiaque ». A court terme, les molécules endogènes sécrétées activent les réponses cellulaires et physiologiques. A plus long terme, le remodelage mène à une altération des dimensions, de la géométrie et de l'épaisseur pariétale du ventricule gauche. Il entraîne une augmentation de la surcharge mécanique, associée à une diminution de la réserve cardiaque, suivis du développement d'une insuffisance cardiaque chronique.

Les lésions tissulaires engendrées par l'infarctus du myocarde provoquent une cascade de réponses conduisant à la formation d'un tissu de réparation et potentiellement à la cicatrisation de la blessure. De nombreux processus dynamiques sont mis en place, et n'intéressent pas seulement la zone ayant subi l'ischémie. Ces processus impliquent les composants du myocarde (cellules, matrice extracellulaire notamment), des médiateurs solubles ainsi que des cellules sanguines et mésenchymateuses. De manière générale, ce processus est complexe et est subdivisé en deux étapes pouvant se superposer et impliquant des processus d'inflammation, la formation d'un nouveau tissu et le remodelage de ce dernier. Brièvement, il est possible de dichotomiser ce remodelage en deux

phases^{185,186} : la première, précoce, dite « phase d'expansion de l'infarctus »¹⁸⁷, et la seconde plus tardive dite « phase de dilatation tardive du VG ».

Jusqu'au 21^e jour post-infarctus, durant la phase de remodelage précoce, les cellules inflammatoires associées aux fibroblastes et aux cellules endothéliales forment un tissu de granulation qui remplace le tissu lésé afin de rétablir l'intégrité tissulaire. La phagocytose des cellules nécrosées se poursuit alors que les myofibroblastes et les cellules endothéliales migrent puis prolifèrent dans la zone infarctée. Les fibroblastes synthétisent alors une matrice désorganisée qui forme un tissu provisoire et les cellules endothéliales forment de nouveaux vaisseaux sanguins. La zone infarctée n'est pas la seule à supporter les modifications structurelles et fonctionnelles, puisque les zones bordantes subissent une réponse hypertrophique suite à l'augmentation de volume des cardiomyocytes.

Enfin, la phase de remodelage tardif intervient en général huit semaines après le syndrome d'I/R et peut durer plusieurs mois. Durant cette phase, les cellules du tissu de granulation permettent la substitution de ce tissu en un tissu cicatriciel tentant de mimer les propriétés du tissu d'origine. Les MMPs et les TIMPs contribuent en permanence à la synthèse et à la dégradation de la MEC et sont impliqués dans le remodelage chronique du VG. Suite à la cicatrisation et au remodelage, le VG subit une dilatation progressive et une diminution de sa fonction, conduisant au développement d'une ICC.

a. Phase d'expansion de l'infarctus

Décrite pour la première fois en 1978, la phase d'expansion de l'infarctus est la première à se mettre en place suite à un syndrome d'I/R. Elle est caractérisée par une dilatation et un amincissement aigu de la zone ayant subi l'infarctus, n'impliquant pas une nouvelle nécrose myocardique¹⁸⁸. Cette phase d'expansion n'est pas constante et dépend de l'étendue de l'infarctus et de son caractère transmural. Elle survient dans les premières heures qui suivent l'épisode ischémique et persiste pendant plusieurs mois. En effet, Hutchins et Bulkley ont pu examiner en 1978 des cœurs issus de patients décédés dans les 30 jours suivants l'épisode ischémique. Ils ont ainsi pu observer deux changements cruciaux : d'une part un amincissement de la zone ayant subi l'infarctus mais également une dilatation du ventricule gauche¹⁸⁸. Il a notamment été montré que la paroi

ventriculaire gauche perdait en moyenne 60% de son épaisseur initiale dans les mois suivants l'épisode ischémique¹⁸⁹⁻¹⁹⁵.

Morphologiquement, cette phase est caractérisée par un amincissement des parois du ventricule gauche au niveau de la zone infarctée qui est dû au glissement des myocytes les uns par rapport aux autres et à la fragmentation du réseau de collagène interstitiel^{196,197}. Cette expansion affecte principalement la fonction systolique et va conduire le ventricule à s'adapter en se dilatant presque instantanément dans le but de maintenir son volume d'éjection. Ceci se fait au prix d'une élévation de la pression en fin de remplissage.

Sur le plan physiopathologique, les premières heures suivant l'épisode ischémique sont caractérisées par le phénomène de *Wave front* qui consiste en la propagation de la nécrose cellulaire depuis les couches sous-endocardiques vers les couches sous-épicardiques. Cette nécrose engendre une inflammation importante qui est caractérisée par l'afflux d'un grand nombre de cellules inflammatoires sur le site de l'infarctus. Ainsi, des polynucléaires et des monocytes/macrophages sont recrutés au niveau de la zone ischémisée dans le but de nettoyer les débris cellulaires et de dégrader le collagène intermyocytaire¹⁹⁸. Cet environnement inflammatoire est donc à l'origine de l'amaigrissement des parois du ventricule gauche au niveau de la zone infarctée et de l'élongation de l'infarctus.

Les plaquettes sanguines, stimulées par les structures matricielles endommagées générées sur le site de la lésion adhèrent au foyer de la blessure et s'agrègent, puis constituent un caillot sanguin contenant de la fibrine et de la fibronectine, qui permettent la formation d'une matrice provisoire¹⁹⁹. L'activation des plaquettes et des cellules du tissu endommagé provoque la libération de substances vasoconstrictrices entraînant l'augmentation de la perméabilité vasculaire périphérique à la zone infarctée et permettant le chimiotactisme des cellules immunitaires^{200,201}.

Les mastocytes, peu nombreux mais résidents permanents du tissu conjonctif, semblent être les premières cellules à intervenir après les plaquettes. Ils sont attirés et activés au niveau du foyer de la blessure et sécrètent des médiateurs stimulant les autres cellules ou participant à la réparation (migration des fibroblastes, activation de la production de collagène etc.). Contrairement aux autres types cellulaires qui interviennent de manière transitoire, les mastocytes sont impliqués dans les processus de réparation jusqu'à reconstitution du tissu lésé²⁰².

Les polynucléaires neutrophiles, connus comme première barrière de défense contre l'infection par des agents pathogènes, sont aussi les premières cellules de l'immunité recrutées dans la zone infarctée. Elles y libèrent différents médiateurs et enzymes dont la MMP-9 par dégranulation. Leur rôle est de phagocyter les débris tissulaires nécrosés. Leur migration est stimulée par les produits de l'activation plaquettaire ou par les molécules libérées par les cellules constitutives du myocarde²⁰³.

b. Phase de dilatation tardive du ventricule gauche

Cette première phase est ensuite suivie d'une seconde phase dite proliférative, dont la transition avec la précédente est assurée par la résorption de l'inflammation et la prolifération/différenciation des fibroblastes.

La dysfonction contractile ventriculaire post-ischémique ou « *myocardial stunning* » (sidération myocardique) se définit comme une dysfonction mécanique qui persiste suite à la reperfusion myocardique, malgré l'absence de dommages irréversibles. Cette sidération myocardique est donc un phénomène totalement réversible. Elle a été décrite pour la première fois sur un modèle expérimental d'I/R en 1975 par Heyndrickx et al.²⁰⁴ mais n'a été dénommée « *stunning* » qu'en 1982 par Braunwald & Kloner²⁰⁵. Parmi les nombreux mécanismes responsables de cette sidération myocardique proposés dans la littérature scientifique, les plus reconnus sont la surcharge calcique, en lien avec l'altération du couplage excitation-contraction (CEC) des cardiomyocytes, sur lequel nous reviendrons par la suite, la production de RLO²⁰⁶. En effet, la diminution de la charge en Ca^{2+} du RS et l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique sont responsables d'une réduction de l'amplitude du transitoire calcique, facteur clé du CEC myocytaire, à l'origine d'une altération de la contraction des cardiomyocytes^{207,208}.

Par ailleurs, en plus d'être impliqués dans l'altération des protéines chargées de l'homéostasie calcique cellulaire, les RLO produits en début de reperfusion ont également pour cible les protéines contractiles. L'oxydation des myofilaments est à l'origine d'une altération de la contractilité cardiomyocytaire, notamment expliquée par une diminution de la sensibilité de la machinerie contractile au Ca^{2+} ²⁰⁹. La dissipation de ces altérations de contractilité ventriculaire post-ischémiques peut nécessiter un délai allant de quelques heures à plusieurs jours selon la sévérité de l'ischémie.

c. Les dommages vasculaires de reperfusion

Le phénomène de « *no-reflow* » se définit par l'absence de reperfusion myocardique post-ischémique survenant malgré la désobstruction de l'artère coronaire responsable de l'ischémie. Ce phénomène a été décrit pour la première fois sur un modèle expérimental en 1966 par Krug *et al.*²¹⁰, puis a été plus amplement défini par Kloner *et al.* en 1974²¹¹ mais ce n'est qu'en 1985 qu'il a été rapporté cliniquement par Schofer *et al.*²¹².

Dans le cadre de l'IR, la restauration du flux sanguin ne s'accompagne pas systématiquement d'une reperfusion au niveau de la microcirculation du territoire ischémié. Cette obstruction peut s'expliquer en termes de dommages « anatomiques » ou « structuraux » par la présence d'un œdème cellulaire comprimant les micro-vaisseaux. De plus, l'afflux brutal de débris plaquettaires et/ou thrombotiques provenant du traitement de l'ischémie par thrombolyse peut être à l'origine d'une obstruction de la microcirculation distale^{213,214}. D'un point de vue fonctionnel, le phénomène de « *no-reflow* » résulte principalement d'une altération de la fonction endothéliale des microvaisseaux, liée à la production de RLO par les neutrophiles circulants ainsi que par les cellules endothéliales elles-mêmes²¹⁵. L'altération de la fonction endothéliale lors de l'IR est responsable d'une réduction de la libération de NO par les vaisseaux coronaires. La moindre biodisponibilité en NO vasculaire, qui est le principal agent vasodilatateur et un puissant anti agrégant plaquettaire^{216,217}, contribue à augmenter l'adhésion des neutrophiles à la paroi vasculaire et favorise ainsi l'aggravation du phénomène de « *no reflow* »²¹⁸. Prévenir et/ou limiter ces altérations vasculaires de reperfusion revêt une importance clinique majeure dans le traitement de l'IR et constitue donc un élément clé dans les stratégies de cardioprotection²¹⁹.

d. Mécanismes physiopathologiques du remodelage cardiaque

Modifications de la géométrie et de l'architecture du ventricule

Il est désormais clairement établi que le remodelage cardiaque aboutit à une hypertrophie dite excentrique du myocarde. En effet, le cœur va ainsi devenir moins elliptique et plus sphérique, ce qui va aboutir à une dilatation ventriculaire et à un amincissement pariétal. Cet amincissement, associé à l'augmentation de la post-charge induite par la dilatation ventriculaire, est à l'origine d'une discordance entre la post-charge et la capacité contractile de la paroi, expliquant la dysfonction

myocardique et la chute du débit cardiaque. Par ailleurs, l'évolution du remodelage vers une modification globale de l'architecture du ventricule aboutit à l'augmentation de la contrainte pariétale radiale, augmentant ainsi le déficit énergétique des cardiomyocytes. Cette augmentation de la contrainte pariétale entretient l'expression de l'angiotensine II, de l'endothéline et du TNF α , ainsi que les voies de signalisation de l'hypertrophie.

L'ischémie reperfusion myocardique fait appel à la fois à une surcharge pressive mais également à une surcharge volumique. L'hypertrophie induite par une surcharge pressive va entraîner l'assemblage en parallèle de nouveaux sarcomères, aboutissant à un élargissement des cardiomyocytes, à une hypertrophie concentrique et à une fonction systolique initialement conservée. A l'inverse, lors d'une surcharge volumique, de nouveaux sarcomères s'assemblent en série, aboutissant à un allongement des cardiomyocytes, une dilatation ventriculaire et à une dysfonction plus précoce.

Les cardiomyocytes

Les cardiomyocytes sont très impliqués dans les processus de remodelage. En effet, de tous les composants de la paroi cardiovasculaire, les myocytes ont été les plus étudiés, au vu de leur activité contractile et de leur nombre dans le cœur. En réponse à une lésion, le nombre de cardiomyocytes diminue et les myocytes survivants s'allongent ou s'hypertrophient, prenant ainsi part au processus initial de compensation pour maintenir le volume d'éjection systolique après une perte du tissu contractile. L'épaisseur de la paroi ventriculaire augmente également et les modifications des conditions de charge étirent les membranes cellulaires²²⁰. Ce phénomène pourrait jouer un rôle en induisant l'expression de gènes associés à l'hypertrophie. Les modifications des conditions de charge étirent les membranes cellulaires et pourraient jouer un rôle en induisant l'expression de gènes associés à l'hypertrophie. Dans les cardiomyocytes, cela peut entraîner la synthèse de nouvelles protéines contractiles et l'assemblage de nouveaux sarcomères. L'augmentation de la tension pariétale peut précipiter le déséquilibre énergétique et l'ischémie, qui est l'un des déterminants majeurs de la demande myocardique en oxygène. Il semblerait que ceci aboutisse à un cercle vicieux avec une augmentation de la tension pariétale et de l'épaisseur de la paroi puis un déséquilibre énergétique et une ischémie.

Les fibroblastes

Suite à une lésion ischémique, les fibroblastes et les cellules endothéliales sont activés. Il a été montré, à la fois dans des modèles animaux et chez l'homme, que la stimulation des fibroblastes augmentait la synthèse de collagène et *a fortiori* la fibrose à la fois au niveau de la zone infarctée mais également au niveau des zones adjacentes à l'infarctus, contribuant ainsi au remodelage²²¹. De plus, les fibroblastes exercent également une action paracrine en jouant le rôle de régulateurs de la prolifération des cardiomyocytes²²².

Stress oxydant et troubles de l'homéostasie calcique

Lors de la reperfusion, la remise en fonction du système énergétique cellulaire aérobie va permettre la remise en activité des canaux ATP-dépendant et favoriser l'extrusion du calcium intracellulaire. Néanmoins, l'apport soudain d'oxygène survenant lors de la reperfusion conduit à la formation de radicaux libres en excès, responsables d'un stress oxydatif sévère impliqué dans de nombreuses altérations cellulaires²²³⁻²²⁵. Hearse introduit ainsi en 1978 le concept de « paradoxe de l'oxygène », désignant la confrontation inévitable entre la nécessité d'apports en oxygène pour la survie cellulaire et la production délétère de RLO liée à cet apport et dont vont résulter les lésions cellulaires de stress oxydant²²⁶.

Parmi les nombreuses cibles cellulaires des RLO, les protéines responsables de l'homéostasie calcique cellulaire au niveau membranaire et du réticulum sarcoplasmique (RE/RS) sont fortement atteintes^{206,227,228}. Notamment, l'oxydation des pompes Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarco/endoplasmique (SERCA-2a)²²⁹, responsables de la re-séquestration calcique dans le RS en diastole, conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. La production de RLO au cours de la reperfusion est ainsi associée à une aggravation de la surcharge calcique intracellulaire induisant notamment une diminution de l'amplitude du transitoire calcique. De plus, cette surcharge calcique, en activant la CaMKII (*Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II*), est responsable d'une hyperphosphorylation des récepteurs à la ryanodine (RyR-2) à l'origine d'une augmentation des fuites de calcium du Rs, et contribuant ainsi à l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium en diastole²³⁰ (Figure 14).

Par ailleurs, le rôle majeur du stress oxydatif dans la progression des maladies cardiovasculaires n'est plus à démontrer. Ainsi, le rôle de ce stress oxydant ainsi que les mécanismes qui lui sont sous-jacents seront discutés dans le chapitre dédié à cet effet.

Altérations mitochondriales

La production massive de RLO, associée à la surcharge calcique cytosolique a été montrée comme responsable d'altérations de la fonction mitochondriale particulièrement critiques dans la genèse des lésions de reperfusion²³¹⁻²³³. Parmi celles-ci, l'ouverture du mégapore de perméabilité transitoire (mPTP pour « *mitochondrial Permeability Transition Pore* ») est largement rapportée comme étant la plus délétère^{232,233}. Le mPTP est un méga canal voltage-dépendant situé sur la membrane interne mitochondriale, permettant la diffusion passive de solutés et de molécules de taille inférieure à 1,5 kDa²³⁴. Ainsi, la surcharge calcique observée conduit à l'ouverture du mPTP et donc à une perte de la perméabilité sélective de la membrane mitochondriale. Ce phénomène est principalement à l'origine d'un effondrement du potentiel de membrane mitochondrial, conduisant à une disruption de la mitochondrie (plus connue sous le terme « *mitochondrial swelling* »). Il en résulte principalement une déplétion de la synthèse d'ATP, aggravant les troubles cellulaires générés en ischémie et pouvant aboutir à la nécrose cellulaire²³⁵, et une libération de différents facteurs pro-apoptotiques dont les deux principaux sont le cytochrome c et l'AIF (*apoptosis inducing factor*)^{236,237}.

Par ailleurs, le *burst d'oxygène* au cours de la reperfusion mène à une production massive de RLO par la chaîne respiratoire, faisant de la mitochondrie la première source de radicaux libres au cours de l'ischémie-reperfusion.

Ainsi, une interdépendance importante apparaît entre les deux principaux mécanismes à l'origine du syndrome d'ischémie-reperfusion, que sont la surcharge calcique des cardiomyocytes et la surproduction de RLO (Figure 14).

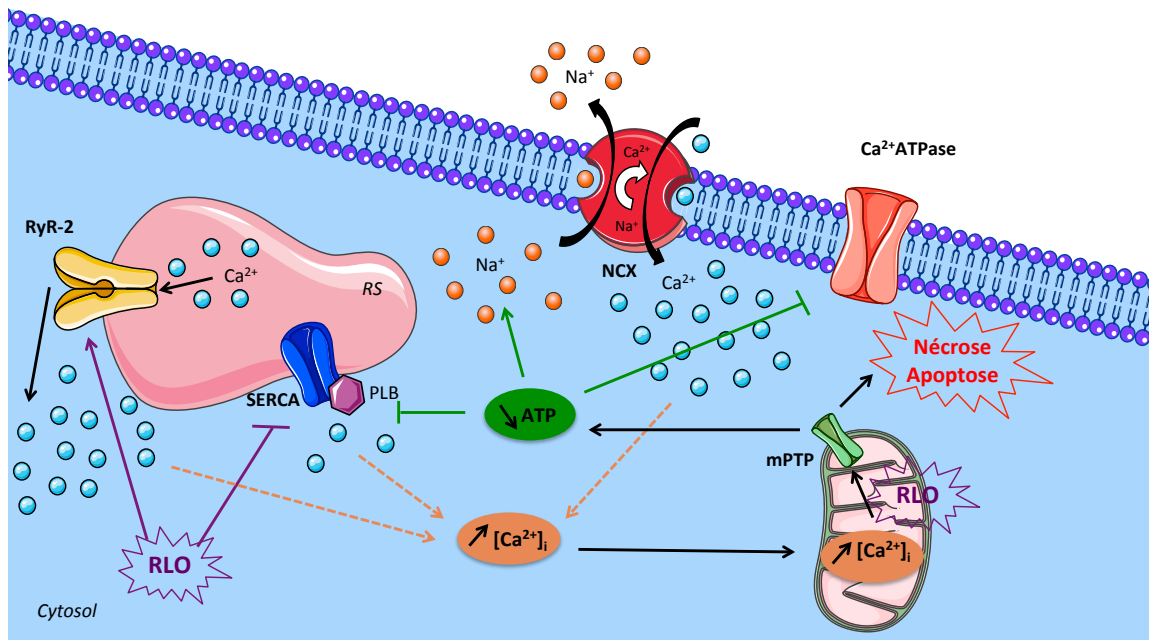


Figure 14 : Effets de la surcharge calcique et du stress oxydant sur les troubles de la reperfusion myocardique.

L'inflammation cardiaque

L'inflammation joue un rôle central et majeur dans la physiopathologie de l'ensemble des pathologies. Au niveau cardiovasculaire, un large spectre d'études, à la fois expérimentales et cliniques, ont reporté le rôle délétère de l'inflammation aiguë et chronique dans la progression de l'I/R cardiaque. Lors de la phase ischémique, les cellules nécrotiques libèrent leur contenu cellulaire, entraînant ainsi la libération de médiateurs inflammatoires et donc la mise en place de la réponse immunitaire innée. Cette dernière a pour objectif de remplacer le tissu nécrosé par une cicatrice fibrotique. Par ailleurs, l'augmentation importante de la production de RLO et de médiateurs inflammatoires lors de la reperfusion a été montrée comme étant à l'origine de l'aggravation de la dysfonction cardiaque. De ce fait, l'inflammation cardiaque semble être une cible thérapeutique prometteuse de l'insuffisance cardiaque. Ainsi, une étude précédemment menée dans notre laboratoire a permis de démontrer l'intérêt d'une inhibition de l'inflammation, moyennant un ciblage de l'IL1- β , dans une pathologie comme l'insuffisance cardiaque chez le rat (Harouki *et. al*, 2017, *accepté*).

La mort cellulaire au cours de l'infarctus du myocarde

La mort cellulaire observée au cours du syndrome d'I/R est directement dépendante de la sévérité et de la durée de l'ischémie. Ainsi, c'est un déterminant majeur de la taille d'infarctus ainsi que la qualité de la récupération fonctionnelle du myocarde post-ischémique, à la fois à court et à long terme. La mort des cardiomyocytes résulte de trois processus différents que sont la nécrose, l'apoptose et l'autophagie ²³⁸.

Tout d'abord, la nécrose cellulaire est caractérisée par un gonflement de la cellule jusqu'à rupture et perte de l'intégrité de la membrane plasmique, et qui entraîne la fuite du contenu cellulaire ²³⁹. La nécrose a longtemps été considérée comme un processus non programmé, mais le concept de nécroptose programmé a peu à peu pris sa place dans la communauté scientifique ²³⁹. Au cours de l'I/R, la nécrose résulte principalement de la déplétion en ATP lors de l'ischémie, déplétion qui est responsable d'une incapacité des cellules à maintenir leur activité vitale. Il s'agit du type de mort cellulaire le plus répandu lors de l'ischémie cardiaque. Ainsi, l'altération de l'homéostasie ionique engendrée par l'ischémie est à l'origine d'un gonflement cellulaire et d'altération membranaires menant à la rupture létale de la cellule. Lors de la reperfusion, les altérations mitochondriales, responsables d'une limitation de la synthèse d'ATP et d'une augmentation de la production de RLO, vont prolonger le processus nécrotique ²³⁵.

L'apoptose, initialement introduite par Kerr en 1972 ²⁴⁰, est définie comme un processus de mort cellulaire « physiologiquement programmée ». Cette dernière est finement régulée par une balance dynamique de signaux de survie (facteurs anti-apoptotiques) et de mort cellulaire (facteurs pro-apoptotiques). L'apoptose est caractérisée en une condensation et une fragmentation de l'ADN, un bourgeonnement de la membrane plasmique ainsi qu'une perte de l'asymétrie membranaire. Le processus apoptotique semble être initié lors de l'ischémie et amplifié lors de la reperfusion, principalement suite à la surcharge calcique et à la production accrue de RLO ^{176,241}. Ainsi, ces processus provoquent l'ouverture du mPTP et la libération de facteurs pro-apoptotiques par la mitochondrie, tels que le cytochrome c et l'AIF (cf. Partie « Altérations mitochondriales »).

Brièvement, l'autophagie est un processus physiologique permettant l'expulsion et la dégradation des organites ou des macromolécules cellulaires endomagées, dans le but de maintenir l'homéostasie cellulaire ²⁴². Malgré un rôle largement controversé dans le cadre de l'I/R, certaines études semblent lui attribuer un rôle d'adaptation bénéfique contribuant à la survie du myocarde ^{243,244}, alors que d'autres ont pointé son rôle dans l'induction de la mort cellulaire ²⁴⁵⁻²⁴⁷. Bien

qu'aucun consensus ne soit actuellement établi, il semblerait que l'autophagie soit un processus bénéfique au maintien de l'homéostasie cellulaire en cas de stress ischémique modéré, mais qu'elle puisse devenir délétère lors d'une stimulation excessive qui pourrait être induite par une ischémie prolongée ou par une production exacerbée de RLO, comme c'est le cas dans l'I/R^{248,249}.

Altération du couplage excitation-contraction

Le remodelage ventriculaire gauche s'accompagne de la modulation d'un grand nombre de processus biologiques. La perturbation des flux calciques, la réexpression des gènes fœtaux, la modulation du métabolisme énergétique, le stress oxydant, l'inflammation, la mort cellulaire ou encore la modulation de l'expression des protéines sarcomériques, sont autant d'éléments qui participent au processus du RVG et à l'installation de l'ICC²⁵⁰.

Le couplage excitation-contraction (CEC) renvoie à l'ensemble des cascades biologiques qui font suite au potentiel d'action myocytaire et aboutissent à la contraction puis à la relaxation du myocarde. Dans le cœur sain, les flux calciques jouent un rôle central puisqu'ils régulent la contraction cardiaque. En effet, la dépolarisation du cardiomyocyte au cours du potentiel d'action va entraîner l'entrée de calcium dans la cellule par le biais de canaux calciques de type L localisés au niveau des tubules transverses (tubules T). Cette entrée modeste de calcium va activer les récepteurs à la ryanodine de type 2 (RyR2) localisés au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS). Cette activation va entraîner la libération massive des stocks calciques contenus dans le RS (Figure 15)^{250,251}. Ce processus est ainsi nommé « *Calcium-induced Calcium-release* » (CICR). L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire va promouvoir la fixation du Ca²⁺ sur la troponine C (TnC) au niveau des sarcomères, favorisant l'interaction actine-myosine. La formation d'un pont entre filaments fins et filaments épais est à l'origine de la contraction cardiaque²⁵². En diastole, la concentration en Ca²⁺ intracellulaire va revenir à son niveau basal grâce à plusieurs systèmes : expulsion du Ca²⁺ hors de la cellule par les échangeurs Na⁺/Ca²⁺ et par une pompe Ca²⁺/ATPase, réabsorption du Ca²⁺ dans le RS par la protéine endo/sarcoplasmique Ca²⁺ ATPase SERCA2a (pour *sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase*)²⁵³. L'activité de cette pompe est régulée par le phospholamban (PLB) dont la phosphorylation par les protéines kinases A (PKA) et la protéine kinase II calcium-calmoduline dépendante (CaMKII) permet de lever l'inhibition de la pompe SERCA2.

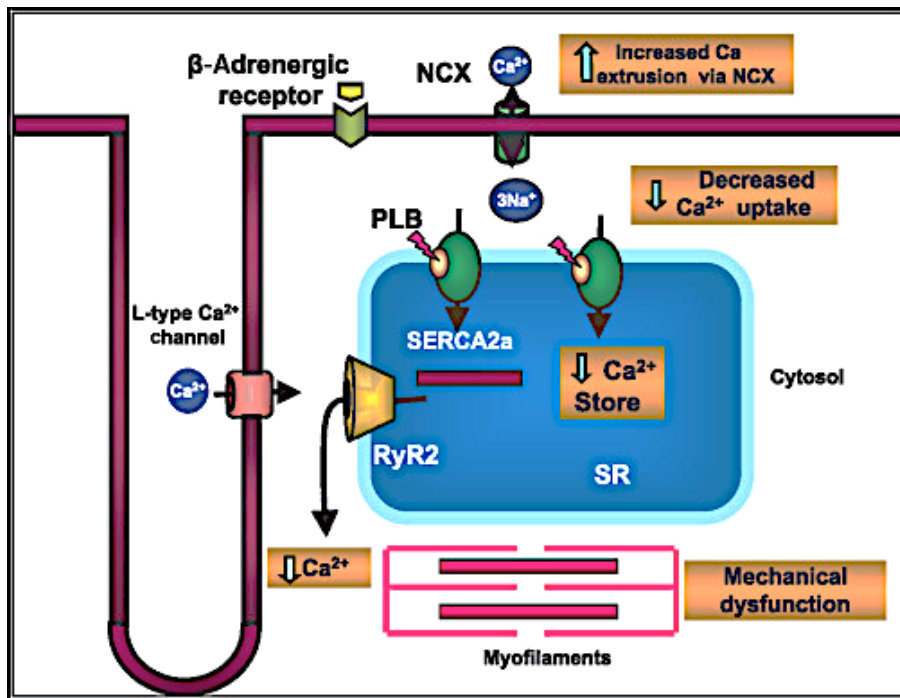


Figure 15 : Cycle d'activation du Ca^{2+} D'après Bers et al., 2006

La perturbation de ces flux calciques, à la fois entrants et sortants, contribue à la dysfonction contractile observée au cours du RVG et de l'ICC. La modulation de l'expression et/ou de l'activité de la pompe SERCA2a, consécutivement à un défaut de phosphorylation du PLB, la dysfonction des RyR2 ou encore l'altération de la structure des tubules T sont à l'origine de ces perturbations²⁵⁰.

En effet, une diminution de l'expression de SERCA2a a été mise en évidence dans des modèles expérimentaux d'ICC chez le cochon et le chien^{254,255}. L'altération de l'expression et/ou de l'activité de la pompe SERCA2a au cours du remodelage VG entraînerait d'une part une accumulation de Ca^{2+} intracellulaire, empêchant la cellule de se relaxer, et d'autre part, une diminution des stocks de Ca^{2+} au niveau du RS, altérant significativement les capacités contractiles du coeur²⁵⁰.

La dysfonction des RyR2 se matérialise par une fuite des stocks de Ca^{2+} du RS, menant progressivement à leur vidange, à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire et à l'augmentation de la fréquence des arythmies par post-dépolarisation tardive²⁵⁶.

L'altération de la structure des tubules T au cours du RVG, notamment l'espacement entre les tubules, semble également contribuer à la dysfonction contractile du VG et au développement de l'ICC²⁵⁷.

Réexpression du programme génétique fœtal

L'hypertrophie des cardiomyocytes se manifeste par une modification du phénotype myocytaire secondaire à la réexpression d'une série de gènes initialement exprimés lors du développement embryonnaire. Cette réexpression du programme génétique fœtal s'accompagne d'une diminution de l'expression d'un certain nombre de gènes normalement exprimés dans le cœur adulte. Les

L'un des changements initiaux observés au cours du RVG est la réexpression du programme fœtal par les cardiomyocytes, c'est-à-dire l'expression de gènes initialement impliqués dans le développement embryonnaire¹⁸².

L'ensemble de ces modifications d'expression est spécifique d'espèce et de tissu. Lorsque la vitesse intrinsèque de contraction est rapide, comme dans le ventricule de rat sain, les deux déterminants de cette vitesse, à savoir les mouvements calciques et l'activité de la myosine, jouent un rôle prépondérant et sont tous deux modifiés au cours du RVG. A l'inverse, dans le ventricule humain, la vitesse de contraction à l'état normal étant proportionnellement plus lente, ce sont les mouvements calciques qui jouent le rôle déterminant au cours du RVG.

Des modulations de l'expression de certaines **protéines contractiles** ont été décrites. En effet, le VG hypertrophié est le siège d'une diminution de l'expression de l'isoforme α et d'une augmentation de l'expression de l'isoforme β de la chaîne lourde de myosine¹⁸². La myosine étant directement impliquée dans la contraction cardiaque, ce changement peut conduire à une diminution de la vitesse de contraction du VG. Par ailleurs, une augmentation du ration N2BA/N2B de la titine, une protéine du cytosquelette, est observée, ce qui entraîne une perte de la rigidité cellulaire puisque les cellules qui expriment majoritairement N2BA sont plus souples que celles qui expriment l'isoforme N2B²⁵⁸. Enfin, l'expression de l'isoforme squelettique de l' α -actine à la place de l'isoforme cardiaque de cette protéine pourrait également avoir un effet délétère sur la contraction cardiaque²⁵⁸.

De plus, les peptides natriurétiques, dont la fonction principale au niveau cardiaque est d'inhiber l'hypertrophie, voient leurs expressions considérablement augmentées lors du RVG¹⁸². De

plus, les peptides natriurétiques de type A et B (ANP et BNP) ont également une action vasodilatatrice en inhibant le système rénine-angiotensine-aldostérone et contribuent donc au maintien du débit cardiaque via une réduction de la post-charge et donc du travail cardiaque ²⁵⁹.

Métabolisme énergétique

Au cours du RVG, l'augmentation de la charge de travail au niveau cardiaque implique un accroissement de ses besoins énergétiques. Pour répondre à cette demande, le cœur change de substrat préférentiel²⁶⁰. En effet, la β -oxydation des acides gras diminue au profit de la glycolyse. Ces changements sont en relation avec la modulation de l'activité et/ou de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la glycolyse et la β -oxydation des acides gras. Ils sont d'autant plus adaptés en conditions d'hypoxie post-ischémique car la glycolyse est nettement moins coûteuse en oxygène que la β -oxydation mais au prix d'une diminution importante de la production d'ATP.

Principales voies de signalisation

Au cours du RVG, de nombreuses voies de signalisation se mettent en place et contribuent à la dilatation du VG et à la perte des propriétés contractiles cardiaques.

Fibrose et remodelage de la matrice extracellulaire

Parmi ces voies, la **dégradation de la matrice extracellulaire** (MEC) joue un rôle important dans le développement du RVG en contribuant à l'expansion de la zone infarctée ²⁶¹.

Dans le cœur sain, la MEC constitue un réseau organisé autour des cardiomyocytes servant d'échafaudage aux éléments cellulaires mais aussi de support aux processus mécaniques et électriques tels que la coordination de la fonction contractile et le couplage électrique entre cardiomyocytes.

La MEC est composée d'un réseau de fibres de collagène entourant les cardiomyocytes, de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes et de molécules de signalisation biologiquement actives. La majorité des fibres de collagène au niveau cardiaque sont les fibres de type I et III. L'organisation myocardique des fibres de collagène assure l'intégrité structurelle des cardiomyocytes adjacents et est essentielle dans le maintien des myofibrilles au sein du cardiomyocyte via l'interaction entre le

collagène, les intégrines et le cytosquelette. Au sein de cette MEC, les fibroblastes régulent la synthèse de collagène via la sécrétion de cytokines, de facteurs de croissance et de MMP.

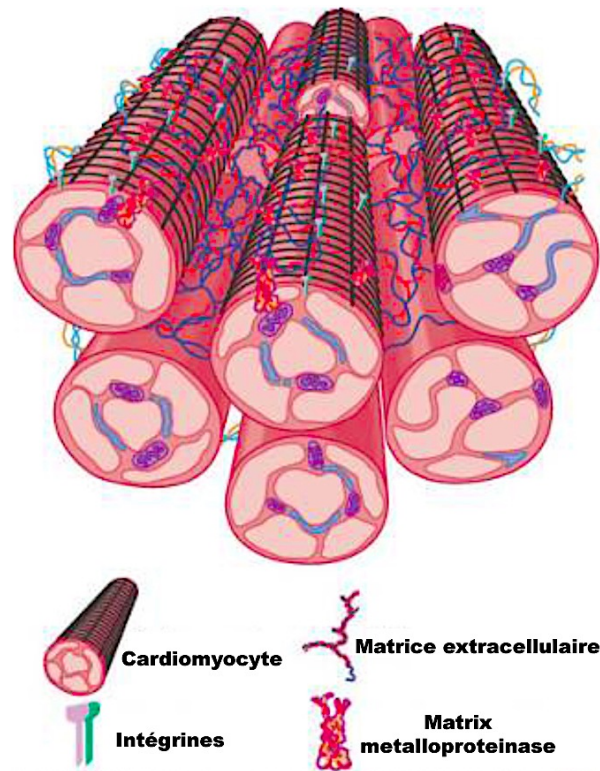


Figure 16 : Relations entre fibres de collagène de la matrice extracellulaire et cardiomyocytes. D'après Mann, Braunwald's Heart Disease, 8ème édition, 2008.

Au cours du RVG, les modifications de la synthèse, de la dégradation et de la jonction des fibres de collagène aboutissent à la perte du support liant les cardiomyocytes²⁶². L'ICC s'accompagne d'une augmentation progressive de la densité en collagène cardiaque avec une augmentation importante des collagènes I, III, IV, VI, de fibronectine et de laminine, accompagnée d'une chute du ratio collagène de type I sur type III. Ces modifications quantitatives s'accompagnent d'une perte des liens de collagènes et conduisent à une profonde altération de la structure et de la fonction ventriculaire. L'accumulation de collagène peut survenir autour des artères coronaires intramurales ou des artérioles, conduisant à une fibrose périvasculaires, ou alors au niveau de l'interstitium,

conduisant à une fibrose interstitielle, indépendamment de la perte cellulaire en cardiomyocytes. L'accumulation de fibrose peut aussi survenir sous une forme cicatricielle en réponse à la perte cellulaire, conduisant à une fibrose de remplacement. Cette augmentation de la fibrose myocardique est à l'origine d'une augmentation de la rigidité pariétale résultant en une diminution de la contraction et de la relaxation myocardiques. La fibrose myocardique participe également à la survenue d'arythmies atriales et ventriculaires qui contribuent à la mort subite dans l'IC.

Le système rénine-angiotensine-aldostérone

Au centre des voies de signalisation impliquées dans les processus de RVG, les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) participent activement à l'hypertrophie cardiaque. Au niveau cardiaque, les récepteurs α et β adrénergiques, le récepteur de type 1 à l'angiotensine II et le récepteur à l'endothéline sont les GPCRs majoritaires²⁶³.

Au cours du RVG, le système rénine-angiotensine-aldostérone, activé en réponse à une surcharge de pression, est impliqué dans l'hypertrophie et la dilatation du VG²⁶⁴. L'effecteur de cette voie de signalisation, l'angiotensine II, résulte du clivage de l'angiotensinogène par la rénine en angiotensine I. Le clivage de l'angiotensine I par l'enzyme de conversion de l'angiotensine aboutit à la production d'angiotensine II. Suite à un IDM, la mise en évidence de la présence d'angiotensine I et II mais aussi d'angiotensinogène au niveau de la zone infarctée a permis de mettre en évidence la production locale d'angiotensine II. Cette dernière va activer la NADPH oxydase qui, à son tour, va promouvoir la production de RLO et la synthèse de $\text{TNF}\beta$ ²⁶⁵. En se fixant sur les récepteurs cardiaques à l'angiotensine I, l'angiotensine II entraîne la production d'aldostérone, induit une rétention de sodium et d'eau, une vasoconstriction des artérioles, une augmentation de la résistance vasculaire, une fibrose cardiaque, une hypertrophie cardiaque et la dysfonction du VG (Figure 17)²⁶⁶.

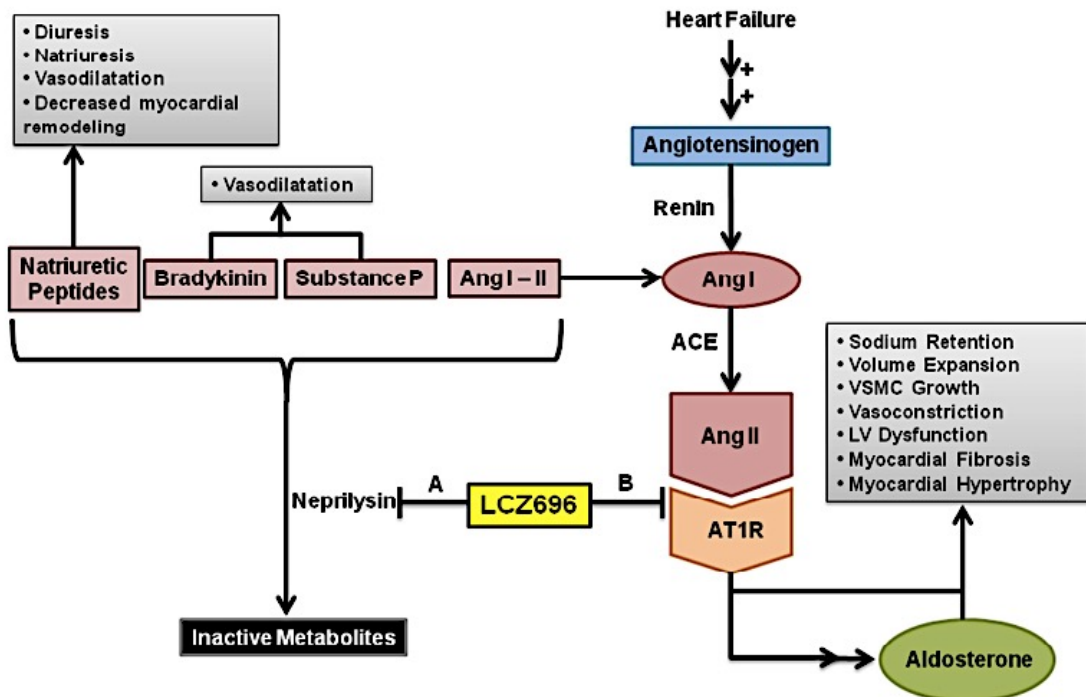


Figure 17 : Schématisation du système rénine – angiotensine – aldostérone. D'après Levine et al., 2002

e. Le stress oxydant

Au sein des systèmes biologiques, un déséquilibre entre des systèmes oxydants et antioxydants en faveur des pro-oxydants peut survenir, conduisant à ce que l'on appelle communément le stress oxydant. Il résulte des processus d'oxydo-réduction mettant en jeu l'oxygène, et conduit à la production excessive d'intermédiaires réactionnels appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO). Parmi les ERO, certaines espèces appelées radicaux à électron libre ou « radicaux libres » se caractérisent par un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe, ce qui leur confère une certaine instabilité. En effet ces radicaux libres cherchent à appairer leur électron célibataire en réagissant avec de nombreuses molécules de leur environnement, provoquant des dommages cellulaires en chaîne. Le plus connu de ces radicaux libres de l'oxygène est sans doute l'anion superoxyde, issu de la réduction monovalente du dioxygène. Bien que les espèces radicalaires soient généralement tenues pour responsables d'effets délétères dans la cellule, certaines molécules non-radicalaires présentent également une activité oxydante significative, parmi lesquelles le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le peroxyde nitrite ($ONOO^-$) ou l'acide hypochloreux ($HClO$).

Le stress oxydant est défini en ce sens comme un déséquilibre en faveur d'un excès de molécules pro-oxydantes aux conséquences néfastes, induisant des altérations biochimiques intracellulaires, telles que l'oxydation des lipides, des protéines^{267,268} ou encore l'oxydation de l'ADN²⁶⁹. Parmi les « espèces réactives de l'oxygène et de l'azote », certaines possédant une faible réactivité peuvent entrer dans le maintien de l'homéostasie de plusieurs systèmes biologiques²⁷⁰.

Sources génératrices d'espèces réactives de l'oxygène

Au sein de la cellule, la production d'espèces radicalaires peut faire intervenir plusieurs processus à la fois enzymatiques et non enzymatiques. Nous détaillerons certaines des principales sources d'ERO, à savoir la chaîne respiratoire mitochondriale, les NADPH oxydases et les NO synthases.

La chaîne respiratoire mitochondriale

La mitochondrie est le principal organite producteur d'énergie sous forme d'ATP. Elle est aussi considérée comme la plus grande source de production d'ERO. La production physiologique de ROS par la mitochondrie est de l'ordre de 0,2 à 0,4 % de l'oxygène consommé^{271,272}. Il a été démontré que les complexes I et III de la chaîne respiratoire sont responsables de la production d'anion superoxyde^{273,274}. L'anion superoxyde est ensuite rapidement converti en H₂O₂ par la superoxyde dismutase (SOD). Si la mitochondrie est la source principale de la production des ROS, elle est aussi l'une des cibles des ROS. Ainsi, l'anion superoxyde peut réagir avec de l'oxyde d'azote et former du peroxynitrite. Le peroxynitrite peut endommager les composants de la chaîne respiratoire mais aussi l'ADN mitochondrial, ce qui va augmenter la production de ROS²⁷⁵. On va ainsi avoir une modification de la morphologie et de la fonction des mitochondries entraînant une génération de ROS plus importante.

Les NADPH oxydases

Les NADPH oxydases sont des complexes enzymatiques multi-protéiques. C'est en 1964 que les NADPH oxydases ont été associées au « respiratory burst » (« flambée respiratoire ») correspondant à une surconsommation d'oxygène durant la phagocytose²⁷⁶. Depuis, d'autres études ont dénombré 6 homologues de la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase phagocytaire

(gp91phox ou NOX2) (NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 et DUOX2). Toutes ces isoformes catalysent le transfert d'électrons de son substrat, le NADPH, à l'accepteur final, l'oxygène, entraînant la production d'anion superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène²⁷⁷. Au niveau cardiovasculaire, on retrouve principalement la NOX 4 qui est exprimée dans les vaisseaux sanguins.

Les NOS

Les NOS sont des protéines enzymatiques responsables de la synthèse du monoxyde d'azote (NO) résultant de la conversion de la L-arginine en L-citrulline^{278,279}. Il a été identifié 3 isoformes de NOS, appelés en fonction du tissu dans lequel elles ont été décrites et qui sont codées par trois gènes différents²⁸⁰ : deux isoformes sont constitutivement actifs, la nNOS (NOS neuronale ou NOS1)^{281,282} et la eNOS (NOS endothéliale ou NOS3)^{283,284} et une isoforme est dite inductible, la iNOS (NOS inductible ou NOS2)^{285,286}.

Leur structure se compose de deux domaines catalytiques ; un domaine N-terminal oxygénase et un domaine C-terminal réductase. Le domaine oxygénase contient des sites de liaison pour l'hème, la L-arginine et le cofacteur BH4 (tétrahydrobioptérine). Le domaine réductase possède quant à lui un site de liaison pour la calmoduline, pour les flavines (FAD, FMN) et pour le NADPH.

Brièvement, la nNOS est une enzyme calcium-dépendante initialement identifiée au niveau cérébral et impliquée dans la neurotransmission^{287,288}. Néanmoins, celle-ci est également exprimée dans les cardiomyocytes au niveau du réticulum endoplasmique²⁸⁹, mais également au niveau des cellules musculaires lisses²⁹⁰. L'invalidation génétique de la nNOS altère la fonction cardiaque et augmente le risque d'arythmies ventriculaires, conduisant à une augmentation de la mortalité dans un contexte d'ICC²⁹¹.

La iNOS est quant à elle retrouvée dans un grand nombre de types cellulaires tels que les macrophages, les pneumocytes, les cellules musculaires lisses et vasculaires, mais également les fibroblastes. Son expression est dite inductible puisqu'elle dépend de l'activation par différentes cytokines et endotoxines notamment pro-inflammatoires, telles que le TNF- α , l'IFN- γ et le LPS (Lipopolysaccharide).

La eNOS est une enzyme calcium-dépendante identifiée et isolée à partir de cellules endothéliales d'aortes bovines^{292,293}. Il a par la suite été montré que son expression s'étendait à d'autres types cellulaires, tels que les cardiomyocytes ou les plaquettes par exemple. Il s'agit d'une

enzyme clé dans la régulation du tonus vasculaire et de la pression artérielle car son inhibition pharmacologique ou sa déficience génétique entraîne de larges perturbations de ces paramètres^{294,295}.

La production physiologique de RLO est parfaitement maîtrisée grâce à l'existence de systèmes de défenses dits « antioxydants ». Ces molécules peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques et permettent de lutter contre les dommages cellulaires causés par la production accrue de molécules pro-oxydantes.

Les mécanismes antioxydants enzymatiques

Les superoxyde dismutases (SOD)

Les SOD sont des métalloprotéines découvertes vers 1970 par Fridovich. Elles constituent la première ligne de défense contre le stress oxydant (53). On peut distinguer 3 isoformes distinctes : la forme cytosolique (Cu/Zn SOD), la forme mitochondriale (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (Cu/Zn SOD). Les différentes SOD catalysent une seule et même réaction qui génère du peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est un composé oxydant capable d'être éliminé par la catalase ou la glutathion peroxydase.

Il a été montré que la MnSOD était indispensable à la survie des souris dès lors que l'inactivation de son gène entraîne la mort des animaux dans les 18 jours qui suivent la naissance, et ce, avec de nombreuses pathologies telles que des cardiomyopathies ou une dégénérescence des neurones²⁹⁶⁻²⁹⁸.

La glutathion peroxydase

Il existe cinq isoformes de la glutathion peroxydase chez les mammifères, localisées dans la mitochondrie, le noyau ou le cytoplasme. Cette sous-famille de protéines possède une Sec qui est essentielle pour son activité enzymatique^{299,300}. Par son activité catalytique la glutathion peroxydase permet d'éliminer les hydroperoxydes, en particulier le peroxyde d'hydrogène³⁰¹. Cette enzyme est chargée de réduire le glutathion oxydé en utilisant du NADPH comme donneur d'électrons. Elle tient une place importante dans la cellule dans la mesure où elle est chargée de la quasi-totalité de la conversion du peroxyde d'hydrogène en H₂O et O₂.

La Catalase

La catalase est particulièrement présente dans les érythrocytes, le foie et parfois les reins plus particulièrement au niveau des peroxysomes. Celle-ci va catalyser la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène. La GPx permet la dégradation de faible concentration d'H₂O₂ alors que la catalase joue un rôle important dans la dismutation de fortes concentrations d'H₂O₂.

Les antioxydants non-enzymatiques

Les vitamines C et E

Les vitamines C et E jouent un rôle important dans l'inhibition de la peroxydation lipidique. En effet, la vitamine C va piéger certains radicaux libres comme le HO· ou le O₂·- mais va aussi permettre de régénérer la vitamine E oxydée. Cependant, il semblerait que la vitamine C joue un rôle différent en fonction de sa concentration. Ainsi, à faible concentration elle agirait comme un pro-oxydant et participerait à la formation d'ERO, alors qu'à forte concentration, elle se comporterait comme un antioxydant³⁰².

Les polyphénols

Les polyphénols sont des antioxydants présents dans les végétaux qui piègent les radicaux libres et protègent contre la glycoxydation des protéines. Ils sont également connus pour avoir des propriétés anti-inflammatoires^{303,304}.

Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires

L'implication du stress oxydatif dans le développement et la progression des maladies cardiovasculaires est désormais amplement documentée. En effet, les perturbations cellulaires induites par le stress oxydant se répercutent au niveau tissulaire. Plusieurs études ont montré son implication dans la dysfonction endothéliale, l'hypertension artérielle, l'athérogénèse, le diabète ou encore l'obésité^{305,306}. Depuis plusieurs années, le rôle prépondérant des mécanismes antioxydants dans le maintien de la fonction cellulaire a été clairement établi et ce, dès les stades précoces du développement. Il a notamment été démontré chez la souris mutante pour le gène de la Mn-SOD, une létalité en période néonatale due à une dysfonction cardiaque²⁹⁸. Ces résultats ont été appuyés

par des études de mutagenèse dirigée, induisant une délétion spécifique de la Mn-SOD cardiaque, montrant une défaillance de la respiration mitochondriale associée à une insuffisance cardiaque congestive³⁰⁷. La mitochondrie est capable de neutraliser les ERO telles que le peroxyde d'hydrogène à l'aide de la peroxyredoxine 3 (Prx3)³⁰⁸. En outre, une surexpression de cette Prx3 chez la souris diminue le remodelage et l'insuffisance cardiaque après une ischémie³⁰⁹.

Plusieurs études expérimentales ont démontré l'implication d'autres sources de production des ERO dans la physiopathologie cardiovasculaire. Les NADPH oxydases jouent ainsi un rôle dans le développement de l'athérosclérose, de l'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA), de l'hypertrophie et de la fibrose cardiaque³¹⁰⁻³¹². De plus, l'augmentation de l'activité des NADPH oxydases a été observée dans différents modèles animaux d'hypertension artérielle (HTA)³¹³⁻³¹⁵. La eNOS participe également à l'altération du système cardiovasculaire par l'intermédiaire de son co-facteur la BH₄, qui, lorsque sa biodisponibilité est diminuée, est responsable du découplage enzymatique conduisant à la production de l'anion superoxyde³¹⁶. D'autres études viennent étayer le rôle du découplage de la NOS dans la physiopathologie vasculaire notamment chez les sujets présentant un diabète et/ou des plaques athéromateuses³¹⁷. Malgré un rôle néfaste du découplage de la NOS au niveau cardiovasculaire, il a été montré que cette enzyme joue un rôle cardioprotecteur, en atténuant l'hypertrophie ventriculaire gauche et en rétablissant les fonctions cardiaque après un infarctus³¹⁸. Quand le stress oxydant commence à se mettre en place, il fait intervenir une certaine synergie des mécanismes pro-oxydants, agissant ainsi de concert dans le développement des maladies cardiovasculaires. Les myeloperoxydases (MPO), principales génératrices de l'acide hypochloreux capable d'induire une dysfonction endothéliale, peuvent de manière concomitante stimuler le découplage de la NOS³¹⁹. Le taux plasmatique de MPO est corrélé positivement à la sévérité des lésions athéromateuses coronariennes³²⁰ et la MPO circulante apparaît comme un bon indicateur pronostic des coronaropathies.

En résumé, les espèces réactives oxygénées sont produites de manière continue en condition physiologique par des mécanismes pro-oxydants. Elles exercent plusieurs rôles sur le système cardiovasculaire avant leur neutralisation par les systèmes de défense antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques. De ce fait, on comprend l'intérêt majeur d'un ciblage des mécanismes antioxydants dans le traitement de pathologies telles que l'ICC.

IV. Evolution vers l'insuffisance cardiaque chronique

Le remodelage cardiaque a été décrit comme étant à la fois un processus d'adaptation et de décompensation, avec une composante adaptative (compensatoire) permettant au cœur de maintenir sa fonction en réponse à une lésion cardiaque. Les augmentations de la charge cardiaque, comme celles observées dans l'insuffisance mitrale, modulent le remodelage du ventriculaire afin de maintenir le débit cardiaque, mais souvent après une lésion cardiaque (comme l'IDM), ce remodelage peut ne pas assurer l'intégrité de la circulation. Dans de telles circonstances, le remodelage peut être considéré comme un événement défavorable qui aboutit à une décompensation progressive.

La progression du remodelage peut toujours être considérée comme délétère et associée à un mauvais pronostic³²¹. Les thérapeutiques modernes de l'ICC doivent une grande partie de leurs effets au fait qu'elles agissent sur le remodelage. Les mécanismes responsables de la transition de l'hypertrophie de compensation (adaptative) à l'ICC ne sont pas encore élucidés, mais plusieurs mécanismes ont été proposés et étudiés, dont les anomalies du métabolisme énergétique, les modifications de l'expression ou de la fonction des protéines contractiles, les anomalies du couplage excitation-contraction, les anomalies du cytosquelette, les altérations de la transduction du signal adrénergique, la formation de fibrose interstitielle ou encore l'apoptose³²².

V. Sélénium, sélénoprotéines et pathologies cardiovasculaires

Le sélénium est également considéré comme une molécule antioxydante. En effet, appartenant à la famille des chalcogène, il a une forte tendance à former deux liaisons covalentes pour acquérir une couche saturée afin de respecter la règle de l'octet. Comme développé dans le premier chapitre de cette introduction, le sélénium intervient notamment dans la composition des sélénoprotéines, dont la plupart ont été définies comme enzymes antioxydantes. Cet effet antioxydant est donc capital à la fonction des protéines à sélénium. Certaines études ont suggéré que le sélénium, en soi, pouvait avoir des effets protecteurs contre les maladies cardiovasculaires. Sur le plan théorique, ces hypothèses peuvent être soutenues par la capacité des GPx à lutter contre l'oxydation des lipides et l'agrégation plaquettaire³²³. La Gpx4 est capable de réduire les phospholipides hydroperoxydés ainsi que les esters de cholestérol associés aux lipoprotéines³²⁴ et

pourrait ainsi contribuer à limiter l'accumulation de lipoprotéines de faible densité (LDL) dans les parois artérielles. Les résultats de plusieurs études épidémiologiques sont pourtant contradictoires; certains auteurs ont observé une augmentation du taux d'apparition de maladies cardiovasculaires lors de déficit en sélénium, alors que d'autres n'ont pas observé de corrélation significative^{325,326}. Une explication moléculaire pourrait être que la GPx4, la seule enzyme capable de réduire les lipides hydroperoxydés, n'est pas présente dans les espaces extracellulaires où sont localisés les LDL. En outre, la GPx4 est peu affectée par les carences en sélénium. De ce fait, son activité ne devrait jamais être limitante dans les pays développés où les carences en sélénium sont faibles et où pourtant les problèmes cardiovasculaires sont le plus souvent observés. La GPx3, bien qu'en contact direct avec les LDL par sa localisation, n'a pas la spécificité de substrat lui permettant de réduire les lipides hydroperoxydés. Le cas de la GPx1 est surprenant. En effet, il a été montré que sa surexpression était associée à des cas d'obésité et de résistance à l'insuline^{327,328}. Les mécanismes sous-jacents à ces observations commencent à être connus: les radicaux libres oxygénés sont nécessaires au bon fonctionnement de l'insuline et par conséquent leur élimination par la GPx1 interfère avec l'activité de l'hormone. Les effets bénéfiques du sélénium en prévention de maladies cardiovasculaires sont donc controversés et nécessitent des investigations supplémentaires. L'oligo-élément pourrait être l'un des composants impliqués dans l'émergence de ces maladies multifactorielles.

Plus récemment, il a été suggéré que trois autres sélénoprotéines pouvaient avoir un rôle dans la prévention de maladies cardiovasculaires: il s'agit de la sélénoprotéine P dont une forte proportion est liée aux protéoglycanes à la surface des cellules épithéliales, notamment dans le système vasculaire, ce qui pourrait permettre la protection de l'endothélium contre les agressions oxydantes locales^{329,330}. La deuxième protéine candidate est la sélénoprotéine S, dont la dérégulation a été identifiée dans certains cas de diabète ou d'intolérance au glucose^{331,332}. Enfin, il a été observé que les acides biliaires, dont la fonction hormonale est connue depuis peu, préviennent l'obésité et la résistance à l'insuline, en stimulant la synthèse de la DIO2³³³. Ce résultat converge avec l'observation antérieure d'un polymorphisme dans le gène de la DIO2 chez certains patients atteints de diabète³³⁴, et confirme l'implication de l'enzyme dans ces processus.

Dans le cadre des pathologies cardiovasculaires ischémiques, peu de données ont été rapportées concernant l'implication du sélénium. Néanmoins, quelques études réalisées durant les années 1990', ont montré que l'ischémie ou l'I/R entraînait une altération du statut corporel en sélénium.

Il a été rapporté que l'ischémie ou l'ischémie/reperfusion entraîne une altération du statut corporel en sélénium. Il a notamment été mis en évidence une baisse du sélénium plasmatique - utilisé usuellement pour définir le statut en cet élément pendant la phase aigüe du post-infarctus avec ou sans traitement par angioplastie coronaire des patients ayant eu un IDM³³⁵. Des résultats semblables ont été également obtenus par Lafont et coll. qui ont montré que le taux de sélénium sanguin diminue significativement après angioplastie coronaire³³⁶. La déplétion en sélénium entraîne une baisse à la fois de la teneur en GSH-Px et de son activité³³⁷. Encore récemment, les études de la bioactivité du sélénium se sont focalisées sur l'activité de cette enzyme.

Il a par la suite été montré que l'activité enzymatique du GSH-Px du myocarde diminuait progressivement dans le post-infarctus³³⁸. L'explication avancée est que l'ischémie ou l'ischémie/reperfusion, en engendrant un stress oxydant mobilise les défenses antioxydantes et entraîne un effondrement du pool tissulaire en sélénium. D'un côté, un apport insuffisant en sélénium a été associé à l'augmentation de la vulnérabilité à l'ischémie ou à une séquence d'ischémie/reperfusion du tissu cardiaque dans différents modèles animaux³³⁹⁻³⁴¹. De l'autre, la supplémentation en cet élément dans les limites des doses recommandées réduit significativement les manifestations du syndrome de reperfusion³⁴¹⁻³⁴³. Eu égard à l'ensemble des observations, le statut en sélénium apparaît donc comme un facteur déterminant dans l'apparition et le pronostic de diverses maladies cardiovasculaires. Cependant, il est difficile de préciser si les maladies cardiovasculaires, en l'occurrence l'IDM, sont à l'origine de la carence en sélénium ou inversement. Considérant la dualité de la question et compte tenu du fait que les sélénoprotéines sont les principales sources de sélénium dans le corps, il nous incombe de s'intéresser à chacune des voies : la supplémentation en sélénoprotéine et l'évolution du taux plasmatique en sélénoprotéines dans le post-infarctus chez le rat.

LA THERAPIE GENIQUE

I. Introduction à la thérapie génique

La thérapie génique est une biotechnologie basée sur le transfert de matériel génétique. Il s'agit en effet d'une stratégie thérapeutique définie par l'introduction d'un acide nucléique, le plus souvent véhiculé par un vecteur, au sein de cellules cibles. Selon l'*European Medicine Agency* (EMA), un médicament de thérapie génique doit i) contenir une séquence d'acide nucléique recombinante qui est administrée dans le but de réguler, réparer, remplacer, ajouter ou déléter une séquence chez le receveur et ii) avoir un effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique directement causé par la séquence recombinante ou le produit de son expression. Les vecteurs permettent la transduction de cellules cibles à la fois *in vivo* et *ex vivo*. De manière générale, la thérapie génique vise à traiter différentes pathologies, telles que des cancers, des maladies monogéniques ou encore des infections. A ce jour, plus de 2200 essais cliniques ont été approuvés à travers le monde (Figure 18).

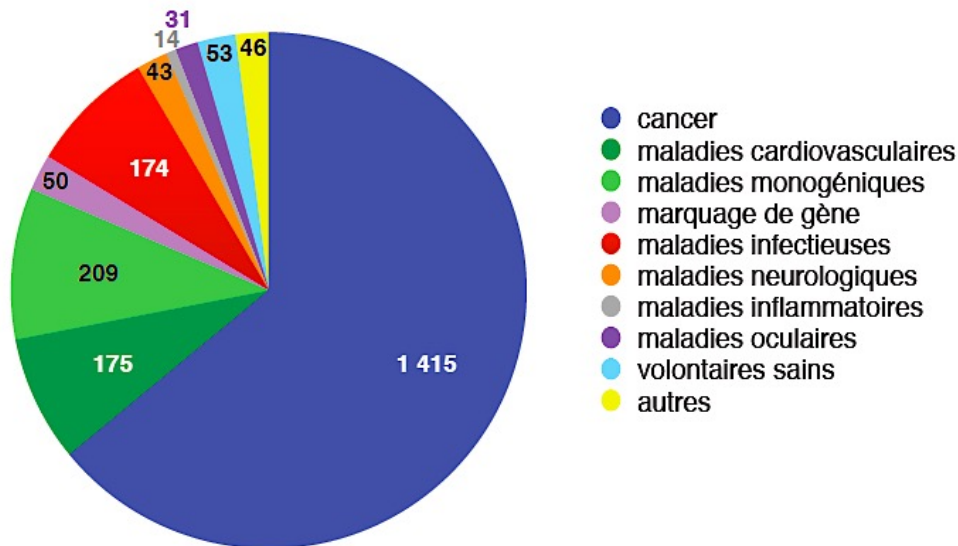


Figure 18 : Domaines d'application de la thérapie génique

L'histoire de la thérapie génique n'est pas si récente. En effet, dès les années 1960, de nombreux débats scientifiques et éthiques se penchent sur la problématique du traitement des maladies génétiques par la thérapie génique. A cette même époque, alors que les approches de remplacement protéique dans le but de traiter des déficits enzymatiques sont en plein essor, les techniques permettant de transférer un gène d'une cellule à une autre ou d'un organisme à un autre sont encore en développement. Ainsi, l'idée d'apporter une copie fonctionnelle d'un gène déficient

dans des pathologies sévères, pour lesquelles aucun traitement n'existait jusqu'alors, a été peu à peu acceptée au sein de la communauté scientifique³⁴⁴.

Les débuts du transfert de gènes eurent lieu au début des années 1980. Dans cette étude, l'ADN complémentaire de l'ARNm codant pour l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase (HGPRT) a été incorporé dans un rétrovirus murin et a permis la transduction et la sélection positive *in vitro* de cellules humaines et murines dépourvues de cette enzyme³⁴⁵. Par ailleurs, la première tentative de transfert de gène chez l'Homme a été réalisée par Martin Cline et Winston Salser de UCLA en 1980³⁴⁶. Cette étude a été effectuée sur deux patients atteints de β -thalassémie. Elle a cependant suscité une forte polémique dans le milieu scientifique car l'auteur n'a bénéficié d'aucune autorisation gouvernementale, ni même d'un consentement de la part des patients³⁴⁷. Il aura fallu attendre décembre 1988 pour voir la première approbation officielle d'essai clinique chez l'Homme³⁴⁸.

Le transfert de gène à visée thérapeutique a connu ses débuts bien plus tard, le 14 septembre 1990³⁴⁹. Le but de cet essai était de traiter deux enfants souffrants d'ADA-SCID (*severe combined immunodeficiency*), pathologie causée par une déficience en Adénosine Déaminase (ADA). Le traitement a alors consisté en la ré-injection de cellules souches hématopoïétiques issues des mêmes patients. Ces cellules ont été transduites *ex vivo* par des vecteurs rétroviraux contenant une séquence sauvage du gène codant pour l'ADA, enzyme nécessaire au métabolisme des purines. Les premiers résultats furent mitigés mais ne mirent en évidence aucun effet secondaire. Néanmoins, les effets observés avaient disparu au bout de deux ans³⁵⁰.

Malgré une période d'ascension fulgurante pour la science durant les années 1990, la recherche en thérapie génique fut fortement remise en cause suite à l'issue fatale d'un essai clinique pour un patient âgé de 18 ans et souffrant de déficit pour une enzyme hépatique, l'ornithine transcarbamylyase. Dans cette étude, deux patients ont reçu la même dose d'adénovirus et seul l'un d'entre eux a rencontré des effets indésirables. En effet, le vecteur s'est alors disséminé dans la circulation sanguine et s'est accumulé dans différents organes tels que la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Cette dissémination a déclenché une réponse inflammatoire massive puis une tempête cytokinique³⁵¹. Cette étude fut la première dans laquelle la mort d'un patient était directement imputée au vecteur viral, mettant ainsi en lumière la nécessité de maîtriser la biologie des interactions entre les vecteurs viraux et le système immunitaire.

L'un des essais les plus retentissant dans le domaine de la thérapie génique eut lieu en 2000, moyennant l'utilisation d'un vecteur rétroviral afin de traiter des patients SCID-X1. Cet essai fut un grand succès car il a permis de corriger le déficit immunitaire induit par cette pathologie chez 9 des 10 patients traités³⁵². Néanmoins, les deux plus jeunes patients de l'essai ont développé une lymphoprolifération incontrôlée trois ans plus tard. Plus tardivement, deux autres patients ont développé une leucémie et l'un d'eux est décédé³⁵³. Le risque de modification incontrôlée du génome humain constitue toujours l'un des plus forts arguments des opposants à la thérapie génique.

Dès lors, les recherches en thérapie génique se portèrent vers d'autres vecteurs afin de mieux contrôler le lieu d'insertion du transgène. Malgré cet échec, la thérapie génique ne cessa de se développer dans différents domaines. De nos jours, la thérapie génique est appliquée à de nombreuses maladies, à la fois génétiques et acquises, telles que le SIDA, les cancers ou encore les maladies cardiovasculaires. Elle a notamment permis l'introduction sur le marché de médicaments de thérapie génique. Ceci eu tout d'abord lieu en Chine en 2004 avec l'introduction de la Gendicine® puis en Europe en 2012 avec l'alipogène tiparvovec (Glybera® ; uniQure) après approbation par l'EMA³⁵⁴. Ce dernier permet le traitement du déficit en lipoprotéine lipase (LPL), une maladie autosomique récessive rare (un cas par million), perturbant le métabolisme des triglycérides et du cholestérol³⁵⁵.

Après avoir connu une histoire tumultueuse, la thérapie génique reste une approche innovante et prometteuse. Son application aux maladies acquises repose sur la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la maladie et sur l'identification de cibles pouvant être modifiées par modulation de l'expression génique. Dans ce récit, nous présenterons les principes de la thérapie génique dans une première partie, afin de présenter les stratégies et les techniques nécessaires à la mise en place d'un traitement par thérapie génique. Par la suite, nous illustrerons ces principes au travers de plusieurs maladies à l'étude actuellement.

II. Principes de la thérapie génique

Tout d'abord, il est important de souligner que la thérapie génique a été créée pour pouvoir s'appliquer à l'ensemble des cellules eucaryotes, c'est-à-dire aux cellules germinales comme aux cellules somatiques. Grâce à la transfection de cellules de la lignée germinale, il serait possible d'éliminer certaines maladies de la descendance des sujets traités. S'il est théoriquement possible de le réaliser, ceci soulève un grand nombre de problèmes éthiques. Néanmoins, la thérapie génique humaine s'intéresse exclusivement aux cellules somatiques pour le moment. En effet, les techniques de thérapie génique germinale sont uniquement utilisées en transgénèse animale afin de mettre au point des modèles animaux³⁵⁶. Un décret interdisant la thérapie génique germinale humaine a été édité par le Conseil de l'Europe en 1991 mais chaque pays possède sa propre législation à ce propos. Pour exemple, l'Allemagne considère la thérapie germinale comme un crime, en opposition avec la FDA (*Food and Drug Administration*) qui l'a autorisée aux Etats-Unis.

Les vecteurs de thérapie génique se doivent de transduire de façon efficace les cellules cibles et d'induire une expression à long terme du transgène, tout en garantissant une absence de toxicité pour l'organisme hôte. D'un aspect simpliste, il existe deux grandes catégories de vecteurs utilisés en thérapie génique : les vecteurs viraux et non-viraux. Du fait de l'immense étendue de ces vecteurs, nous nous focaliserons principalement dans cet exposé sur les vecteurs viraux, et notamment les virus adéno-associés que nous utiliserons dans nos études. Il est à souligner que les vecteurs non viraux, tels que les liposomes ou les approches sans vecteurs (acides nucléiques nus, plasmides) sont de moins en moins utilisés. Ceci est la conséquence de leur capacité de transduction réduite, à l'inverse des vecteurs viraux (Figure 19). De très rares essais recensés ont eu recours à des vecteurs de type bactérien ou eucaryote (levure)³⁵⁷.

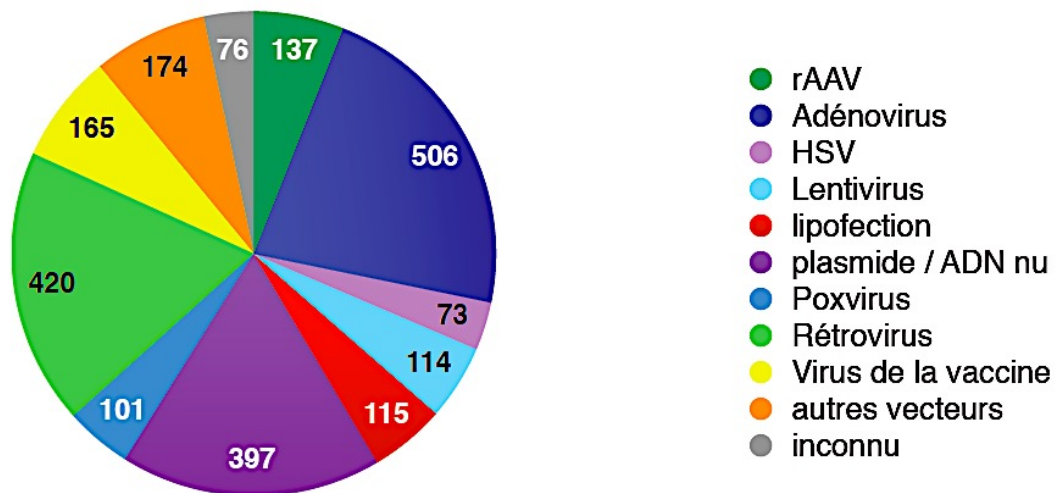


Figure 19 : Nombre d'essais cliniques en thérapie génique par vecteur.

1. Stratégies de transduction *in vivo*

Il existe trois stratégies de transduction *in vivo* par un vecteur de transfert de gène en thérapie génique en vue de traiter des pathologies. i) La première consiste en l'utilisation d'un organe ciblé par le vecteur afin de produire une protéine normalement sécrétée dans le sérum. Le muscle et le foie sont les tissus les plus couramment ciblés en essai clinique dans ce cas de figure. Cette stratégie a été étayée dans des pathologies telles que l'hémophilie B (déficit en facteur IX de coagulation). ii) La deuxième approche a pour but le traitement de pathologies affectant toutes les cellules d'un organisme, telle qu'une maladie lysosomale. L'injection intramusculaire ou systémique du vecteur permet de transduire certaines cellules qui produisent dès lors une enzyme ensuite endocytée par des cellules à distance. Enfin, iii) la dernière approche s'effectue par injection chirurgicale du vecteur directement dans l'organe à traiter. C'est notamment le cas le plus courant pour le traitement des pathologies oculaires telles que l'amaurose génitale de Leber. Néanmoins, la présence d'un acte chirurgical majore les risques de cette technique et ne permet par ailleurs pas une transduction complète de la rétine.

2. Les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux utilisés pour le transfert de gènes peuvent être de différents types, présentant chacun des avantages et des inconvénients (Tableau 2).

vecteur	capside	transgène	tropisme	transgène & génome hôte	avantages	limites
virus enveloppés						
oncorétrovirus	icosaédrique	ARN sb 7 à 10 kb	cellules mitotiques	intégration	persistance du transgène	risque d'oncogenèse (intégration)
lentivirus	icosaédrique	ARN sb 8 kb	cellules mitotiques ou quiescentes	intégration	persistance du transgène	risque d'oncogenèse (intégration)
HSV-1	icosaédrique 125 nm	ADN db 152 kb	cellules mitotiques	épisode	transgène de grande taille	inflammatoire
virus non enveloppés						
AAV	icosaédrique 22 à 26 nm	ADN sb 4,7 kb	cellules mitotiques ou quiescentes	épisode (à 99%)	non pathogène	taille du transgène limitée
adénovirus	icosaédrique 70 à 90 nm	ADN db 36 kb	cellules mitotiques ou quiescentes	épisode	transduction efficace dans différents tissus	fortement inflammatoire

Tableau 2 : Tableau représentant les caractéristiques majeures des principaux vecteurs viraux.

a. Les Retroviridae

Les *retroviridae* sont une famille de virus enveloppés à ARN simple brin. Ils possèdent tous une reverse transcriptase qui permet de transcrire leur matériel génétique en ADN, une intégrase qui permet l'intégration du matériel génétique viral au génome de la cellule infectée et trois gènes principaux (*pol*, *gag* et *env* qui codent respectivement pour la reverse transcriptase et l'intégrase, les protéines de la capsidie et les protéines de l'enveloppe). On peut classer les rétrovirus en deux catégories distinctes : les simples (alpharétrovirus, betarétrovirus, gammarétrovirus et epsilon-rétrovirus) et les complexes (deltarétrovirus, lentivirus et spumavirus) selon la diversité des protéines codées par le génome viral. En effet, les rétrovirus complexes sont capables de pénétrer

dans le noyau cellulaire via un transport actif alors que les retrovirus simples profitent de la mitose pour pénétrer le noyau³⁵⁸. La figure 20 illustre le cycle de réplication des *retroviridae*.

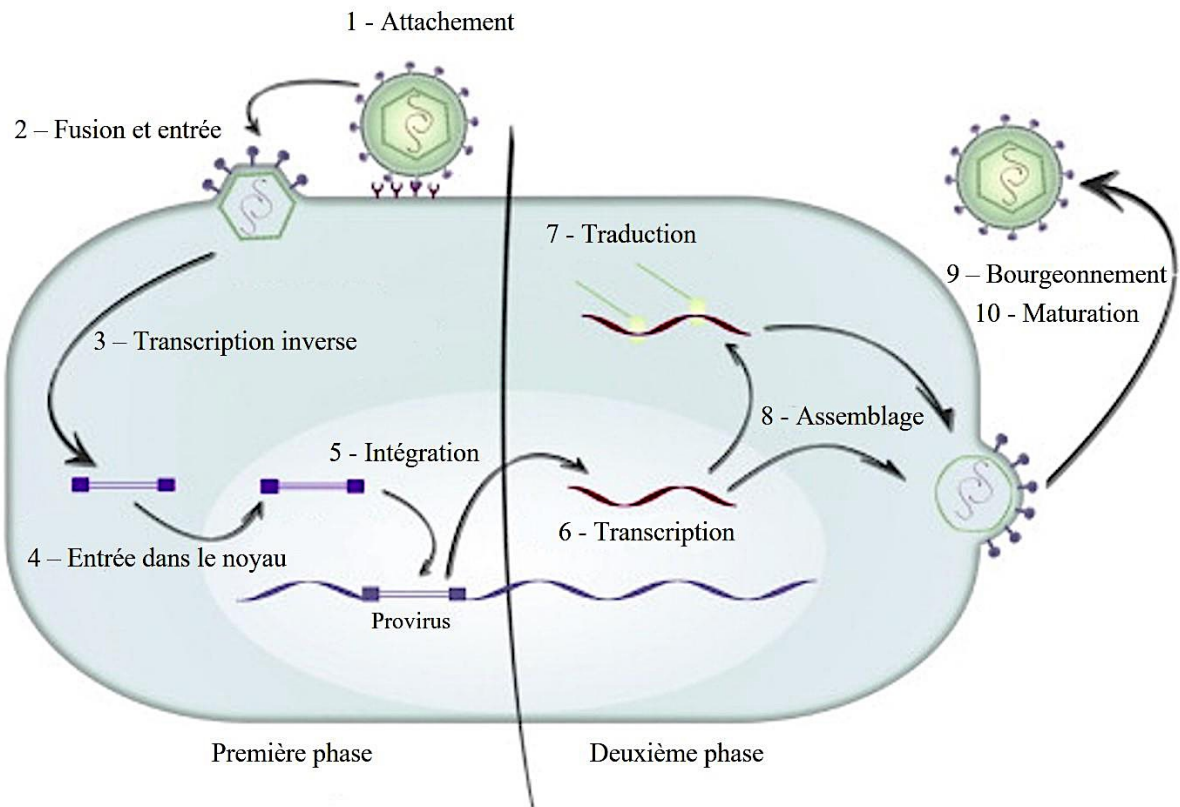


Figure 20 : Cycle de vie des rétrovirus d'après Spencer et Plamarini (2012).

Dans le cas des virus enveloppés, et particulièrement dans celui des *retroviridae*, il est possible de modifier le tropisme du vecteur viral en le pseudotypant. En effet, le pseudotypage est une technique qui consiste en la modification des glycoprotéines de surface des vecteurs viraux dans le but de modifier leur tropisme cellulaire. Cette technique est dérivée de la modification des enveloppes des virus lorsque deux types (ou plus) infectent la même cellule³⁵⁹.

Les rétrovirus simples ont été très utilisés comme vecteur au début des essais cliniques de thérapie génique, car ils permettent une intégration stable du transgène dans le génome de l'hôte.

Néanmoins, ils ne peuvent transfecter que des cellules en division³⁶⁰. Leurs inconvénients sont cependant majeurs dès lors qu'ils sont immunogènes et peuvent provoquer le déclenchement de cancers par activation d'un oncogène ou l'inactivation d'un oncosuppresseur lors de l'insertion du transgène dans le génome cellulaire. Ce fut notamment le cas lors de l'essai clinique conduit en 2000 sur les patients SCID que nous avons évoqué précédemment et dans lequel le déclenchement de la leucémie fut attribué à l'insertion du transgène au sein d'un proto-oncogène³⁶¹.

Par ailleurs, les lentivirus sont particulièrement étudiés de nos jours comme vecteurs de thérapie génique. Ainsi, des « self-inactivating » lentivirus (ou SIN lentivirus) sont utilisés dans lesquels le génome a été modifié afin de les rendre incapables de se répliquer. Les lentivirus ont la capacité d'infecter les cellules quiescentes grâce à des protéines virales capables de faire pénétrer leur matériel génétique dans le noyau des cellules cibles via les pores nucléaires³⁶². Ces caractéristiques permettent aux lentivirus d'être des vecteurs de choix pour toutes les pathologies impliquant des cellules hautement différenciées et qui se divisent peu. Comme tous les rétrovirus, les lentivirus ont la capacité d'intégrer leur génome à celui de la cellule cible, permettant ainsi une expression du transgène à long terme. Cependant, cette insertion dans le génome hôte a déjà eu pour conséquence de provoquer des mutations par insertion³⁶¹. En effet, ils insèrent naturellement leur matériel génétique près des sites de transcription actifs alors que les autres types de rétrovirus ont plutôt tendance à s'intégrer près des promoteurs, augmentant le risque d'oncogenèse³⁶². D'autre part, il est également possible d'utiliser des « Non Integrating LentiViruses » (NILVs) qui ne peuvent pas intégrer leur matériel génétique. Dans ce cas, le transgène reste dans le noyau cellulaire sous forme d'épisome et l'expression à long terme du transgène est liée à l'état de quiescence des cellules infectées³⁵⁸. En revanche, il est désormais clairement établi que les lentivirus induisent une forte réponse immunitaire de l'hôte à l'encontre du transgène, ce qui diminue considérablement la durée de vie des cellules et donc l'effet thérapeutique.

b. Les adénovirus

A l'inverse des vecteurs rétroviraux, les adénovirus permettent l'introduction de gènes de grandes tailles au sein de leur génome long de 36 kb. De plus, ils présentent l'avantage de pouvoir être produits à de forts titres et ne s'intègrent pas dans le génome de l'hôte, persistant plutôt sous

forme épisomale. Cependant les vecteurs adénoviraux possèdent un fort potentiel pro-inflammatoire.

Il existe plus de cent sérotypes découverts à ce jour dont 51 infectant l'Homme. Les adénovirus figurent parmi les virus les plus utilisés en thérapie génique et le sérotype 5 (HAd5) est le plus étudié³⁶³. L'exposition de la population à l'HAd5, qui est particulièrement forte dans les pays en voie de développement³⁶⁴, engendre des réponses immunitaires qui limitent son utilisation en clinique. L'utilisation d'un sérotype différent ou le typage des patients, conditionnant leur inclusion dans les essais, se révèle donc être une nécessité. Néanmoins, ces vecteurs restent les plus utilisés et c'est un adénovirus, vecteur d'un transgène codant pour l'onco-suppresseur p53, qui a constitué le premier médicament de thérapie génique mis sur le marché (Gendicine®)³⁶⁵.

c. Les virus adéno-associés

Biologie des AAV

Les virus adéno-associés (AAV) ont été identifiés il y a plus de 50 ans par Atchison³⁶⁶, ainsi que par Hoggan et Rowe³⁶⁷, comme contaminants de préparations adénovirales (Figure 21). Depuis, plus d'une centaine de variants ont été isolés chez différentes espèces animales, dont l'Homme, les primates non humains, les bovins etc³⁶⁸.

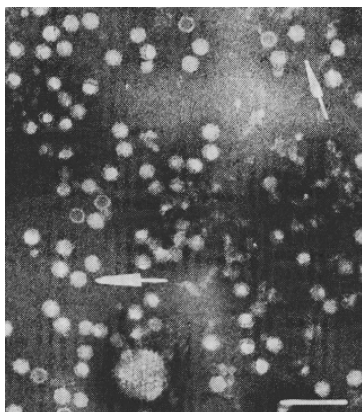


Figure 21 : Découverte de particules AAV contaminants une préparation adénovirale. (Atchison et al., 1965)

Les AAV (indiqués par des flèches blanches) entourent une particule adénovirale simienne (SV15) en bas de l'image. La barre d'échelle représente 100 nm.

Les AAV sont des virus non enveloppés issus de la famille des *parvoviridae*, les plus petits virus animaux à ADN et appartiennent à la sous-famille des *parvovirinae*. Ils ne peuvent répliquer leur génome au sein de la cellule hôte de façon autonome et nécessitent la co-infection avec un virus helper (adénovirus, herpesvirus, virus de la vaccine ou papillomavirus humain). Cette caractéristique les fait appartenir au genre des *dependovirus*³⁶⁹. En l'absence de virus helper, leur réplication est en effet limitée et ils peuvent alors entrer dans une phase de latence. Le génome de l'AAV sauvage s'intègre alors dans l'ADN de la cellule hôte, dont la région AAVS1 de 4 kb située dans la séquence du gène *MBS85* sur le chromosome 19 (q13.4) dans 45% des cas. Cette intégration n'a jamais été corrélée avec une éventuelle tumorigénicité chez l'homme.

Tous les sérotypes humains et non-humains possèdent une capsid à géométrie icosaédrique, composée des protéines VP1, VP2 et VP3 qui s'associent en 60 sous-unités pour former le virion³⁷⁰ (Figure 22).

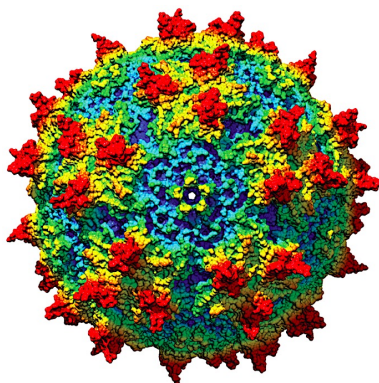


Figure 22 : Topologie de la capsid de l'AAV2. (Tiré de Samulski & Muzyczka, 2014).

Les acides aminés de surface sont colorés en fonction de leur distance du centre de la capsid. Du plus près au plus éloigné : bleu, cyan, vert, jaune, rouge.

Les protéines VP1, VP2 et VP3 sont respectivement représentées au sein de la capsid virale au ratio 1/1/10. Les capsides sont tout d'abord synthétisées vides, puis le génome les intégrerait *via* un pore de 8,5 Å de diamètre. Il a en effet été démontré que des mutations modifiant les acides aminés qui constituent ce pore affectent l'efficacité d'encapsulation de l'ADN génomique³⁷¹.

Le génome des AAV est constitué d'un ADN monocaténaire long de 4,7 kb. Il est composé à chaque extrémité de séquences *inverted terminal repeats* (ITR) de 145 pb, dont les 125 premiers

nucléotides constituent une séquence palindromique permettant l'organisation en une structure secondaire de type épingle à cheveux (*T-shaped hairpin*). Ces séquences ITR encadrent trois cadres de lectures ouverts codant pour huit protéines sous le contrôle de trois promoteurs. La séquence *Rep* code quatre protéines dont le rôle est la régulation de l'expression du génome en fonction de la présence ou non de virus helper (Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40). *Cap* code pour les trois protéines de la capsid (VP1, VP2 et VP3) selon un épissage alternatif de l'ARNm initié par le promoteur p40. Un cadre de lecture alternatif du gène *Cap* code pour l'*Assembly-activating protein* (AAP) qui permet l'assemblage des capsides au sein du nucléole de la cellule hôte³⁷².

La réplication virale implique l'ADN polymérase δ qui synthétise le brin complémentaire en débutant son activité par l'extrémité 3' de la séquence ITR. A la suite des étapes de transcription et de traduction du génome, les capsides sont formées dans le noyau de la cellule hôte. Les particules virales ainsi assemblées sont libérées lors de la lyse cellulaire induite par l'infection d'un virus helper³⁶⁹.

En 1984, Hermonat et Muzyczka ont réalisé la preuve de concept de l'utilisation des AAV comme vecteur de transfert de gène. Ainsi, ils ont isolé des AAV dans lesquels le gène de résistance à la néomycine a été incorporé en lieu et place de *Cap*. Le rAAV obtenu a permis de transduire des cellules humaines de lignée D6³⁷³. En parallèle, le groupe de Carter a produit un vecteur rAAV codant pour la chloramphenicol acetyltransférase qui a permis l'expression de ce transgène dans les lignées cellulaires humaines Hela et HEK293³⁷⁴.

Synthèse des vecteurs rAAV

Les AAV peuvent être produits *in vitro* selon deux grandes méthodes distinctes. La première s'effectue par transfection de la lignée cellulaire HEK avec trois plasmides différents, contenant i) la séquence du transgène d'intérêt, ii) les séquences *Rep* et *Cap* de l'AAV et iii) les séquences adénovirales E2A et E4. La seconde méthode consiste en une construction baculovirale de la cassette de l'AAV qui permet de co-infecter les cellules d'insecte Sf9 avec un autre baculovirus exprimant *Rep* et *Cap*³⁷¹. Le génome encapsidé au sein des vecteurs rAAV ainsi produit se limite au transgène thérapeutique, à son promoteur et à un signal de polyadénylation. Seules les séquences ITR de l'AAV sauvage sont alors conservées, limitant considérablement le risque de réplication virale même en présence de virus helper.

Avantages des rAAV en thérapie génique

A ce jour, les rAAV ont été utilisés en essai clinique sur plus de 1300 sujets. Comme précédemment évoqué (cf. Tableau 2), les AAV présentent différents avantages par rapport aux autres vecteurs viraux. En effet, ce sont des virus non pathogènes, ce qui représente un fort bénéfice quant à leur manipulation en vue d'un usage thérapeutique. De plus, 99% des génomes issus des vecteurs rAAV persistent sous forme épisomale dans les cellules infectées³⁷⁵, seulement 1% d'entre eux s'intègrent au sein de génome hôte³⁷⁶. Cette caractéristique diminue fortement le risque de mutagenèse insertionnelle et permet ainsi une utilisation des AAV pour une correction à long-terme, cependant restreinte à des cellules post-mitotiques. Les rares intégrations dans le matériel génétique des cellules cibles ont été décrites comme non spécifiques d'un locus, bien qu'elles semblent avoir préférentiellement lieu chez l'homme au sein de l'ADN mitochondrial³⁷⁷. Les nombreux sérotypes d'AAV existants ont permis d'obtenir de nombreux vecteurs possédant des tropismes pour différents tissus, ce qui représente un grand avantage pour une application thérapeutique³⁷⁸.

Limites des rAAV

Néanmoins, les rAAV ont de nombreuses limites que nous détaillerons dans ce chapitre. Tout d'abord, il est à noter que la capacité de taille du transgène encapsidé constitue une limite majeure des rAAV par rapport aux autres vecteurs viraux. Par ailleurs, la synthèse du brin complémentaire du génome de l'AAV constitue une étape limite dans la transduction cellulaire, raison pour laquelle des rAAV au génome bicaténaire ont été développés, les *self-complementary self-complementary* AAV (scAAV). En s'affranchissant de cette étape répliquative, ils permettent de réduire le délai d'expression du transgène et lui confèrent une meilleure efficacité d'expression aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Néanmoins, la taille du transgène inséré dans ces vecteurs est limitée à la moitié de celui des rAAV simple brin, constituant un inconvénient important quant à leur utilisation en thérapeutique pour le transfert de gène de grande taille³⁷⁹. De plus, les scAAV présentent une immunogénicité plus importante.

Par ailleurs, aucune toxicité des rAAV n'a été constatée chez l'Homme en clinique, à l'inverse des vecteurs viraux intégratifs (rétrovirus) ou fortement pro-inflammatoires (adénovirus). Bien que les vecteurs AAV soient faiblement intégratifs, une étude publiée en 2001 a montré que le transfert de gène dans un modèle murin de mucopolysaccharidose de type 7 induisait des carcinomes hépatocellulaires et des angiosarcomes³⁸⁰. A l'inverse, une autre étude a été réalisée dans laquelle des souris sont suivies 18 mois après le transfert de gène. Cette dernière n'a pas révélé de

tumorigénicité supérieure ou de région d'intégration différente par rapport aux animaux contrôles²⁹⁸. Des observations semblables ont été faites chez des souris nouveau-nées après transfert de gène hépatique par scAAV³⁸².

Néanmoins, le risque de tumorigénicité n'est pas totalement écarté. En effet, des travaux chez le macaque Rhésus ont montré que l'intégration aléatoire du transgène peut entraîner des délétions de séquence génique (jusqu'à 3kb). De plus, l'intégration s'avère trois fois plus importante en cas de transfert dans le foie par rapport au tissu musculaire squelettique³⁸³. Récemment, un suivi au long cours de souris nouveau-nées injectées avec des rAAV8 a fait l'objet d'une étude. Les animaux traités avec de fortes doses de rAAV ont développé significativement plus de carcinomes hépatocellulaires, indépendamment du promoteur ou du transgène transféré (GFP ou methylmalonylCoA mutase) ainsi que de la souche de souris. Les auteurs ont ici associé ces cancers à des insertions transgéniques dans le locus *RNA imprinted and accumulated in nucleus (Rian)* sur le chromosome 12, au sein d'une séquence codant un micro ARN³⁸⁴. L'impact de ces études doit être pondéré car elles ont été réalisées dans des modèles animaux particuliers. De plus, plus d'une centaine d'essais cliniques ont été réalisés avec des rAAV et aucune tumorigénicité n'a été rapportée, seule une hépatite symptomatique et transitoire a été constatée suite à leur utilisation chez l'homme.

Les rAAV en clinique

La première application d'un AAV recombinant chez l'homme a eu lieu lors d'un essai clinique chez des patients atteints de mucoviscidose. Il s'agissait d'un transfert du gène codant pour le canal chlore *cystic fibrosis transmembrane regulator* (CFTR) au sein des épithéliums nasal et pulmonaire chez dix patients. Cet essai a permis de démontrer l'innocuité de ce vecteur ainsi que sa capacité à induire l'expression du transgène. Cependant, aucun effet thérapeutique n'a été constaté chez les sujets traités³⁸⁵. Depuis, de nombreux essais cliniques dans le cadre de pathologies très diverses ont été menés.

III. Exemples d'application de la thérapie génique

Les techniques de thérapie génique se sont majoritairement développées grâce aux pathologies qui ont été ciblées. La majorité des études a visé à traiter les cancers, mais également les maladies génétiques et infectieuses. Nous prendrons l'exemple de l'hémophilie B pour illustrer nos propos.

Les maladies génétiques, congénitales ou héréditaires, sont les maladies pour lesquelles la thérapie génique a initialement été créée. Si elles sont reléguées loin derrière les cancers en tant que sujet d'étude, la thérapie génique reste pour la plupart la meilleure, si ce n'est la seule, alternative thérapeutique pour ces pathologies.

Dans le cas des maladies génétiques, nous prendrons l'exemple de l'hémophilie B qui a été longuement étudiée en thérapie génique. L'hémophilie est un trouble de la coagulation héréditaire, récessif et lié au chromosome X. Cette maladie monogénique est due à l'absence de certains facteurs de coagulation fonctionnels. Il existe deux types principaux d'hémophilie : l'hémophilie A, due à un défaut de facteur VIII et l'hémophilie B, due à un défaut de facteur IX de coagulation. Le traitement actuel est principalement préventif et consiste en des injections régulières de facteurs de coagulation recombinants. Malgré son efficacité, ce traitement reste extrêmement lourd pour les patients et entraîne la formation d'inhibiteurs qui sont des anticorps anti-facteur IX.

De ce fait, de nombreuses études ont été réalisées afin de traiter ces pathologies. Ainsi, dans le cadre de l'hémophilie B, une étude de thérapie génique a récemment été réalisée et a consisté en l'utilisation d'un AAV8 exprimant le facteur IX. Ce vecteur a été testé dans une étude clinique de phase I, dans laquelle six patients atteints d'une hémophilie B sévère ont été inclus. Ainsi, une injection unique du vecteur a permis d'augmenter le taux de facteur IX à un niveau suffisant pour réduire considérablement les hémorragies et la nécessité des injections préventives³⁸⁶. Le suivi de ces patients pendant plus de trois ans a montré qu'aucune nouvelle injection n'avait été nécessaire pour maintenir le taux de facteur IX satisfaisant, permettant alors de réduire considérablement la fréquence des accidents hémorragiques et donc d'éviter les perfusions de facteur IX. Ces résultats étaient observés en l'absence d'effet indésirable notable. Malgré ces effets encourageants, ces derniers doivent toutefois être confirmés par des études incluant un plus grand nombre de patients.

LA THERAPIE GENIQUE ET L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

Malgré une prédominance de la recherche en thérapie génique sur les maladies génétiques, les maladies acquises ou dégénératives peuvent également être traitées par thérapie génique. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents au développement et à la progression de la pathologie doivent être préalablement compris et maîtrisés. C'est notamment le cas de l'insuffisance cardiaque, pathologie sur laquelle porte ce travail de thèse. Différentes recherches ont préalablement été entreprises et nous les détaillerons dans ce chapitre.

I. Intérêt de la thérapie génique

Grâce à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la dysfonction cardiaque, la thérapie génique est aujourd'hui une alternative thérapeutique au fort potentiel.

Le principe de la thérapie génique dans le traitement de l'insuffisance cardiaque est le ciblage des mécanismes moléculaires permettant de réduire ou d'inverser les modifications subies par le cœur. Comme précisé précédemment, l'insuffisance cardiaque est une pathologie aux étiologies diverses. De fait, les solutions de thérapie génique auront comme enjeu de s'adapter à l'origine de la maladie. Néanmoins, une fois la pathologie installée, certaines modifications moléculaires sont semblables malgré les étiologies différentes. C'est donc sur ces mécanismes que se concentrent actuellement les stratégies de recherche³⁸⁷.

II. Les vecteurs viraux et l'insuffisance cardiaque

En théorie, le vecteur idéal pour la thérapie génique de l'insuffisance cardiaque devrait posséder deux caractéristiques essentielles à l'efficacité du traitement. En effet, il doit, d'une part, permettre une expression à long terme du transgène et d'autre part, être capable de transduire un nombre suffisance de cellules cardiaques pour que la thérapie génique ait un impact sur la fonction ventriculaire^{388,389}.

Les vecteurs viraux sont les vecteurs les plus utilisés en thérapie génique cardiaque car ils sont à l'heure actuelle, les plus efficaces. Du fait de leur intégration aléatoire, les lentivirus et rétrovirus ont été écartés de ce champ de recherche. Par ailleurs, les adénovirus ont longtemps été utilisés en

recherché préclinique. Néanmoins, leur immunogénicité reste problématique car dangereuse pour le patient et probablement responsable de l'expression à court terme du transgène. De ce fait, l'ensemble de ces vecteurs est de moins en moins employé au profit des AAV.

Certains sérotypes d'AAV ont un tropisme pour les cellules cardiaques, en particulier les sérotypes 1, 6, 8 et 9. Cependant, ce tropisme n'est que partiel et les AAV infectent en même temps d'autres tissus comme le foie notamment. Des modifications de la capsidie visent à réduire ces infections erratiques. L'expression du transgène est stable au cours du temps, mais une partie de la population présente des anticorps neutralisants, ce qui les exclut des essais cliniques³⁸⁸.

Brièvement, l'utilisation des vecteurs non viraux en thérapie génique cardiaque n'en est qu'à ses débuts. De nombreuses pistes sont étudiées, mais aucune ne présente assez d'avantages pour être développée au-delà du stade de l'expérimentation animale. Le problème majeur est le faible taux de transfection et une expression transitoire du transgène³⁸⁸.

III. Modalités d'administration du transgène

De nombreuses techniques sont utilisées pour administrer le transgène au niveau cardiaque. Il a été montré que la modalité d'administration permettait de cibler plus ou moins l'organe cible.

Tout d'abord, l'injection intraveineuse est la technique la plus simple. Elle permet de délivrer le transgène dans la circulation et mise sur le tropisme du vecteur pour les effets du transgène. Néanmoins, elle ne permet pas de s'affranchir de la réponse immunitaire possible suite à l'injection et ne force pas le ciblage du cœur en tant qu'organe cible. De ce fait, le transgène se retrouve exprimé dans d'autres tissus et ce qui implique une observation plus globale de ses effets.

De plus, la cathétérisation de l'artère coronaire (Figure 23 A) est une technique aujourd'hui bien maîtrisée, peu invasive et plutôt sûre chez l'animal. Elle permet une répartition homogène du vecteur dans le myocarde, mais la vitesse de circulation du sang n'autorise qu'un court temps de contact. L'occlusion de la veine coronaire est possible par ballonisation et permet alors d'augmenter le temps de séjour du vecteur dans le cœur (Figure 23 B). Il est également possible d'inverser la technique en injectant le vecteur dans la veine coronaire et en obstruant l'artère. Cette modalité est plus sûre pour les patients présentant une maladie coronarienne.

Un by-pass peut également être mis en place durant l'intervention. Le cœur est alors isolé du reste de la circulation et le vecteur peut rester en contact plus longtemps. De plus, l'ischémie cardiaque provoquée augmente la transfection. Des études réalisées chez le mouton ont prouvé l'efficacité de cette méthode par rapport aux autres, car elle réduit fortement l'expression extracardiaque du transgène, mais les risques d'œdème myocardique et d'hémorragie sont non négligeables³⁸⁸.

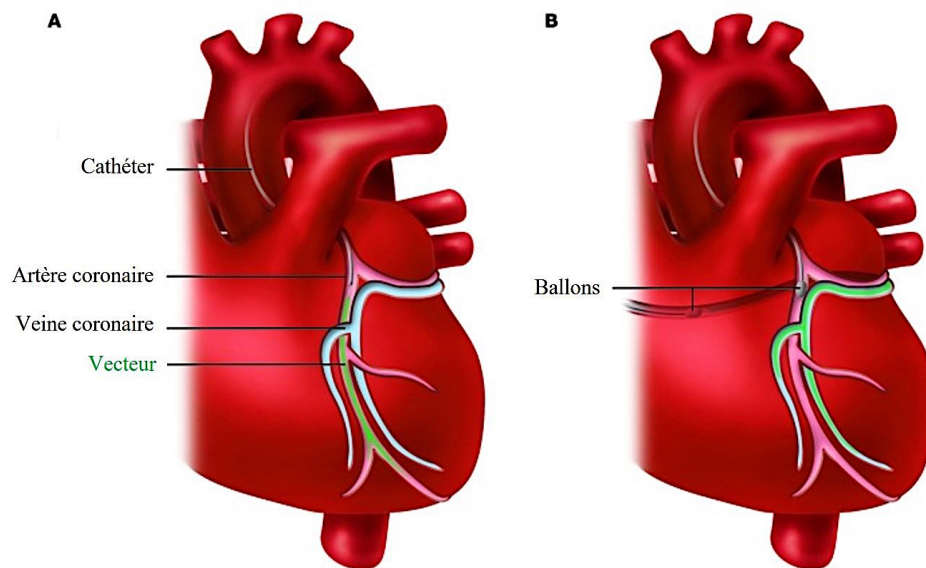


Figure 23 : Techniques de perfusion via les artères ou les veines coronaires, d'après Hajjar et al., 2013

L'injection locale est une technique très utilisée. Elle est réalisée en injectant directement le vecteur *via* une aiguille de petit calibre dans l'épicarde, l'endocarde ou le péricarde (Figure 24). Cette modalité d'administration a notamment été utilisée au sein de notre équipe dans un modèle de thérapie protéique pro-angiogénique ciblée moyennant des biopolymères et a montré son efficacité dans un contexte d'insuffisance cardiaque³⁹⁰. Cette technique présente trois avantages majeurs : elle permet de traverser la barrière endothéliale, de minimiser le contact avec les anticorps présents dans le sang et de réduire l'expression extracardiaque du transgène.

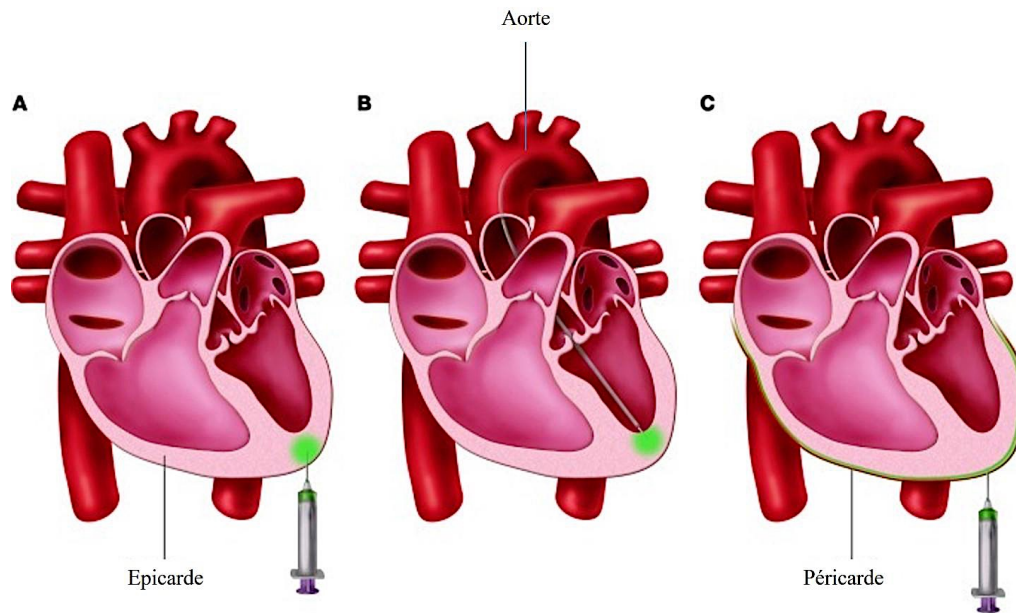


Figure 24 : Techniques d'injection locale, d'après Hajjar et al., 2013

Il existe une autre méthode, relativement simple mais plus invasive qui consiste en l'injection du transgène lors d'une thoracotomie. Celle-ci permet d'observer directement le lieu de l'injection, notamment en périphérie de l'infarctus.

L'injection péricardique permet de mettre en contact le vecteur avec toute la surface du cœur (Figure 24 C). Elle est réalisable par voie sous-xyphoïdienne sous contrôle échographique (avec par exemple, une sonde intravasculaire). Néanmoins, la transfection ne se fait que dans les cellules superficielles du myocarde et il existe une expression extracardiaque, probablement due à la résorption rapide du fluide intra-péricardique par le système lymphatique. Il est également possible, même si l'utilisation de cette méthode est encore marginale, d'administrer en parallèle des agents pharmacologiques (enzymes protéolytiques ou polyéthylèneimine par exemple), car il a été prouvé qu'ils augmentaient la profondeur de pénétration du vecteur dans le myocarde³⁸⁸.

Il existe une dernière méthode qui émerge et qui consiste en l'utilisation de microbulles. Il est possible d'insérer un vecteur viral dans une microbulle, de l'injecter par voie intraveineuse et de la faire exploser au niveau cardiaque par application d'ultrasons. Ainsi, on peut protéger le vecteur des anticorps circulants, le diriger vers le tissu cible et ainsi augmenter la transfection par l'application

d'ultrasons (création de pores). L'efficacité de l'utilisation des microbulles a été prouvée dans de nombreuses études expérimentales³⁹¹. Cependant, cette technique crée des pores dans l'endothélium et le risque associé à ces lésions, qu'elles soient permanentes ou transitoires, est encore aujourd'hui inconnu³⁸⁹. A l'heure actuelle, l'utilisation de ces microbulles est cantonnée aux modèles animaux jusqu'à l'évaluation des risques de cette technique à plus long terme.

IV. Ciblage et régulation de l'expression des gènes

Grâce à la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans le fonctionnement de la cellule cardiaque, l'identification de protéines capables d'améliorer, voire de rétablir le fonctionnement normal de la cellule cardiaque lors de l'insuffisance cardiaque a été rendue possible. A l'heure actuelle, de nombreuses études ont été réalisées mais nous détaillerons les plus marquantes dans l'histoire de la thérapie génique cardiaque.

1. Le système β -adrénergique

Il est désormais clairement établi que l'insuffisance cardiaque engendre une diminution de la sensibilité des cellules cardiaques aux signaux du système sympathique. Cette désensibilisation se fait via une diminution du nombre de récepteurs β 2-adrénergiques (β -AR) à la surface de la cellule. Ceci provoque une perte d'inotropisme au niveau cardiaque. L'utilisation d'agonistes β a montré de nombreux effets délétères à long terme, d'où l'arrêt de ce type de traitement et leur substitution par les β -bloquants³⁹². Ces dernières années, l'étude de la surexpression du gène codant pour les β -AR chez l'animal a montré une efficacité certaine³⁹³.

D'autres cibles de ce système ont également été étudiées. On peut notamment citer le GRK2 (pour récepteur kinase couplé à la protéine G) qui est impliqué dans le rétrocontrôle négatif de cette voie. Cette molécule phosphoryle les β -AR, empêchant leur liaison avec l'adrénaline ou la noradrénaline³⁹⁴. Ce récepteur est inhibé par un peptide, le β ARKct et des études réalisées sur le rongeur ont pu montrer que l'insertion d'un transgène codant pour ce peptide permettait l'amélioration de la contraction ventriculaire gauche³⁹⁵.

Par ailleurs, l'adényl-cyclase de type VI est également une molécule capable d'inhiber le GRK2. Une étude réalisée chez le cochon a montré une amélioration de la fonction cardiaque ainsi qu'une augmentation de la capacité du cœur à régénérer l'AMPC (adénosine monophosphate cyclique), un second messager intracellulaire impliqué dans la contraction musculaire³⁸⁸.

2. Circulation du calcium

Comme détaillé dans précédemment, la circulation calcique est fortement altérée au cours de l'insuffisance cardiaque, passant par une moindre activité de la pompe calcique SERCA2a située dans la membrane du RS et permettant l'entrée du calcium intracellulaire dans le RS au cours de la diastole.

Il a été montré, dans plusieurs modèles animaux, que la transduction de cellules cardiaques avec le gène codant pour la pompe SERCA2a permettait une nette amélioration de la contractilité cardiaque, un rétablissement de la géométrie cardiaque et de la consommation énergétique. Ce traitement permettait également de diminuer le risque d'arythmies et d'augmenter le flux sanguin coronaire grâce à l'activation de la eNOS par les cellules endothéliales coronaires³⁹³.

Il existe trois autres mécanismes qui permettent d'augmenter l'activité de la pompe SERCA2a³⁸⁸. En premier lieu, le phospholamban (PLB), lorsqu'il est phosphorylé, augmente l'activité de la pompe. Au cours de l'insuffisance cardiaque, le PP1 (protéine phosphatase 1), inhibiteur du PLB par déphosphorylation, est surexprimé, alors que son inhibiteur, le PP1-I est sous-exprimé. Il a été montré qu'une modulation de l'expression de l'une de ces deux cibles permettait à elle seule de rétablir l'activité de la pompe SERCA2a.

Par ailleurs, le S100A1 est une molécule régulatrice qui augmente l'activité de la pompe SERCA2a et du canal calcique RyR (récepteur à la ryanodine) qui permet la sortie du calcium du RS vers le cytoplasme au cours de la systole.

Un nouveau mécanisme cellulaire a été découvert au début des années 2010. Des molécules appelées SUMO (petits modificateurs ubiquitine-like) interviennent dans la modification post-traductionnelle de certaines protéines et la surexpression du gène SUMO de type 1 conduit à un rétablissement de l'activité de la pompe SERCA2a au cours de l'insuffisance cardiaque.

OBJECTIFS DE LA THESE

L'insuffisance cardiaque est donc un syndrome complexe dont les traitements actuels, malgré qu'ils soient efficaces, ne permettent pas d'inverser les dommages subis au niveau cardiaque et vasculaire. L'enjeu des stratégies de thérapie génique est donc majeur. De nos jours, seuls trois essais cliniques principaux sont en cours et offrent des perspectives prometteuses. Le premier, en phase I, étudie le système AAV6-SERCA2a par rapport à un placebo, et deux autres essais de phase II étudient le système AAV1-SERCA2a³⁸⁸. La thérapie génique pour l'insuffisance cardiaque commence donc à se développer et on comprend l'importance des recherches précliniques pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques prometteuses.

Par ailleurs, l'une des voies possibles de traitement de l'insuffisance cardiaque serait l'utilisation de molécules renforçant les défenses antioxydantes endogènes pour palier au défaut de la balance EROs/antioxydants. Si l'administration d'antioxydants/chélateurs d'EROs, tels que les vitamines C et E³⁹⁶ ou le mitoQ³⁹⁷, ralentissent la progression de l'insuffisance cardiaque dans des modèles animaux, aucun traitement antioxydant n'a clairement démontré son efficacité chez l'Homme. Ces traitements d'origine exogène étant inefficaces chez l'Homme, il est néanmoins envisageable que l'activité d'une ou plusieurs enzymes antioxydantes puisse être bénéfique.

Sur la base des données obtenues dans les travaux pionniers ayant contribué à caractériser la SeIT – rôle antioxydant, effets bénéfiques dans différents organes -, nous pouvons formuler l'hypothèse que ces effets puissent se retrouver au niveau cardiaque, en particulier dans le remodelage ventriculaire gauche et l'insuffisance cardiaque. A ce jour, aucune étude expérimentale ou clinique n'a montré le rôle de la SeIT dans le développement et la progression de pathologies cardiovasculaires. Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse ont été :

- ❖ D'étudier au cours du remodelage ventriculaire gauche, l'impact d'une thérapie protéique par la SeIT chez le rat Wistar.
- ❖ D'évaluer l'impact d'une thérapie génique par la SeIT, moyennant l'utilisation de plusieurs sérotypes de rAAV :
 - Un rAAV à tropisme majoritairement cardiaque, à savoir le rAAV9, qui permettra une surexpression majoritairement cardiaque du gène de la SeIT
 - Un rAAV à tropisme cardiaque, mais également musculaire, qui permettra une expression plus étendue d'une forme sécrétable de la protéine, permettant une comparaison plus aisée avec la thérapie protéique.

MATERIEL & METHODES

I. Modèles animaux

L'ensemble des expérimentations que nous avons réalisées ont été réalisées sous l'égide de l'habilitation du projet 01354.01. Les personnes ayant participé au travail sur les animaux sont titulaires du diplôme de niveau I d'Expérimentation Animale. Au cours de ce travail, le protocole expérimental et les soins apportés aux animaux ont été conformes aux réglementations en vigueur (décret 2013-118 du 1^{er} février 2013). Les animaux ont été acclimatés au moins 7 jours avant le début de chaque expérimentation. L'animalerie est équipée d'un système d'éclairage automatisé, permettant de reproduire un cycle jour/nuit de 12h et est stabilisée à une température de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ et à un taux d'hygrométrie de $65 \pm 5\%$. De plus, les animaux ont eu un libre accès à la nourriture (RM1, SDS, Royaume Uni) ainsi qu'à l'eau de boisson.

1. Modèle de thérapie protéique par la SelT chez le rat Wistar

La première étude réalisée avait pour but d'évaluer les effets d'une supplémentation systémique en SelT, moyennant l'utilisation de minipompes osmotiques. Cette étude a été réalisée sur des rats Wistar ayant subi ou non une ischémie-reperfusion coronaire.

Le design expérimental de cette étude fut de randomiser les rats en trois groupes distincts (Figure 25). Au sein du premier groupe, les rats ont subi une opération fantôme et seront appelés « contrôles ». Les deux autres groupes d'animaux ont subi une opération d'ischémie-reperfusion coronaire dans le but d'induire un infarctus du myocarde. Ces animaux seront ensuite randomisés en deux groupes distincts huit jours après l'opération. A ce stade, des minipompes osmotiques (Alzet) sont implantées de manière intra-péritonéale chez les rats et permettent de délivrer en continu soit de la solution saline, soit la protéine SelT à une dose de $15 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$. Un mois après l'opération, l'évaluation de la fonction cardiaque et vasculaire a été réalisée et les animaux sacrifiés. Différentes mesures ont ensuite été réalisées sur le ventricule gauche (biologie moléculaire, immuno-histochimie, évaluation du stress oxydant etc.).

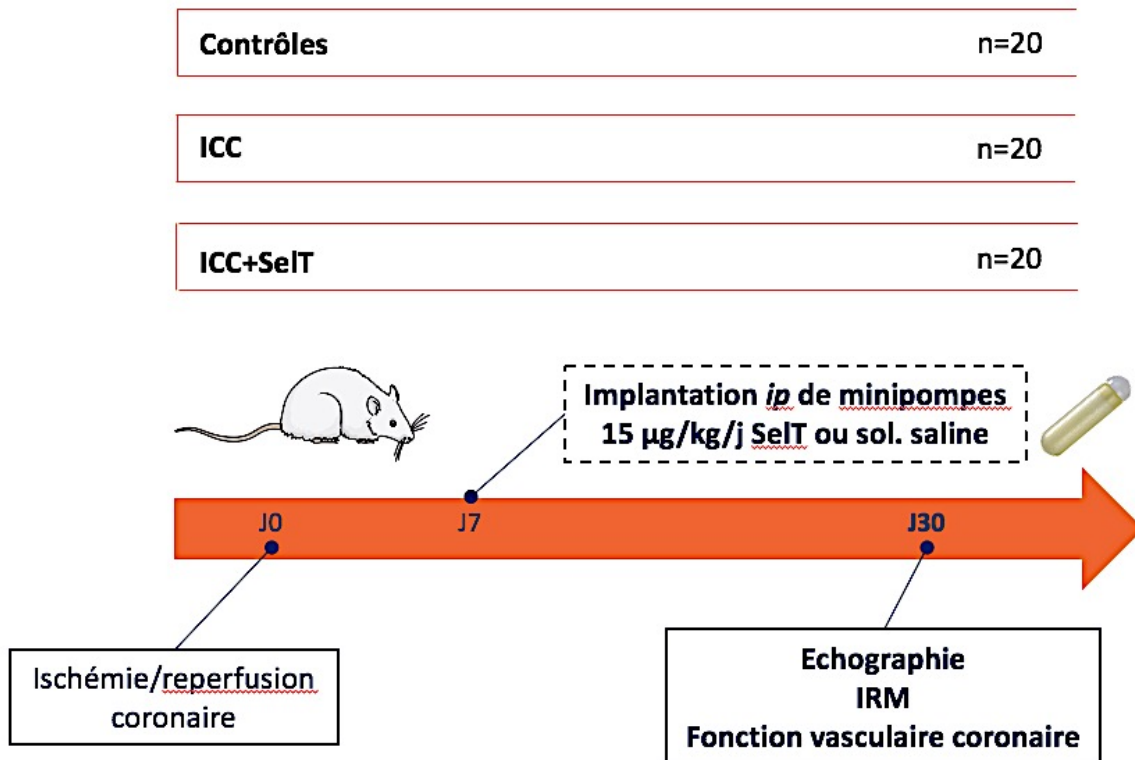


Figure 25 : Schéma expérimental de l'étude de thérapie protéique par la SeIT moyennant l'utilisation de minipompes osmotiques.

Sept jours après avoir subi une ischémie/reperfusion coronaire, les rats se voient implanter des minipompes osmotiques en ip de manière à délivrer en continu la protéine SeIT. Un mois après, différentes évaluations cardiaques et vasculaires sont réalisées.

2. Modèle de thérapie génique par un rAAV9-SeIT dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le rat

L'autre grand chapitre de ce travail de thèse a été la mise au point d'un modèle de thérapie génique chez le rat. Cette étude a été permise grâce à une collaboration avec le Dr. Adriouch, immunologiste au sein de l'Unité U905 à Rouen. Cette partie a été divisée, par soucis de compréhension en deux études. La première, que je détaillerai dans ce paragraphe, a permis l'évaluation des effets d'un traitement par un AAV9 recombinant permettant la majoration de l'expression de la SeIT, principalement au niveau cardiaque. Lors de cette étude, les rats ont été

randomisés en trois groupes distincts afin de procéder à l'administration du biomédicament. Le premier groupe d'animaux, n'ayant pas subi la ligature coronaire, mais une opération fantôme (les détails sur le protocole chirurgical seront expliqués dans le chapitre dédié à cet effet), a constitué le groupe « contrôle ». Les deux autres groupes ont subi une ligature coronaire et ont été traités soit avec de la solution saline, constituant le groupe « ICC », qui sera notre groupe témoin négatif ; soit avec l'AAV9 recombinant exprimant la SelT, qui sera le groupe « ICC+rAAV9-SelT ». Les traitements ont été administrés 7 jours après la ligature coronaire en *iv* à la dose de 1.10^{11} particules virales/rat (Figure 26).

Le choix d'initiation du traitement à 7 jours suivant la chirurgie repose principalement sur la cinétique du remodelage cardiaque chez le rat. En effet, il est désormais clairement établi chez l'Homme et chez l'animal, que le remodelage cardiaque passe par deux phases essentielles : la première phase dite « d'expansion de l'infarctus » qui s'étend de l'épisode ischémique jusqu'à 7 jours et une deuxième phase dite « de dilatation du myocarde sain » qui débute 7 jours après la chirurgie et se prolonge quelques semaines voire quelques mois plus tard. Du fait de cette cinétique, les premiers jours suivant l'épisode ischémique sont les plus critiques, notamment chez l'animal, avec une mortalité accentuée des animaux dans les 7 premiers jours suivant la chirurgie. Ainsi, le traitement par le rAAV9-SelT, initié 7 jours après la ligature coronaire, a permis d'une part de s'affranchir de la mortalité précoce consécutive à l'opération, et d'autre part, d'évaluer le rôle de la SelT dans la physiopathologie de la phase tardive.

Au cours de cette étude, un suivi échocardiographique sera réalisé à 1 et 3 mois. En point final, avant le sacrifice à 3 mois, nous avons évalué la perfusion cardiaque par IRM, l'hémodynamique cardiaque en courbes pression-volume, ainsi que la fonction vasculaire coronaire. Par la suite, différentes mesures seront réalisées sur différents organes, y compris le cœur.

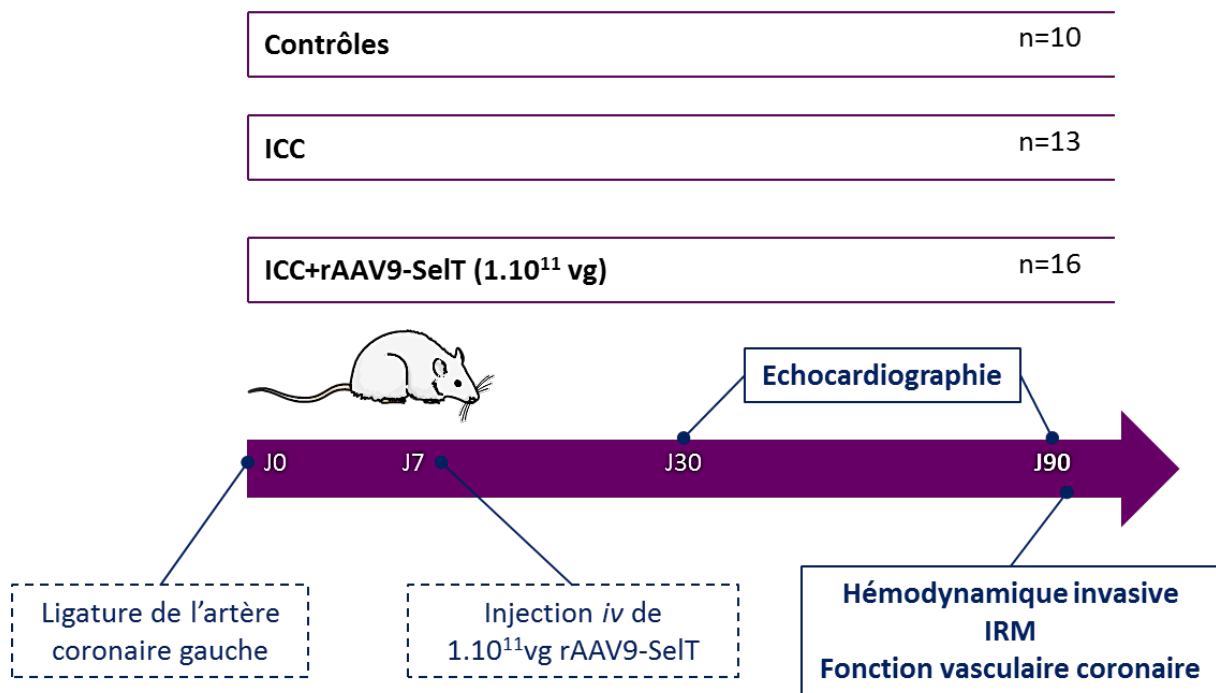


Figure 26 : Schéma expérimental résumant le principe de l'étude de thérapie génique cardiaque par la SelT moyennant l'utilisation d'un rAAV9-SelT.

3. Modèle de thérapie génique par un rAAV8-SelT dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le rat

La seconde étude du chapitre de thérapie génique a consisté en l'évaluation des effets d'un traitement par un AAV8 recombinant, permettant la majoration de l'expression de la SelT au niveau systémique. Dans le cadre de ce projet, l'objectif a été de comparer ces effets à ceux que nous observions lors de la thérapie protéique par la SelT. Pour ce faire, nous avons construit un rAAV8 codant pour une forme modifiée de la SelT, laquelle forme permettrait d'exprimer une forme sécrétable de la protéine. Ainsi, injectée de manière intra-musculaire, cet rAAV8-SelT permettra la surexpression de la SelT au niveau musculaire, site préférentiel d'expression de ce sérotype d'AAV, et permettra ainsi la sécrétion de la SelT dans la circulation sanguine, entraînant l'expression de la protéine dans l'ensemble des tissus de l'organisme.

Par ailleurs, un second objectif de cette étude a été d'appréhender l'implication du sélénium dans la protéine SelT. Pour ce faire, nous avons également construit un dernier rAAV8 dans lequel la séquence de la protéine a été modifiée avec pour but de remplacer la Sec de la séquence (c'est-à-dire le sélénium incorporé dans la séquence protéique) par une Alanine, afin de mesurer la part spécifique de la Sec dans les effets de la SelT.

Ainsi, pour cette partie, les rats ont été randomisés en quatre groupes distincts (Figure 27).

- Un premier groupe dans lequel les rats ont subi une opération dite fantôme, qui sera appelé « contrôle ».
- Un second groupe dans lequel les rats subissent une ligature coronaire définitive et sont traités avec de la solution saline au 7^e jour suivant l'opération, constituant le groupe « ICC ».
- Un troisième groupe dans lequel les rats subissent également une ligature coronaire définitive. Ils seront traités à J7 par une injection intra-musculaire unique de rAAV8-SelT^{Sec} à la dose de 1.10^{11} particules virales/rat. Ces animaux constitueront le groupe « ICC+rAAV8-SelT^{Sec} ».
- Enfin, un quatrième groupe dans lequel les animaux subissent une ligature coronaire définitive et sont traités à J7 par une injection intra-musculaire unique de rAAV8-SelT^{Ala} (exprimant la forme modifiée de la SelT dans laquelle le résidu Sec sera remplacé par une alanine) à la dose de 1.10^{11} particules virales/rat. Ces animaux constitueront le groupe « ICC+rAAV8-SelT^{Ala} ».

De manière identique à l'étude précédente, un suivi échocardiographique sera réalisé à 1 et 3 mois. En point final, avant le sacrifice à 3 mois, nous avons évalué la perfusion cardiaque par IRM, l'hémodynamique cardiaque en courbes pression-volume, ainsi que la fonction vasculaire coronaire. Par la suite, différentes mesures seront réalisées sur différents organes, y compris le cœur.

Contrôles	n=9
ICC	n=14
ICC+rAAV8-SelT ^{Sec} (1.10 ¹¹ vg)	n=16
ICC+rAAV8-SelT ^{Ala} (1.10 ¹¹ vg)	n=16

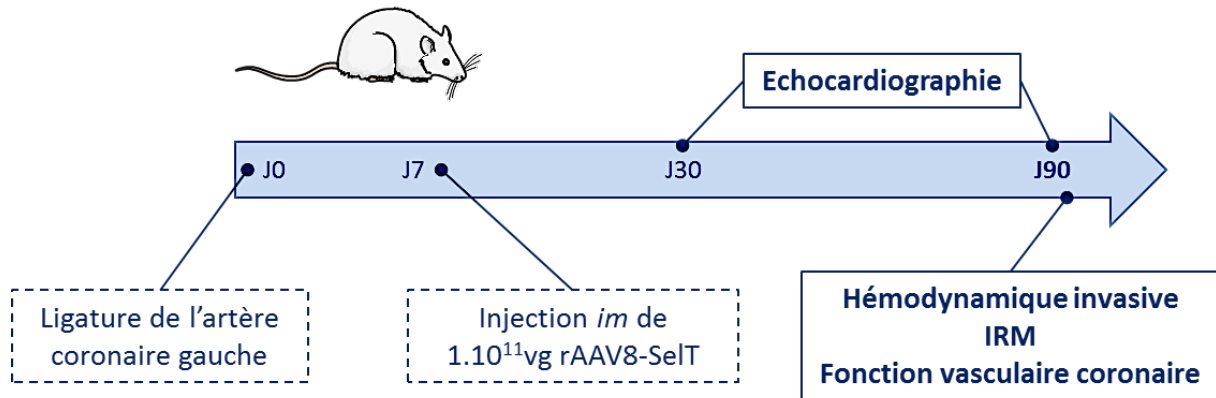


Figure 27 : Schéma expérimental résumant le principe de l'étude de thérapie génique systémique par la SelT moyennant l'utilisation d'un rAAV8-SelT contenant soit la forme sauvage de la protéine, le rAAV8-SelT^{Sec}, soit la forme modifiée dans laquelle le résidu Sec est remplacé par un résidu Ala, le rAAV8-SelT^{Ala}.

II. Protocole expérimental

1. Modèles chirurgicaux

Lors de ce travail de thèse, deux modèles chirurgicaux ont été utilisés dans le but d'induire une insuffisance cardiaque chronique, soit une ligature coronaire définitive, soit une ischémie-reperfusion coronaire.

Cette opération consiste en la ligature transitoire ou définitive de l'artère coronaire gauche descendante, suivie par une restauration permanente de la perfusion sanguine jusqu'au sacrifice de l'animal. Dans ce but, les rats Wistar ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale (*ip*) d'un mélange de kétamine (100 mg/kg) et de Xylazine (30 mg/kg).

L'abord chirurgical fut identique pour tous les animaux. Brièvement, les animaux sont intubés afin de permettre leur ventilation mécanique, moyennant un ventilateur spécifique pour rongeurs (Ugo Basile®, modèle 7025, Milan, Italie). Le volume courant était fixé à 10 mL/kg avec une fréquence respiratoire de 60 cycles par minute. Afin d'accéder à l'artère coronaire gauche interventriculaire, une thoracotomie gauche est réalisée puis le péricarde est délicatement disséqué. L'artère coronaire gauche est ensuite ligaturée moyennant un fil de suture en propylène 6.0 (Prolène®, Ethicon, France). L'ischémie myocardique est alors visible immédiatement par cyanose du myocarde, confirmant ainsi l'occlusion complète de l'artère coronaire (Figure 28).

Dans le cadre de l'opération d'ischémie-reperfusion, la ligature a ensuite été maintenue pendant 45 minutes puis le nœud autour de l'artère a été desserré, permettant ainsi la reperfusion du myocarde. Pour finir, le thorax est refermé plan par plan à l'aide d'un fil en polyester 2.0 (Vicryl®, Ethicon, France) et le pneumothorax a été résorbé par aspiration.

Dans le cadre de la ligature définitive, la ligature a été maintenue et le thorax a été refermé plan par plan selon le même protocole que précédemment.

Au terme du protocole chirurgical et conformément aux recommandations du bien-être animal, des injections d'analgésique (Nelbuphine ; 10 mg/mL ; Sigma-Aldrich, France) ont été réalisées par voie intra-musculaire pendant les 72 heures suivant l'opération.

Des opérations fantômes ont également été réalisées, au cours desquelles les cœurs ont été exposés à la même chirurgie sans serrer le fil de ligature autour de l'artère coronaire.

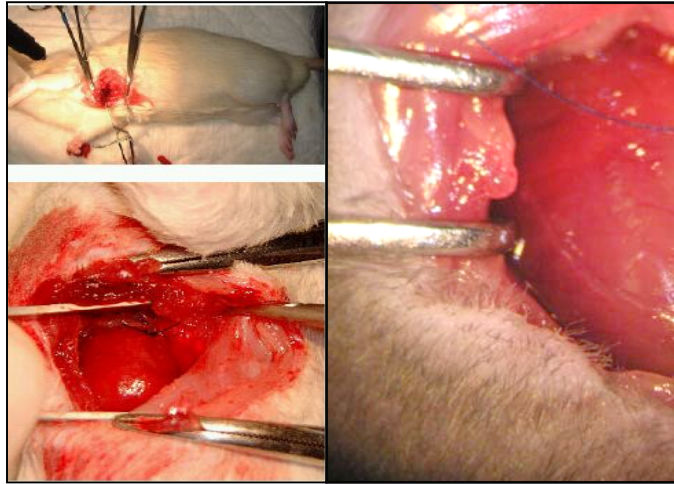


Figure 28 : Photographies d'un cœur après ligature de l'artère coronaire gauche descendante.

2. Evaluation de la fonction cardiaque

a. Echocardiographie

Les mesures échocardiographiques ont été réalisées à l'aide d'un échographe Vivid 7 Ultrasound (General Electric Healthcare), équipé d'une sonde linéaire de 14MHz (M12L) et d'un système d'analyse (EchoPac PC).

Mode Temps-Mouvements

L'acquisition des images en mode Temps-Mouvements (bidimensionnel) a été réalisée en coupe parasternale petit axe, au niveau des muscles papillaires et a permis la mesure des dimensions du VG. En effet, ce mode nous a permis de mesurer directement les épaisseurs des parois antérieures du VG en télé-diastole (EPATD-VG ; mm) et télé-systole (EPATS-VG ; mm), ainsi que les diamètres ventriculaires gauches télé-diastolique et télé-systolique (DTD-VG, DTS-VG ; mm) (Figure 29). De plus, selon la méthode « leading Edge » de la société américaine d'échographie, le calcul de la fraction de raccourcissement (FR ; %) a pu être réalisé à l'aide de la formule suivante :

$$FR (\%) = [(DTDVG - DTSVG) / DTDVG] \times 100$$

La FR permet d'évaluer la fonction ventriculaire gauche.

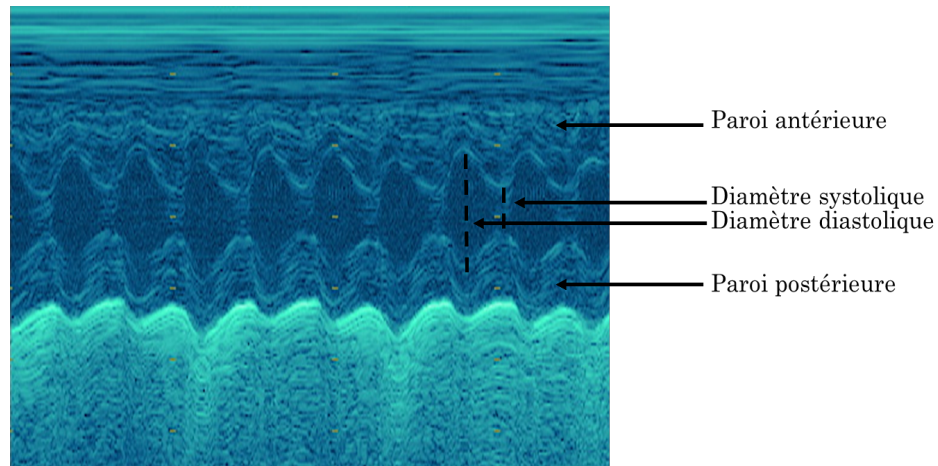


Figure 29 : Exemple d'un enregistrement en mode Temps-Mouvements.

Mode Doppler Pulsé

Le mode Doppler pulsé permet de visualiser les flux sanguins au sein des cavités cardiaques et vasculaires, et de calculer les vitesses de leurs déplacements (Figure 30). Afin de réaliser ces mesures, la sonde de l'échographe a été placée au niveau de l'aorte thoracique, permettant ainsi de visualiser le flux sanguin sortant du VG. La fréquence cardiaque (FC ; Bat/min) et l'Intégrale Temps Vitesse (ITV ; cm), qui rendent compte de la vélocité sanguine, ont été directement mesurés et ont permis de calculer le volume d'éjection systolique (VES ; mL) selon la formule :

$$VES (ml) = [ITV \times \pi \times (D^2_{aortique} / 4)]$$

Le VES représente la capacité du VG à éjecter le sang vers le système périphérique. Ce paramètre a été multiplié par la FC pour le calcul du débit cardiaque (DC ; mL/min).

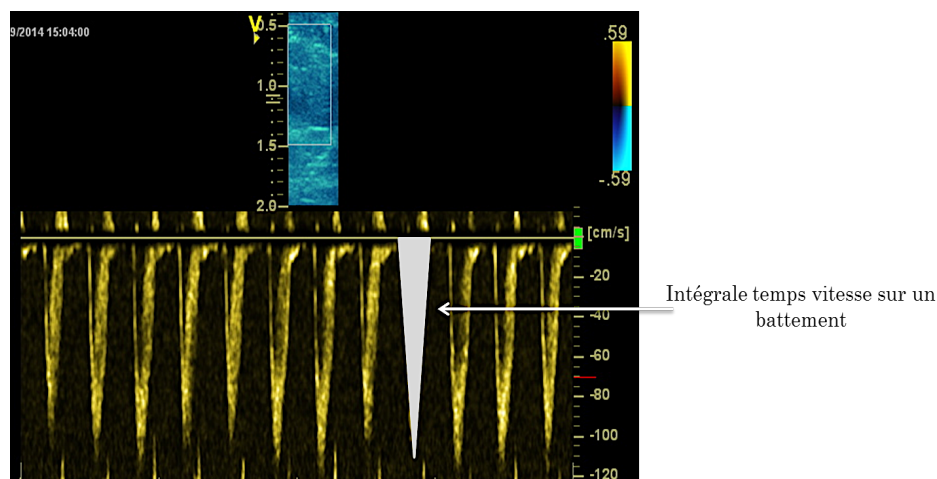


Figure 30 : Exemple d'un enregistrement en mode Doppler pulsé.

b. Mesure hémodynamique invasive

Les mesures hémodynamiques ventriculaires gauches ont été réalisées sur des animaux anesthésiés par injection de Briétal (*ip* ; 60mg/kg) (Sigma-Aldrich, France) et par application locale de Lidocaïne (locale ; 2mg/kg) (Sigma-Aldrich, France). Les animaux ont été maintenus à 37° C pendant toute la durée de l'expérimentation à l'aide d'un support chauffant. L'artère carotide droite a été repérée et isolée du nerf vague, puis canulée à l'aide d'un micro-manomètre électronique permettant l'enregistrement des pressions ainsi que des volumes (SR-839 type 1.4F, Millar instrument, USA). Les pressions artérielles systolique (PAS ; mmHg) et diastolique (PAD ; mmHg) et la fréquence cardiaque (FC ; bpm), ont ainsi pu être enregistrées au niveau carotidien. En progressant de façon rétrograde dans l'artère, la tête de pression a été introduite dans le VG. Au sein de la cavité gauche, les pressions télé-diastolique (PTD-VG ; mmHg) et télé-systolique (PTS-VG ; mmHg), les valeurs minimale et maximale de la dérivée de la pression par rapport au temps (dp/dt_{\min} , dp/dt_{\max} ; mmHg/sec) ainsi que la constante de relaxation tau (ms), ont été enregistrées. Les pentes des relations pressions pression-volume télé-systolique (RPVTS-VG) et télé-diastolique (RPVTD-VG), reflétant respectivement l'élastance et la compliance ventriculaire gauche, de façon charge et fréquence indépendantes, ont été obtenues après enregistrement et analyse des courbes pression-volume du VG. Ces pentes ont été analysées au cours d'une épreuve d'effort cardiaque simulée par l'occlusion de l'aorte abdominale, conduisant à une forte augmentation de la post-charge du VG. L'ensemble de ces expérimentations a été numérisé puis analysé à l'aide du logiciel d'analyse IOX (EMKA, France).

c. Imagerie par résonance magnétique

La perfusion myocardique a été évaluée par imagerie par résonance magnétique (IRM). Les séquences d'acquisitions ont été réalisées sur animaux anesthésiés par un mélange de Kétamine et de Xylazine (IP, 100 mg/kg Kétamine et 30 mg/kg de Xylazine) (Sigma-Aldrich, France) à l'aide d'une IRM Brucker BioSpec 4.7 T/30 (Brucker, Allemagne).

Cette mesure a été effectuée, au niveau du septum, par la technique d'« Arterial spin labeling » (ASL). Cette méthode utilise l'eau du sang artériel marqué électro-magnétiquement comme un traceur diffusible pour mesurer la perfusion de manière non-invasive. Pour cela, les noyaux d'hydrogène de l'eau intravasculaire artérielle ont été marqués par une inversion magnétique juste en amont de la zone d'intérêt (la zone médiane du cœur). En effet, l'application d'impulsions de radiofréquences entraîne une inversion de l'aimantation longitudinale des spins des molécules d'H₂O du sang artériel dans cette zone. Après un certain temps de transit, le changement de magnétisation au niveau de la coupe médiane marque l'arrivée des spins récemment marqués et par conséquent l'arrivée du sang au niveau de la coupe d'intérêt. L'expérience a ensuite été répétée mais cette fois-ci en entraînant une inversion de tous les spins au niveau de la zone d'intérêt (la zone médiane), ce qui a eu pour but de discriminer la part du bruit de fond dans le signal précédemment obtenu. La différence entre les deux images acquises lors de ces deux conditions reflète la perfusion myocardique.

3. Evaluation du remodelage cardiaque

a. Histomorphométrie cardiaque

Les études *ex vivo* ont été effectuées suite au sacrifice des animaux, sacrifice qui a été réalisé sous anesthésie. Encore battant, le cœur a été prélevé et plongé dans une solution saturée de chlorure de potassium, permettant son arrêt en diastole.

Par ailleurs, le cœur a été pesé, puis les oreillettes sont retirées ainsi que le ventricule droit. Les différentes parties sont alors pesées, puis le VG est ensuite coupé transversalement en trois parties. Les pôles du VG serviront pour les analyses moléculaires. Ils sont déposés dans des tubes Eppendorf, congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C. La partie médiane, quant à elle, est

fixée sur du tissu Tec (OCT, SAKURA ref n°4583) déposée dans un cryotube, congelée également dans l'azote liquide, puis conservée à -80°C.

Les différentes pesées réalisées ont permis d'appréhender l'hypertrophie ventriculaire (gauche et droite), témoin du remodelage cardiaque.

b. Mesure histologique de la taille d'infarctus

Des coupes de cœur de 8 µm d'épaisseur ont été réalisées au cryostat. Différentes colorations et immunomarquages ont ensuite été effectués, moyennant une coloration au rouge Sirius ou encore l'utilisation de différents marqueurs sanguins, de la matrice extracellulaire etc.

La coloration au rouge Sirius a été effectuée après fixation des cœurs au liquide de Bouin (30 min, T° ambiante) sur quatre niveaux sur la hauteur du cœur. Cette coloration permet d'appréhender la taille d'infarctus ainsi que la quantité de fibrose, dès lors qu'elle permet de révéler les collagènes de type I et III en les colorant en rouge.

Ainsi, les coupes de cœurs ont été plongées dans un bain de rouge Sirius (45 min, T° ambiante) puis rincées successivement dans un bain d'H₂O, puis dans trois bains d'éthanol. Les coupes ont ensuite été maintenues dans le xylène avant d'être montées entre lame et lamelle.

Par la suite, les lames ont été observées au microscope optique (Zeiss ; logiciel : AxioVision) au grossissement x1.25 afin d'observer l'intégralité du plan transversale du cœur. Des photographies ont été prises, puis, à l'aide du logiciel ImageJ, la surface externe totale du VG, de la cavité interne du VG ainsi que celle la zone infarctique, entièrement fibrotiques et donc colorées en rouge, ont été détournés et la taille d'infarctus pour un niveau donné a été obtenue selon la formule suivante :

$$\text{Taille de l'infarctus (\%)} = [A. \text{ zone infarctique} / (A. \text{ ext} - A. \text{ int})] \times 100$$

Finalement, la taille d'infarctus sur l'ensemble de cœur a été obtenue en moyennant les différentes tailles d'infarctus obtenues sur plusieurs niveaux et a été exprimée sous forme de % de VG.

c. Mesure histologique de la fibrose cardiaque

Des coupes de cœur de 8 µm d'épaisseur ont été colorées selon la même méthode que décrite précédemment. Afin d'évaluer la fibrose cardiaque, les coupes médianes de VG ont été

observées au microscope optique (Zeiss ; logiciel : AxioVision) au grossissement x40. A partir de cette coupe, six photographies ont été prises dans chacune des deux zones d'intérêts comprenant (respectivement) le septum interventriculaire ainsi que les bordures de part et d'autre de la zone nécrosée. La densité en collagène (%), a ensuite été évaluée par le calcul du rapport du nombre de pixels colorés en rouge sur l'aire totale de l'image multiplié par 100, ceci à l'aide du logiciel ImageJ.

d. Evaluation de la densité capillaire

Durant nos travaux, les immunomarquages ont été réalisés sur les coupes de cœurs précédemment décrites. La densité capillaire est mesurée grâce à l'association d'un immunomarquage PECAM-1 spécifique des cellules endothéliales (PECAM-1 : Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule I) et d'une coloration à l'agglutinine de blé (WGA : Wheat Germ Agglutinin) qui permet de révéler la matrice extracellulaire et les membranes des myocytes cardiaques. Après avoir décongelé les lames à température ambiante pendant environ 30 min, ces dernières sont fixées par immersion dans un bain d'acétone pendant 10min. Les lames sont ensuite réhydratées dans du PBS 1X (10min, T° ambiante) puis recouvertes d'une solution de BSA (0.3% dans du PBS) afin de perméabiliser les membranes (10min). Les sites non-spécifiques de marquage sont bloqués par le kit avidine-biotine (Avidine : 10min ; Biotine : 10min) (Dako, cat : X0590). Deux rinçages au PBS 1X (2x5min) s'en suivent puis les cellules endothéliales sont marquées par l'ajout d'un anticorps anti-PECAM-1 (CD31*^b rat anti souris 1/100, 1h, à T° ambiante et à l'obscurité) puis d'un anticorps secondaire, le SA-fluoprobe 547 (1/500, 30min, T° ambiante et à l'obscurité). Deux rinçages au PBS 1X sont ensuite effectués puis la matrice extracellulaire est marquée par l'agglutinine de germe de blé (WGA : Wheat Germ Agglutinin – Invitrogen, cat : MP00831, 30min, à l'obscurité, en chambre humide, couplée à un fluorochrome FITC (vert)). Suivent deux rinçages au PBS 1X (2x5min) qui précèdent la coloration au Hoescht (Sigma, cat : H33258) permettant la mise en évidence des noyaux cellulaires (1/10 000, 2min). Les coupes sont rincées dans de l'eau distillée et montées entre lames et lamelle maintenues entre elles par de la colle Vectashield (Abcys, cat : H1000).

Les lames sont observées sur microscope à fluorescence (Imager-Z1, ZEISS) à l'objectif microscopique x40. L'évaluation de la densité capillaire est réalisée sur les mêmes champs photographiques que ceux décrits dans l'étude de la fibrose. La densité capillaire est mesurée

comme le rapport du nombre de vaisseaux sur le nombre de cardiomyocytes par champ. Ces mesures sont effectuées à l'aveugle grâce au logiciel d'analyse d'image ImageJ.

e. Mesure de la taille des cardiomyocytes

La taille des cardiomyocytes a été mesurée sur les mêmes images que celles utilisées pour la mesure de la densité capillaire, en utilisant le logiciel ImageJ, qui permet de délimiter manuellement le contour des cardiomyocytes et ainsi de calculer leur aire.

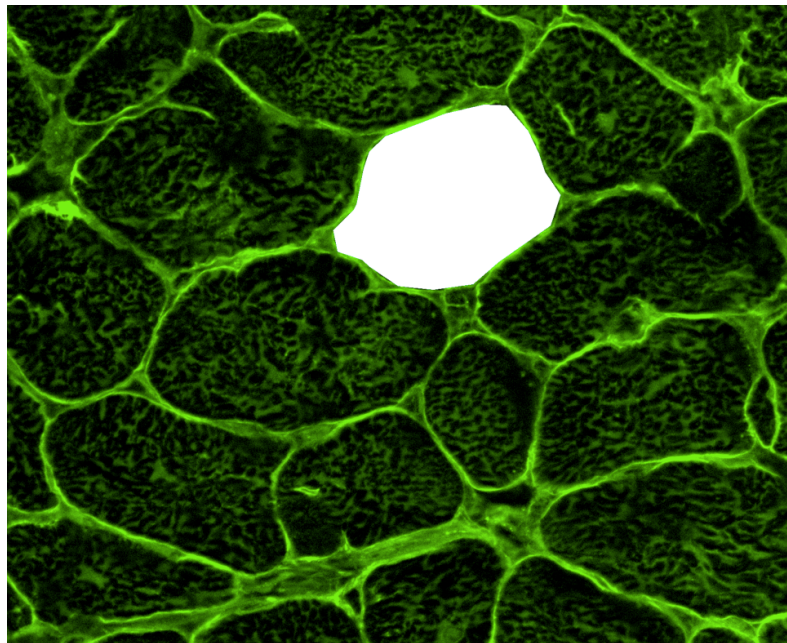


Figure 31 : Photographie représentant la technique de mesure de l'aire des cardiomyocytes sur ImageJ.

4. Evaluation de la fonction vasculaire

Les études vasculaires ont été réalisées *in vitro* sur des artères coronaires septales à différents temps selon les études à l'aide d'un myographe de Mulvany (Dual Myograph 410A, Aarhus, Danemark). Ces dernières ont été effectuées par le Dr. Najah Harouki.

Après anesthésie des animaux par injection d'un mélange de Kétamine et de Xylazine (*ip*, 100 mg/kg Kétamine et 30 mg/kg Xylazine), le cœur a été prélevé et immédiatement placé dans une solution de Krebs (NaCl 120, KCl 4.96, CaCl₂ 2.61, NaHCO₃ 24, KH₂PO₄ 1.21, MgSO₄ 1.2, glucose 5 ; mmol/L) (Sigma-Aldrich, France) froide (4°C) et oxygénée (95% O₂, 5% CO₂). Un petit segment (\approx 1mm) d'artère coronaire est soigneusement isolé sous loupe binoculaire (grossissement x4) avant d'être monté sur deux fils de tungstène de 25 μ m de diamètre chacun, dans la cuve du myographe de Mulvany, contenant 10 mL de solution de Krebs froide et oxygénée. Les deux extrémités des deux différents fils ont été fixées respectivement à un support relié à une vis micrométrique ou à un transducteur, permettant d'étudier les variations de tensions isométriques, correspondant à la contraction ou à la relaxation du muscle lisse coronaire (Figure 32). Par la suite, un processus de normalisation a été effectué après augmentation progressive de la température de la cuve à 35,8 °C. Le but de la normalisation est d'appliquer à l'artère le diamètre interne théorique qu'elle aurait sous une pression transmurale de 100 mmHg (ou 13 KPa).

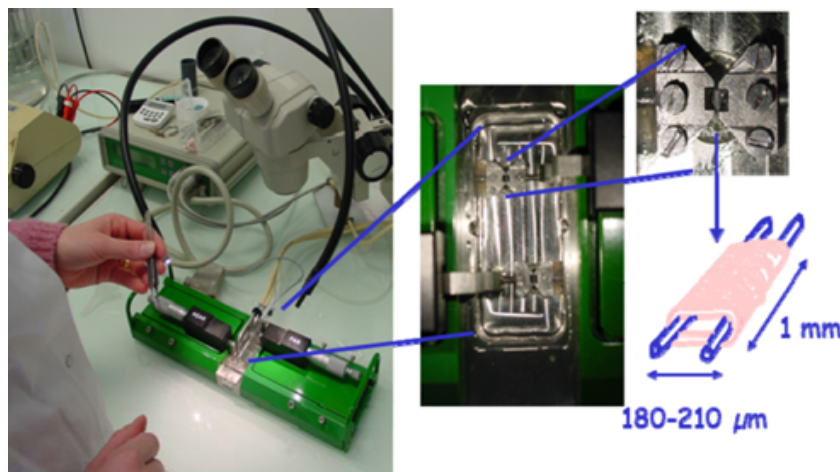


Figure 32 : Montage de l'artère coronaire sur le myographe de Mulvany.

Dans cette étude, après pré-contraction des artères à la Sérotonine 5-HT (10^{-5} M, Sigma-Aldrich, France), et afin d'évaluer la relaxation endothélium-dépendante, une courbe de concentration-réponse est réalisée, moyennant des concentrations croissantes d'acétylcholine (ACh, Sigma-Aldrich, France), allant de 10^{-9} à $3 \cdot 10^{-5}$ M. A chaque concentration correspond une force exercée sur le fil par la contraction de l'artère. Par la suite, la réponse endothélium-indépendante a

été évaluée au moyen du nitroprussiate de sodium (NPS ; 10^{-9} à $10^{-4,5}$ M), un donneur de NO, permettant d'étudier la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO.

5. Biologie moléculaire et biochimie

Suite aux différents prélèvements d'organes, diverses expérimentations de biologie moléculaire et de biochimie ont été réalisées. Elles sont décrites dans le chapitre suivant.

a. RT-qPCR semi-quantitative en temps réel

Extraction des ARNs totaux

Nous avons réalisé des extractions d'ARNs totaux sur différents organes prélevés sur nos animaux. Pour ce faire, les échantillons sont placés dans des tubes à microbilles de 1,5 mL (Precellys) remplis de Trizol (1 mL pour 50-100 mg de tissu ; Trizol, Invitrogen). Les tubes sont ensuite placés dans un homogénéisateur de tissu (Precellys 24, Bertin Technologies, France), qui va effectuer deux cycles d'agitation (2 x 10 sec, 550 tours par min), séparés d'une minute. Au cours de l'agitation, les microbilles broient mécaniquement les tissus, permettant *in fine* d'obtenir un homogénat. Ces derniers sont transférés, après centrifugation (12 000 g, 10 min, 4 °C), dans d'autres tubes où 200 µL de chloroforme (pour 1 mL de Trizol) leurs sont ajoutés. Ils sont agités et laissés à incuber (3min, T° ambiante) avant d'être à nouveau centrifugés (12 000 g, 20 min, 4 °C). La phase aqueuse contenant l'ARN est récupérée et précipitée avec de l'isopropanol (volume à volume). Le mélange est agité quelques secondes puis incubé (10 min, T° ambiante) et centrifugé (12 000 g, 20 min, 4°C). Ensuite, le surnageant est éliminé et le culot d'ARN lavé deux fois avec de l'éthanol à 75 % (1 mL d'éthanol par mL de Trizol). Après avoir bien mélangé au vortex, les tubes sont centrifugés (7 500 g, 5 min, 4 °C). L'éthanol est alors éliminé et le culot d'ARN est laissé à sécher à l'air libre pendant environ 10 minutes puis repris dans 30 µL d'eau RNase-free avant d'être chauffé (5 min, 55-60 °C).

La concentration et la qualité des ARNs sont évaluées par spectrophotométrie (Nanodrop, Thermo Scientific, USA). Une mesure est effectuée à 260 nm, permettant de déterminer la quantité d'ARN, et une seconde à 280 nm, correspondant à la concentration protéique de l'échantillon. Le ratio 260/280 permet alors d'évaluer la qualité de l'extraction, un ratio compris entre 1,8 et 2

témoigne de la bonne qualité des ARNs. Les échantillons sont ensuite conservés à -20 °C jusqu'à utilisation.

Traitement à la DNase I

Malgré les précautions prises pour l'extraction des ARNs, une petite quantité d'ADN peut persister, pouvant fausser les résultats par la suite. Un traitement préalable par la DNase diminue ce risque.

Pour ce faire, un kit de traitement à la DNase I (Invitrogen) est utilisé et le protocole indiqué par le fournisseur est suivi précautionneusement. Brièvement, 2 µg d'ARN de chaque échantillon sont traités par un mix contenant 2 µL de DNase I (1U/µL) et 2 µL de tampon DNase 10X (15 min, T° ambiante). La DNase I est ensuite inactivée en ajoutant 2 µL d'EDTA (10 min, 65 °C). Les ARNs sont finalement redosés grâce au Nanodrop.

Réaction de transcription inverse

La transcription inverse (*Reverse Transcription, RT*) permet de néo-synthétiser de l'ADN complémentaire (ADNc) double brin à partir d'un simple brin d'ARN. La RT est réalisée à partir d'1 µg d'ARN extrait, préalablement traité à la DNase I. La composition du mix RT est la suivante :

Amorces aléatoires	hexamériques (oligopd(N) ₆ , 100 µM, Invitrogen)	2,5 µL
Mélange de dNTP (10	mM, Invitrogen)	3 µL
Tampon 5X (Invitrogen)	6 µL
RNaseOUT	[™] (30 U/µL, Invitrogen)	0,75 µL
ARN		volume pour 1 µg
Eau	ultrapure	qsp 30 µL

Les échantillons sont incubés 5 min à 65 °C, puis 1 heure à 37 °C, en présence d'1 µL de transcriptase inverse (*M-MLV Reverse Transcriptase*, 400 unités, Invitrogen). La réaction est ensuite arrêtée par dénaturation de l'enzyme par une incubation de 5 min à 95 °C. Les ADNc peuvent ensuite être conservés à -20 °C jusqu'à utilisation.

qPCR

Les produits de RT sont amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne en utilisant un appareil de RT-PCR quantitative (Light Cycler LC480, Roche), qui permet le suivi en temps réel de l'amplification, grâce à l'utilisation du SYBR Green I, un agent intercalant qui se lie à l'ADN double brin néo-synthétisé. La fluorescence émise par le SYBR Green I est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié. Pour ce faire, tous les échantillons sont dilués au 1/10^{ème} avec de l'eau extra-pure. Puis, 2,5 µL d'ADNc (1/10^{ème}) sont mélangés et déposés sur une plaque 96 puits avec 7,5 µL d'un mix contenant 5 µL du kit *LightCycler® 480 SYBR Green I Master* (Roche), 0,5 µL d'amorces sens et anti-sens (10 µM) et 1,5 µL d'eau ultra pure. La PCR se déroule de la manière suivante :

Dénaturation	95°C, 10 min
Amplification (40 cycles)	Dénaturation 95 °C, 10 sec
	Hybridation 60 °C, 10 sec
Elongation	Variable en fonction de l'amorce

Une étape de fusion est réalisée pour vérifier la spécificité de l'amplification.

Le logiciel LightCycler 480 calcule la concentration d'ADNc cible grâce à une gamme de dilution allant de 1/2 à 1/164, obtenue suite au mélange de quelques µL d'ADNc prélevés dans chaque tube d'échantillon pur. De plus, afin de rationaliser nos résultats, les amplifications des gènes de ménage que sont l'*eef2* (*eukaryotic elongation factor 2*), la β-actine et la β-2-microglobuline sont effectuées. Pour les différents protocoles, la moyenne des gènes de ménage pour chaque échantillon a été utilisée.

b. Western Blot

Les échantillons ont été broyés dans un tampon de lyse RIPA (NaCl 150 mM, 1 % Triton X-100, 0,5 % SDS, Tris pH 8 50 mM) contenant des inhibiteurs de protéases afin d'extraire les protéines du tissu. Après broyage, une centrifugation a été effectuée (15 000g, 10 min, 4 °C). Un dosage de protéines par la méthode de Bradford a été réalisé, puis le volume équivalent à 100 µg de protéines a été prélevé et dilué dans du tampon Laemmli de charge (Biorad), contenant 5 % de β-mercaptoéthanol. Les protéines ont ensuite été dénaturées à 95 °C pendant 10 minutes, puis les échantillons ont été déposés sur des gels de polyacrylamide (Biorad, 4-12 % acrylamide) et la migration a été réalisée pendant 30-40 min à 240 V dans un tampon Tris-Glycine-SDS (Biorad). Les gels sont ensuite irradiés aux UV pour activer la technologie StainFree® (Biorad) qui permet de révéler les protéines totales. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose *via* le Trans-Bot Turbo® (Biorad). Le blocage des sites non spécifiques a été réalisé dans du Tris-Buffer Salin Tween20 0,1 % (TBST – NaCl 140 mM, Tris base 20 mM, pH=7,6) avec soit de la BSA à 5 % ou du lait en poudre à 5 % pendant 30 minutes à température ambiante. L'anticorps primaire a été appliqué sur la nuit à 4 °C, puis, après trois rinçages dans du TBST sur agitation, l'anticorps secondaire, couplé à l'enzyme HRP, a été appliqué pendant 1 heure à température ambiante. Après trois rinçages, les membranes sont incubées avec dans un volume minimal d'ECL Clarity (Biorad), qui permet la production d'un signal chimiluminescent proportionnel à l'expression de la protéine d'intérêt. L'analyse densitométrique du signal de chimiluminescence a été réalisée *via* le logiciel ImageLab (Biorad). La normalisation des échantillons a été réalisée en divisant le signal d'intérêt par le signal des protéines totales.

III. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism (Version 5.01). Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± erreur standard (ESM, *Error Standard Mean*). Dans toutes les expériences, le n représente le nombre d'animaux utilisés par condition. Afin d'explorer la distribution des données quantitatives, trois tests ont été utilisés, à savoir les tests de Kolmogorov-Smirnov, d'Agostino et Pearson et de Shapiro-Wilk. Si la distribution suit une loi normale, les tests paramétriques ont été appliqués. Le cas échéant, des tests non paramétriques ont été utilisés.

Dans le cas d'une distribution normale, la comparaison de plusieurs groupes est effectuée en deux étapes. Initialement, un test ANOVA à un seul facteur est appliqué. Si la valeur p est significative et que la variance est équivalente, les comparaisons de paire de groupes sont réalisées avec un post-test de Tukey. Dans le cas d'une cinétique, la comparaison entre groupes est réalisée initialement avec un test ANOVA répété. Si la valeur p est significative et que la variance est équivalente, le post-test de Tukey est réalisé.

Dans le cas d'une distribution non normale, la comparaison de plusieurs groupes est effectuée en deux étapes. Initialement, un test de Kruskal-Wallis est réalisé. Si la valeur p est significative, les comparaisons de paires de groupes sont réalisées avec un post-test de Dunns. Dans le cas d'une cinétique, la comparaison entre groupes est réalisée initialement avec un test de Friedman. Si la valeur p est significative, les comparaisons de paires de groupes sont réalisées avec un post-test de Dunns.

L'analyse univariée de la mortalité en fonction du temps a été réalisée à l'aide de courbes de survie et d'un test de Mantel Cox.

Dans le cas de comparaisons multiples, la correction de Bonferroni a été appliquée. Les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

RÉSULTATS

I. Evaluations cardiaques

1. Mesures échocardiographiques

a. Modèle de thérapie protéique par la SeIT

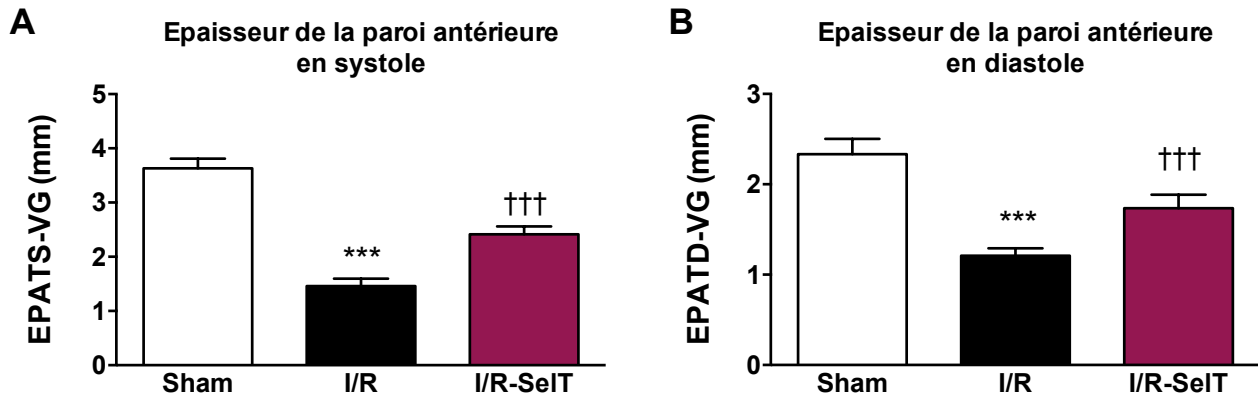


Figure 33 : Effets d'une thérapie protéique par la SeIT sur l'épaisseur de la paroi antérieure du VG dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar

*Les épaisseurs de la paroi antérieure du ventricule gauche en télé-systole « EPATS-VG » (A) et en télé-diastole « EPATD-VG » (B) ont été mesurées par échocardiographie 28 jours après l'I/R. * $p < 0,05$, vs Sham ; † $p < 0,05$, vs I/R.*

Les évaluations échocardiographiques ont été réalisées 4 semaines après l'implantation des mini-pompes chez les rats, soit 30 jours après l'I/R. Ces dernières ont permis d'évaluer l'épaisseur de la paroi antérieure en télé-diastole « EPATD-VG » et en télé-systole « EPATS-VG », la dilatation ventriculaire gauche par la mesure des diamètres télé-diastolique « DTD » et télé-systolique « DTS », ainsi que la fonction cardiaque par la mesure de la fraction de raccourcissement « FR » du VG.

Ces mesures nous ont permis de mettre en évidence un amincissement de la paroi antérieure du VG (ayant subi l'I/R), à la fois en systole et en diastole, en comparaison des rats contrôles (Figure 33 A). Le traitement par la SeIT, initié à 7 jours post-I/R, ne modifie pas les épaisseurs de la paroi antérieure en systole et en diastole (Figure 33 B).

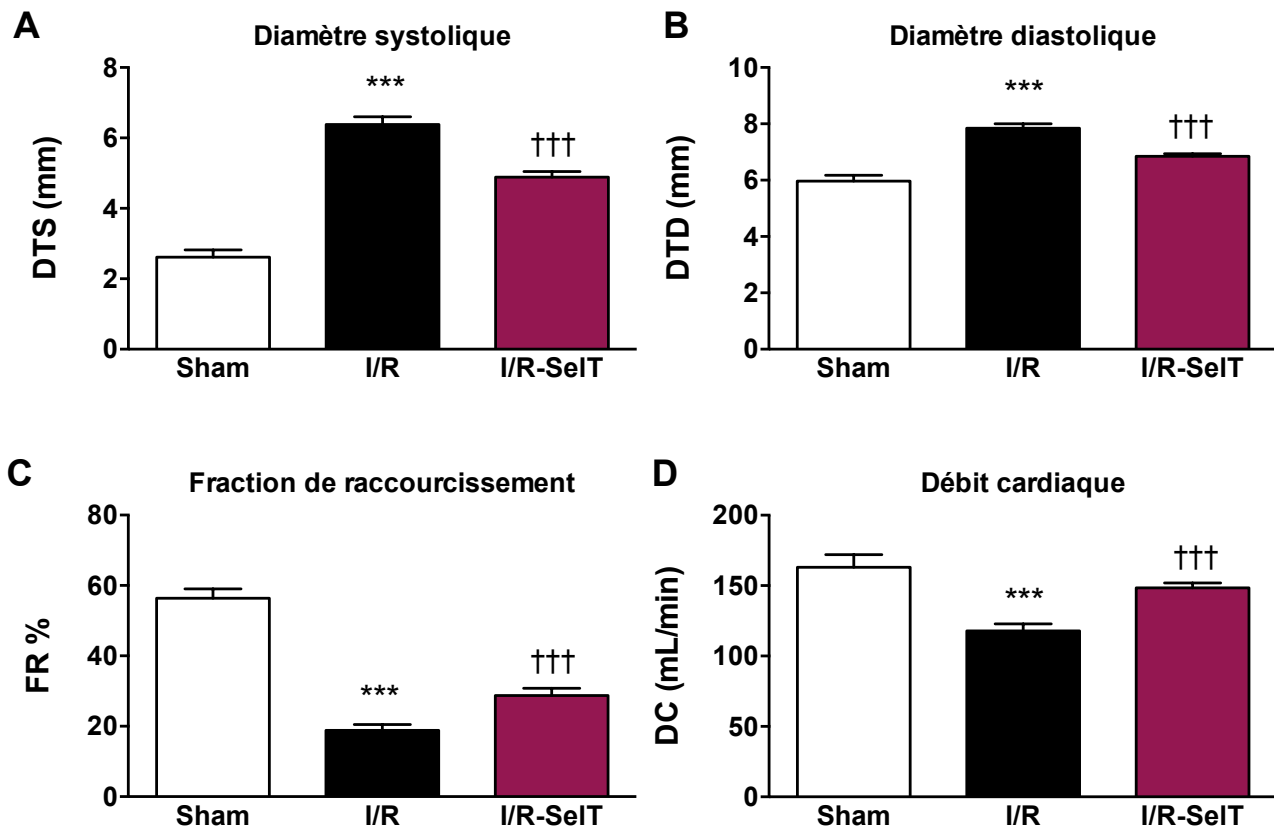


Figure 34 : Effets d'une thérapie protéique par la SeIT sur la fonction cardiaque dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar.

Les diamètres télé-systolique « DTS » (A), télé-diastolique « DTD » (B), la fraction de raccourcissement « FR » (C) et le débit cardiaque « DC » (D) ont été mesurés par échocardiographie au 28^e jour de protocole. * $p < 0,05$, vs Sham ; † $p < 0,05$, vs I/R.

De plus, nous avons montré une dilatation ventriculaire gauche des rats ayant subi une I/R par rapport aux rats contrôles. Celle-ci est responsable d'un effondrement de la FR chez ces mêmes animaux. Le traitement par la SeIT limite la dilatation ventriculaire gauche et améliore significativement la FR par rapport aux rats non traités (Figure 34 A-C).

Nous avons également démontré par échocardiographie, que l'I/R est responsable, chez les animaux ayant subi une I/R, d'une importante diminution du DC (Figure 34 D). La thérapie protéique par la SeIT entraîne une normalisation du DC à des valeurs quasi similaires à celles des animaux non traités.

b. Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV9

Les évaluations échocardiographiques ainsi que la mesure des différents paramètres de la fonction cardiaque ont également été réalisés dans le modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV9-SelT.

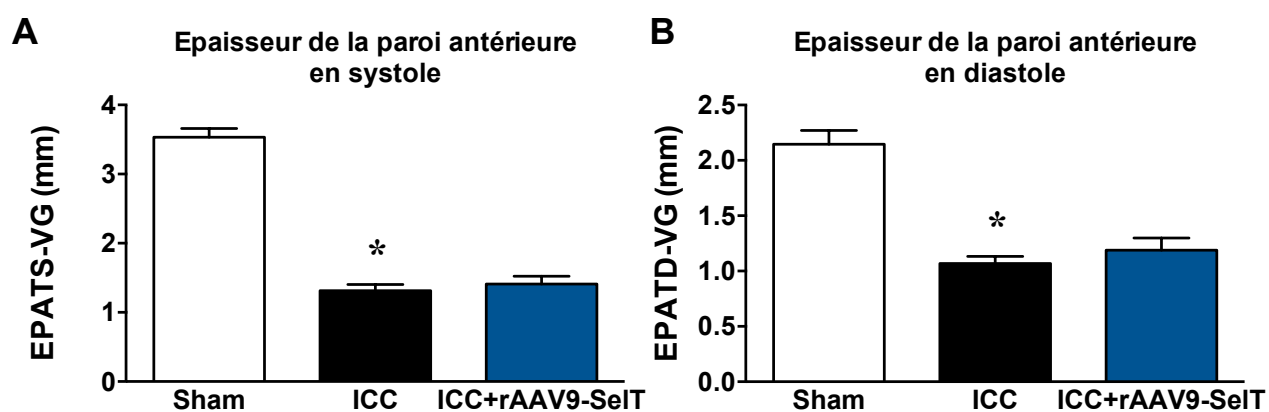


Figure 35 : Effets d'un traitement par un rAAV9-SelT sur l'épaisseur de la paroi antérieure du VG dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar

*Les épaisseurs de la paroi antérieure du ventricule gauche en télé-systole « EPATS-VG » (A) et en télé-diastole « EPATD-VG » (B) ont été mesurées par échocardiographie après 90 jours de protocole. * $p < 0,05$, vs Sham.*

Nous avons ainsi pu montrer un amincissement de la paroi antérieure du VG, à la fois en systole et en diastole, en comparaison des rats contrôles n'ayant pas subis de ligature coronaire. De plus, la thérapie génique par la SelT, moyennant l'utilisation d'un rAAV9, ne modifie pas les épaisseurs de la paroi antérieure en systole et en diastole (Figure 35).

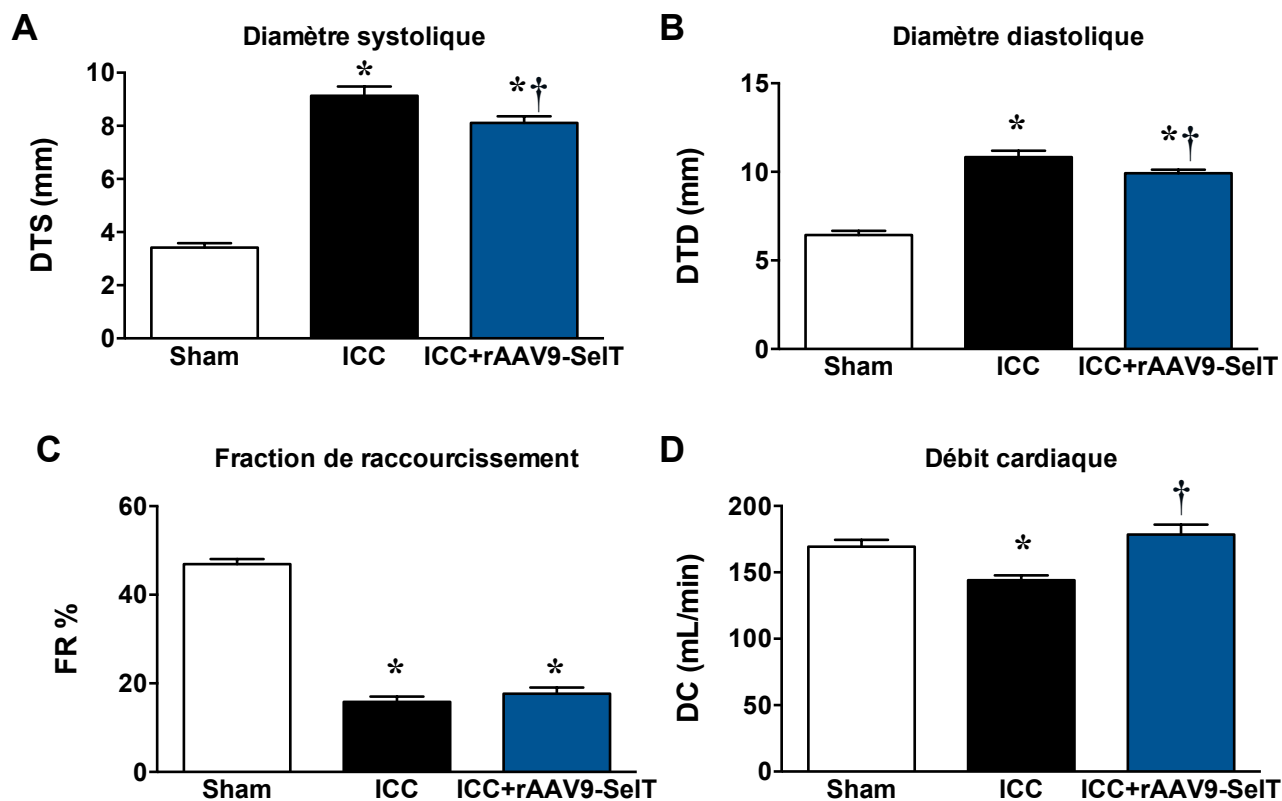


Figure 36 : Effets d'un traitement par un rAAV9-SeIT sur la fonction cardiaque dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar.

Les diamètres télé-systolique « DTS » (A), télé-diastolique « DTD » (B), la fraction de raccourcissement « FR » (C) et le débit cardiaque « DC » (D) ont été mesurés par échocardiographie au 90^e jour de protocole. * $p < 0,05$, vs Sham ; † $p < 0,05$, vs ICC.

D'autre part, la dilatation ventriculaire gauche et l'effondrement du DC classiquement observés chez les rats insuffisants cardiaques sont significativement améliorés par le traitement par un rAAV9-SeIT. Néanmoins, le rAAV9-SeIT, administré 8 jours post-LC, n'améliore pas la fraction de raccourcissement cardiaque (Figure 36).

c. Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV8

Nous avons également évalué la fonction cardiaque par échocardiographies dans le modèle d'insuffisance cardiaque traitée par un rAAV8 codant soit pour une forme normale de SelT soit pour une forme modifiée, dans laquelle l'acide aminé sélénocystéine a été modifié par une alanine.

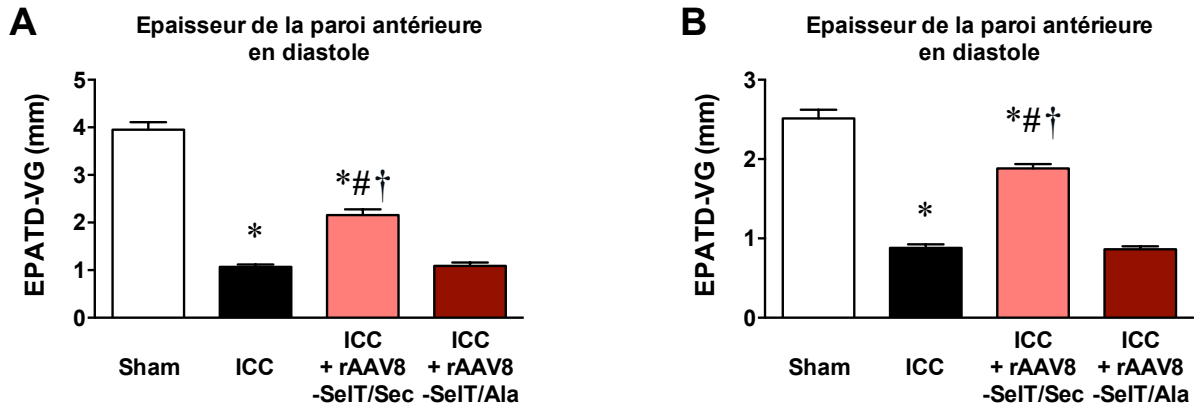


Figure 37 : Effets d'un traitement par un rAAV8-SelT sur l'épaisseur de la paroi antérieure du VG dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar

Les épaisseurs de la paroi antérieure du ventricule gauche en télé-systole « EPATS-VG » (A) et en télé-diastole « EPATD-VG » (B) ont été mesurées par échocardiographie après 90 jours de protocole. * $p < 0,05$, vs Sham ; † $p < 0,05$, vs ICC ; # $p < 0,05$, vs ICC+rAAV8-SelT^{Ala}.

Nous avons également pu montrer un amincissement de la paroi antérieure du VG, à la fois en systole et en diastole, en comparaison des rats contrôles n'ayant pas subis de ligature coronaire (Figure 37). De plus, la thérapie génique par la SelT, moyennant l'utilisation d'un rAAV9-SelT^{Sec}, permet une augmentation de l'épaisseur de la paroi antérieure, à la fois en systole et en diastole. Le traitement par la forme modifiée de la SelT, à savoir par le rAAV8-SelT^{Ala} ne modifie pas les épaisseurs de la paroi antérieure.

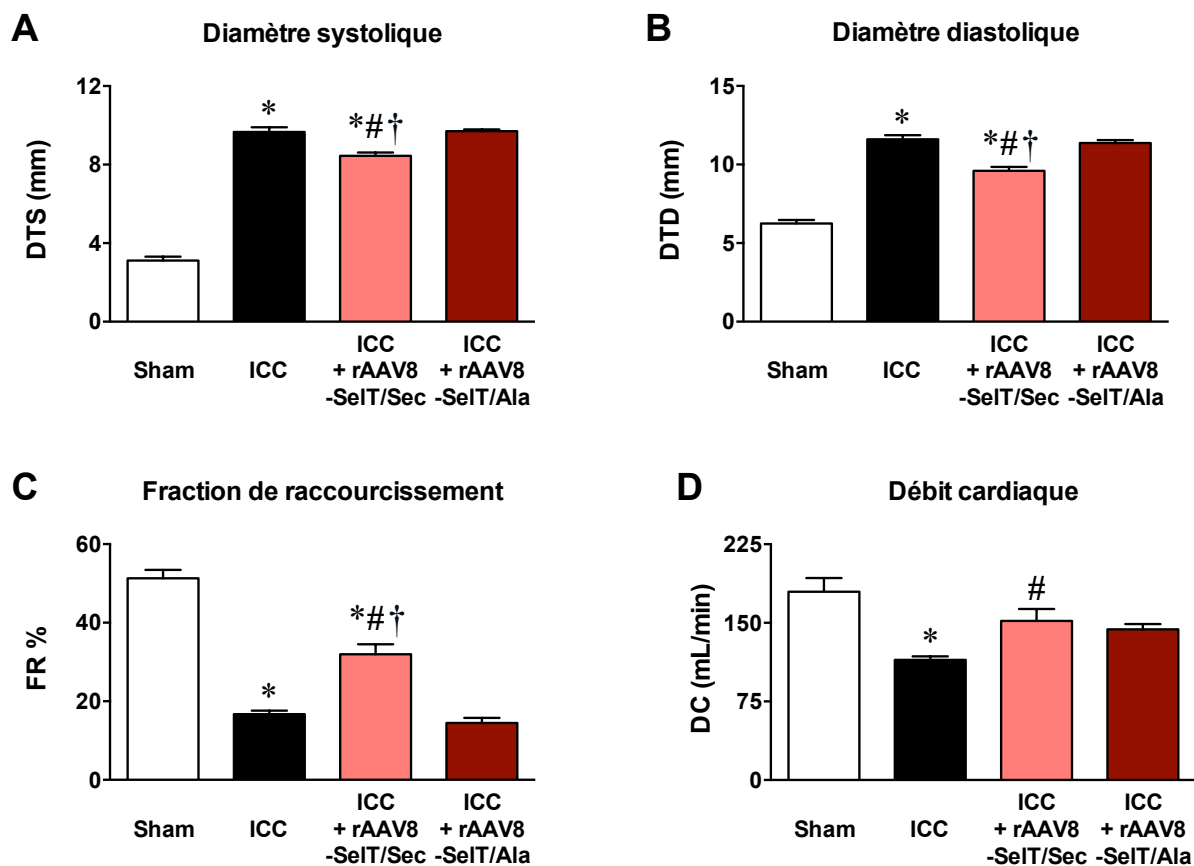


Figure 38 : Effets d'un traitement par un rAAV8-SeIT sur la fonction cardiaque dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar.

Les diamètres télé-systolique « DTS » (A), télé-diastolique « DTD » (B), la fraction de raccourcissement « FR » (C) et le débit cardiaque « DC » (D) ont été mesurés par échocardiographie au 90^e jour de protocole. * $p < 0,05$, vs Sham ; † $p < 0,05$, vs ICC ; # $p < 0,05$, vs ICC+rAAV8-SeIT^{Ala}.

D'autre part, le traitement par un rAAV8-SeIT^{Sec} diminue la dilatation du ventricule gauche à la fois en systole et en diastole (Figure 38 A-B). De plus, ce vecteur permet d'améliorer significativement la fraction de raccourcissement ainsi que le débit cardiaque qui sont classiquement altérés dans l'insuffisance cardiaque (Figure 38 C). En revanche, le vecteur rAAV8-SeIT^{Ala} ne modifie pas la dilatation ventriculaire gauche ainsi que la fraction de raccourcissement et le débit cardiaque en comparaison des rats contrôles insuffisants cardiaques non traités (Figure 38 D).

2. Evaluations hémodynamiques

a. Modèle de thérapie protéique par la SelT

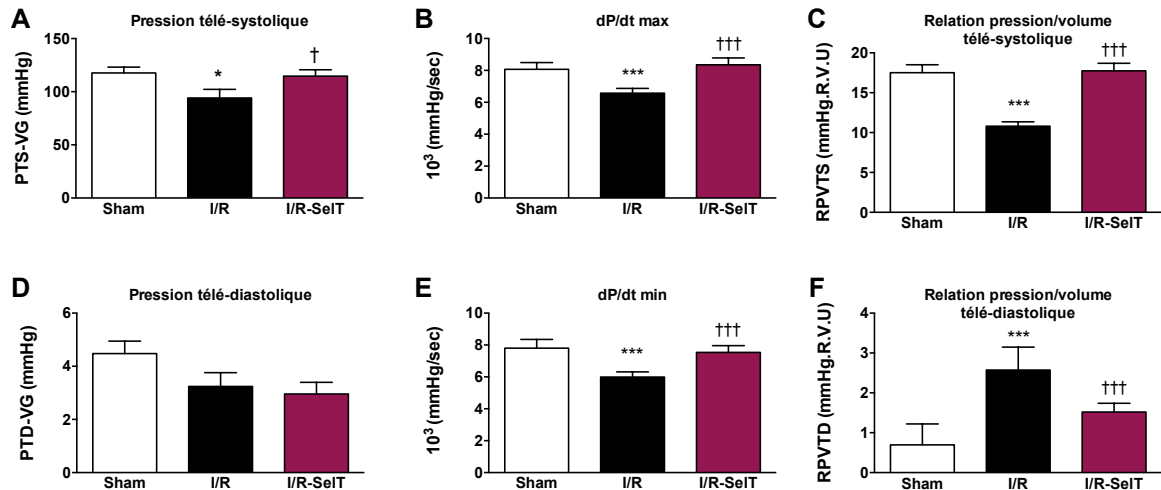


Figure 39 : Effets d'une thérapie protéique par la SelT sur l'hémodynamique cardiaque dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar.

Les paramètres de la fonction systolique (pression télé-systolique « PTS-VG » (A), dérivée de la pression en fonction du temps « dP/dt max » (B) et la relation pression volume en fin de systole « RPVTS » (C)), ainsi que les paramètres de la fonction diastolique (pression télé-diastolique « PTD-VG » (D), dérivée de la pression en fonction du temps « dP/dt min » (E) et la relation pression volume en fin de diastole « RPVTD » (F)) ont été mesurés par cathétérisme cardiaque chez le rat Wistar au 28^e jour de protocole. * $p < 0,05$, vs Sham ; † $p < 0,05$, vs I/R.

Au terme des 28 jours du protocole expérimental, les rats Wistar ont été soumis à des évaluations de l'hémodynamique cardiaque. Nous avons pu montrer que l'I/R entraîne une altération de la fonction systolique et diastolique du VG. En effet, au niveau systolique, la pression télé-systolique (PTS-VG), la dérivée de pression en fonction du temps (dP/dt max), ainsi que l'élastance cardiaque, représentée par la pente de la relation pression/volume télé-systolique (RPVTS-VG) sont diminuées (Figure 39 A-C). Au niveau diastolique, l'I/R provoque une augmentation significative de la pression télé-diastolique et de la relation pression/volume télé-diastolique, ainsi qu'une diminution de la dérivée de pression en fonction du temps (dP/dt min) par rapports aux animaux contrôles.

Nous avons également pu montrer que les animaux traités par la SelT par minipompes osmotiques voient leur fonction systolique améliorée, notamment grâce à une augmentation de la pression télé-systolique, de la dP/dt max, ainsi qu'une amélioration de l'élastance cardiaque, représentée par une augmentation de la relation pression/volume en fin de systole. De plus, la fonction diastolique de ces animaux est significativement améliorée dès lors que la dP/dt min ainsi que la compliance cardiaque, représentée par la relation pression/volume en fin de diastole sont améliorées (Figure 39 D-F).

b. Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV9

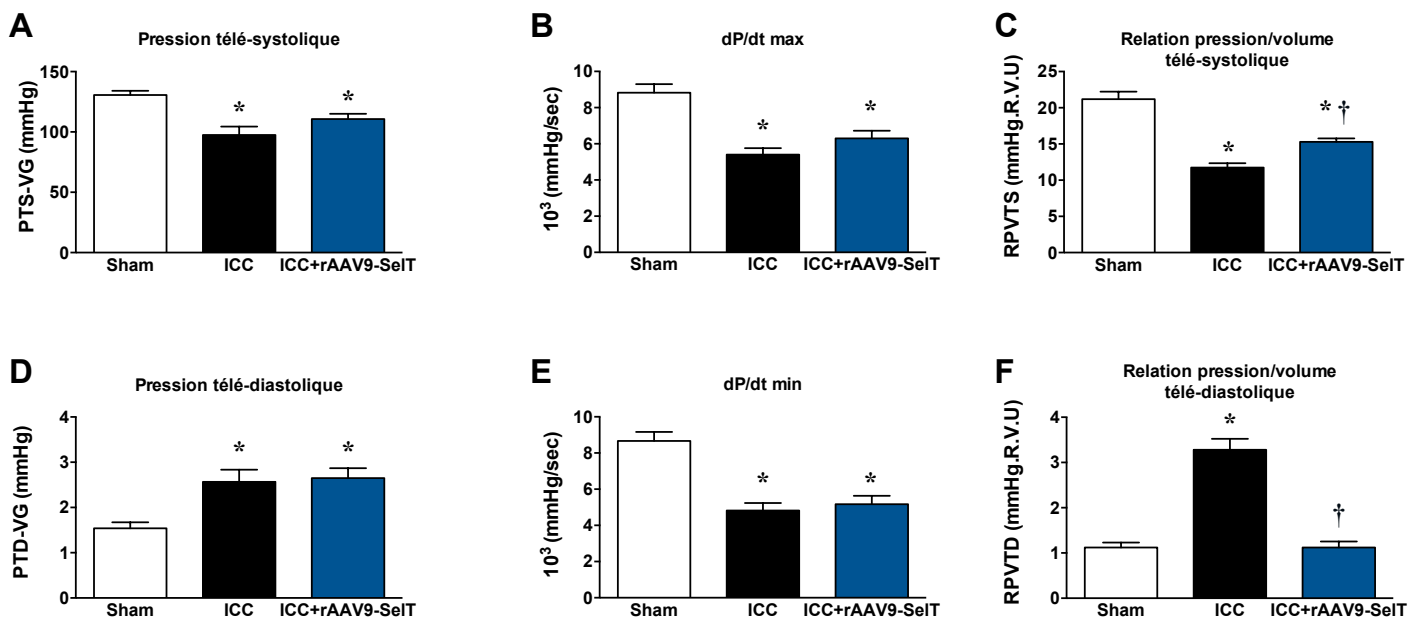


Figure 40 : Effets d'un traitement par rAAV9-SelT sur l'hémodynamique cardiaque dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar.

Les paramètres de la fonction systolique (pression télé-systolique « PTS-VG » (A), dérivée de la pression en fonction du temps « dP/dt max » (B) et la relation pression volume en fin de systole « RPVTS » (C)), ainsi que les paramètres de la fonction diastolique (pression télé-diastolique « PTD-VG » (D), dérivée de la pression en fonction du temps « dP/dt min » (E) et la relation pression volume en fin de diastole « RPVTD » (F)) ont été mesurés par cathétérisme cardiaque chez le rat Wistar au 90^e jour de protocole. *p<0,05, vs Sham ; † p<0,05, vs ICC.

Dans le cadre des études de thérapie génique, les évaluations hémodynamiques cardiaques ont été réalisées au terme du protocole expérimental, c'est-à-dire au 90^{ème} jour.

Ces évaluations nous ont permis de démontrer que l'ICC est responsable d'une altération des fonctions systoliques et diastoliques du VG. En effet, cette dernière entraîne une franche diminution de la PTS, de la dP/dt max ainsi que de l'élastance cardiaque. Au niveau diastolique, l'ICC est responsable d'une augmentation de la PTD et de la compliance cardiaque, mais également d'une diminution de la dP/dt min.

La thérapie génique par la SelT, moyennant l'utilisation d'un rAAV9 permet d'améliorer significativement l'élastance et la compliance cardiaque. En revanche, elle ne modifie pas les autres paramètres hémodynamiques en comparaison des animaux contrôles ICC (Figure 40).

c. Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV8

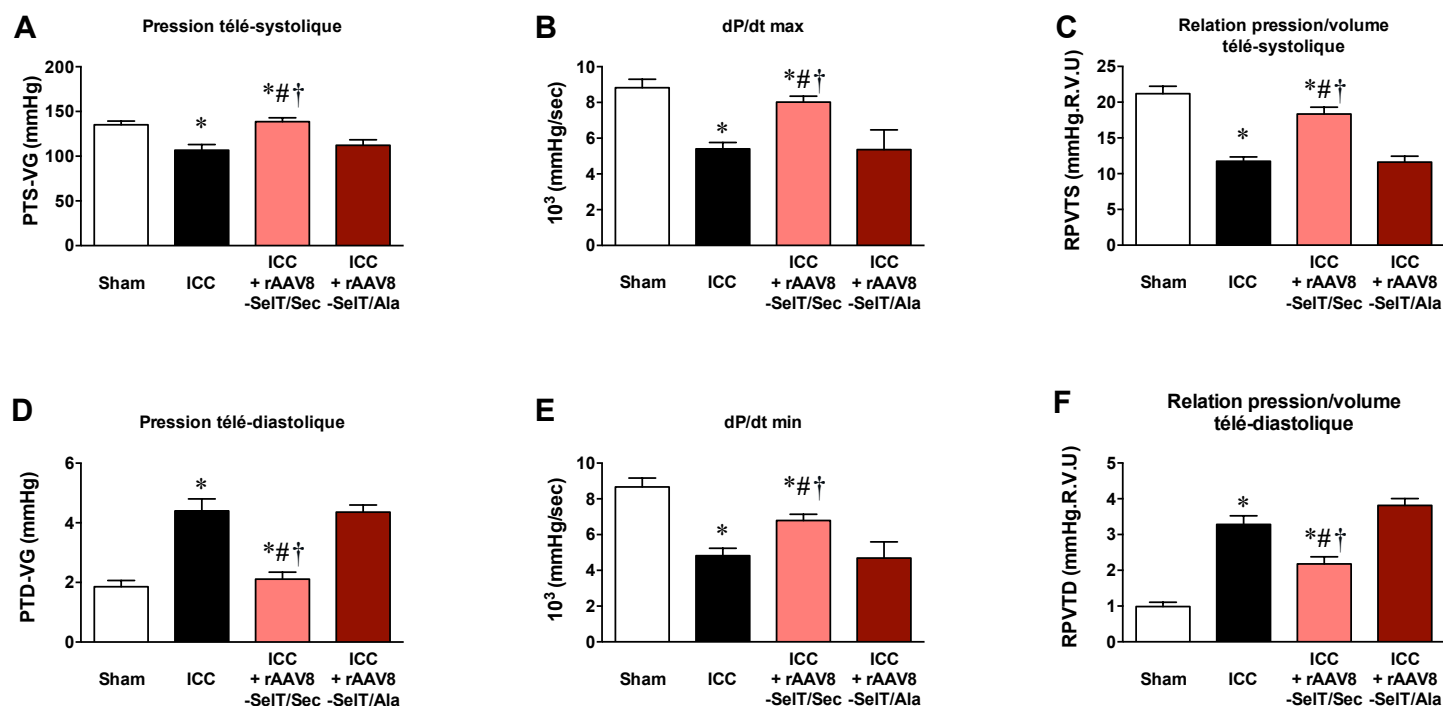


Figure 41 : Effets d'un traitement par rAAV8-SelT sur l'hémodynamique cardiaque dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar.

Les paramètres de la fonction systolique (pression télé-systolique « PTS-VG » (A), dérivée de la pression en fonction du temps « dP/dt max » (B) et la relation pression volume en fin de systole « RPVTS » (C)), ainsi que les paramètres de la fonction diastolique (pression télé-diastolique « PTD-VG » (D), dérivée de la pression en fonction du temps « dP/dt min » (E) et la relation pression volume en fin de diastole « RPVTD » (F)) ont été mesurés par cathétérisme cardiaque chez le rat Wistar au 90^e jour de protocole. * p<0,05, vs Sham ; † p<0,05, vs ICC ; # p<0,05, vs ICC+rAAV8-SelT^{Ala}.

De la même manière que dans l'étude précédente, l'évaluation hémodynamique cardiaque a été réalisée au 90^{ème} jour du protocole expérimental.

Nous avons ainsi mis en évidence des modifications semblables des paramètres systoliques et diastoliques chez les animaux ICC non traités.

De plus, le traitement par un rAAV8-SelT^{Sec}, codant pour la forme normale de la protéine, permet une quasi restauration des paramètres systoliques. On observe ainsi une augmentation

significative de la PTS, de la dP/dt max ainsi que de l'élastance du VG. Au niveau diastolique, le rAAV8-SelT^{Sec} permet de diminuer significativement la PTD et la compliance cardiaque, mais également d'augmenter la dP/dt min (Figure 41).

3. Evaluation de la perfusion myocardique et de la densité capillaire

a. Modèle de thérapie protéique par la SelT

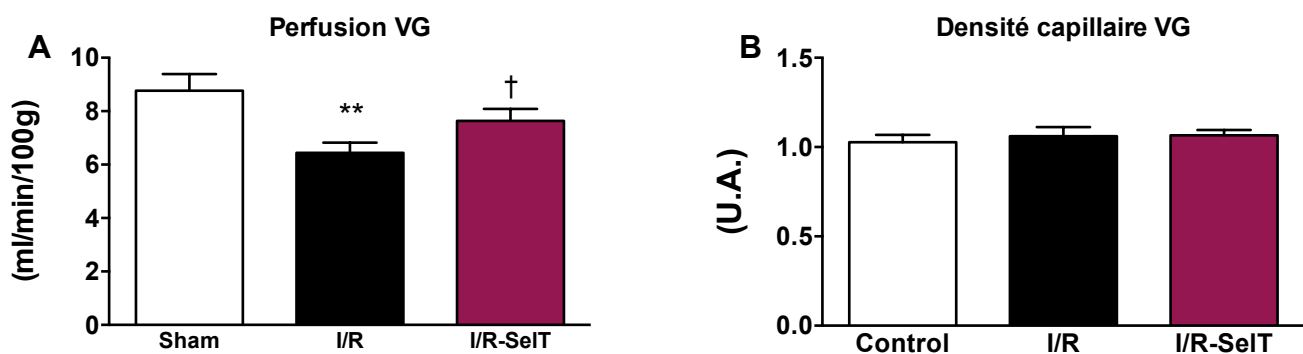


Figure 42 : Effets d'une thérapie protéique par la SelT sur la perfusion cardiaque et la densité capillaire cardiaque dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar

*La perfusion myocardique a été évaluée au terme du protocole expérimental (28 jours) par la technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM). La densité capillaire est calculée comme étant le ratio entre le nombre de vaisseaux capillaires et le nombre de cardiomyocytes sur les images prises au microscope (C). . * $p < 0,05$, vs Sham ; † $p < 0,05$, vs I/R.*

*La perfusion myocardique des rats Wistar a été évaluée au terme du protocole expérimental (90 jours) par la technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM). (n= 8 rats/ groupe). * $p < 0,05$, vs Témoin ; † $p < 0,05$, vs I/R*

Au terme du protocole expérimental, la perfusion myocardique a été appréhendée par IRM par la méthode d'Arterial spin labeling « ASL ». Cette mesure nous a permis de montrer que l'I/R cardiaque est responsable d'une altération de la perfusion cardiaque. En revanche, l'I/R ne modifie

pas la densité capillaire du VG. De plus, le traitement par la SelT permet de corriger la perfusion du VG, sans pour autant modifier la densité capillaire. (Figure 42).

b. Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV9

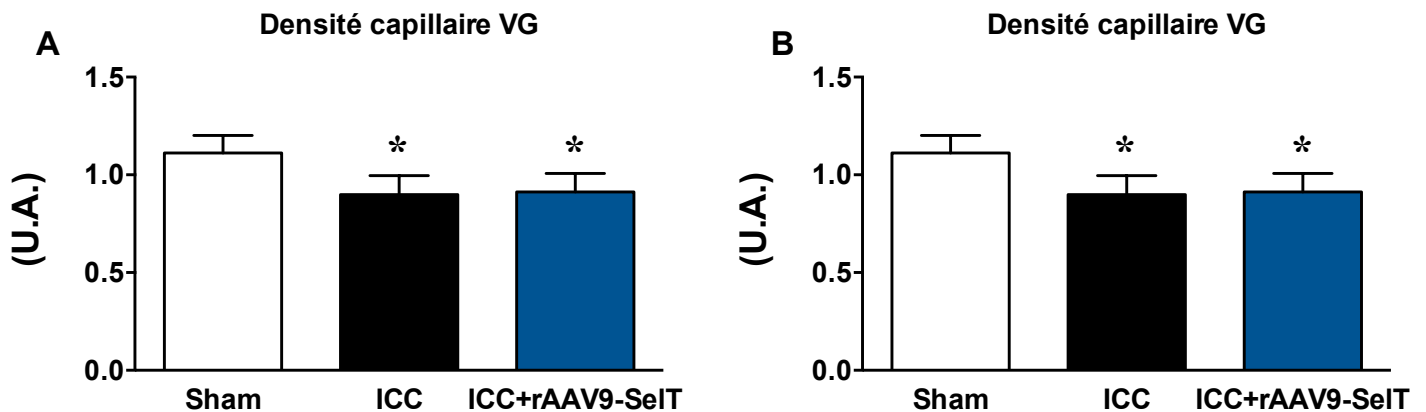


Figure 43 : Effets d'un traitement par rAAV9-SelT sur la perfusion cardiaque et la densité capillaire cardiaque dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar

*La perfusion myocardique a été évaluée au terme du protocole expérimental (28 jours) par la technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM). La densité capillaire est calculée comme étant le ratio entre le nombre de vaisseaux capillaires et le nombre de cardiomyocytes sur les images prises au microscope (C). * $p < 0,05$, vs Sham; † $p < 0,05$, vs ICC.*

Nous avons également évalué la perfusion du VG de la même manière dans les protocoles de thérapie génique. Ainsi, l'analyse IRM a révélé une altération significative de la perfusion ventriculaire gauche chez les animaux ICC au 90^e jour du protocole ainsi qu'une altération de la densité capillaire du VG. Le traitement par un rAAV9-SelT entraîne une amélioration significative de cette perfusion cardiaque sans modifier la densité capillaire (Figure 43).

c. Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV8

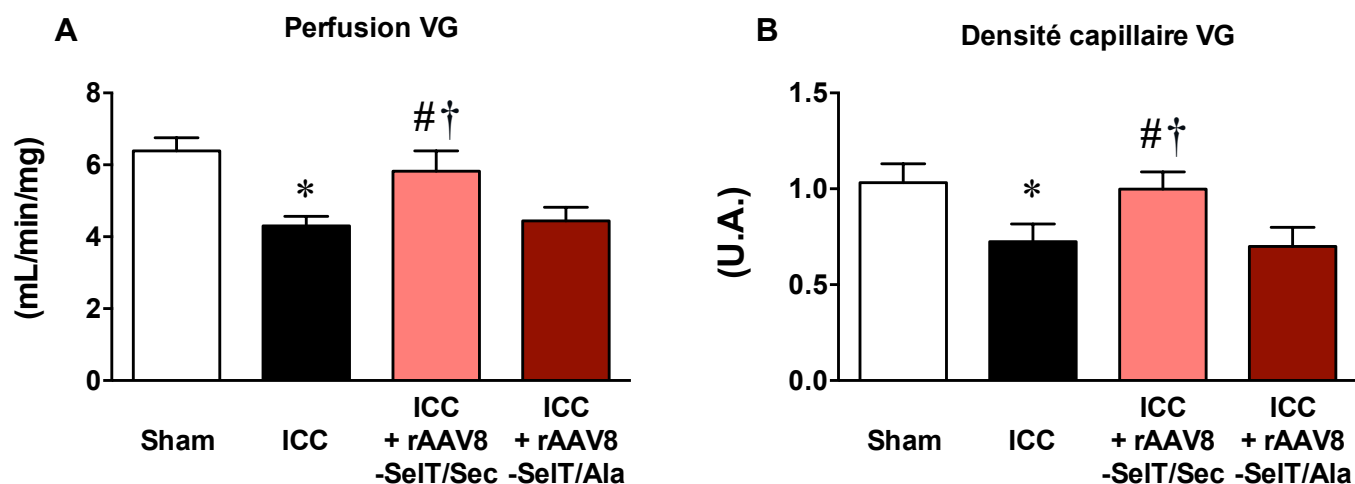


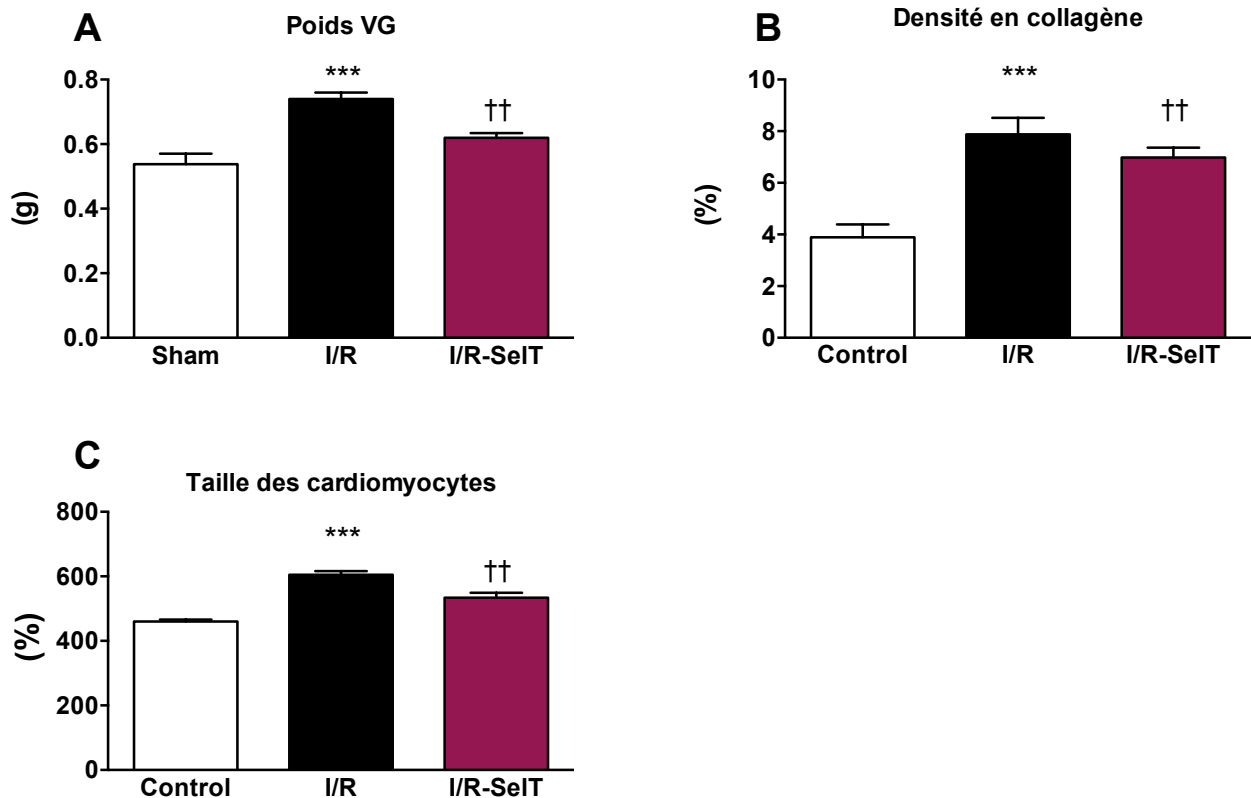
Figure 44 : Effets d'un traitement par rAAV8-SelT sur la perfusion cardiaque et la densité capillaire cardiaque dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar

La perfusion myocardique a été évaluée au terme du protocole expérimental (28 jours) par la technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM). La densité capillaire est calculée comme étant le ratio entre le nombre de vaisseaux capillaires et le nombre de cardiomyocytes sur les images prises au microscope (C). * $p < 0,05$, vs Sham ; † $p < 0,05$, vs ICC ; # $p < 0,05$, vs ICC+rAAV8-SelT^{Ala}.

De même que dans l'étude précédente, l'ICC est responsable d'une diminution similaire de la perfusion du VG. Le traitement par le rAAV8-SelT^{Sec} permet une amélioration significative de la perfusion cardiaque et de la densité capillaire, en les restaurant à des valeurs similaires aux témoins (Figure 44). De plus, le traitement par le rAAV8-SelT^{Ala} ne modifie ni la perfusion VG ni la densité capillaire en comparaison des animaux ICC non traités.

II. Evaluations de la morphologie cardiaque

1. Evaluation de l'hypertrophie et de la fibrose



a. Modèle de thérapie protéique par la SeIT

Figure 45 : Effets d'une thérapie protéique par la SeIT sur l'hypertrophie cardiaque, la fibrose cardiaque et l'hypertrophie des cardiomyocytes dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar

L'hypertrophie cardiaque (A) a été évaluée par pesée des ventricules gauches au terme du protocole. La densité en collagène (B) a été mesurée histologiquement par coloration au rouge Sirius. Enfin, la taille des cardiomyocytes (C) est mesurée sur coupes histologiques après immuno-marquage au WGA. * $p < 0,05$, vs Sham ; † $p < 0,05$, vs I/R.

Afin d'investiguer le rôle délétère l'I/R ainsi que les impacts des traitements par la SeIT sur la morphologie cardiaque, l'évaluation de la fibrose et de l'hypertrophie cardiaque ont été investiguées sur les cœurs provenant des différents groupes.

Ainsi, la pesée des ventricules gauches a révélé une augmentation significative du poids de ces derniers chez les rats I/R par rapport aux rats contrôles (Figure 45 A). Cette hypertrophie ventriculaire est également corrélée à une augmentation de la densité de collagène au niveau interstitiel (Figure 45 B). De plus, le traitement par la SelT, débutant à 7 jours post I/R, réduit significativement le poids des VG et la fibrose cardiaque (7.97 ± 0.65 vs 6.89 ± 0.59 %, I/R-SelT vs I/R).

Par ailleurs, nous avons pu montrer que l'I/R entraînait une augmentation de la taille des cardiomyocytes et que la thérapie protéique par la SelT permettait de corriger cette hypertrophie (Figure 45 C).

b. Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV9

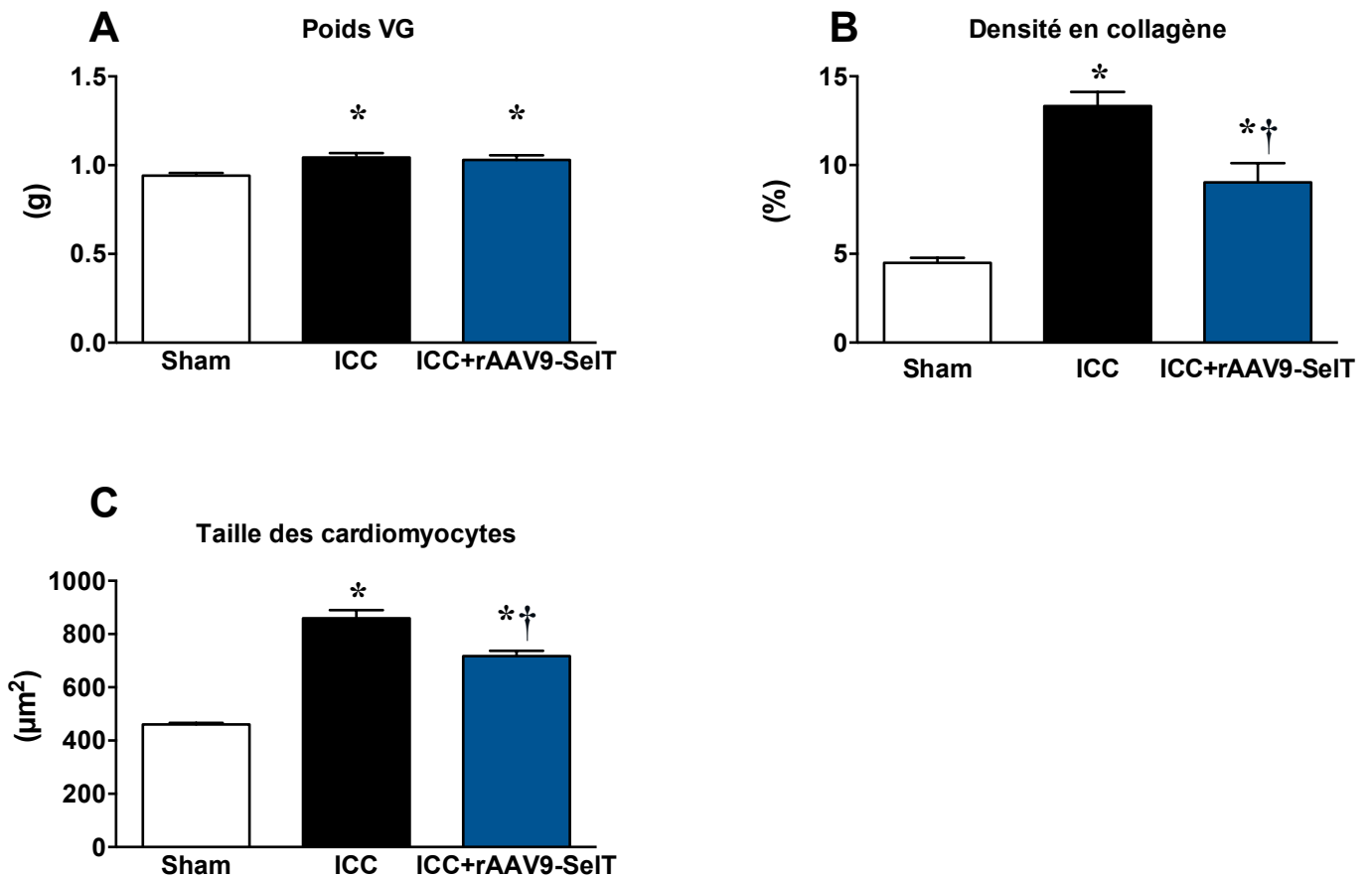


Figure 46 : Effets d'un traitement par rAAV9-SeIT sur l'hypertrophie cardiaque, la fibrose cardiaque et l'hypertrophie des cardiomyocytes dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar

L'hypertrophie cardiaque (A) a été évaluée par pesée des ventricules gauches au terme du protocole. La densité en collagène (B) a été mesurée histologiquement par coloration au rouge Sirius. Enfin, la taille des cardiomyocytes (C) est mesurée sur coupes histologiques après immuno-marquage au WGA. * $p < 0,05$, vs Sham; † $p < 0,05$, vs ICC.

Nous avons également évalué l'hypertrophie du VG ainsi que la fibrose lors des études de thérapie génique. Ainsi, l'ICC est responsable d'une augmentation significative du poids des VG, de la taille des cardiomyocytes ainsi que d'une augmentation de la densité en collagène.

De plus, le traitement par un rAAV9-SelT ne permet pas de diminuer l'hypertrophie du VG mais permet cependant de prévenir le dépôt de collagène au niveau interstitiel et également l'hypertrophie des cardiomyocytes du VG (Figure 46).

c. Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV8

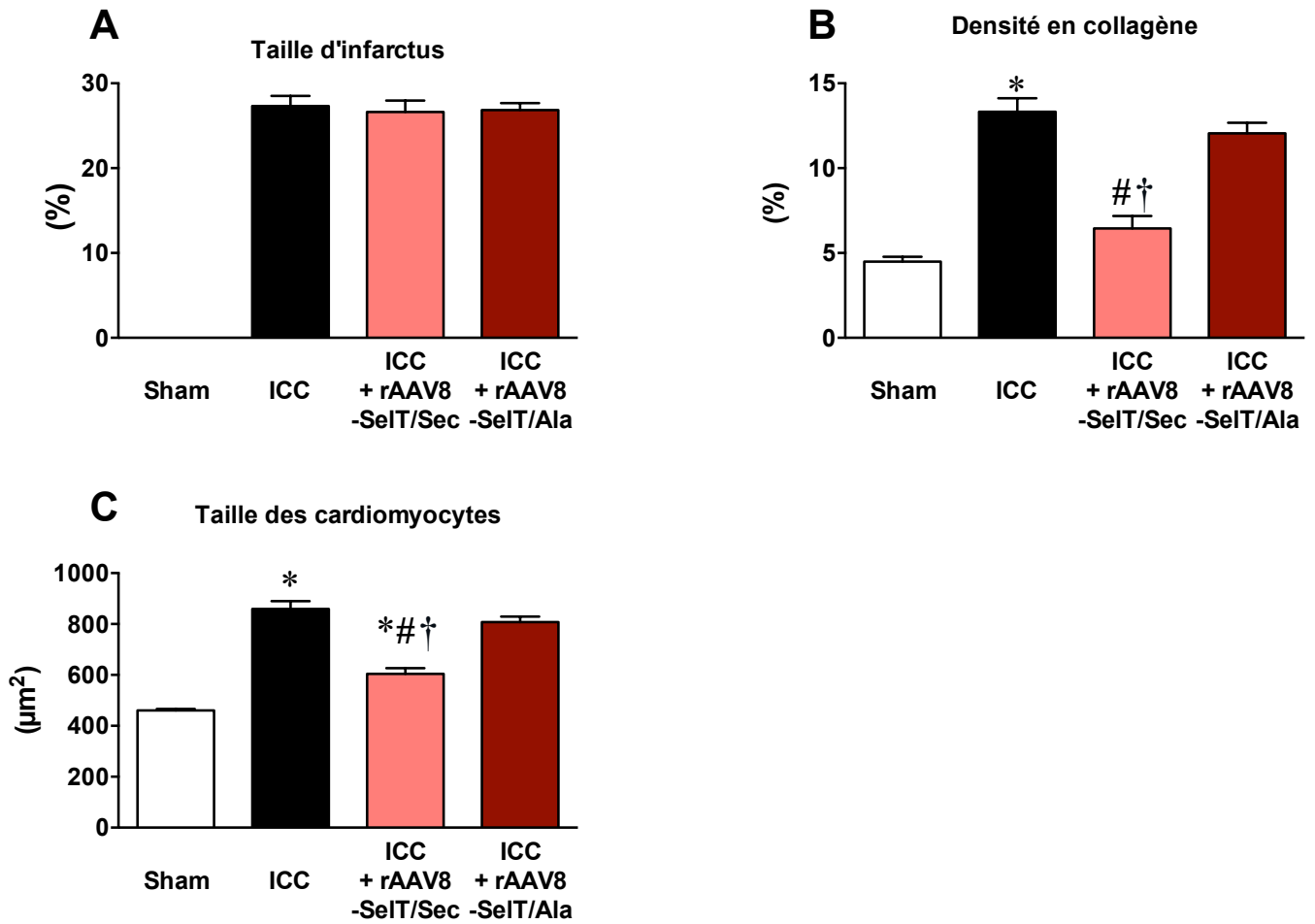


Figure 47 : Effets d'un traitement par rAAV8-SelT sur l'hypertrophie cardiaque, la fibrose cardiaque et l'hypertrophie des cardiomyocytes dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar

L'hypertrophie cardiaque (A) a été évaluée par pesée des ventricules gauches au terme du protocole. La densité en collagène (B) a été mesurée histologiquement par coloration au rouge Sirius. Enfin, la taille des cardiomyocytes (C) est mesurée sur coupes histologiques après immuno-marquage au WGA. * $p < 0,05$, vs Sham ; † $p < 0,05$, vs ICC ; # $p < 0,05$, vs ICC+rAAV8-SelT^{Ala}.

Lors de cette seconde étude de thérapie génique, nous avons pu montrer que l'ICC était également responsable d'une augmentation du poids des VG, de la taille des cardiomyocytes et de la densité en collagène. L'utilisation d'un rAAV8-SelT^{Sec} permet de restaurer les poids du VG, la taille des cardiomyocytes et la densité en collagène à des niveaux quasi similaires à ceux observés chez les animaux contrôles Sham. En revanche, le traitement par un rAAV8-SelT^{Ala} ne modifie ni le poids du VG, ni la taille des cardiomyocytes, ni la densité en collagène en comparaison des animaux contrôles ICC (Figure 47).

2. Evaluation de la taille d'infarctus

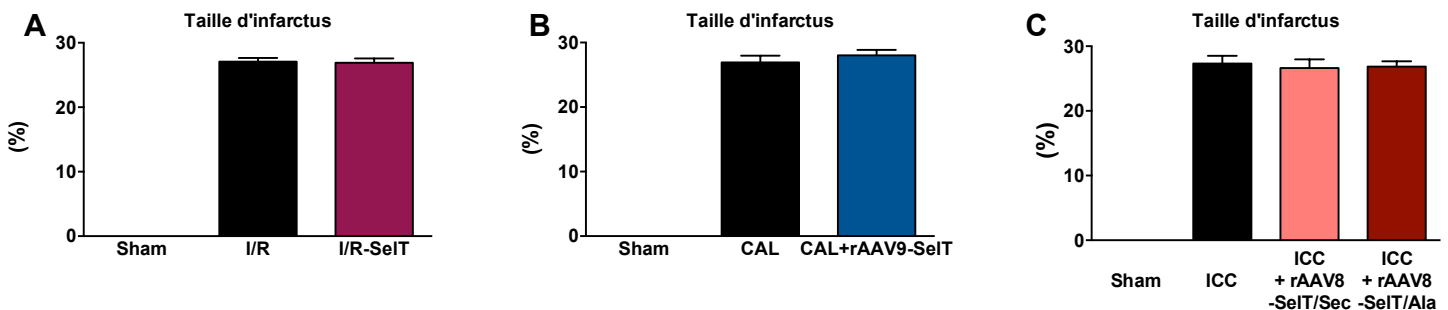


Figure 48 : Effets des différents traitements utilisés sur la taille d'infarctus

La taille d'infarctus a été mesurée chez le rat Wistar au terme des protocoles expérimentaux par coloration au rouge Sirius. * $p < 0,05$, vs Témoin; † $p < 0,05$, vs I/R

Nous avons par ailleurs cherché à évaluer les effets de traitements par la SelT sur la taille d'infarctus. Nous avons pu observer que l'ischémie coronaire entraîne la mise en place d'une zone infarctée de l'ordre de 30% du VG qui se maintient au cours du temps (90 jours). Du fait de l'administration des différents traitements 7 jours après l'ischémie coronaire, nous nous sommes affranchis des phases précoces de remodelage et de cicatrisation de l'infarctus. Ainsi, nos résultats démontrent sans surprise que la thérapie protéique par la SelT, la thérapie génique moyennant l'utilisation d'un rAAV9, mais également moyennant l'utilisation d'un rAAV8-SelT n'influent pas sur la taille d'infarctus. (Figure 48).

III. Evaluation de la fonction vasculaire

1. Modèle de thérapie protéique par la SelT

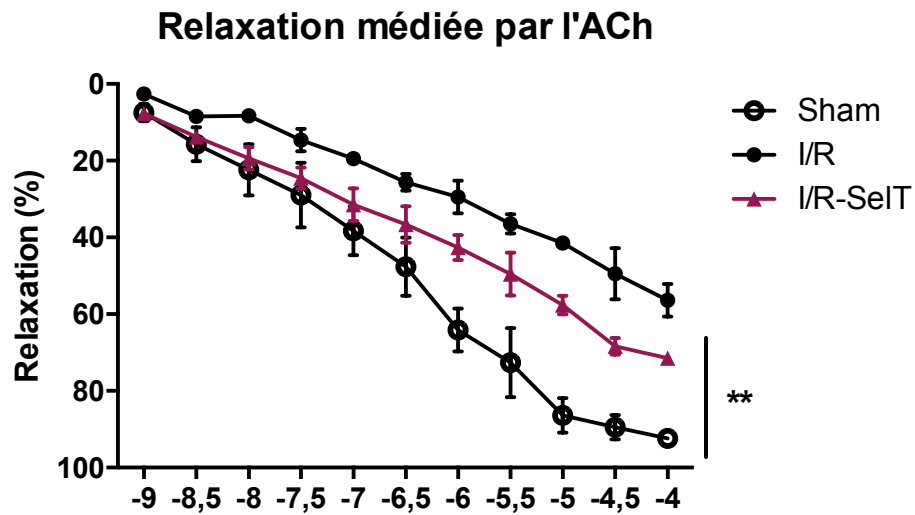


Figure 49 : Effets d'une thérapie protéique par la SelT sur la fonction vasculaire coronaire dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar

L'évaluation de la fonction vasculaire, a été réalisée à l'aide du myographe de Mulvany sur les artères coronaires septales isolées de rats provenant des différents groupes. Cette mesure consiste à évaluer la réactivité vasculaire par la mesure de la relaxation NO-dépendante des artères coronaires en réponse à des concentrations croissantes d'ACh (10^{-9} à 3.10^{-5} M) et ceci après pré-constriction par la 5-HT.

Nous avons pu constater que l'I/R entraîne une diminution significative de la capacité de relaxation des artères coronaires. De plus, la thérapie protéique par la SelT, initiée 7 jours après l'I/R et poursuivie pendant 28 jours améliore significativement la relaxation coronaire (Figure 49).

2. Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV9

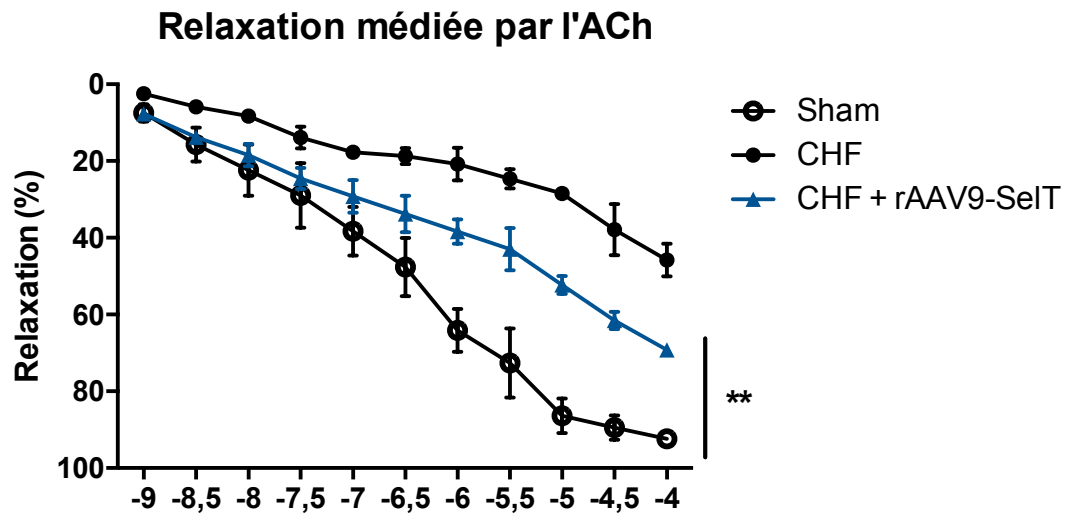


Figure 50 : Effets d'un traitement par rAAV9-SeIT sur la fonction vasculaire coronaire dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar

L'évaluation de la réactivité vasculaire des artères coronaires septales a été également réalisée dans l'étude de thérapie génique par traitement par un rAAV9-SeIT. Cette étude fonctionnelle sur artère isolée a révélé la présence d'une importante dysfonction coronaire chez les rats ICC. De plus, le traitement par le rAAV9-SeIT améliore significativement la relaxation coronaire médiée par l'acétylcholine (Figure 50).

3. Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV8

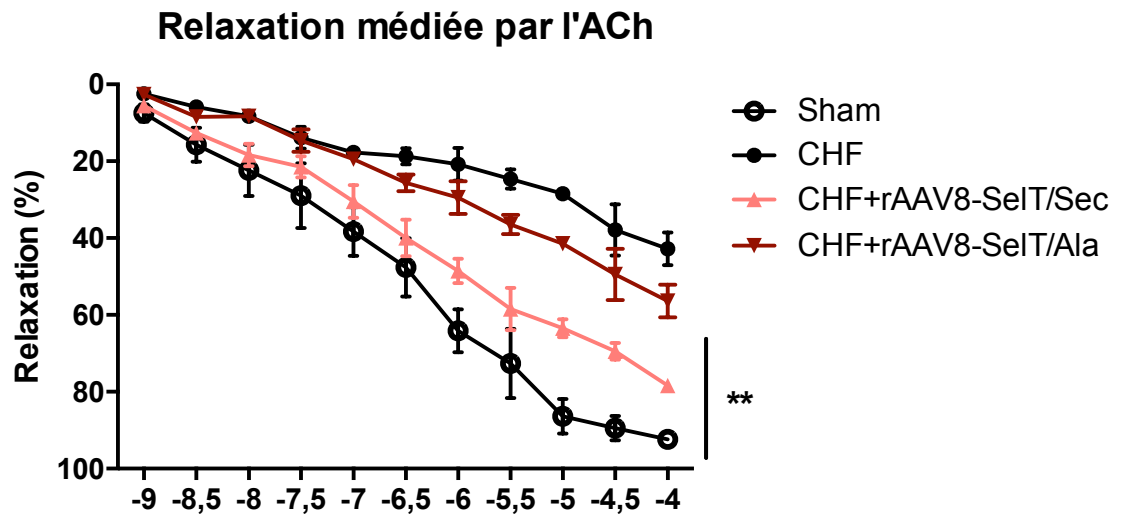


Figure 51 : Effets d'un traitement par rAAV8-SelT sur la fonction vasculaire coronaire dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar

Ces mesures ont également été réalisées dans l'étude de thérapie génique par traitement par un rAAV8-SelT. Nous avons pu montrer que le rAAV8-SelT^{Sec} permettait d'améliorer significativement, à des niveaux quasi comparables à ceux observés chez les contrôles Sham, la relaxation coronaire médiée par l'acétylcholine. En revanche, le rAAV8-SelT^{Ala} ne modifie pas la relaxation coronaire par rapports aux rats contrôles ICC (Figure 51).

IV. Evaluation du remodelage cardiaque

1. Mesure du stress oxydant cardiaque

a. Modèle de thérapie protéique par la SeIT

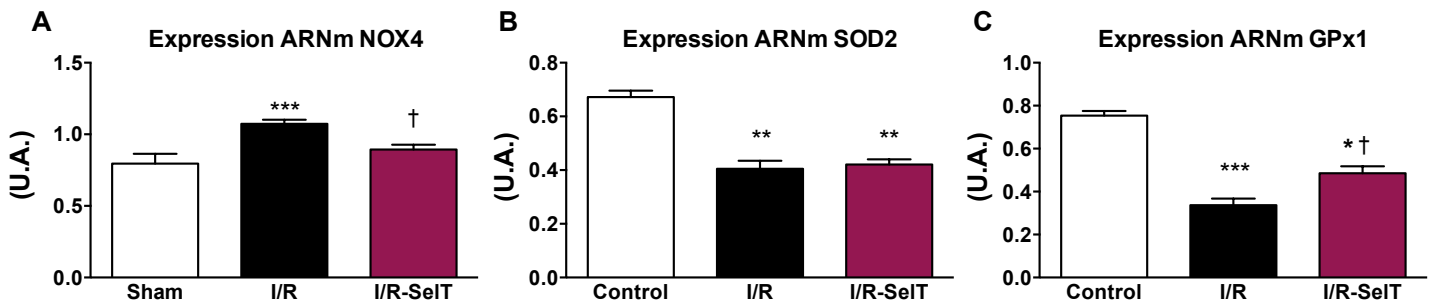


Figure 52 : Effets d'une thérapie protéique par la SeIT sur les taux d'ARNm de différentes molécules impliquées dans le stress oxydatif dans un modèle d'I/R chez le rat Wistar

D'autre part, du fait du rôle antioxydant de la SeIT dans d'autres contextes physiopathologiques, nous avons cherché à évaluer ses effets dans le remodelage VG consécutif à une I/R cardiaque. Nous avons ainsi pu montrer que l'I/R était responsable d'une augmentation de l'expression de la NOX4, molécule pro-oxydante, mais également d'une diminution de molécules antioxydantes telles que la SOD2 et la GPx1. De plus, nous avons démontré que la thérapie protéique par la SeIT permettait une diminution significative des taux d'ARNm de la NOX4 et une augmentation significative des taux d'ARNm de la GPx1, sans pour autant modifier les taux de SOD2 (Figure 52).

b. Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV9

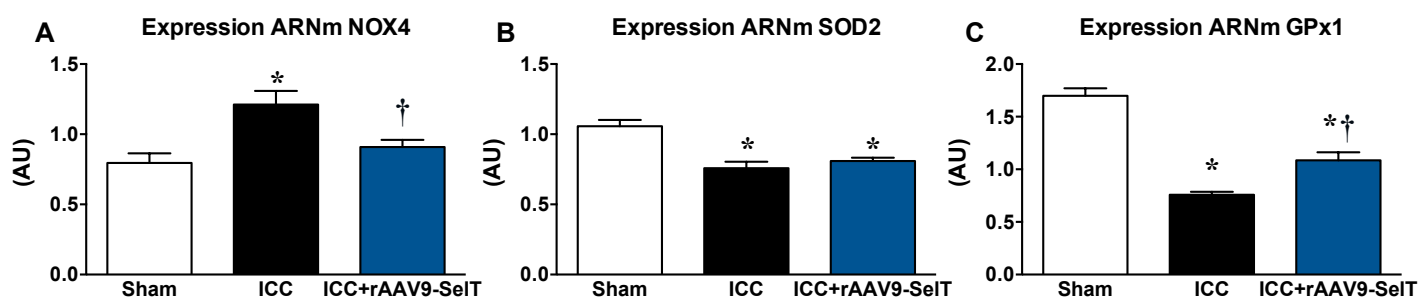
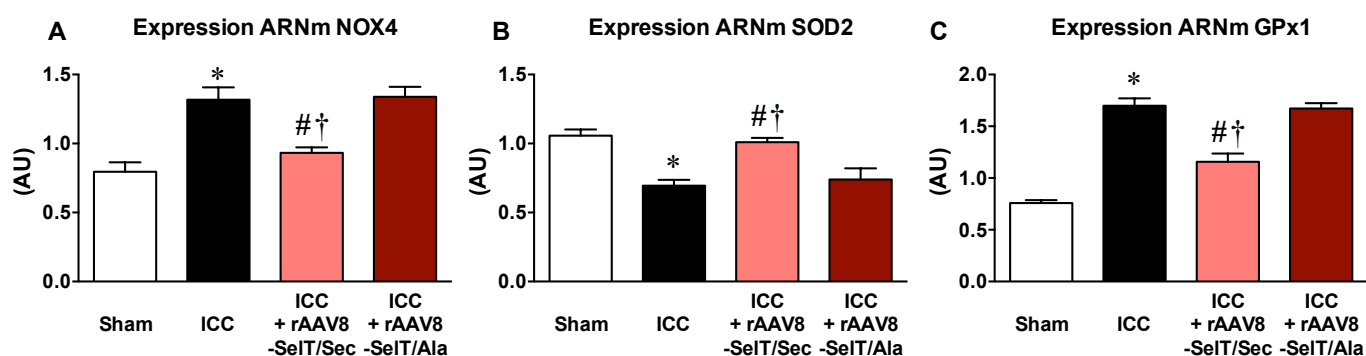


Figure 53 : Effets d'un traitement par rAAV9 sur les taux d'ARNm de différentes molécules impliquées dans le stress oxydatif dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar

Nous avons également mesuré les taux d'expression des mêmes molécules impliquées dans la balance rédox dans nos études de thérapie génique. Nous avons ainsi pu montrer que l'ICC était responsable d'un stress oxydatif cardiaque, représenté par une augmentation significative de molécules pro-oxydantes telles que la NOX4, et par une diminution significative des taux de molécules antioxydantes telles que la SOD2 et la GPx1. De plus, la thérapie génique par la SeIT, moyennant l'utilisation d'un rAAV9-SeIT permet de contrebalancer les modifications d'expression de la NOX4 et de la GPx1 mais ne modifie pas les taux de SOD2 en comparaison des animaux ICC non traités (Figure 53).

c. Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV8



[Figure 54 : Effets d'un traitement par rAAV8-SelT sur les taux d'ARNm de différentes molécules impliquées dans le stress oxydatif dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar](#)

Dans cette dernière étude de thérapie génique, nous avons montré que l'ICC était responsable de modification similaires des profils d'expression géniques de NOX4, SOD2 et GPx1. Le traitement des animaux ICC par le rAAV8-SelT^{Sec} permet de rétablir les taux d'expression de ces trois gènes à des taux quasi similaires à ceux observés chez les animaux Sham. De plus, le traitement par l'AAV modifié rAAV8-SelT^{Ala} ne modifie pas l'expression de ces gènes en comparaison des animaux contrôles ICC (Figure 54).

2. Evaluations des propriétés contractiles des cardiomyocytes

Dans le but d'évaluer l'implication de la SelT dans la contractilité des cardiomyocytes, nous avons réalisé différentes expérimentations en collaboration avec le laboratoire Inserm U955 et plus particulièrement le Dr. A. de Tassigny. Nous avons ainsi évalué l'impact de nos thérapies géniques par la SelT sur la contraction des cardiomyocytes ainsi que la vitesse de contraction/relaxation de ces derniers.

a. Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV9

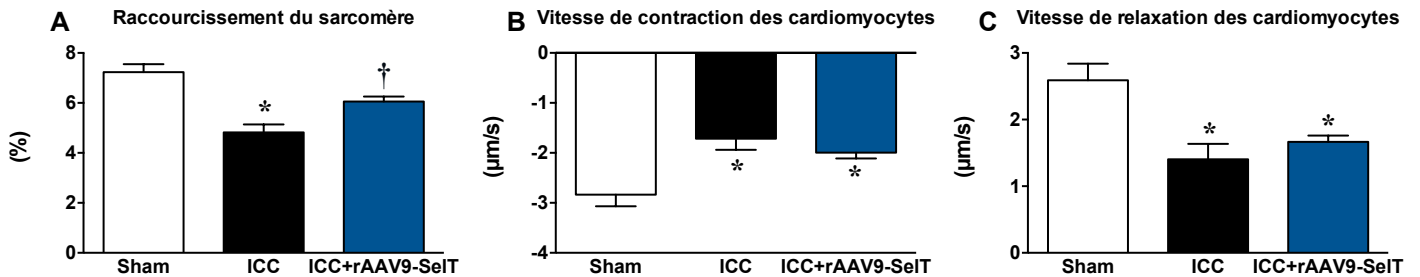


Figure 55 : Effets d'un traitement par rAAV9-SeIT sur différents paramètres d'évaluation des propriétés contractiles des cardiomyocytes dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar

Tout d'abord, nous avons pu montrer que l'ICC est à l'origine d'une diminution de pourcentage de raccourcissement des sarcomères. De plus, l'ICC entraîne également une diminution des vitesses de contraction et de relaxation des cardiomyocytes. Le traitement par le rAAV9-SeIT permet d'améliorer le pourcentage de raccourcissement du sarcomère mais ne modifie pas la vitesse de contraction/relaxation des cardiomyocytes (Figure 55).

b. Modèle de thérapie génique par utilisation d'un rAAV8

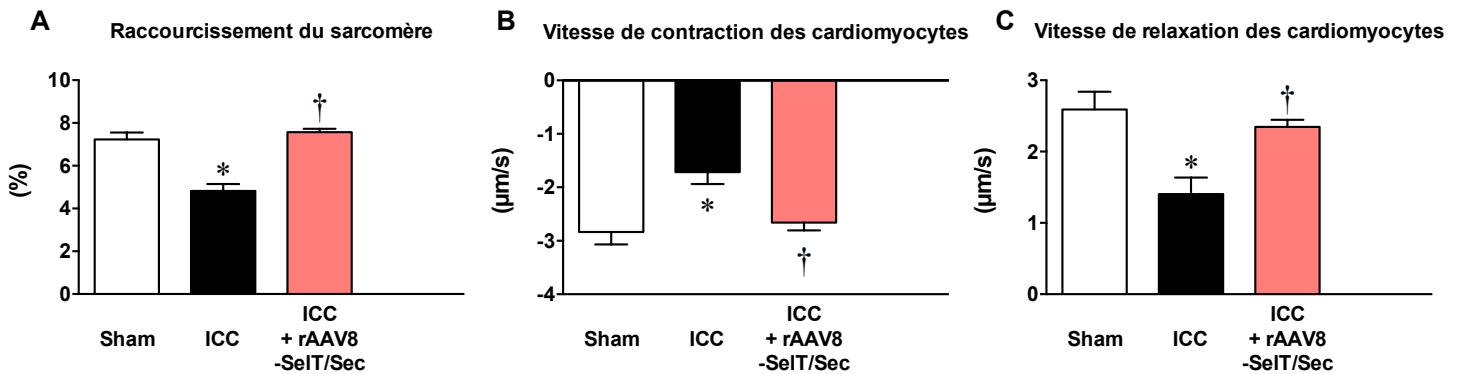


Figure 56 : Effets d'un traitement par rAAV8-SelT sur différents paramètres d'évaluation des propriétés contractiles des cardiomyocytes dans un modèle d'ICC chez le rat Wistar

Dans cette seconde étude, nous avons pu confirmer nos résultats des effets de l'ICC sur les différents paramètres mesurés. De plus, le traitement par le rAAV8-SelT^{Sec} permet un rétablissement du pourcentage de raccourcissement du sarcomère à des niveaux comparables à ceux observés chez les animaux contrôles Sham. Ce traitement permet également d'améliorer significativement les vitesses de contraction mais également de relaxation des cardiomyocytes en comparaison des animaux contrôles ICC (Figure 56).

DISCUSSION

En 1817, le chimiste suédois Jöns Jacob Berzelius découvrit un nouvel élément dans une cuve de sa fabrique d'acide sulfurique, aux caractéristiques proches du tellure et du soufre. Cet élément, baptisé sélénium, fut considéré telle une substance toxique, notamment au niveau cardiovasculaire, et ce, jusqu'à la fin des années 1950, lorsque la caractérisation du 21^{ème} acide aminé, la sélénocystéine, et des sélénoprotéines a bouleversé notre vision du code génétique et de la synthèse des protéines⁴⁰³. Bien que ce pan de la biologie soit en pleine expansion avec notamment la caractérisation de nouvelles sélénoprotéines ou de formes Cys retrouvées dans divers phylums du vivant, certaines d'entre elles restent à ce jour peu connues.

La SelT fut découverte pour la première fois à l'aide du programme bio-informatique SECISearch⁶². Néanmoins il fallut attendre quatre années supplémentaires pour que celle-ci soit identifiée au cours d'un processus cellulaire par les chercheurs de l'Unité Inserm U982, à Rouen. En effet, la SelT fait partie d'un ensemble de gènes dont l'expression est augmentée lors de la différenciation de cellules sympatho-surréaliennes induite par le neuropeptide PACAP⁴⁰⁴. Au sein de cette lignée cellulaire, cette sélénoprotéine jouerait un rôle potentiateur sur la sécrétion hormonale induite par le PACAP, en facilitant la libération du calcium stocké dans le RE¹²⁸. Dès lors, les travaux ont montré que la SelT est fortement exprimée lors de l'embryogénèse chez les rongeurs, notamment au sein du futur système nerveux, puis que son expression décline dès la naissance et n'est retrouvée que de manière résiduelle dans quelques populations cellulaires du SNC^{128,133}. De plus, des travaux récemment publiés ont montré le rôle neuroprotecteur de la SelT et son implication dans les processus comportementaux⁴⁰⁵.

Pour déterminer les fonctions de la SelT, les chercheurs de l'Unité Inserm U982 ont développé un modèle de souris transgénique basé sur la technologie Cre-loxP. Le croisement de souris SelT^{fl/fl}, dans lesquelles des séquences loxP ont été insérées de part et d'autre des exons 2 et 3 du gène de la SelT, avec des souris CMV-Cre, a permis l'invalidation de ce gène dans leur descendance, par l'action de la recombinase Cre dont l'expression est induite par le promoteur du cytomegalovirus humain. Toutefois, ce modèle totalement invalidé pour cette sélénoprotéine n'a pu être exploité, puisqu'il s'est avéré léthal dès les premiers stades développementaux, témoignant pourtant du rôle essentiel de la SelT.

Pour répondre à nos questions sur les fonctions de cette protéine au niveau cardiovasculaire, un second modèle, non détaillé dans ce manuscrit, a été généré pour obtenir une invalidation de la SelT restreinte à l'endothélium, et dont la caractérisation a fait partie de ces travaux de thèse. Nous

avons pu montrer que, dans une lignée de souris déficientes en SelT endothéliale (appelées Tie2-SelT^{-/-}), l'absence de SelT au niveau des cellules endothéliales entraînait une exacerbation de la mortalité post-infarctus, comme vous pouvez le constater en figure 57. Ainsi, la SelT endothéliale semble essentielle à la survie post-infarctus, dès lors que 100% des animaux Tie2-SelT^{-/-} décèdent dans les 12 premiers jours de remodelage cardiaque.

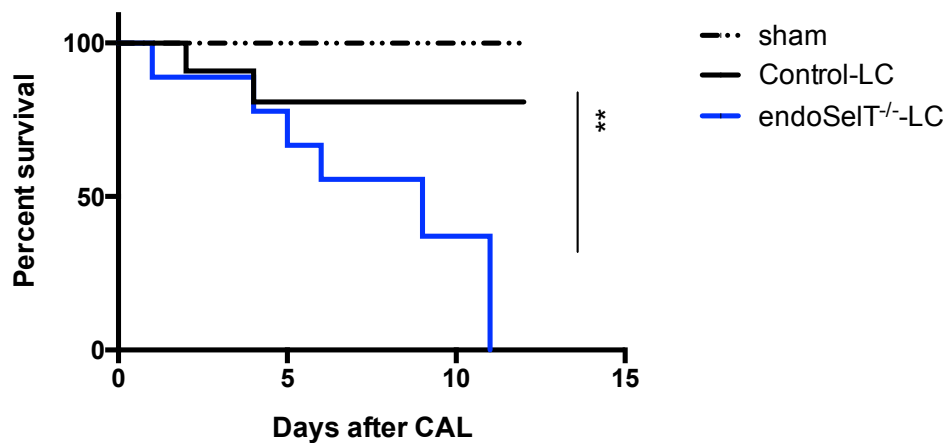


Figure 57 : Evolution de la mortalité dans les jours suivant une ligature coronaires chez les animaux Tie2-SelT^{-/-}

Ces données nous laissent donc supposer un rôle bénéfique intrinsèque de la SelT au niveau cardiovasculaire, dès les premières phases de remodelage cardiaque.

Nous nous sommes ainsi intéressés au remodelage cardiaque consécutif à une I/R (ou LC définitive) et à son évolution en insuffisance cardiaque chronique. Tout d'abord, nous avons pu montrer qu'une ischémie de 45 minutes par ligature de l'artère coronaire gauche chez le rat Wistar, suivie d'une reperfusion est responsable d'une altération morphologique et fonctionnelle du VG similaire à celle observée lors d'une ligature coronaire définitive. En effet, les mesures échocardiographiques réalisées un mois post I/R ainsi que celles réalisées à 3 mois post-ligature, ont permis de montrer un amincissement progressif de la paroi de la zone infarctée et une dilatation

croissante de la cavité du ventricule gauche, traduite par une augmentation des diamètres systoliques et diastoliques du ventricule gauche. De plus, nous avons pu montrer l'existence d'une taille d'infarctus comparable aux deux temps mesurés, nous permettant de distinguer les deux phases de remodelage cardiaque traditionnellement décrites, à savoir la phase d'expansion de l'infarctus ainsi que la phase de dilatation du VG, en nous focalisant sur l'étude de la seconde phase du remodelage.

De plus, ces modifications morphologiques ne sont pas isolées mais sont associées à des altérations de la fonction du VG. En effet, nous avons pu montrer une diminution progressive de la fraction de raccourcissement du VG ainsi qu'une chute du débit cardiaque. En outre, la mesure de l'hémodynamique cardiaque invasive, par évaluation des courbes pression-volume, nous a permis d'évaluer la fonction cardiaque indépendamment de la charge et de la fréquence cardiaque. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence une altération de la capacité contractile du cœur, illustrée par une diminution significative de la pente des relations pression-volume en télé-systole, reflet d'une diminution de l'élastance ventriculaire gauche ; associée à une atteinte de la fonction diastolique, illustrée par une augmentation significative de la pente des relations pression-volume en télé-diastole, reflet d'une diminution de la compliance cardiaque. Ces résultats, que nous avons obtenus à moyen et à long terme, sont comparables à ceux observés classiquement dans la littérature, que ce soit moyennant des modèles d'I/R ou des modèles de ligature coronaire définitive.

A l'heure actuelle, aucune étude expérimentale ou clinique n'a démontré de corrélation entre les taux de SelT et le remodelage cardiaque induit par l'ischémie. Néanmoins, nous avons également pu montrer que la SelT était réexprimée précocement et durablement suite à une ligature coronaire chez la souris (*donnée non détaillées dans ce manuscrit*). En effet, la SelT est réexprimée au niveau cardiaque dès 30 minutes d'ischémie et son expression reste significativement augmentée 7 jours après la ligature coronaire. Ces données sont en concordance avec celles observées lors d'une hypoxie cérébrale chez la souris. En effet, Ikematsu et ses collaborateurs ont pu montrer une augmentation de l'expression de la SelT au niveau cérébral dès 30 minutes d'hypoxie. Cette hypoxie modérée a été suggérée comme étant à l'origine de cette augmentation d'expression, mais ne l'est probablement pas en ce qui concerne l'augmentation précoce observée au niveau cardiaque. En effet, au niveau cardiaque, une hypoxie/ischémie tissulaire dans la zone non infarctée ne s'installe que très progressivement dans les heures qui suivent l'infarctus, secondairement, d'une part, à une diminution de la perfusion tissulaire causée par une raréfaction capillaire et d'autre part, à une augmentation du travail cardiaque³⁹⁸. Ainsi, durant la première semaine suivant la ligature coronaire,

correspondant à notre étude, ce phénomène n'est pas encore opérationnel dans la zone non infarctée et laisse au contraire place à une hyper-perfusion du tissu viable³⁹⁹.

Au vu de ces données et de l'absence de publication relative à l'implication de la SelT dans le post-infarctus, nos travaux se sont dirigés vers la mise en évidence d'un rôle potentiel de la SelT au cours de cette pathologie et au cours du développement de l'insuffisance cardiaque chronique. De ce fait, le but principal de notre étude a été d'évaluer les effets d'une supplémentation/surexpression en SelT (moyennant soit la perfusion de peptide via des minipompes osmotiques, soit la surexpression génique de la SelT moyennant deux vecteurs rAAV différents) sur la fonction cardiaque et vasculaire dans un modèle d'ischémie cardiaque chez le rat. De plus, nous avons fait le choix d'initier notre traitement 7 jours après l'épisode ischémique afin de nous affranchir de la phase d'expansion de l'infarctus et de nous focaliser sur la phase de remodelage tardif observé consécutivement à l'infarctus du myocarde.

Nous avons ainsi pu montrer que la supplémentation en SelT lors d'une thérapie protéique permet, à moyen terme, d'améliorer l'amincissement de la paroi antérieure du VG à la fois en systole et en diastole, mais également la dilatation ventriculaire gauche par rapport aux animaux non traités. Cette limitation du remodelage cardiaque à moyen terme n'est pas liée à une modification de la taille de l'infarctus. Ceci s'explique par le fait qu'à 7 jours de reperfusion, date à laquelle est initié le traitement, la zone infarctée est entièrement remplacée par une zone cicatricielle fibreuse. Ainsi, nos résultats témoignent pour la première fois d'une action bénéfique de la SelT dans le mécanisme de remodelage post-I/R de la zone saine du myocarde. Parallèlement à ces améliorations morphologiques, nous avons pu montrer une amélioration de la fonction du VG suite au traitement protéique. En effet, la thérapie protéique par la SelT entraîne une amélioration de la FR et du DC en comparaison des animaux non traités. De même, l'altération des paramètres hémodynamiques ventriculaires gauche est clairement améliorée par le traitement. Ainsi, en améliorant considérablement la fonction et l'altération de la morphologie du VG, nos données montrent pour la première fois l'intérêt du ciblage thérapeutique de la SelT dans le post-infarctus.

Ces données ont été confirmées dans les différents modèles de thérapie génique que nous avons utilisés. En effet, le traitement des animaux ICC par un rAAV-SelT (soit 8, soit 9, exprimant la forme classique de la protéine), permet d'améliorer significativement la fonction cardiaque mesurée par échocardiographie à 90 jours. La SelT permet donc de limiter le remodelage tardif du myocarde et de restreindre la perte fonctionnelle observée classiquement dans l'ICC.

L'amélioration de la fonction cardiaque après traitement par la Selt pourrait s'expliquer par les effets de la Selt sur la signalisation calcique. En effet, il a été montré dans des travaux expérimentaux réalisés par Grumolato et ses collaborateurs que la Selt était impliquée dans la régulation de la signalisation calcique¹²⁴. De plus, la localisation subcellulaire de la Selt dans le réticulum endoplasmique, source majeure du calcium intracellulaire souligne son rôle potentiel sur cette signalisation. Nous avons ainsi pu montrer que l'ICC entraînait une altération significative de la contractilité des cardiomyocytes par fonction isolée. Dans nos travaux, la stimulation de l'expression de la Selt permet une nette amélioration de ces paramètres, et pourrait donc expliquer l'amélioration de la fonction cardiaque.

De plus, comme décrit précédemment, les dommages cardiaques au cours du remodelage et de l'ICC se caractérisent notamment par une altération de la compliance cardiaque. L'augmentation de la rigidité cardiaque a souvent été associée à la présence d'une importante fibrose interstitielle. Nos mesures de la fibrose cardiaque par coloration au Rouge Sirius ont révélé une augmentation de la densité en collagène, attendue du fait des processus de cicatrisation et de remodelage observés consécutivement à l'infarctus. La mise en place d'une fibrose cicatricielle pourrait participer à la dégradation de la fonction cardiaque. Il semblerait donc dans notre modèle que la Selt ait un rôle à jouer sur la fibrose interstitielle dès lors qu'elle est significativement diminuée dans l'ensemble de nos modèles expérimentaux, expliquant en partie l'amélioration de la fonction cardiaque.

Outre ces mécanismes, le statut rédox cardiaque semble être un facteur majeur afin d'expliquer les effets bénéfiques d'une stimulation de la Selt dans le remodelage VG et l'ICC. En effet, il est désormais clairement établi que la mort cellulaire engendrée par l'ischémie, l'inflammation ainsi que la déplétion en O₂, résultent en un déséquilibre de la balance pro-/anti-oxydante et donc en l'instauration d'un stress oxydant majeur au niveau cardiaque⁴⁰⁰. Plusieurs études ont montré, à l'aide d'outils pharmacologiques, que la supplémentation en enzymes antioxydantes au cours du remodelage VG est capable de diminuer l'apoptose, de limiter la fragmentation de l'ADN et *in fine* d'améliorer la fonction cardiaque .

Ainsi, il semblerait que l'amélioration de la fonction cardiaque induite par la stimulation de l'expression de la Selt soit due à l'amélioration des flux calciques permettant ainsi une diminution globale du stress oxydant au sein du VG. Ceci est illustré par la diminution des enzymes pro-oxydantes telles que la NOX4, mais également par une augmentation des défenses antioxydantes telles que les SOD.

De plus, l'amélioration de la relaxation coronaire permet également d'étayer cet argument, avec notamment une augmentation des taux de NO au niveau cardiomyocytaire qui permet d'améliorer la contractilité et la relaxation³⁹⁸. Cette amélioration de la relaxation coronaire contribue à l'amélioration de la perfusion myocardique et ainsi à une diminution de l'hypoxie. Ceci entraîne donc par conséquence une diminution de l'activation des mécanismes du remodelage cardiaque, tels que l'inflammation et l'activation du système RAA.

Parallèlement, nous avons également souhaité investiguer l'implication de la sélénocystéine dans les différents effets médiés par la SelT au niveau cardiaque et vasculaire. Pour ce faire, nous avons utilisé deux vecteurs rAAV différents, l'un permettant l'expression de la SelT sous sa forme native, et l'autre permettant l'expression d'un gène dans lequel le résidu Sec a été modifié par une Ala. Nous avons pu montrer que la thérapie génique par l'utilisation du rAAV8-SelT^{Sec} permet une amélioration franche de la fonction et du remodelage cardiaque ainsi que de la relaxation coronaire. En revanche, l'utilisation du rAAV8-SelT^{Ala} ne modifie pas l'ensemble de ces paramètres en comparaison des animaux non traités. Il semblerait donc que l'ensemble des effets bénéfiques de la SelT soient médiés par le résidu Sec.

L'implication du résidu Sec dans les effets bénéfiques de la SelT a été suggérée au travers de la séquence CXXU⁴⁰¹⁻⁴⁰³. En effet, des travaux réalisés *in vitro* dans une lignée de neuroblastomes humains (SH-5Y) et *in vivo*, dans un modèle murin invalidé pour la SelT dans les cellules neurales, révèlent que la SelT protège les cellules du stress oxydatif via son motif CXXU⁴⁰². Castex et ses collaborateurs ont montré que la SelT est nécessaire à la survie des neurones durant le développement cérébral en prévenant l'augmentation des ERO⁴⁰³. Enfin, Abid et ses collaborateurs ont montré l'implication de la SelT dans une cascade de signalisation cellulaire qui intervient dans la survie cellulaire contre le stress oxydant (Abid et al., soumis).

De plus, il est établi que certaines sélénoprotéines (GPx5, 7, 8 et Trx2) conservent leur fonction lorsque le résidu Sec est remplacé par une Cys⁶². En effet, l'avantage que procure la présence d'une Sec en comparaison du Cys au sein des sélénoprotéines fait l'objet de débats actuellement. Il semble que l'environnement du résidu Sec ait plus d'influence sur le potentiel rédox que la nature Sec ou Cys du résidu présent au niveau du site actif⁴⁰⁴. En revanche, l'incorporation du sélénium dans les sélénoprotéines leur confère un niveau de régulation supplémentaire dont sont dépourvus les homologues contenant une Cys.

Nos résultats semblent donc conforter cette hypothèse d'importance du résidu Sec en comparaison d'une alanine, résidu simple et sans propriété antioxydante. Néanmoins, la part d'importance de la Sec en comparaison de la Cys reste encore à déterminer en ce qui concerne la SelT.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de montrer l'importance de la SelT dans le système cardiovasculaire ainsi que l'importance de sa stimulation dans le traitement de l'ICC.

La première partie de ce travail a permis de révéler, pour la première fois, qu'une thérapie protéique par la SelT, moyennant l'utilisation de minipompes osmotiques, améliore significativement le débit cardiaque et la fraction de raccourcissement du VG. Cette thérapie permet également d'améliorer les pressions télé-systoliques et diastoliques ainsi que la perfusion coronaire du VG. Ces changements sont associés à une diminution du stress oxydant au niveau cardiaque ainsi qu'à une diminution de l'inflammation. Cette étude fut un préalable à nos études de thérapie génique que nous avons réalisé dans un second temps.

Le second chapitre de ce travail a visé en la mise au point d'un modèle de thérapie génique cardiaque chez le rat. Cette étude a été réalisée en collaboration étroite avec le Dr. Adriouch (U905, Rouen).

Tout d'abord, nous avons évalué les effets d'un traitement par un AAV9 recombinant permettant la majoration de l'expression de la SelT, principalement au niveau cardiaque. Nous avons pu montrer que le traitement par le rAAV9-SelT permettait de diminuer la dilatation du VG 3 mois après la LC. La thérapie génique cardiaque a ainsi permis d'améliorer le débit et la perfusion cardiaque, mais également la compliance et l'élastance du ventricule gauche, paramètres essentiels à sa fonction.

Enfin, la dernière partie de cette thèse nous a permis d'évaluer les effets d'un traitement par un AAV8 recombinant, entraînant la majoration de l'expression de la SelT au niveau systémique. Le suivi échocardiographique des animaux nous a permis de montrer que la thérapie par rAAV8-SelT^{Sec} restaure le débit cardiaque 3 mois après LC, et améliore considérablement la dilatation du ventricule gauche. Par ailleurs, l'élastance et la compliance du VG sont significativement améliorées, ainsi que la fraction de raccourcissement du VG.

De plus, nous avons pu montrer l'importance cruciale du résidu sélénocystéine au sein de la séquence de la protéine SelT. En effet, l'ensemble des effets bénéfiques observés a totalement été inhibé par le remplacement de ce résidu Sec par une Alanine. Il semblerait donc que l'essentiel des mécanismes d'actions de la SelT soient médiés par le résidu sélénocystéine. Néanmoins, il serait intéressant de poursuivre cette étude en comparant les effets de la SelT médiés par la sélénocystéine en les opposants à ceux médiés par le sélénium seul.

Ce travail de thèse a ainsi permis d'apporter la preuve de concept de l'intérêt d'une thérapie cardiovasculaire par la SelT, moyennant l'utilisation d'un vecteur rAAV. Néanmoins, ces résultats restent à conforter par des études à plus long terme, impliquant notamment la mesure de la survie à moyen et long terme, paramètre essentiel à la validation de l'intérêt thérapeutique.

Enfin, l'utilisation des rAAV étant soumise à de nombreuses réglementations, notamment en ce qui concerne les dosages, il serait intéressant de tester d'autres doses de vecteur afin de minimiser l'impact immunologique potentiel de cette thérapie sur le court et long terme, à la fois chez l'animal, mais également chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hatfield DL, Berry MJ, Gladyshev VN. Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. Springer Science & Business Media; 2011.
2. Weekley CM, Harris HH. Which form is that? The importance of selenium speciation and metabolism in the prevention and treatment of disease. *Chem Soc Rev.* 2013;42:8870–8894.
3. O'Toole D, Raisbeck MF. Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc.* 1995;7:364–373.
4. Yaeger MJ, Neiger RD, Holler L, Fraser TL, Hurley DJ, Palmer IS. The effect of subclinical selenium toxicosis on pregnant beef cattle. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc.* 1998;10:268–273.
5. Pinsent J. The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the coli-aerogenes group of bacteria. *Biochem J.* 1954;57:10–16.
6. Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. 1951. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 1999;15:255.
7. Schwarz K, Stesney JA, Foltz CM. Relation between selenium traces in L-cystine and protection against dietary liver necrosis. *Metabolism.* 1959;8:88–90.
8. Lamand M. [Biochemical lesions in calf myopathy by selenium deficiency]. *Comptes Rendus Hebd Séances Académie Sci Sér Sci Nat.* 1970;270:417–420.
9. Patterson EL, Milstrey R, Stokstad EL. Effect of selenium in preventing exudative diathesis in chicks. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* 1957;95:617–620.
10. Ge K, Yang G. The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. *Am J Clin Nutr.* 1993;57:259S–263S.
11. Sun G-X, Meharg AA, Li G, Chen Z, Yang L, Chen S-C, Zhu Y-G. Distribution of soil selenium in China is potentially controlled by deposition and volatilization? *Sci Rep.* 2016;6:20953.
12. Kobayashi Y, Ogra Y, Ishiwata K, Takayama H, Aimi N, Suzuki KT. Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:15932–15936.
13. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Hoekstra WG. Prevention of oxidative damage to rat

erythrocytes by dietary selenium. *J Nutr.* 1972;102:689–696.

14. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 1973;179:588–590.
15. Flohe L, Günzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 1973;32:132–134.
16. Andreesen JR, Ljungdahl LG. Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*: incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme. *J Bacteriol.* 1973;116:867–873.
17. Turner DC, Stadtman TC. Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. *Arch Biochem Biophys.* 1973;154:366–381.
18. Cone JE, Del Río RM, Davis JN, Stadtman TC. Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976;73:2659–2663.
19. Forstrom JW, Zakowski JJ, Tappel AL. Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry (Mosc).* 1978;17:2639–2644.
20. Köhrl J, Brigelius-Flohé R, Böck A, Gärtner R, Meyer O, Flohé L. Selenium in biology: facts and medical perspectives. *Biol Chem.* 2000;381:849–864.
21. Ip C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J Nutr.* 1998;128:1845–1854.
22. Fairweather-Tait SJ, Collings R, Hurst R. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J Clin Nutr.* 2010;91:1484S–1491S.
23. Schrauzer GN. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J Nutr.* 2000;130:1653–1656.
24. Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, Harrison PR. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the “termination” codon, TGA. *EMBO J.* 1986;5:1221–1227.

25. Zinoni F, Birkmann A, Stadtman TC, Böck A. Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:4650–4654.
26. Osawa S, Jukes TH, Watanabe K, Muto A. Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol Rev*. 1992;56:229–264.
27. Krzycki JA. The direct genetic encoding of pyrrolysine. *Curr Opin Microbiol*. 2005;8:706–712.
28. Arnér ESJ. Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp Cell Res*. 2010;316:1296–1303.
29. Bösl MR, Takaku K, Oshima M, Nishimura S, Taketo MM. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (*Trsp*). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:5531–5534.
30. Xu X-M, Carlson BA, Mix H, Zhang Y, Saira K, Glass RS, Berry MJ, Gladyshev VN, Hatfield DL. Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *PLoS Biol*. 2007;5:e4.
31. Yuan J, Palioura S, Salazar JC, Su D, O'Donoghue P, Hohn MJ, Cardoso AM, Whitman WB, Söll D. RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:18923–18927.
32. Esaki N, Nakamura T, Tanaka H, Suzuki T, Morino Y, Soda K. Enzymatic synthesis of selenocysteine in rat liver. *Biochemistry (Mosc)*. 1981;20:4492–4496.
33. Seale LA, Hashimoto AC, Kurokawa S, Gilman CL, Seyedali A, Bellinger FP, Raman AV, Berry MJ. Disruption of the selenocysteine lyase-mediated selenium recycling pathway leads to metabolic syndrome in mice. *Mol Cell Biol*. 2012;32:4141–4154.
34. Labunskyy VM, Lee BC, Handy DE, Loscalzo J, Hatfield DL, Gladyshev VN. Both maximal expression of selenoproteins and selenoprotein deficiency can promote development of type 2 diabetes-like phenotype in mice. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14:2327–2336.
35. Berry MJ, Banu L, Chen YY, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature*. 1991;353:273–276.

36. Copeland PR, Driscoll DM. Purification, redox sensitivity, and RNA binding properties of SECIS-binding protein 2, a protein involved in selenoprotein biosynthesis. *J Biol Chem.* 1999;274:25447–25454.
37. Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ. Regulation and function of selenoproteins in human disease. *Biochem J.* 2009;422:11–22.
38. Hatfield DL, Carlson BA, Xu X-M, Mix H, Gladyshev VN. Selenocysteine incorporation machinery and the role of selenoproteins in development and health. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2006;81:97–142.
39. Schoenmakers E, Agostini M, Mitchell C, Schoenmakers N, Papp L, Rajanayagam O, Padidela R, Ceron-Gutierrez L, Doffinger R, Prevosto C, Luan J 'an, Montano S, Lu J, Castanet M, Clemons N, Groeneveld M, Castets P, Karbaschi M, Aitken S, Dixon A, Williams J, Campi I, Blount M, Burton H, Muntoni F, O'Donovan D, Dean A, Warren A, Brierley C, Baguley D, Guicheney P, Fitzgerald R, Coles A, Gaston H, Todd P, Holmgren A, Khanna KK, Cooke M, Semple R, Halsall D, Wareham N, Schwabe J, Grasso L, Beck-Peccoz P, Ogunko A, Dattani M, Gurnell M, Chatterjee K. Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *J Clin Invest.* 2010;120:4220–4235.
40. Copeland PR, Fletcher JE, Carlson BA, Hatfield DL, Driscoll DM. A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J.* 2000;19:306–314.
41. Lescure A, Allmang C, Yamada K, Carbon P, Krol A. cDNA cloning, expression pattern and RNA binding analysis of human selenocysteine insertion sequence (SECIS) binding protein 2. *Gene.* 2002;291:279–285.
42. Bifano AL, Atassi T, Ferrara T, Driscoll DM. Identification of nucleotides and amino acids that mediate the interaction between ribosomal protein L30 and the SECIS element. *BMC Mol Biol.* 2013;14:12.
43. Chavatte L, Brown BA, Driscoll DM. Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12:408–416.
44. Budiman ME, Bubenik JL, Miniard AC, Middleton LM, Gerber CA, Cash A, Driscoll DM. Eukaryotic initiation factor 4a3 is a selenium-regulated RNA-binding protein that selectively inhibits selenocysteine incorporation. *Mol Cell.* 2009;35:479–489.

45. Miniard AC, Middleton LM, Budiman ME, Gerber CA, Driscoll DM. Nucleolin binds to a subset of selenoprotein mRNAs and regulates their expression. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:4807–4820.
46. Lee BJ, Worland PJ, Davis JN, Stadtman TC, Hatfield DL. Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA. *J Biol Chem.* 1989;264:9724–9727.
47. Howard MT, Aggarwal G, Anderson CB, Khatri S, Flanigan KM, Atkins JF. Recoding elements located adjacent to a subset of eukaryal selenocysteine-specifying UGA codons. *EMBO J.* 2005;24:1596–1607.
48. Berry MJ, Banu L, Harney JW, Larsen PR. Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *EMBO J.* 1993;12:3315–3322.
49. Hill KE, Lyons PR, Burk RF. Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;185:260–263.
50. Lei XG, Evenson JK, Thompson KM, Sunde RA. Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. *J Nutr.* 1995;125:1438–1446.
51. Schomburg L, Schweizer U. Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1790:1453–1462.
52. Sunde RA, Raines AM. Selenium regulation of the selenoprotein and nonselenoprotein transcriptomes in rodents. *Adv Nutr Bethesda Md.* 2011;2:138–150.
53. Grundner-Culemann E, Martin GW, Tujebajeva R, Harney JW, Berry MJ. Interplay between termination and translation machinery in eukaryotic selenoprotein synthesis. *J Mol Biol.* 2001;310:699–707.
54. Tormay P, Sawers A, Böck A. Role of stoichiometry between mRNA, translation factor SelB and selenocysteyl-tRNA in selenoprotein synthesis. *Mol Microbiol.* 1996;21:1253–1259.
55. Tujebajeva RM, Copeland PR, Xu XM, Carlson BA, Harney JW, Driscoll DM, Hatfield DL, Berry MJ. Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO Rep.* 2000;1:158–163.
56. Burk RF, Hill KE. Regulation of Selenium Metabolism and Transport. *Annu Rev Nutr.*

2015;35:109–134.

57. Behne D, Kyriakopoulos A. Effects of dietary selenium on the tissue concentrations of type I iodothyronine 5'-deiodinase and other selenoproteins. *Am J Clin Nutr.* 1993;57:310S–312S.
58. Dumitrescu AM, Liao X-H, Abdullah MSY, Lado-Abeal J, Majed FA, Moeller LC, Boran G, Schomburg L, Weiss RE, Refetoff S. Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nat Genet.* 2005;37:1247–1252.
59. Allamand V, Richard P, Lescure A, Ledeuil C, Desjardin D, Petit N, Gartioux C, Ferreiro A, Krol A, Pellegrini N, Urtizbera JA, Guicheney P. A single homozygous point mutation in a 3'untranslated region motif of selenoprotein N mRNA causes SEPNI-related myopathy. *EMBO Rep.* 2006;7:450–454.
60. Driscoll DM, Chavatte L. Finding needles in a haystack. In silico identification of eukaryotic selenoprotein genes. *EMBO Rep.* 2004;5:140–141.
61. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science.* 2003;300:1439–1443.
62. Kryukov GV, Kryukov VM, Gladyshev VN. New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J Biol Chem.* 1999;274:33888–33897.
63. Lescure A, Gautheret D, Carbon P, Krol A. Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. *J Biol Chem.* 1999;274:38147–38154.
64. Lescure A, Gautheret D, Krol A. Novel selenoproteins identified from genomic sequence data. *Methods Enzymol.* 2002;347:57–70.
65. Reeves MA, Hoffmann PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2009;66:2457–2478.
66. Bley J, Navas-Acien A, Guallar E. Serum selenium levels and all-cause, cancer, and cardiovascular mortality among US adults. *Arch Intern Med.* 2008;168:404–410.
67. Akbaraly NT, Arnaud J, Hininger-Favier I, Gourlet V, Roussel A-M, Berr C. Selenium and mortality in the elderly: results from the EVA study. *Clin Chem.* 2005;51:2117–2123.
68. Ray AL, Semba RD, Walston J, Ferrucci L, Cappola AR, Ricks MO, Xue Q-L, Fried LP. Low serum

selenium and total carotenoids predict mortality among older women living in the community: the women's health and aging studies. *J Nutr*. 2006;136:172–176.

69. Hoffmann FW, Hashimoto AC, Shafer LA, Dow S, Berry MJ, Hoffmann PR. Dietary selenium modulates activation and differentiation of CD4+ T cells in mice through a mechanism involving cellular free thiols. *J Nutr*. 2010;140:1155–1161.

70. Hoffmann PR. Mechanisms by which selenium influences immune responses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007;55:289–297.

71. Carlson BA, Yoo M-H, Shrimali RK, Irons R, Gladyshev VN, Hatfield DL, Park JM. Role of selenium-containing proteins in T-cell and macrophage function. *Proc Nutr Soc*. 2010;69:300–310.

72. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet Lond Engl*. 2000;356:233–241.

73. Wood null, Beckham1 null, Yosioka2 null, Darban3 null, Watson null. beta-Carotene and selenium supplementation enhances immune response in aged humans. *Integr Med Integrating Conv Altern Med*. 2000;2:85–92.

74. Kiremidjian-Schumacher L, Roy M, Glickman R, Schneider K, Rothstein S, Cooper J, Hochster H, Kim M, Newman R. Selenium and immunocompetence in patients with head and neck cancer. *Biol Trace Elem Res*. 2000;73:97–111.

75. Hawkes WC, Kelley DS, Taylor PC. The effects of dietary selenium on the immune system in healthy men. *Biol Trace Elem Res*. 2001;81:189–213.

76. Broome CS, McArdle F, Kyle JAM, Andrews F, Lowe NM, Hart CA, Arthur JR, Jackson MJ. An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. *Am J Clin Nutr*. 2004;80:154–162.

77. Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790:1441–1447.

78. Ashrafi MR, Shams S, Nouri M, Mohseni M, Shabanian R, Yekaninejad MS, Chegini N, Khodadad A, Safaralizadeh R. A probable causative factor for an old problem: selenium and glutathione peroxidase appear to play important roles in epilepsy pathogenesis. *Epilepsia*. 2007;48:1750–1755.

79. Ashrafi MR, Shabani R, Abbaskhanian A, Nasirian A, Ghofrani M, Mohammadi M, Zamani GR, Kayhanidoost Z, Ebrahimi S, Pourpak Z. Selenium and intractable epilepsy: is there any correlation? *Pediatr Neurol.* 2007;36:25–29.
80. Amiri M, Farzin L, Moassesi ME, Sajadi F. Serum trace element levels in febrile convulsion. *Biol Trace Elem Res.* 2010;135:38–44.
81. Mahyar A, Ayazi P, Fallahi M, Javadi A. Correlation between serum selenium level and febrile seizures. *Pediatr Neurol.* 2010;43:331–334.
82. Castaño A, Ayala A, Rodríguez-Gómez JA, Herrera AJ, Cano J, Machado A. Low selenium diet increases the dopamine turnover in prefrontal cortex of the rat. *Neurochem Int.* 1997;30:549–555.
83. Shahar A, Patel KV, Semba RD, Bandinelli S, Shahar DR, Ferrucci L, Guralnik JM. Plasma selenium is positively related to performance in neurological tasks assessing coordination and motor speed. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc.* 2010;25:1909–1915.
84. Hawkes WC, Hornbostel L. Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit. *Biol Psychiatry.* 1996;39:121–128.
85. Finley JW, Penland JG. Adequacy or deprivation of dietary selenium in healthy men: Clinical and psychological findings. *J Trace Elem Exp Med.* 1998;11:11–27.
86. Benton D, Cook R. The impact of selenium supplementation on mood. *Biol Psychiatry.* 1991;29:1092–1098.
87. Benton D, Cook R. Selenium supplementation improves mood in a double-blind crossover trial. *Psychopharmacology (Berl).* 1990;102:549–550.
88. Schomburg L, Köhrle J. On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52:1235–1246.
89. Aaseth J, Frey H, Glatte E, Norheim G, Ringstad J, Thomassen Y. Selenium concentrations in the human thyroid gland. *Biol Trace Elem Res.* 1990;24:147–152.
90. Marcocci C, Kahaly GJ, Krassas GE, Bartalena L, Prummel M, Stahl M, Altea MA, Nardi M, Pitz S, Boboridis K, Sivelli P, von Arx G, Mourits MP, Baldeschi L, Bencivelli W, Wiersinga W, European Group on Graves' Orbitopathy. Selenium and the course of mild Graves' orbitopathy. *N Engl J Med.*

2011;364:1920–1931.

91. Bülow Pedersen I, Knudsen N, Carlé A, Schomburg L, Köhrle J, Jørgensen T, Rasmussen LB, Ovesen L, Laurberg P. Serum selenium is low in newly diagnosed Graves' disease: a population-based study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79:584–590.
92. Bleys J, Navas-Acien A, Guallar E. Serum selenium and diabetes in U.S. adults. *Diabetes Care*. 2007;30:829–834.
93. Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ, Lucia MS, Thompson IM, Ford LG, Parnes HL, Minasian LM, Gaziano JM, Hartline JA, Parsons JK, Bearden JD, Crawford ED, Goodman GE, Claudio J, Winkquist E, Cook ED, Karp DD, Walther P, Lieber MM, Kristal AR, Darke AK, Arnold KB, Ganz PA, Santella RM, Albanes D, Taylor PR, Probstfield JL, Jagpal TJ, Crowley JJ, Meyskens FL, Baker LH, Coltman CA. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA*. 2009;301:39–51.
94. Arnaud J, Akbaraly TN, Akbaraly NT, Hininger I, Roussel A-M, Berr C. Factors associated with longitudinal plasma selenium decline in the elderly: the EVA study. *J Nutr Biochem*. 2007;18:482–487.
95. Zhang Y, Gladyshev VN. Trends in selenium utilization in marine microbial world revealed through the analysis of the global ocean sampling (GOS) project. *PLoS Genet*. 2008;4:e1000095.
96. Hatfield DL, Tsuji PA, Carlson BA, Gladyshev VN. Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. *Trends Biochem Sci*. 2014;39:112–120.
97. Lobanov AV, Fomenko DE, Zhang Y, Sengupta A, Hatfield DL, Gladyshev VN. Evolutionary dynamics of eukaryotic selenoproteomes: large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life. *Genome Biol*. 2007;8:R198.
98. Mariotti M, Ridge PG, Zhang Y, Lobanov AV, Pringle TH, Guigo R, Hatfield DL, Gladyshev VN. Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *PLoS One*. 2012;7:e33066.
99. Zhang Y, Romero H, Salinas G, Gladyshev VN. Dynamic evolution of selenocysteine utilization in bacteria: a balance between selenoprotein loss and evolution of selenocysteine from redox active cysteine residues. *Genome Biol*. 2006;7:R94.
100. Lobanov AV, Hatfield DL, Gladyshev VN. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes.

Biochim Biophys Acta. 2009;1790:1424–1428.

101. Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev*. 2014;94:739–777.

102. Tosatto SCE, Bosello V, Fogolari F, Mauri P, Roveri A, Toppo S, Flohé L, Ursini F, Maiorino M. The catalytic site of glutathione peroxidases. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10:1515–1526.

103. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*. 1999;27:951–965.

104. Sarma BK, Mugesh G. Thiol cofactors for selenoenzymes and their synthetic mimics. *Org Biomol Chem*. 2008;6:965–974.

105. Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta*. 1985;839:62–70.

106. Zhou J, Huang K, Lei XG. Selenium and diabetes--evidence from animal studies. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:1548–1556.

107. Cho S-H, Lee C-H, Ahn Y, Kim H, Kim H, Ahn C-Y, Yang K-S, Lee S-R. Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H₂O₂ mediated cell signaling. *FEBS Lett*. 2004;560:7–13.

108. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med*. 2014;66:75–87.

109. Arnér ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem FEBS*. 2000;267:6102–6109.

110. Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeöld A, Bianco AC. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev*. 2008;29:898–938.

111. de Jesus LA, Carvalho SD, Ribeiro MO, Schneider M, Kim SW, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest*. 2001;108:1379–1385.

112. Xu X-M, Carlson BA, Irons R, Mix H, Zhong N, Gladyshev VN, Hatfield DL. Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. *Biochem J*. 2007;404:115–120.

113. Kim G, Weiss SJ, Levine RL. Methionine oxidation and reduction in proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840:901–905.
114. Labunskyy VM, Yoo M-H, Hatfield DL, Gladyshev VN. Sep15, a thioredoxin-like selenoprotein, is involved in the unfolded protein response and differentially regulated by adaptive and acute ER stresses. *Biochemistry (Mosc)*. 2009;48:8458–8465.
115. Shchedrina VA, Everley RA, Zhang Y, Gygi SP, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoprotein K binds multiprotein complexes and is involved in the regulation of endoplasmic reticulum homeostasis. *J Biol Chem*. 2011;286:42937–42948.
116. Lilley BN, Ploegh HL. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature*. 2004;429:834–840.
117. Park YH, Jeon YH, Kim IY. Selenoprotein W promotes cell cycle recovery from G2 arrest through the activation of CDC25B. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823:2217–2226.
118. Bang J, Huh JH, Na J-W, Lu Q, Carlson BA, Tobe R, Tsuji PA, Gladyshev VN, Hatfield DL, Lee BJ. Cell Proliferation and Motility Are Inhibited by G1 Phase Arrest in 15-kDa Selenoprotein-Deficient Chang Liver Cells. *Mol Cells*. 2015;38:457–465.
119. Jurynek MJ, Xia R, Mackrill JJ, Gunther D, Crawford T, Flanigan KM, Abramson JJ, Howard MT, Grunwald DJ. Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:12485–12490.
120. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9:775–806.
121. Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr*. 2005;25:215–235.
122. Kasaikina MV, Hatfield DL, Gladyshev VN. Understanding selenoprotein function and regulation through the use of rodent models. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823:1633–1642.
123. Moustafa ME, Antar HA. A bioinformatics approach to characterize mammalian selenoprotein T. *Biochem Genet*. 2012;50:736–747.
124. Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, Galas L, Ait-Ali D,

Leprince J, Guérineau NC, Elkahoulou AG, Fournier A, Vieau D, Vaudry H, Anouar Y. Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2008;22:1756–1768.

125. Dikiy A, Novoselov SV, Fomenko DE, Sengupta A, Carlson BA, Cerny RL, Ginalski K, Grishin NV, Hatfield DL, Gladyshev VN. SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family. *Biochemistry (Mosc)*. 2007;46:6871–6882.

126. Aachmann FL, Fomenko DE, Soragni A, Gladyshev VN, Dikiy A. Solution structure of selenoprotein W and NMR analysis of its interaction with 14-3-3 proteins. *J Biol Chem*. 2007;282:37036–37044.

127. Shchedrina VA, Zhang Y, Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. Structure-function relations, physiological roles, and evolution of mammalian ER-resident selenoproteins. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12:839–849.

128. Prevost G, Arabo A, Jian L, Queleñec E, Cartier D, Hassan S, Falluel-Morel A, Tanguy Y, Gargani S, Lihmann I, Kerr-Conte J, Lefebvre H, Pattou F, Anouar Y. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is abundantly expressed in mouse and human β -cells and its targeted inactivation impairs glucose tolerance. *Endocrinology*. 2013;154:3796–3806.

129. Tanguy Y, Falluel-Morel A, Arthaud S, Boukhar L, Manecka D-L, Chagraoui A, Prevost G, Elias S, Dorval-Coiffec I, Lesage J, Vieau D, Lihmann I, Jégou B, Anouar Y. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes. *Endocrinology*. 2011;152:4322–4335.

130. Hoffmann PR, Höge SC, Li P-A, Hoffmann FW, Hashimoto AC, Berry MJ. The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:3963–3973.

131. Ikematsu K, Tsuda R, Tsuruya S, Nakasono I. Identification of novel genes expressed in hypoxic brain condition by fluorescence differential display. *Forensic Sci Int*. 2007;169:168–172.

132. Sengupta A, Carlson BA, Labunskyy VM, Gladyshev VN, Hatfield DL. Selenoprotein T deficiency alters cell adhesion and elevates selenoprotein W expression in murine fibroblast cells. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell*. 2009;87:953–961.

133. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet Lond Engl.* 1997;349:1498–1504.
134. WHO publishes definitive atlas on global heart disease and stroke epidemic. *Indian J Med Sci.* 2004;58:405–406.
135. Morales A, Cowan J, Dagua J, Hershberger RE. Family history: an essential tool for cardiovascular genetic medicine. *Congest Heart Fail Greenwich Conn.* 2008;14:37–45.
136. Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:1890–1900.
137. Jenkins KJ, Correa A, Feinstein JA, Botto L, Britt AE, Daniels SR, Elixson M, Warnes CA, Webb CL, American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young. Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation.* 2007;115:2995–3014.
138. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanus F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L, INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet Lond Engl.* 2004;364:937–952.
139. Libby P. The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1225–1228.
140. Lewis EF, Moye LA, Rouleau JL, Sacks FM, Arnold JMO, Warnica JW, Flaker GC, Braunwald E, Pfeffer MA, CARE Study. Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: the CARE study. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:1446–1453.
141. Greenland P, Knoll MD, Stamler J, Neaton JD, Dyer AR, Garside DB, Wilson PW. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. *JAMA.* 2003;290:891–897.
142. Reddy KS, Yusuf S. Emerging epidemic of cardiovascular disease in developing countries. *Circulation.* 1998;97:596–601.
143. Hellermann JP, Goraya TY, Jacobsen SJ, Weston SA, Reeder GS, Gersh BJ, Redfield MM,

Rodeheffer RJ, Yawn BP, Roger VL. Incidence of heart failure after myocardial infarction: is it changing over time? *Am J Epidemiol*. 2003;157:1101–1107.

144. Braunwald E. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med*. 1997;337:1360–1369.

145. McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GYH, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik K, Rutten FH, Schwitler J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeyher A, Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESC) Akut ve Kronik Kalp Yetersizliği Tani ve Tedavisi 2012 Görev Grubu, ESC Kalp Yetersizliği Birliğinin İşbirliğiyle hazırlanmıştır, Heart Failure Association. [ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012]. *Türk Kardiyol Dernegi Arsivi Turk Kardiyol Derneginin Yayin Organidir*. 2012;40 Suppl 3:77–137.

146. Roger VL, Weston SA, Redfield MM, Hellermann-Homan JP, Killian J, Yawn BP, Jacobsen SJ. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA*. 2004;292:344–350.

147. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KKL, Murabito JM, Vasan RS. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med*. 2002;347:1397–1402.

148. Saudubray T, Saudubray C, Viboud C, Jondeau G, Valleron A-J, Flahault A, Hanslik T. [Prevalence and management of heart failure in France: national study among general practitioners of the Sentinelles network]. *Rev Med Interne*. 2005;26:845–850.

149. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:30–41.

150. Zannad F, Mebazaa A, Juillière Y, Cohen-Solal A, Guize L, Alla F, Rougé P, Blin P, Barlet M-H, Paolozzi L, Vincent C, Desnos M, Samii K, EFICA Investigators. Clinical profile, contemporary management and one-year mortality in patients with severe acute heart failure syndromes: The EFICA study. *Eur J Heart Fail*. 2006;8:697–705.

151. Torabi A, Cleland JGF, Khan NK, Loh PH, Clark AL, Alamgir F, Caplin JL, Rigby AS, Goode K. The timing of development and subsequent clinical course of heart failure after a myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2008;29:859–870.

152. Reddy K, Khaliq A, Henning RJ. Recent advances in the diagnosis and treatment of acute myocardial infarction. *World J Cardiol.* 2015;7:243–276.
153. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, Writing Group on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Third universal definition of myocardial infarction. *Glob Heart.* 2012;7:275–295.
154. Benhabbouche S, Crola da silva C, Abrial M, Ferrera R. Base des phénomènes d'ischémie reperfusion et de la protection myocardique. *Ann Fr Anesth Réanimation.* 2011;30:S2–S16.
155. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298:229–317.
156. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation.* 1977;56:786–794.
157. Jennings RB, Reimer KA. Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation.* 1983;68:125–36.
158. Ytrehus K, Liu Y, Tsuchida A, Miura T, Liu GS, Yang XM, Herbert D, Cohen MV, Downey JM. Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am J Physiol.* 1994;267:H2383–2390.
159. Allen DG, Orchard CH. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res.* 1987;60:153–168.
160. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 1960;70:68–78.
161. Reimer KA, Jennings RB. The “wavefront phenomenon” of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* 1979;40:633–644.
162. Lubbe WF, Opie LH. Metabolic basis of increased vulnerability to fibrillation in myocardial ischaemia. *J Mol Cell Cardiol.* 1987;19 Suppl 5:1–3.
163. Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, London RE. Correlation between cytosolic free calcium,

contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res*. 1990;66:135–146.

164. Steenbergen C, Fralix TA, Murphy E. Role of increased cytosolic free calcium concentration in myocardial ischemic injury. *Basic Res Cardiol*. 1993;88:456–470.

165. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282:C227–241.

166. Opie LH. What is new in myocardial ischemia? *Cardiovasc Drugs Ther*. 1990;4 Suppl 4:765–766.

167. Pike MM, Luo CS, Clark MD, Kirk KA, Kitakaze M, Madden MC, Cragoe EJ, Pohost GM. NMR measurements of Na⁺ and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange. *Am J Physiol*. 1993;265:H2017–2026.

168. Imahashi K, Pott C, Goldhaber JJ, Steenbergen C, Philipson KD, Murphy E. Cardiac-specific ablation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*. 2005;97:916–921.

169. Talukder MAH, Zweier JL, Periasamy M. Targeting calcium transport in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res*. 2009;84:345–352.

170. Ivanes F, Mewton N, Rioufol G, Piot C, Elbaz M, Revel D, Croisille P, Ovize M. Cardioprotection in the clinical setting. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2010;24:281–287.

171. Braunwald E. Clinical efforts to reduce myocardial infarct size--the next step. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2011;16:349–353.

172. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev*. 2007;59:418–458.

173. Ito H, Iwakura K, Oh H, Masuyama T, Hori M, Higashino Y, Fujii K, Minamino T. Temporal changes in myocardial perfusion patterns in patients with reperfused anterior wall myocardial infarction. Their relation to myocardial viability. *Circulation*. 1995;91:656–662.

174. Sheiban I, Tonni S, Chizzoni A, Marini A, Trevisani G. Recovery of left ventricular function following early reperfusion in acute myocardial infarction: a potential role for the calcium antagonist

nisoldipine. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1997;11:5–16.

175. Willerson JT, Buja LM. Protection of the myocardium during myocardial infarction: pharmacologic protection during thrombolytic therapy. *Am J Cardiol.* 1990;65:351–411.

176. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res.* 1996;79:949–956.

177. Manning AS, Hearse DJ. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol.* 1984;16:497–518.

178. Wang P, Zweier JL. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem.* 1996;271:29223–29230.

179. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull.* 2004;70:71–86.

180. Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65:1454–1471.

181. Gaertner R, Logeart D, Michel J-B, Mercadier J-J. [Early left ventricular remodelling following acute coronary accident]. *Med Sci MS.* 2004;20:643–650.

182. Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:2023–2039.

183. Willenheimer R. Left ventricular remodelling and dysfunction. Can the process be prevented? *Int J Cardiol.* 2000;72:143–150.

184. Tiyyagura SR, Pinney SP. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: past, present, and future. *Mt Sinai J Med N Y.* 2006;73:840–851.

185. Lamas GA, Pfeffer MA. Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: clinical course and beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Am Heart J.* 1991;121:1194–1202.

186. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation.* 2000;101:2981–2988.

187. Sharpe N. Ventricular remodeling following myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1992;70:20C–26C.
188. Hutchins GM, Bulkley BH. Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1978;41:1127–1132.
189. Roberts CS, Maclean D, Maroko P, Kloner RA. Early and late remodeling of the left ventricle after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1984;54:407–410.
190. Crozatier B, Ross J, Franklin D, Bloor CM, White FC, Tomoike H, McKown DP. Myocardial infarction in the baboon: regional function and the collateral circulation. *Am J Physiol.* 1978;235:H413–421.
191. Eaton LW, Weiss JL, Bulkley BH, Garrison JB, Weisfeldt ML. Regional cardiac dilatation after acute myocardial infarction: recognition by two-dimensional echocardiography. *N Engl J Med.* 1979;300:57–62.
192. Fieno DS, Hillenbrand HB, Rehwald WG, Harris KR, Decker RS, Parker MA, Klocke FJ, Kim RJ, Judd RM. Infarct resorption, compensatory hypertrophy, and differing patterns of ventricular remodeling following myocardial infarctions of varying size. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:2124–2131.
193. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol.* 1978;90:57–70.
194. Richard V, Murry CE, Reimer KA. Healing of myocardial infarcts in dogs. Effects of late reperfusion. *Circulation.* 1995;92:1891–1901.
195. Hillenbrand HB, Sandstede J, Störk S, Ramsayer B, Hahn D, Ertl G, Koestler H, Bauer W, Ritter C. Remodeling of the infarct territory in the time course of infarct healing in humans. *Magma N Y N.* 2011;24:277–284.
196. Abbate A, Biondi-Zoccai GGL, Baldi A. Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling. *J Cell Physiol.* 2002;193:145–153.
197. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990;81:1161–1172.
198. Rutschow S, Li J, Schultheiss H-P, Pauschinger M. Myocardial proteases and matrix

- remodeling in inflammatory heart disease. *Cardiovasc Res.* 2006;69:646–656.
199. Borel JP, Maquart FX. [Molecular mechanisms of wound scarring]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1998;56:11–19.
200. Greiling D, Clark RA. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 7):861–870.
201. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature.* 2008;451:914–918.
202. Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Dewald O, Gersch C, Shan K, Aggeli C, Reardon M, Letsou GV, Espada R, Ramchandani M, Entman ML, Zoghbi WA. Active interstitial remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:1468–1474.
203. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol.* 2001;69:851–859.
204. Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest.* 1975;56:978–985.
205. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation.* 1982;66:1146–1149.
206. Bolli R, Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* 1999;79:609–634.
207. Krause SM, Jacobus WE, Becker LC. Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the postischemic “stunned” myocardium. *Circ Res.* 1989;65:526–530.
208. Valverde CA, Korniyev D, Ferreiro M, Petrosky AD, Mattiazzi A, Escobar AL. Transient Ca²⁺ depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2010;85:671–680.
209. Gao WD, Atar D, Backx PH, Marban E. Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium. Direct evidence for decreased myofilament Ca²⁺

responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle. *Circ Res.* 1995;76:1036–1048.

210. Krug A, Du Mesnil de Rochemont null, Korb G. Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circ Res.* 1966;19:57–62.

211. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The “no-reflow” phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest.* 1974;54:1496–1508.

212. Schofer J, Montz R, Mathey DG. Scintigraphic evidence of the “no reflow” phenomenon in human beings after coronary thrombolysis. *J Am Coll Cardiol.* 1985;5:593–598.

213. Mauri L, Rogers C, Baim DS. Devices for distal protection during percutaneous coronary revascularization. *Circulation.* 2006;113:2651–2656.

214. Mizote I, Ueda Y, Ohtani T, Shimizu M, Takeda Y, Oka T, Tsujimoto M, Hirayama A, Hori M, Kodama K. Distal protection improved reperfusion and reduced left ventricular dysfunction in patients with acute myocardial infarction who had angioscopically defined ruptured plaque. *Circulation.* 2005;112:1001–1007.

215. Schwartz BG, Kloner RA. Coronary no reflow. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52:873–882.

216. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:4651–4655.

217. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43:109–142.

218. Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ, Lefer AM. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res.* 1993;72:403–412.

219. Butler MJ, Chan W, Taylor AJ, Dart AM, Duffy SJ. Management of the no-reflow phenomenon. *Pharmacol Ther.* 2011;132:72–85.

220. Anversa P, Olivetti G, Capasso JM. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1991;68:7D–16D.

221. Volders PG, Willems IE, Cleutjens JP, Arends JW, Havenith MG, Daemen MJ. Interstitial

collagen is increased in the non-infarcted human myocardium after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1993;25:1317–1323.

222. Ieda M, Tsuchihashi T, Ivey KN, Ross RS, Hong T-T, Shaw RM, Srivastava D. Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. *Dev Cell.* 2009;16:233–244.

223. Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ, Slater TF. Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ Res.* 1987;61:757–760.

224. Zweier JL, Talukder MAH. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2006;70:181–190.

225. Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:1404–1407.

226. Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR. The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? *J Mol Cell Cardiol.* 1978;10:641–668.

227. Dixon IM, Kaneko M, Hata T, Panagia V, Dhalla NS. Alterations in cardiac membrane Ca²⁺ transport during oxidative stress. *Mol Cell Biochem.* 1990;99:125–133.

228. Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res.* 2006;71:310–321.

229. Kuster GM, Lancel S, Zhang J, Communal C, Trucillo MP, Lim CC, Pfister O, Weinberg EO, Cohen RA, Liao R, Siwik DA, Colucci WS. Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na⁺-Ca²⁺ exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med.* 2010;48:1182–1187.

230. Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. *Circ Res.* 2005;97:1314–1322.

231. Borutaite V, Morkuniene R, Brown GC. Release of cytochrome c from heart mitochondria is induced by high Ca²⁺ and peroxynitrite and is responsible for Ca(2+)-induced inhibition of substrate oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1453:41–48.

232. Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole.

Cardiovasc Res. 2006;70:191–199.

233. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res.* 2003;93:292–301.

234. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev.* 1999;79:1127–1155.

235. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev.* 2008;88:581–609.

236. Borutaite V, Jekabsone A, Morkuniene R, Brown GC. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35:357–366.

237. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature.* 2001;410:549–554.

238. Chiong M, Wang ZV, Pedrozo Z, Cao DJ, Troncoso R, Ibacache M, Criollo A, Nemchenko A, Hill JA, Lavandero S. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis.* 2011;2:e244.

239. Oerlemans MIFJ, Koudstaal S, Chamuleau SA, de Kleijn DP, Doevendans PA, Sluijter JPG. Targeting cell death in the reperfused heart: pharmacological approaches for cardioprotection. *Int J Cardiol.* 2013;165:410–422.

240. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239–257.

241. Gottlieb RA. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011;16:233–238.

242. Chen-Scarabelli C, Agrawal PR, Saravolatz L, Abuniat C, Scarabelli G, Stephanou A, Loomba L, Narula J, Scarabelli TM, Knight R. The role and modulation of autophagy in experimental models of myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Geriatr Cardiol JGC.* 2014;11:338–348.

243. Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2006;281:29776–29787.
244. Yan L, Vatner DE, Kim S-J, Ge H, Masarekar M, Masover WH, Yang G, Matsui Y, Sadoshima J, Vatner SF. Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:13807–13812.
245. Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, Levine B, Sadoshima J. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res*. 2007;100:914–922.
246. Przyklenk K, Dong Y, Undyala VV, Whittaker P. Autophagy as a therapeutic target for ischaemia /reperfusion injury? Concepts, controversies, and challenges. *Cardiovasc Res*. 2012;94:197–205.
247. Valentim L, Laurence KM, Townsend PA, Carroll CJ, Soond S, Scarabelli TM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. Urocortin inhibits Beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;40:846–852.
248. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Autophagy in ischemic heart disease. *Circ Res*. 2009;104:150–158.
249. Takagi H, Matsui Y, Sadoshima J. The role of autophagy in mediating cell survival and death during ischemia and reperfusion in the heart. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9:1373–1381.
250. Tham YK, Bernardo BC, Ooi JYY, Weeks KL, McMullen JR. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol*. 2015;89:1401–1438.
251. Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA2a gene therapy for heart failure: ready for primetime? *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2008;16:1002–1004.
252. Solaro RJ. Sarcomere control mechanisms and the dynamics of the cardiac cycle. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:105648.
253. Bers DM. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiol Bethesda Md*. 2006;21:380–387.

254. Kawase Y, Ly HQ, Prunier F, Lebeche D, Shi Y, Jin H, Hadri L, Yoneyama R, Hoshino K, Takewa Y, Sakata S, Peluso R, Zsebo K, Gwathmey JK, Tardif J-C, Tanguay J-F, Hajjar RJ. Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:1112–1119.
255. O'Rourke B, Kass DA, Tomaselli GF, Käab S, Tunin R, Marbán E. Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. *Circ Res*. 1999;84:562–570.
256. Bers DM, Morotti S. Ca(2+) current facilitation is CaMKII-dependent and has arrhythmogenic consequences. *Front Pharmacol*. 2014;5:144.
257. Crossman DJ, Ruygrok PN, Ruygrok PR, Soeller C, Cannell MB. Changes in the organization of excitation-contraction coupling structures in failing human heart. *PLoS One*. 2011;6:e17901.
258. Taegtmeyer H, Sen S, Vela D. Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1188:191–198.
259. Kasama S, Furuya M, Toyama T, Ichikawa S, Kurabayashi M. Effect of atrial natriuretic peptide on left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2008;29:1485–1494.
260. Taegtmeyer H. Switching metabolic genes to build a better heart. *Circulation*. 2002;106:2043–2045.
261. Spinale FG. The extracellular matrix: summation. *J Card Fail*. 2002;8:S349–350.
262. López B, González A, Varo N, Laviades C, Querejeta R, Díez J. Biochemical assessment of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Hypertens Dallas Tex 1979*. 2001;38:1222–1226.
263. Cotecchia S, Del Vescovo CD, Colella M, Caso S, Diviani D. The alpha1-adrenergic receptors in cardiac hypertrophy: signaling mechanisms and functional implications. *Cell Signal*. 2015;27:1984–1993.
264. Münzel T, Gori T, Keaney JF, Maack C, Daiber A. Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. *Eur Heart J*. 2015;36:2555–2564.
265. Shearer F, Lang CC, Struthers AD. Renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors in heart

failure. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94:459–467.

266. Buggey J, Mentz RJ, DeVore AD, Velazquez EJ. Angiotensin receptor neprilysin inhibition in heart failure: mechanistic action and clinical impact. *J Card Fail.* 2015;21:741–750.

267. Pamplona R, Portero-Otín M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A, Barja G. Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev.* 2000;112:169–183.

268. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med.* 2002;32:790–796.

269. Lass A, Sohal BH, Weindruch R, Forster MJ, Sohal RS. Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 1998;25:1089–1097.

270. Wolin MS. Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirc N Y N 1994.* 1996;3:1–17.

271. Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr.* 1997;29:89–95.

272. Sanz A, Stefanatos RKA. The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view. *Curr Aging Sci.* 2008;1:10–21.

273. Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr.* 1999;31:347–366.

274. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* 2002;80:780–787.

275. Shiva S, Crawford JH, Ramachandran A, Ceaser EK, Hillson T, Brookes PS, Patel RP, Darley-Usmar VM. Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria. *Biochem J.* 2004;379:359–366.

276. Rossi F, Zatti M. Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia.* 1964;20:21–23.

277. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87:245–313.
278. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327:524–526.
279. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;153:1251–1256.
280. Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev.* 1998;17:7–23.
281. Hall AV, Antoniou H, Wang Y, Cheung AH, Arbus AM, Olson SL, Lu WC, Kau CL, Marsden PA. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *J Biol Chem.* 1994;269:33082–33090.
282. Kishimoto J, Spurr N, Liao M, Lizhi L, Emson P, Xu W. Localization of brain nitric oxide synthase (NOS) to human chromosome 12. *Genomics.* 1992;14:802–804.
283. Robinson LJ, Weremowicz S, Morton CC, Michel T. Isolation and chromosomal localization of the human endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene. *Genomics.* 1994;19:350–357.
284. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993;268:17478–17488.
285. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, Billiar TR, Hutchinson NI, Mudgett JS. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1994;269:6765–6772.
286. Marsden PA, Heng HH, Duff CL, Shi XM, Tsui LC, Hall AV. Localization of the human gene for inducible nitric oxide synthase (NOS2) to chromosome 17q11.2-q12. *Genomics.* 1994;19:183–185.
287. Schmidt HH, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F. Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 1992;40:1439–1456.

288. Schmidt HH, Murad F. Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;181:1372–1377.
289. Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:657–662.
290. Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Lévy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res.* 1998;83:1271–1278.
291. Burger DE, Lu X, Lei M, Xiang F-L, Hammoud L, Jiang M, Wang H, Jones DL, Sims SM, Feng Q. Neuronal nitric oxide synthase protects against myocardial infarction-induced ventricular arrhythmia and mortality in mice. *Circulation.* 2009;120:1345–1354.
292. Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:1788–1792.
293. Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:10480–10484.
294. Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:13176–13181.
295. Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:3375–3378.
296. Indo HP, Yen H-C, Nakanishi I, Matsumoto K-I, Tamura M, Nagano Y, Matsui H, Gusev O, Cornette R, Okuda T, Minamiyama Y, Ichikawa H, Suenaga S, Oki M, Sato T, Ozawa T, Clair DKS, Majima HJ. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J Clin Biochem Nutr.* 2015;56:1–7.
297. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:9782–9787.

298. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 1995;11:376–381.
299. Ding L, Liu Z, Zhu Z, Luo G, Zhao D, Ni J. Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic. *Biochem J.* 1998;332 (Pt 1):251–255.
300. Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci J Virtual Libr.* 1999;4:D339–345.
301. Banerjee M, Vats P. Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biol.* 2014;2:170–177.
302. Mandl J, Szarka A, Bánhegyi G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol.* 2009;157:1097–1110.
303. Sears B, Ricordi C. Role of fatty acids and polyphenols in inflammatory gene transcription and their impact on obesity, metabolic syndrome and diabetes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012;16:1137–1154.
304. Sadowska-Bartosz I, Galiniak S, Bartosz G. Polyphenols protect against protein glycooxidation. *Free Radic Biol Med.* 2014;75 Suppl 1:S47.
305. Dobrian AD, Davies MJ, Schriver SD, Lauterio TJ, Prewitt RL. Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertens Dallas Tex 1979.* 2001;37:554–560.
306. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114:1752–1761.
307. Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, Yamaguchi O, Zhou H, Kawakami S, Ohta Y, Sami M, Tachibana T, Ishikawa H, Kurosawa H, Kahn RC, Otsu K, Shirasawa T. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem.* 2006;281:33789–33801.
308. Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem.* 1998;273:6297–6302.

309. Matsushima S, Ide T, Yamato M, Matsusaka H, Hattori F, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Hasegawa Y, Kurihara T, Oikawa S, Kinugawa S, Tsutsui H. Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2006;113:1779–1786.
310. Barry-Lane PA, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland SM, Yeh ET, Runge MS. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. *J Clin Invest*. 2001;108:1513–1522.
311. Johar S, Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ, Shah AM. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2006;20:1546–1548.
312. Thomas M, Gavrila D, McCormick ML, Miller FJ, Daugherty A, Cassis LA, Dellsperger KC, Weintraub NL. Deletion of p47phox attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2006;114:404–413.
313. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003;111:1201–1209.
314. Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996;97:1916–1923.
315. Sicard P, Oudot A, Guillard J-C, Moreau D, Vergely C, Rochette L. Dissociation between vascular oxidative stress and cardiovascular function in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Vascul Pharmacol*. 2006;45:112–121.
316. Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:9220–9225.
317. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;105:1656–1662.

318. Janssens S, Pokreisz P, Schoonjans L, Pellens M, Vermeersch P, Tjwa M, Jans P, Scherrer-Crosbie M, Picard MH, Szelid Z, Gillijns H, Van de Werf F, Collen D, Bloch KD. Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction. *Circ Res*. 2004;94:1256–1262.
319. Xu J, Xie Z, Reece R, Pimental D, Zou M-H. Uncoupling of endothelial nitric oxidase synthase by hypochlorous acid: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide and peroxynitrite. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2688–2695.
320. Düzgünçinar O, Yavuz B, Hazirolan T, Deniz A, Tokgözoğlu SL, Akata D, Demirpençe E. Plasma myeloperoxidase is related to the severity of coronary artery disease. *Acta Cardiol*. 2008;63:147–152.
321. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*. 1987;76:44–51.
322. Kotlyar E, Vita JA, Winter MR, Awtry EH, Siwik DA, Keaney JF, Sawyer DB, Cupples LA, Colucci WS, Sam F. The relationship between aldosterone, oxidative stress, and inflammation in chronic, stable human heart failure. *J Card Fail*. 2006;12:122–127.
323. Nève J. Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Risk*. 1996;3:42–47.
324. Sattler W, Maiorino M, Stocker R. Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and Ebselen (PZ 51). *Arch Biochem Biophys*. 1994;309:214–221.
325. Salonen JT, Alfthan G, Huttunen JK, Pikkarainen J, Puska P. Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study. *Lancet Lond Engl*. 1982;2:175–179.
326. Virtamo J, Valkeila E, Alfthan G, Punsar S, Huttunen JK, Karvonen MJ. Serum selenium and the risk of coronary heart disease and stroke. *Am J Epidemiol*. 1985;122:276–282.
327. Lei XG, Cheng W-H. New roles for an old selenoenzyme: evidence from glutathione peroxidase-1 null and overexpressing mice. *J Nutr*. 2005;135:2295–2298.
328. McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk DJ, Langlais P, Liu F, Lei XG. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S*

A. 2004;101:8852–8857.

329. Hill KE, Burk RF. Selenoprotein P: recent studies in rats and in humans. *Biomed Environ Sci BES*. 1997;10:198–208.

330. Hondal RJ, Ma S, Caprioli RM, Hill KE, Burk RF. Heparin-binding histidine and lysine residues of rat selenoprotein P. *J Biol Chem*. 2001;276:15823–15831.

331. Curran JE, Jowett JBM, Elliott KS, Gao Y, Gluschenko K, Wang J, Abel Azim DM, Cai G, Mahaney MC, Comuzzie AG, Dyer TD, Walder KR, Zimmet P, MacCluer JW, Collier GR, Kissebah AH, Blangero J. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat Genet*. 2005;37:1234–1241.

332. Gao Y, Feng HC, Walder K, Bolton K, Sunderland T, Bishara N, Quick M, Kantham L, Collier GR. Regulation of the selenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress - SelS is a novel glucose-regulated protein. *FEBS Lett*. 2004;563:185–190.

333. Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*. 2006;439:484–489.

334. Canani LH, Capp C, Dora JM, Meyer ELS, Wagner MS, Harney JW, Larsen PR, Gross JL, Bianco AC, Maia AL. The type 2 deiodinase A/G (Thr92Ala) polymorphism is associated with decreased enzyme velocity and increased insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:3472–3478.

335. Pucheu S. Contribution a l'étude des manifestations physiopathologiques liées au stress oxydatif intervenant lors de la reperfusion du myocarde ischémique : rôle des oligoéléments et essais de protection par des molécules antioxydantes. 1994;

336. Lafont A, Marwick TH, Chisolm GM, Van Lente F, Vaska KJ, Whitlow PL. Decreased free radical scavengers with reperfusion after coronary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 1996;131:219–223.

337. Takahashi K, Newburger PE, Cohen HJ. Glutathione peroxidase protein. Absence in selenium deficiency states and correlation with enzymatic activity. *J Clin Invest*. 1986;77:1402–1404.

338. Hill MF, Singal PK. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure

subsequent to myocardial infarction. *Circulation*. 1997;96:2414–2420.

339. Toufektsian MC, Boucher F, Pucheu S, Tanguy S, Ribuoat C, Sanou D, Tresallet N, de Leiris J. Effects of selenium deficiency on the response of cardiac tissue to ischemia and reperfusion. *Toxicology*. 2000;148:125–132.

340. Tanguy S, Boucher F, Besse S, Ducros V, Favier A, de Leiris J. Trace elements and cardioprotection: increasing endogenous glutathione peroxidase activity by oral selenium supplementation in rats limits reperfusion-induced arrhythmias. *J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS*. 1998;12:28–38.

341. Venardos K, Harrison G, Headrick J, Perkins A. Selenium supplementation and ischemia-reperfusion injury in rats. *Redox Rep Commun Free Radic Res*. 2004;9:317–320.

342. Poltronieri R, Cevese A, Sbarbati A. Protective effect of selenium in cardiac ischemia and reperfusion. *Cardioscience*. 1992;3:155–160.

343. Tanguy S, Boucher F, Besse S, Ducros V, Favier A, de Leiris J. Trace elements and cardioprotection: increasing endogenous glutathione peroxidase activity by oral selenium supplementation in rats limits reperfusion-induced arrhythmias. *J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS*. 1998;12:28–38.

344. Friedmann T, Roblin R. Gene therapy for human genetic disease? *Science*. 1972;175:949–955.

345. Miller AD, Jolly DJ, Friedmann T, Verma IM. A transmissible retrovirus expressing human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT): gene transfer into cells obtained from humans deficient in HPRT. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80:4709–4713.

346. Wade N. UCLA gene therapy racked by friendly fire. *Science*. 1980;210:509–511.

347. Beutler E. The Cline affair. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2001;4:396–397.

348. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*. 1990;323:570–578.

349. Culver KW, Osborne WR, Miller AD, Fleisher TA, Berger M, Anderson WF, Blaese RM.

Correction of ADA deficiency in human T lymphocytes using retroviral-mediated gene transfer. *Transplant Proc.* 1991;23:170–171.

350. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science.* 1995;270:475–480.

351. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao G, Wilson JM, Batshaw ML. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab.* 2003;80:148–158.

352. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nussbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* 2000;288:669–672.

353. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval J-L, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 2003;348:255–256.

354. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene.* 2013;525:162–169.

355. Bryant LM, Christopher DM, Giles AR, Hinderer C, Rodriguez JL, Smith JB, Traxler EA, Tycko J, Wojno AP, Wilson JM. Lessons learned from the clinical development and market authorization of Glybera. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2013;24:55–64.

356. Smith KR. Gene Therapy: The Potential Applicability of Gene Transfer Technology to the Human Germline. *Int J Med Sci.* 2004;1:76–91.

357. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J Gene Med.* 2013;15:65–77.

358. Lentz TB, Gray SJ, Samulski RJ. Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiol Dis.* 2012;48:179–188.

359. Cronin J, Zhang X-Y, Reiser J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther.* 2005;5:387–398.

360. Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res.* 2012;1:27.
361. Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2010;58:107–119.
362. Kamimura K, Suda T, Zhang G, Liu D. Advances in Gene Delivery Systems. *Pharm Med.* 2011;25:293–306.
363. Sharma A, Li X, Bangari DS, Mittal SK. Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. *Virus Res.* 2009;143:184–194.
364. Kostense S, Koudstaal W, Sprangers M, Weverling GJ, Penders G, Helmus N, Vogels R, Bakker M, Berkhout B, Havenga M, Goudsmit J. Adenovirus types 5 and 35 seroprevalence in AIDS risk groups supports type 35 as a vaccine vector. *AIDS Lond Engl.* 2004;18:1213–1216.
365. Wilson JM. Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Hum Gene Ther.* 2005;16:1014–1015.
366. Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science.* 1965;149:754–756.
367. Hoggan MD, Blacklow NR, Rowe WP. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1966;55:1467–1474.
368. Zinn E, Vandenberghe LH. Adeno-associated virus: fit to serve. *Curr Opin Virol.* 2014;8:90–97.
369. Dismuke DJ, Tenenbaum L, Samulski RJ. Biosafety of recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr Gene Ther.* 2013;13:434–452.
370. Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:583–593.
371. Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu Rev Virol.* 2014;1:427–451.
372. Sonntag F, Schmidt K, Kleinschmidt JA. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:10220–10225.

373. Hermonat PL, Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:6466–6470.
374. Tratschin JD, West MH, Sandbank T, Carter BJ. A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase. *Mol Cell Biol*. 1984;4:2072–2081.
375. Penaud-Budloo M, Le Guiner C, Nowrouzi A, Toromanoff A, Chérel Y, Chenuaud P, Schmidt M, von Kalle C, Rolling F, Moullier P, Snyder RO. Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *J Virol*. 2008;82:7875–7885.
376. Kay MA. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet*. 2011;12:316–328.
377. Kaepfel C, Beattie SG, Fronza R, van Logtenstein R, Salmon F, Schmidt S, Wolf S, Nowrouzi A, Glimm H, von Kalle C, Petry H, Gaudet D, Schmidt M. A largely random AAV integration profile after LPD gene therapy. *Nat Med*. 2013;19:889–891.
378. Peters-Silva H, Linden R. Advances in recombinant adeno-associated viral vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther*. 2013;13:335–345.
379. McCarty DM. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2008;16:1648–1656.
380. Donsante A, Miller DG, Li Y, Vogler C, Brunt EM, Russell DW, Sands MS. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science*. 2007;317:477.
381. Li H, Malani N, Hamilton SR, Schlachterman A, Bussadori G, Edmonson SE, Shah R, Arruda VR, Mingozzi F, Wright JF, Bushman FD, High KA. Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood*. 2011;117:3311–3319.
382. Gauttier V, Pichard V, Aubert D, Kaepfel C, Schmidt M, Ferry N, Conchon S. No tumour-initiating risk associated with scAAV transduction in newborn rat liver. *Gene Ther*. 2013;20:779–784.
383. Nowrouzi A, Penaud-Budloo M, Kaepfel C, Appelt U, Le Guiner C, Moullier P, von Kalle C, Snyder RO, Schmidt M. Integration frequency and intermolecular recombination of rAAV vectors in non-human primate skeletal muscle and liver. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2012;20:1177–1186.

384. Chandler RJ, LaFave MC, Varshney GK, Trivedi NS, Carrillo-Carrasco N, Senac JS, Wu W, Hoffmann V, Elkahloun AG, Burgess SM, Venditti CP. Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J Clin Invest*. 2015;125:870–880.
385. Wagner JA, Messner AH, Moran ML, Daifuku R, Kouyama K, Desch JK, Manley S, Norbash AM, Conrad CK, Friborg S, Reynolds T, Guggino WB, Moss RB, Carter BJ, Wine JJ, Flotte TR, Gardner P. Safety and biological efficacy of an adeno-associated virus vector-cystic fibrosis transmembrane regulator (AAV-CFTR) in the cystic fibrosis maxillary sinus. *The Laryngoscope*. 1999;109:266–274.
386. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EGD, Rosales C, Chowdary P, McIntosh J, Della Peruta M, Lheriteau E, Patel N, Raj D, Riddell A, Pie J, Rangarajan S, Bevan D, Recht M, Shen Y-M, Halka KG, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Allay J, Kay MA, Ng CYC, Zhou J, Cancio M, Morton CL, Gray JT, Srivastava D, Nienhuis AW, Davidoff AM. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2014;371:1994–2004.
387. Vinge LE, Raake PW, Koch WJ. Gene therapy in heart failure. *Circ Res*. 2008;102:1458–1470.
388. Naim C, Yerevanian A, Hajjar RJ. Gene therapy for heart failure: where do we stand? *Curr Cardiol Rep*. 2013;15:333.
389. Hajjar RJ. Potential of gene therapy as a treatment for heart failure. *J Clin Invest*. 2013;123:53–61.
390. Banquet S, Gomez E, Nicol L, Edwards-Lévy F, Henry J-P, Cao R, Schapman D, Dautreux B, Lallemand F, Bauer F, Cao Y, Thuillez C, Mulder P, Richard V, Brakenhielm E. Arteriogenic therapy by intramyocardial sustained delivery of a novel growth factor combination prevents chronic heart failure. *Circulation*. 2011;124:1059–1069.
391. Chen Z-Y, Lin Y, Yang F, Jiang L, Ge S ping. Gene therapy for cardiovascular disease mediated by ultrasound and microbubbles. *Cardiovasc Ultrasound*. 2013;11:11.
392. Ho D, Yan L, Iwatsubo K, Vatner DE, Vatner SF. Modulation of beta-adrenergic receptor signaling in heart failure and longevity: targeting adenylyl cyclase type 5. *Heart Fail Rev*. 2010;15:495–512.
393. Kairouz V, Lipskaia L, Hajjar RJ, Chemaly ER. Molecular targets in heart failure gene therapy: current controversies and translational perspectives. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1254:42–50.

394. Rengo G, Lympopoulos A, Leosco D, Koch WJ. GRK2 as a novel gene therapy target in heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50:785–792.
395. Rengo G, Lympopoulos A, Zincarelli C, Donniacuo M, Soltys S, Rabinowitz JE, Koch WJ. Myocardial adeno-associated virus serotype 6-betaARKct gene therapy improves cardiac function and normalizes the neurohormonal axis in chronic heart failure. *Circulation.* 2009;119:89–98.
396. Moritz F, Monteil C, Isabelle M, Bauer F, Renet S, Mulder P, Richard V, Thuillez C. Role of reactive oxygen species in cocaine-induced cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2003;59:834–843.
397. Vergeade A, Mulder P, Vendeville-Dehaut C, Estour F, Fortin D, Ventura-Clapier R, Thuillez C, Monteil C. Mitochondrial impairment contributes to cocaine-induced cardiac dysfunction: Prevention by the targeted antioxidant MitoQ. *Free Radic Biol Med.* 2010;49:748–756.
398. Fang Y, Debunne M, Vercauteren M, Brakenhielm E, Richard V, Lallemand F, Henry J-P, Mulder P, Thuillez C. Heart rate reduction induced by the if current inhibitor ivabradine improves diastolic function and attenuates cardiac tissue hypoxia. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2012;59:260–267.
399. Dedkov EI, Zheng W, Christensen LP, Weiss RM, Mahlberg-Gaudin F, Tomanek RJ. Preservation of coronary reserve by ivabradine-induced reduction in heart rate in infarcted rats is associated with decrease in perivascular collagen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H590–598.
400. Bashar T, Akhter N. Study on oxidative stress and antioxidant level in patients of acute myocardial infarction before and after regular treatment. *Bangladesh Med Res Counc Bull.* 2014;40:79–84.
401. Hamieh A, Cartier D, Abid H, Calas A, Burel C, Bucharles C, Jehan C, Grumolato L, Landry M, Lerouge P, Anouar Y, Lihmann I. Selenoprotein T is a novel OST subunit that regulates UPR signaling and hormone secretion. *EMBO Rep.* 2017;18:1935–1946.
402. Boukhzar L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, Alsharif I, Castex M, Arabo A, El Hajji S, Bonnet J-J, Errami M, Falluel-Morel A, Chagraoui A, Lihmann I, Anouar Y. Selenoprotein T Exerts an Essential Oxidoreductase Activity That Protects Dopaminergic Neurons in Mouse Models of Parkinson's Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2016;24:557–574.
403. Castex MT, Arabo A, Bénard M, Roy V, Le Joncour V, Prévost G, Bonnet J-J, Anouar Y, Falluel-

Morel A. Selenoprotein T Deficiency Leads to Neurodevelopmental Abnormalities and Hyperactive Behavior in Mice. *Mol Neurobiol.* 2016;53:5818–5832.

404. Li F, Liu J, Rozovsky S. Glutathione peroxidase's reaction intermediate selenenic acid is stabilized by the protein microenvironment. *Free Radic Biol Med.* 2014;76:127–135.

ANNEXES

Aldosterone Target NGAL (Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin) Is Involved in Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction Through NFκB Pathway

Ernesto Martínez-Martínez, Mathieu Buonafine, Ines Boukhalifa, Jaime Ibarrola, Amaya Fernández-Celis, Peter Kolkhof, Patrick Rossignol, Nicolas Girerd, Paul Mulder, Natalia López-Andrés, Antoine Ouvrard-Pascaud,* Frédéric Jaisser*

See Editorial Commentary, pp xxx–xxx

Abstract—Myocardial infarction (MI) is accompanied by cardiac fibrosis, which contributes to cardiac dysfunction. Mineralocorticoid receptor (MR) antagonists have beneficial effects in patients with left ventricular (LV) dysfunction after MI. We herein investigated the role of the MR target NGAL (neutrophil gelatinase–associated lipocalin) in post-MI cardiac damages. Both higher baseline NGAL and a greater increase in serum NGAL levels during follow-up were significantly associated with lower 6-month LV ejection fraction recovery in a cohort of 119 post-MI patients, as assessed by cardiac magnetic resonance imaging. NGAL protein levels increased in the LV at 7 days post-MI in wild-type mice with MI. This effect was prevented by treatment with the nonsteroidal MR antagonist finerenone (1 mg/kg per day). NGAL knockout mice with MI had lower LV interstitial fibrosis and inflammation, better LV contractility and compliance, and greater stroke volume and cardiac output than wild-type mice with MI at 3 months post-MI. Aldosterone (10^{-8} mol/L) increased NGAL expression in cultured human cardiac fibroblasts. Cells treated with aldosterone or NGAL (500 ng/mL) showed increased production of collagen type I. The effects of aldosterone were abolished by finerenone (10^{-6} mol/L) or NGAL knockdown. This NGAL-mediated activity relied on NFκB (nuclear factor-κB) activation, confirmed by the use of the NFκB-specific inhibitor BAY11-7082, which prevented the effect of both aldosterone and NGAL on collagen type I production. In conclusion, NGAL, a downstream MR activation target, is a key mediator of post-MI cardiac damage. NGAL may be a potential therapeutic target in cardiovascular pathological situations in which MR is involved. (*Hypertension*. 2017;70:00-00. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09791.) • [Online Data Supplement](#)

Key Words: aldosterone ■ fibrosis ■ inflammation ■ mineralocorticoid receptor ■ myocardial infarction ■ NGAL

Myocardial infarction (MI) is increasing worldwide and is a major cause of death in industrialized countries, with ≈25% of patients developing congestive heart failure (HF).¹ MI is associated with adverse left ventricular (LV) remodeling, involving cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibrosis, which together contribute to alterations in cardiac architecture and ischemic HF.² Identification of novel therapeutic targets to reduce cardiac remodeling, post-infarct, is a current challenge.

Aldosterone, via activation of the mineralocorticoid receptor (MR), is a key regulator of blood pressure and electrolytic balance.³ It plays an important role in cardiac remodeling via the MR, promoting inflammation, fibrosis, and hypertrophy.^{4–6}

Previous studies have demonstrated the beneficial effects of MR antagonists (MRAs) in preclinical models of MI⁷ and in patients with HF after MI. The EPHEMUS (Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study)⁸ reported that the addition of eplerenone to standard medical therapy improved survival in patients with LV dysfunction after MI. The beneficial effects of MRAs, post-MI, have also been demonstrated in patients without HF.⁹ A recent study has demonstrated that a nonsteroidal MRA, finerenone, improved LV and coronary function post-MI.¹⁰ Despite accumulating evidence that MRAs are beneficial in MI, a better understanding of the underlying mechanism

Received May 29, 2017; first decision June 19, 2017; revision accepted September 4, 2017.

From the INSERM, UMRS 1138, Team 1, Centre de Recherche des Cordeliers, Pierre et Marie Curie University, Paris Descartes University, France (E.M.-M., M.B., F.J.); Inserm U1096, UFR Médecine-Pharmacie, Rouen, France (I.B., P.M., A.O.-P.); Cardiovascular Translational Research, Navarrabiomed (Miguel Servet Foundation), Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona, Spain (J.L., A.F.-C., N.L.-A.); Cardiology Research, BAYER AG, Wuppertal, Germany (P.K.); and INSERM, Centre d'Investigations Cliniques-Plurithématique 1433, UMR 1116 Université de Lorraine, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy, French-Clinical Research Infrastructure Network (F-CRIN) INI-CRCT, France (P.R., N.G., N.L.-A., F.J.).

*These authors contributed equally to this work.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://hyper.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09791/-DC1>.

Correspondence to Frédéric Jaisser, INSERM U1138, Centre de Recherche de Cordeliers, Team 1, 15 rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France. E-mail frederic.jaisser@inserm.fr

© 2017 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://hyper.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09791

linking MR activation and its impact on MI is critical and may help to identify new biotargets in MI.

Lcn2 (lipocalin 2), also known in humans as NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) or oncogene 24p3, was previously identified as a novel MR target in the cardiovascular system.^{11–13} NGAL is a 25 kDa glycoprotein belonging to the lipocalin superfamily.^{14,15} In a recent study from our group, we demonstrated that NGAL plays a key role in blood pressure and cardiovascular extracellular matrix remodeling after MR activation. Genetic NGAL inactivation in mice blunted hypertension and vascular fibrosis induced by aldosterone/salt challenge.¹² We hypothesized that the MR target NGAL is a key factor in the development of cardiac fibrosis and cardiac dysfunction induced by MI, as MR activation is associated with deleterious effects in MI.

We studied the direct effects of NGAL on cardiac function and extracellular matrix remodeling by combining a clinical survey of NGAL serum levels in a cohort of post-MI patients and preclinical studies in NGAL knockout (KO) mice subjected to left coronary artery ligations. We explored underlying mechanisms in primary cultures of human cardiac fibroblasts, one of the major cellular components of the heart.

Methods

Detailed methods are available in the [online-only Data Supplement](#).

Post-MI Cohort

The study population comprised 119 patients who were successfully reperfused after a first acute ST-segment-elevation myocardial infarction, included in a prospective monocentric cohort study (REMI Study [Relation Between Aldosterone and Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction]), and performed in a university hospital between April 2010 and December 2013.¹⁶ Patients underwent cardiac magnetic resonance during the first 4 days of the acute event and at the 6-month follow-up. The study was approved by an institutional review committee, and the subjects gave informed consent. It was sponsored by the Nancy Centre Hospitalier Régional Universitaire.

Myocardial Infarction

Experiments conformed to the 2010/63 directive of the European Union and the *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* of the US National Institute of Health (No. 85-23). Left coronary artery ligations were performed in 8-week-old male NGAL KO C57BL/6J mice with MI (NGAL KO-MI; n=6–13) and wild-type littermates with MI (WT-MI; n=6–13) under anesthesia (3.6 mg/kg xylazine, intraperitoneal, plus 2% isoflurane). Analgesia was induced using buprenorphine (0.05 mg/kg, subcutaneous) just after induction of anesthesia and after 6, 12, 24, and 48 hours after coronary artery ligation. The snare was not tied for sham-operated mice (WT-Sham; n=6–9). Finerenone (1 mg/kg per day) was administered as a food additive for 7 days, starting the day after MI.

Cell Culture

Human cardiac fibroblasts were obtained from Promocell and maintained in medium (Fibroblast Media 3). Cells were cultured according to the manufacturer's instructions and used between passages 5 and 7. Cells were stimulated with aldosterone (10^{-8} mol/L; Sigma), finerenone (10^{-6} mol/L; Bayer), or recombinant human NGAL (hNGAL; 500 ng/mL; R&D Systems) for 24 hours for protein analysis. The doses were chosen based on previous studies.^{6,12}

For the study of the intracellular pathways, cells were treated with recombinant hNGAL for 5, 10, 30, and 60 minutes. The chemical inhibitors PD98059 (Sigma Aldrich) and BAY 11-7082 (Sigma Aldrich) were added at 10^{-5} mol/L 1 hour before NGAL stimulation.

Statistics

Data are presented as the means±SEM. Student *t* test (2-tailed) was used to compare paired groups of independent samples. ANOVA with Bonferroni adjustment for post hoc tests was used for multiple comparisons.

Continuous data from the REMI cohort are presented either as the means±SD or the median (25–75 percentile). A paired *t* test was used to compare values obtained at baseline and 6 months. The associations between baseline NGAL levels and changes in NGAL levels with LV ejection fraction (LVEF) recovery were evaluated using multivariable linear regression models. The outcome variable of this model was the change in the LVEF between baseline and 6 months, expressed as a continuous variable. Thus, a positive β value provided by the linear regression model indicates greater LVEF recovery (ie, an increased LVEF within 6 months of the baseline evaluation). Adjustment variables were selected a priori based on their known association with post-MI remodeling.

Data analysis was performed using GraphPad Prism V6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA) Software Inc and SAS version 9.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC). The predetermined significance level was $P < 0.05$.

Results

NGAL Is Associated With Lower LVEF Recovery in Patients After MI

The study group consisted of 119 post-MI patients: 56±10 years old, 85.7% men, Killip class 2 to 3 9.2%, baseline median B-type natriuretic peptide 152 pg/mL (80–257), and loop diuretics at baseline 2.1%. Overall, NGAL levels remained stable during follow-up (71.6 ng/mL [60.3–91.3 ng/mL] at baseline versus 71.7 ng/mL [55.9–89.0 ng/mL] at 6 months [$P=0.35$]), and the LVEF rose from 42±8% to 49±9% ($P<0.001$). In multivariable linear regression adjusted for anterior myocardial location, baseline B-type natriuretic peptide, baseline infarct size, and baseline LVEF, both higher baseline serum NGAL levels (β per 10 ng/mL increase=−0.82±0.25; $P=0.001$) and a larger increase in serum NGAL levels during follow-up (β per 10 ng/mL increase=−0.82±0.22; $P=0.0003$) were significantly associated with lower recovery of LVEF after 6 months, evaluated by cardiac magnetic imaging (Table 1).

Inactivation of NGAL Improves LV Function and Cardiac Remodeling in MI

We investigated the role of NGAL in the recovery of LV function and cardiac remodeling after MI in mice by inducing MI in NGAL KO mice and WT littermates. Of note, all functional and histological parameters were similar between WT-Sham and NGAL KO-Sham mice (Table 1 in the [online-only Data Supplement](#)). We measured a 1.7-fold increase in cardiac NGAL protein levels at 7 days post-MI in WT mice (Figure S1) and aldosterone plasma levels in WT-MI mice (572.8±6.9 pg/mL) when compared with WT-Sham mice (416.7±6.9 pg/mL; $P<0.05$). Echocardiography showed that WT-MI mice at 7 days post-MI displayed greater LV end-systolic and end-diastolic diameters than sham-operated (WT-Sham) mice, together with reduced fractional shortening without modifications in stroke volume or in cardiac output. NGAL KO-MI mice partly blunted the modifications in LV diameters observed in WT-MI mice (Table 2). Infarct size was similar between WT-MI and NGAL KO-MI (%: WT-MI 34±3, n=9 versus NGAL KO-MI 39±4, n=8; nonsignificant).

Table 1. Linear Regression Evaluating the Association of NGAL Levels With LVEF Recovery Assessed by Cardiac Magnetic Resonance in 119 Patients After Myocardial Infarction

Variables	Univariable		Adjusted on ST Segment		Multivariable	
	$\beta \pm \text{SD}$	P Value	$\beta \pm \text{SD}$	P Value	$\beta \pm \text{SD}$	P Value
NGAL changes (per 10 ng/mL)	-0.78 \pm 0.20	0.0002	-0.82 \pm 0.20	<.0001	-0.82 \pm 0.22	0.0003
Baseline NGAL (per 10 ng/mL)	-0.68 \pm 0.24	0.0046	-0.76 \pm 0.24	0.0016	-0.82 \pm 0.25	0.001
Anterior ST segment			-2.307 \pm 1.140	0.0453	-2.591 \pm 1.204	0.0336
BNP at v1 (per 10 pg/mL)					0.05 \pm 0.04	0.2381
Total infarct size at v1 (per 1 %)					-0.060 \pm 0.046	0.2028
LVEF at v1 (%)	-0.239 \pm 0.066	0.0005	-0.264 \pm 0.067	0.0001	-0.273 \pm 0.079	0.0008

BNP indicates B-type natriuretic peptide; NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin; and LVEF, left ventricular ejection fraction.

Echocardiography data 3 months post-MI showed that WT-MI mice displayed greater LV end-systolic and LV end-diastolic diameters than WT-Sham, together with reduced fractional shortening (Table 2). This was accompanied by decreased stroke volume and reduced cardiac output in the WT-MI mice. NGAL KO-MI mice had a lower LV end-systolic diameter, with a trend toward better fractional shortening, than WT-MI mice, participating in the improvement of both stroke volume and cardiac output at 3 months post-MI (Table 2).

Table 2. LV Remodeling and Functional Parameters 3 Months After Myocardial Infarction

Parameter	WT-Sham	WT-MI	NGAL KO-MI
Infarct size, %	...	34 \pm 3	39 \pm 4
SBP, mm Hg	86.6 \pm 1.9	83.6 \pm 4.4	85.8 \pm 3.5
DBP, mm Hg	51.7 \pm 5.5	58.5 \pm 3.28	57.1 \pm 2.2
LVEDD, mm	2.14 \pm 0.12	4.84 \pm 0.16*†	4.01 \pm 0.33‡
LVEDD, mm	3.37 \pm 0.08	5.80 \pm 0.14*†	5.28 \pm 0.32
FS, %	36.6 \pm 2.5	16.7 \pm 1.4*†	24.4 \pm 3.4
Heart rate, bpm	429 \pm 17	415 \pm 10	389 \pm 13
Stroke volume, mL/beat	0.092 \pm 0.003	0.069 \pm 0.003†	0.094 \pm 0.009§
Cardiac output, mL/min	39.4 \pm 1.8	28.9 \pm 1.4†	36.6 \pm 3.5‡
+dP/dt, mm Hg/s	5219 \pm 528	3747 \pm 412*	4958 \pm 257‡
-dP/dt, mm Hg/s	-4873 \pm 550	-2807 \pm 358†	-3864 \pm 320‡
BW, g	34.0 \pm 0.7	31.1 \pm 0.8*	31.3 \pm 0.5*
HW/TL, mg/mm	8.54 \pm 0.41	11.32 \pm 0.56†	9.89 \pm 0.38
LWV/TL, mg/mm	6.25 \pm 0.30	8.37 \pm 0.34†	7.13 \pm 0.27

BW indicates body weight; DBP, diastolic blood pressure; +dP/dt, the first derivative of LV pressure rise over time; -dP/dt, the first derivative of LV pressure decline over time; FS, fractional shortening; HW, heart weight; KO, knockout; LV, left ventricle; LVEDD, LV end-diastolic diameters; LVEDD, LV end-systolic diameters; LWV, left ventricular weight; MI, myocardial infarction; NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin; SBP, systolic blood pressure; TL, tibia length; and WT, wild type.

* $P < 0.05$.

† $P < 0.01$ vs WT-Sham.

‡ $P < 0.05$.

§ $P < 0.01$ vs WT-MI.

Three months post-MI, LV hemodynamic studies showed that the dP/dt_{max} and dP/dt_{min} rates of LV pressure rise and fall, taken as indices of global LV contractility and diastolic function, were negatively altered in WT-MI versus WT-Sham mice, but were much less strongly affected in NGAL KO-MI mice (Table 2). LV pressure-volume curves showed that there were no modification of LV end-systolic pressure (Figure 1A) and no significant increase in LV end-diastolic pressure, that is, LV filling pressure, in the NGAL KO-MI mice relative to WT-Sham mice (Figure 1B). However, WT-MI mice had a lower LV end-systolic pressure-volume relation (Figure 1A) and higher LV end-diastolic pressure-volume relation than WT-Sham mice (Figure 1B), indicating impaired LV contractility and compliance, respectively. Again, both LV contractility and compliance were better in NGAL KO-MI than WT-MI mice (Figure 1A and 1B).

Improvements in LV function were sustained by improvements in LV remodeling at 3 months post-MI: LV weight was higher for WT-MI than WT-Sham mice, whereas there was no increase in NGAL KO-MI mice (Table 2). WT-MI mice presented and increase in myocyte cross-sectional area and the hypertrophic marker atrial natriuretic peptide (Figure S2) when compared with WT-Sham mice, effects not prevented in NGAL KO mice. Furthermore, the increase in interstitial myocardial fibrosis observed in WT-MI mice was markedly reduced in NGAL KO-MI mice (Figure 1C). WT-MI mice presented an increase in cardiac α -SMA (α -smooth muscle actin) protein levels, an effect not observed in NGAL KO-MI mice (Figure S3).

In addition, WT-MI mice showed an increase in several inflammatory markers such as IL-6 (interleukin-6; Figure S4A), CD3 (Figure S4B), CD45 (Figure S4C), CD68 (Figure S4D), and CD80 (Figure S4E) when compared with WT-Sham mice at 3 months post-MI. The increase in proinflammatory markers, except CD45, was prevented in NGAL KO-MI mice (Figure S4).

NGAL Mediates the Effects of Aldosterone in Human Cardiac Fibroblasts

We next investigated the role of NGAL in aldosterone-mediated effects in human cardiac fibroblasts. Aldosterone induced NGAL protein synthesis in human cardiac fibroblasts (Figure 2A) and enhanced the secretion of collagen type I (Figure 2B) after 24 hours of stimulation. These effects were prevented by the MRA finerenone (Figure 2A and 2B).

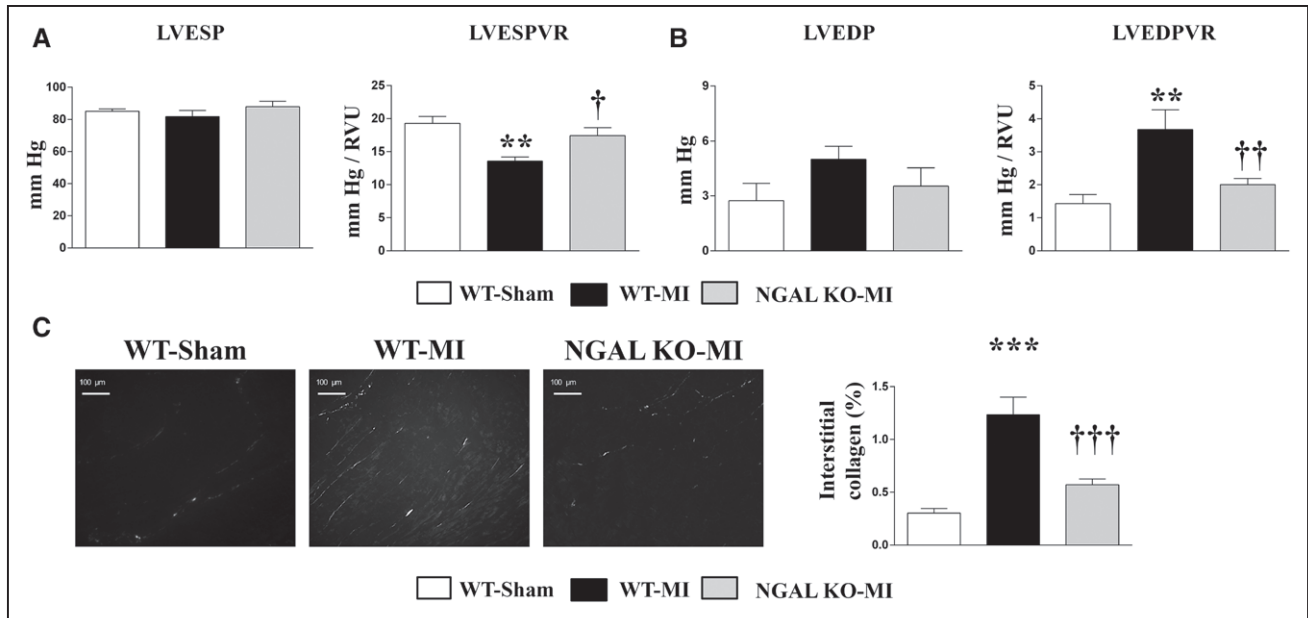


Figure 1. NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) deletion improves hemodynamics and reduces cardiac fibrosis 3 mo after myocardial infarction (MI). Left ventricular end-systolic pressure (LVESP) and pressure–volume relationship (LVESPVR; **A**) and LV end-diastolic pressure (LVEDP) and pressure–volume relationship (LVEDPVR; **B**) in sham-operated mice (WT-Sham), wild-type mice with myocardial infarction (WT-MI), and NGAL knockout mice with MI (NGAL KO-MI). Representative microphotographs and quantification of interstitial fibrosis in WT-Sham, WT-MI, and NGAL KO-MI mice (**C**). Histogram bars represent the mean \pm SEM. *** P <0.01; **** P <0.001 vs WT-Sham; † P <0.05; †† P <0.01; ††† P <0.001 vs WT-MI.

Increased cardiac NGAL expression in MI was also blunted by finerenone treatment in vivo (Figure S1). We studied the direct effect of NGAL on collagen production by treating human cardiac fibroblasts with recombinant hNGAL (500 ng/mL) for 24 hours. Human-NGAL induced an increase in collagen type I (Figure 2C) and collagen type III (Figure 2D) protein levels. These data indicate that NGAL has direct profibrotic effects in human cardiac fibroblasts.

Aldosterone also induced collagen type I (Figure 2E), but not collagen type III production in human cardiac fibroblasts (Figure 2F). We performed NGAL silencing experiments to investigate the role of NGAL in these aldosterone-mediated effects. siRNA-mediated downexpression of NGAL prevented the aldosterone-induced increase in collagen type I levels (Figure 2E). Altogether, these data suggest that NGAL may directly control collagen production in MI and that aldosterone/MR-mediated NGAL expression may be involved in the MR-mediated deleterious effects that are prevented by finerenone in MI.¹⁰

NF κ B Mediates the Profibrotic Actions of NGAL

We then investigated the intracellular mechanism by which NGAL exerts its profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. Recombinant hNGAL induced the phosphorylation of ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2; Figure 3A) and NF κ B (nuclear factor- κ B) after 5 minutes of stimulation (Figure 3B), whereas phosphorylation of STAT-3 (signal transducer and activator of transcription-3) was not altered (Figure 3C). The addition of PD98059, a specific inhibitor of ERK 1/2, was unable to block the hNGAL-mediated increase in collagen type I protein levels (Figure 3D). In contrast, pretreatment with BAY 11-7082, a specific NF κ B pathway inhibitor, blocked the increase in collagen type I

protein levels induced by hNGAL (Figure 3E), highlighting the role of NF κ B in the profibrotic effect of NGAL. Our data indicate that NGAL could activate the NF κ B pathway promoting an increase in the phosphorylation of its negative modulator I κ B (inhibitor of nuclear factor- κ B; Figure S5). BAY 11-7082 was also able to prevent the increase in collagen type I protein levels induced by aldosterone in human cardiac fibroblasts, indicating that NF κ B activation has a key role in the profibrotic action of both aldosterone and NGAL in these cells (Figure 3F). Genetic deletion of NGAL in mice blunted the cardiac NF κ B phosphorylation observed 7 days post-MI (Figure 4A), without modifications of NF κ B phosphorylation in any of the groups studied at 3 months post-MI (Figure S3).

Discussion

The purpose of this study was to investigate the role of the recently identified MR target NGAL in cardiac remodeling and function after MI. Serum NGAL was associated with less LVEF improvement after MI. We demonstrated that cardiac NGAL expression is elevated at 7 days post-MI and that this effect is dependent on MR activation. The absence of NGAL expression in vivo prevented the interstitial cardiac fibrosis, inflammation, and cardiac dysfunction observed after MI. Recombinant human NGAL exerted direct profibrotic actions in human cardiac fibroblasts by increasing collagen type I, whereas NGAL knockdown prevented aldosterone-induced synthesis of collagen type I. The MR target NGAL thus seems to be a key mediator of cardiac damage induced by MI, through its profibrotic properties.

Increased systemic levels of NGAL have been reported in clinical studies in patients with MI.^{17–20} NGAL is also a biomarker of renal injury,^{21,22} and it is thus difficult to dissociate the modulation of NGAL, related to renal dysfunction, associated

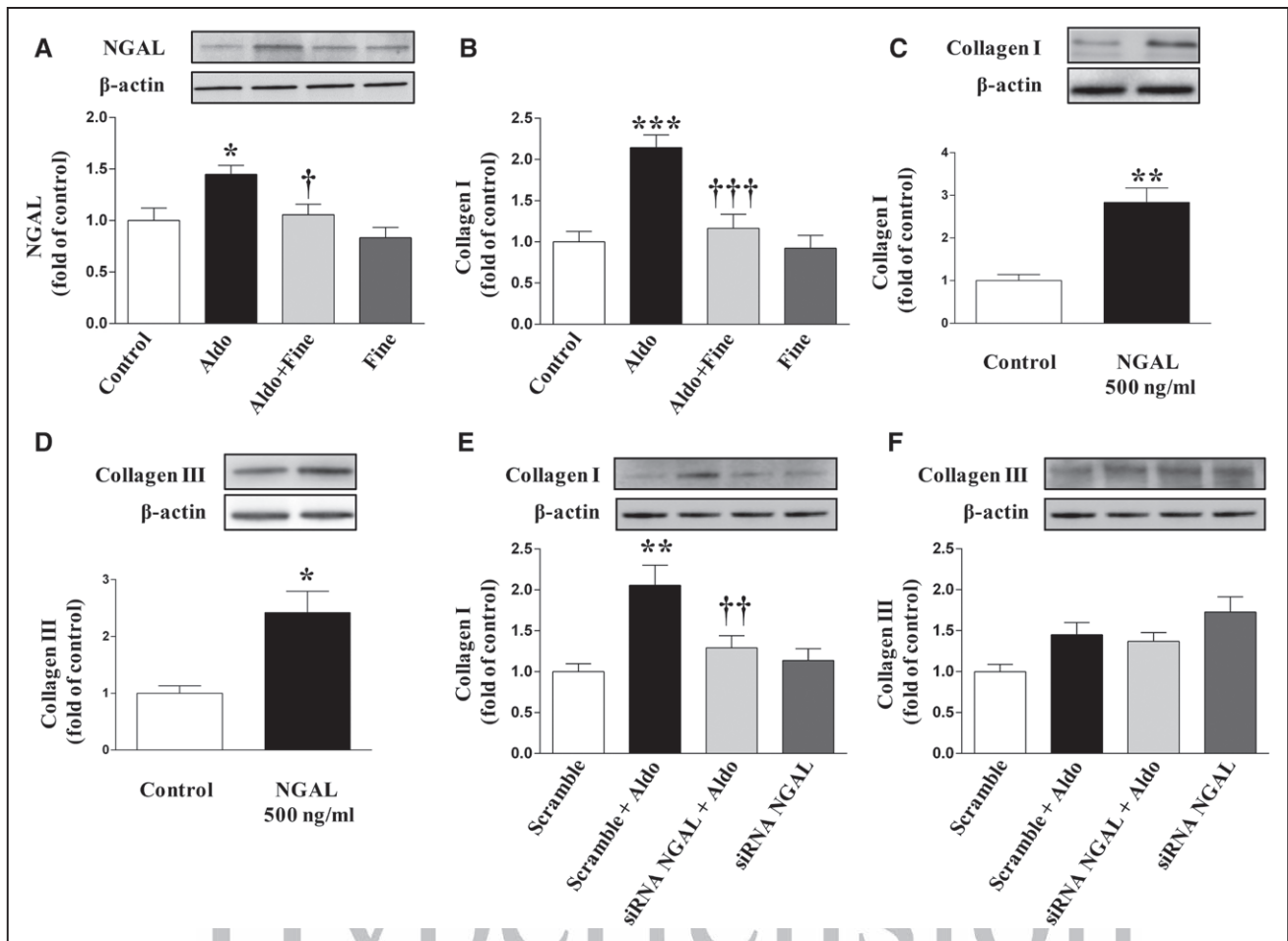


Figure 2. NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) mediates the profibrotic actions of aldosterone in human cardiac fibroblasts. Effects of aldosterone (Aldo; 10^{-8} mol/L) and finerenone (Fine; 10^{-6} mol/L) on the intracellular expression of NGAL (A) and collagen type I secretion (B) at 24 h. Effects of NGAL (500 ng/mL) on collagen type I (C) and collagen type III (D) protein synthesis at 24 h. Effect of aldosterone on NGAL-silenced cells on collagen type I (E) and collagen type III (F) protein synthesis. All conditions were performed at least in triplicate. Histogram bars represent the mean \pm SEM in arbitrary units normalized to β -actin. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001 vs Control. † P <0.05; †† P <0.01; ††† P <0.001 vs Aldo.

with cardiovascular diseases from a direct relationship with cardiac or vascular injury. NGAL plasma levels are elevated in coronary heart disease in patients without renal dysfunction²³ and correlate with the severity of the disease.¹⁹ In addition, NGAL predicts mortality and cardiovascular disease in older adults without kidney disease,²⁴ as well as in patients with HF after MI.^{25,26} In the present study, increased serum NGAL levels were correlated with lower LVEF recovery in post-MI patients after 6 months. NGAL has already been reported to be associated with clinical outcome in a biomarker substudy of the OPTIMAAL trial (Optimal Trial in Myocardial infarction With the Angiotensin II Antagonist Losartan).²⁶ Patients in the REMI cohort were of similar age (55 years old) but had higher LVEF (50% versus 32%) when compared with the OPTIMAAL biomarker substudy population. Most importantly, all patients included in the OPTIMAAL substudy were NYHA 2 (New York Heart Association) or higher, whereas only 3 patients of the REMI population had diuretics, suggesting that the vast majority had no symptoms of HF. In the REMI cohort, our results indicate that higher serum NGAL is associated with less LVEF improvement (ie, less reverse remodeling)

after MI. Reverse remodeling has been mainly studied after cardiac resynchronization²⁷ but is also frequent after MI. It has been reported to occur in a third of patients after MI and is strongly associated with favorable clinical outcome.^{28,29} Of note, Funaro et al²⁸ reported that in a cohort of acute MI, the only variable (while competing with age and baseline systolic LV volumes) significantly associated with a 2-year event-free survival was reverse remodeling (hazard ratio, 0.28 [0.12–0.66]). Similarly, Spinelli et al²⁹ reported extreme association (HR, <0.20) between reverse remodeling and the composite of reinfarction, HF hospitalization and death. As a consequence, our results, in light of the aforementioned evidence, suggest that higher NGAL levels could have a detrimental effect in patients after MI through its association with less reverse ischemic remodeling. A limitation of the analysis deserves to be mentioned. Because the REMI cohort was primarily design to study the factors associated with the early myocardial remodeling post-MI, no control population was considered.

Elevated vascular and myocardial levels of NGAL have been reported in several experimental models of cardiovascular diseases, such as atherosclerosis³⁰ and aortic abdominal

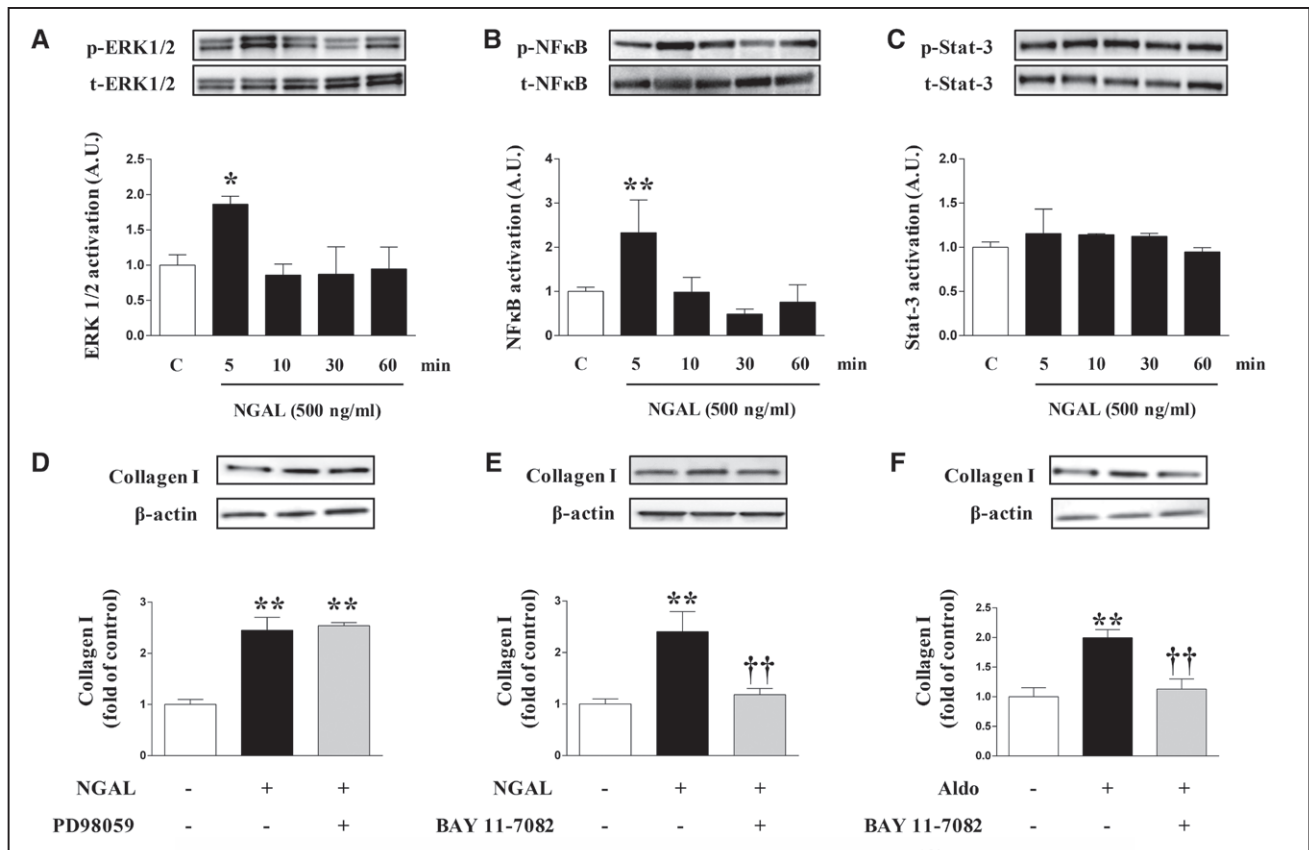


Figure 3. NFκB mediates the profibrotic actions of NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) in human cardiac fibroblasts. Phosphorylation of ERK 1/2 (p-ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases 1/2; **A**), NFκB (p-NFκB, nuclear factor-κB; **B**), and STAT-3 (p-Stat-3, signal transducer and activator of transcription-3; **C**) in human cardiac fibroblasts treated with NGAL (500 ng/mL) for 5, 10, 30, and 60 min. Effects of the ERK 1/2 inhibitor, PD98059 (**D**), and the NFκB inhibitor, BAY 11-7082 (**E**), on collagen type I protein synthesis induced by NGAL or aldosterone (**F**). Histogram bars represent the mean±SEM in arbitrary units normalized to total ERK 1/2 (t-ERK1/2), total NFκB (t-NFκB), total STAT-3 (t-Stat-3), or β-actin. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs Control; †† $P < 0.01$ vs NGAL or Aldo. A.U. indicates arbitrary units.

aneurysm,³¹ as well as after MI.^{26,32–34} We confirmed these results in mice at 7 days post-MI and showed that increased NGAL levels were because of MR activation. A previous study showed that the lack of NGAL improved the functional recovery and reduced infarct size of isolated mouse hearts subjected to ischemia/reperfusion. This effect was associated with the restoration of mitochondrial function and phospholipid remodeling.³⁵ Mice lacking NGAL were protected from cardiac cell death and elicited a higher autophagic response in a study limited to the first 24 hours after cardiac ischemia.³³ We show in the present study that the absence of NGAL expression in vivo is beneficial after MI, reducing cardiac fibrosis, inflammation, and the impairment of cardiac function.

Changes in collagen synthesis occur in patients with congestive HF and LV systolic dysfunction after acute MI,¹ an effect partially mediated by MR activation.¹⁰ Finerenone is a highly selective nonsteroidal MRA that mediates end-organ protection with a lower risk of electrolyte disturbances than other MRAs.³⁶ Previous studies have demonstrated the beneficial effects of finerenone, which improves post-MI LV function.^{10,36} We show here that NGAL levels did not increase at 7 days post-MI in finerenone-treated animals and that aldosterone modulates NGAL expression through MR activation in human cardiac fibroblasts. Indeed, aldosterone also modulates NGAL expression in cardiomyocytes and smooth muscle cells.¹¹ We further

demonstrated that NGAL mediates the profibrotic actions of aldosterone in human cardiac fibroblasts: aldosterone did not increase collagen type I protein levels in NGAL knockdown cells. We propose that NGAL is a mediator of aldosterone-induced fibrosis after MI. This is in accordance with another experimental setting where we reported that genetic disruption of NGAL prevented hypertension and cardiovascular remodeling associated with MR activation by aldosterone treatment.¹²

The underlying mechanisms linking NGAL, MR activation, and collagen type I expression are centered on NFκB activation; we demonstrated that NFκB activation is necessary for the profibrotic effects of NGAL. NFκB regulates many processes in the cardiovascular system, including inflammation, cell survival, differentiation, fibrosis, and proliferation.³⁷ NFκB is a key regulator of cardiac responses to ischemia and reperfusion. The alterations in oxygen availability that occur in MI can activate NFκB.³⁸ Several studies have demonstrated that NFκB is upregulated 3 days after MI in mice³⁹ and that this increase is maintained at 7 and 30 days post-MI.^{40–42} These results are in accordance with our data showing an increase in the phosphorylation of NFκB 7 days after MI. Frantz et al⁴³ have demonstrated that the genetic inactivation of NFκB improves survival and reduces LV dilatation 8 weeks after MI. Our data suggest that NGAL could activate NFκB through a phosphorylation of IκB. In

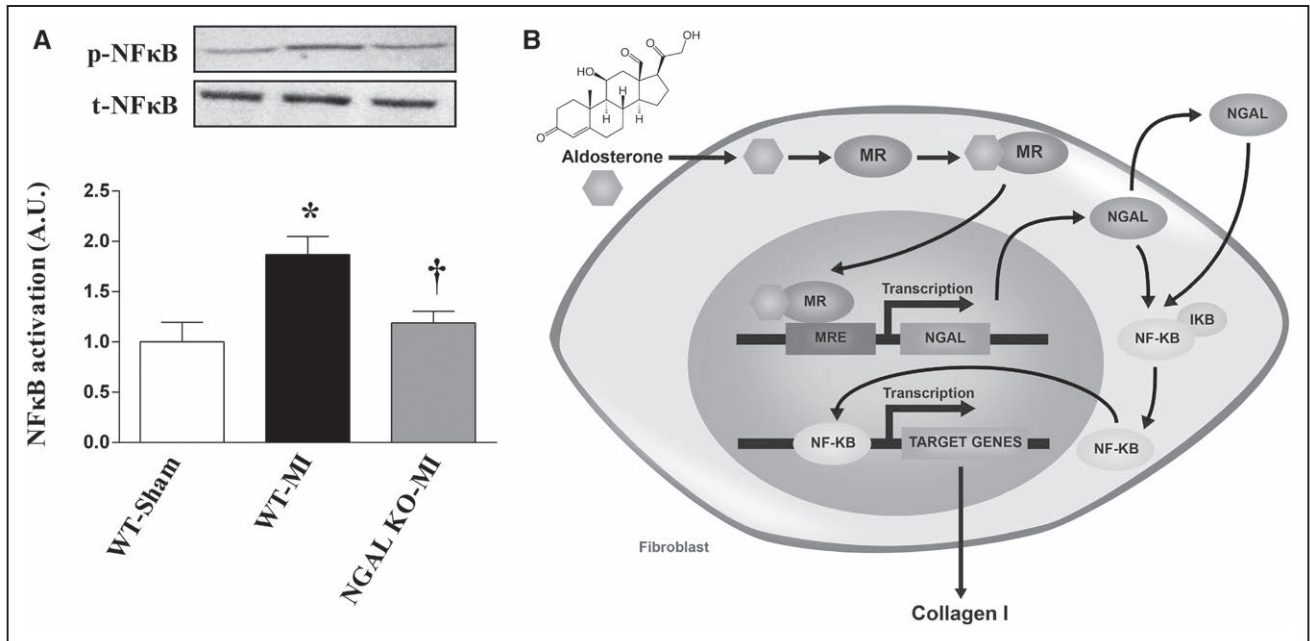


Figure 4. NFκB (nuclear factor-κB) phosphorylation (p-NFκB) 7 d after myocardial infarction. NFκB phosphorylation in sham-operated mice (WT-Sham), wild-type mice with myocardial infarction (WT-MI), and NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) KO mice with MI (NGAL KO-MI) (A). Histogram bars represent the mean±SEM in arbitrary units normalized to total NFκB (t-NFκB). * $P < 0.05$ vs Sham; † $P < 0.05$ vs MI. B, Scheme illustrating the possible mechanism involved in the profibrotic effects of NGAL. A.U. indicates arbitrary units; IKB, inhibitor of nuclear factor-κB; MR, mineralocorticoid receptor; and MRE, mineralocorticoid response element.

addition, inhibition of NFκB phosphorylation by pharmacological approaches reduced extracellular matrix deposition and adverse cardiac remodeling after MI.^{40,41} NFκB is therefore involved in the NGAL-mediated profibrotic effect of aldosterone, as summarized in Figure 4B.

In conclusion, this study demonstrates the beneficial effects of NGAL deletion in mice subjected to left artery coronary ligation by limiting cardiac fibrosis, inflammation, and LV dysfunction associated with MI. It also demonstrates the detrimental effect of increased cardiac NGAL levels within days of MI and shows a correlation between circulating NGAL levels and reduced recovery of systolic function in patients during the first 6 months after an MI. NGAL is a novel mediator of the actions of aldosterone and is an exciting potential therapeutic target for cardiovascular diseases in which MR is involved, such as MI, as well as perhaps mineralocorticoid-independent extracellular matrix remodeling in the cardiovascular system and beyond.

Perspectives

NGAL, which is overexpressed by the heart after MI, is an emerging potential therapeutic target for the detrimental consequences associated with MI. NGAL deletion blocks cardiac dysfunction and fibrosis in experimental MI. Further studies are required to establish the potential therapeutic benefit of NGAL inhibition in patients with MI.

Acknowledgments

We are grateful for the excellent technical assistance of the Centre d'Exploration Fonctionnelles team and their support with animal care. We are grateful to the staffs of the Nancy Centre d'Investigation Clinique Plurith (CIC-P), Centre d'Investigation Clinique-Innovation Technologie (CIC-IT), and Cardiology Unit, who managed the cohort study. We are grateful to Marie Pieronne-Deperrois and Jean-Paul

Henry for their technical help and Thorsten Berger and Tak W. Mak (University of Toronto, Canada) for kindly sharing the NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) knockout (KO) mice.

Sources of Funding

This work was funded by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre de Recherche Industrielle et Technique, the European Fibro-Targets Project (grant agreement No. FP7#602904), the European Regional Development Fund (ERDF) in Normandy, the FP7-funded COST ADMIRE network (BM1301), ANR MRFOCUS (ANR-15-CE14-0032-02), the Fight-HF Avenir investment program (ANR-15-RHUS-0004), the French Programme Hospitalier de Recherche Clinique, and a research grant from Bayer (12127a10). N. López-Andrés was supported by a Miguel Servet contract CP13/00221 from the Instituto de Salud Carlos III-FEDER.

Disclosures

P. Kolkhof is an employee of BAYER AG. The other authors report no conflicts.

References

1. Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, Fay R, Nuée J, Ketelslegers JM, Vincent J, Pitt B, Zannad F. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study. *Circulation*. 2009;119:2471–2479. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.809194.
2. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101:2981–2988.
3. Rogerson FM, Fuller PJ. Mineralocorticoid action. *Steroids*. 2000;65:61–73.
4. López-Andrés N, Martín-Fernandez B, Rossignol P, Zannad F, Lahera V, Fortuno MA, Cachafeiro V, Díez J. A role for cardiotrophin-1 in myocardial remodeling induced by aldosterone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H2372–H2382. doi: 10.1152/ajpheart.00283.2011.
5. Briet M, Schiffrin EL. Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6:261–273. doi: 10.1038/nrneph.2010.30.

6. Martínez-Martínez E, Calvier L, Fernández-Celis A, Rousseau E, Jurado-López R, Rossoni LV, Jaisser F, Zannad F, Rossignol P, Cachofeiro V, López-Andrés N. Galectin-3 blockade inhibits cardiac inflammation and fibrosis in experimental hyperaldosteronism and hypertension. *Hypertension*. 2015;66:767–775. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05876.
7. Reddy NM, Mahajan UB, Patil CR, Agrawal YO, Ojha S, Goyal SN. Eplerenone attenuates cardiac dysfunction and oxidative stress in β -receptor stimulated myocardial infarcted rats. *Am J Transl Res*. 2015;7:1602–1611.
8. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M; Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003;348:1309–1321. doi: 10.1056/NEJMoa030207.
9. Beygui F, Labbé JP, Cayla G, Ennezat PV, Motreff P, Roubille F, Silvain J, Barthélémy O, Delarche N, Van Belle E, Collet JP, Montalescot G. Early mineralocorticoid receptor blockade in primary percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction is associated with a reduction of life-threatening ventricular arrhythmia. *Int J Cardiol*. 2013;167:73–79. doi: 10.1016/j.ijcard.2011.11.076.
10. Gueret A, Harouki N, Favre J, Galmiche G, Nicol L, Henry JP, Besnier M, Thuillez C, Richard V, Kolkhof P, Mulder P, Jaisser F, Ouvrard-Pascaud A. Vascular smooth muscle mineralocorticoid receptor contributes to coronary and left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Hypertension*. 2016;67:717–723. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06709.
11. Latouche C, El Moghrabi S, Messaoudi S, Nguyen Dinh Cat A, Hernandez-Diaz I, Alvarez de la Rosa D, Perret C, López Andrés N, Rossignol P, Zannad F, Farman N, Jaisser F. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a novel mineralocorticoid target in the cardiovascular system. *Hypertension*. 2012;59:966–972. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187872.
12. Tarjus A, Martínez-Martínez E, Amador C, Latouche C, El Moghrabi S, Berger T, Mak TW, Fay R, Farman N, Rossignol P, Zannad F, López-Andrés N, Jaisser F. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a novel mineralocorticoid biotarget, mediates vascular profibrotic effects of mineralocorticoids. *Hypertension*. 2015;66:158–166. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05431.
13. Gilet A, Zou F, Boumenir M, Fripiat JP, Thornton SN, Lacolley P, Ropars A. Aldosterone up-regulates MMP-9 and MMP-9/NGAL expression in human neutrophils through p38, ERK1/2 and PI3K pathways. *Exp Cell Res*. 2015;331:152–163. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.11.004.
14. Flower DR, North AC, Sansom CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1482:9–24.
15. Grzyb J, Latowski D, Strzałka K. Lipocalins - a family portrait. *J Plant Physiol*. 2006;163:895–915. doi: 10.1016/j.jplph.2005.12.007.
16. Huttin O, Marie PY, Benichou M, Bozec E, Lemoine S, Mandry D, Juillière Y, Sadoul N, Micard E, Duarte K, Beaumont M, Rossignol P, Girerd N, Selton-Suty C. Temporal deformation pattern in acute and late phases of ST-elevation myocardial infarction: incremental value of longitudinal post-systolic strain to assess myocardial viability. *Clin Res Cardiol*. 2016;105:815–826. doi: 10.1007/s00392-016-0989-6.
17. Helanova K, Littnerova S, Kubena P, Ganovska E, Pavlusova M, Kubkova L, Jarkovsky J, Pavkova Goldbergova M, Lipkova J, Gottwaldova J, Kala P, Toman O, Dastych M, Spinar J, Parenica J. Prognostic impact of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and B-type natriuretic in patients with ST-elevation myocardial infarction treated by primary PCI: a prospective observational cohort study. *BMJ Open*. 2015;5:e006872. doi: 10.1136/bmjopen-2014-006872.
18. Sahinarslan A, Kocaman SA, Bas D, Akyel A, Ercin U, Zengin O, Timurkaynak T. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in acute myocardial infarction and stable coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. 2011;22:333–338. doi: 10.1097/MCA.0b013e3283472a71.
19. Zografos T, Haliassos A, Korovesis S, Giazitoglou E, Voridis E, Katritsis D. Association of neutrophil gelatinase-associated lipocalin with the severity of coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2009;104:917–920. doi: 10.1016/j.amjcard.2009.05.023.
20. Lindberg S, Pedersen SH, Mogelvang R, Jensen JS, Flyvbjerg A, Galatius S, Magnusson NE. Prognostic utility of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in predicting mortality and cardiovascular events in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:339–345. doi: 10.1016/j.jacc.2012.04.017.
21. Singer E, Markó L, Paragas N, Barasch J, Dragun D, Müller DN, Budde K, Schmidt-Ott KM. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications. *Acta Physiol*. 2013;207:663–672. doi: 10.1111/apha.12054.
22. Di Grande A, Giuffrida C, Carpinteri G, Narbone G, Pirrone G, Di Mauro A, Calandra S, Noto P, Le Moli C, Alongi B, Nigro F. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel biomarker for the early diagnosis of acute kidney injury in the emergency department. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2009;13:197–200.
23. Choi KM, Lee JS, Kim EJ, Baik SH, Seo HS, Choi DS, Oh DJ, Park CG. Implication of lipocalin-2 and visfatin levels in patients with coronary heart disease. *Eur J Endocrinol*. 2008;158:203–207. doi: 10.1530/EJE-07-0633.
24. Daniels LB, Barrett-Connor E, Clopton P, Laughlin GA, Ix JH, Maisel AS. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is independently associated with cardiovascular disease and mortality in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:1101–1109. doi: 10.1016/j.jacc.2011.11.046.
25. van Deursen VM, Damman K, Voors AA, van der Wal MH, Jaarsma T, van Veldhuisen DJ, Hillege HL. Prognostic value of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin for mortality in patients with heart failure. *Circ Heart Fail*. 2014;7:35–42. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000242.
26. Yndestad A, Landrø L, Ueland T, Dahl CP, Flo TH, Vinge LE, Espevik T, Frøland SS, Husberg C, Christensen G, Dickstein K, Kjekshus J, Øie E, Gullestad L, Aukrust P. Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure. *Eur Heart J*. 2009;30:1229–1236. doi: 10.1093/eurheartj/ehp088.
27. Sutton MS, Keane MG. Reverse remodelling in heart failure with cardiac resynchronisation therapy. *Heart*. 2007;93:167–171. doi: 10.1136/hrt.2005.067967.
28. Funaro S, La Torre G, Madonna M, Galiuto L, Scarà A, Labbadia A, Canali E, Mattatelli A, Fedele F, Alessandrini F, Crea F, Agati L; AMICI Investigators. Incidence, determinants, and prognostic value of reverse left ventricular remodelling after primary percutaneous coronary intervention: results of the Acute Myocardial Infarction Contrast Imaging (AMICI) multicenter study. *Eur Heart J*. 2009;30:566–575. doi: 10.1093/eurheartj/ehn529.
29. Spinelli L, Morisco C, Assante di Panzillo E, Izzo R, Trimarco B. Reverse left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: the prognostic impact of left ventricular global torsion. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2013;29:787–795. doi: 10.1007/s10554-012-0159-5.
30. Eilenberg V, Stojkovic S, Piechota-Polanczyk A, Kaun C, Rauscher S, Gröger M, Klinger M, Wojta J, Neumayer C, Huk I, Demyanets S. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) is associated with symptomatic carotid atherosclerosis and drives pro-inflammatory state in vitro. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2016;51:623–631. doi: 10.1016/j.ejvs.2016.01.009.
31. Tarín C, Fernandez-Garcia CE, Burillo E, Pastor-Vargas C, Llamas-Granda P, Castejón B, Ramos-Mozo P, Torres-Fonseca MM, Berger T, Mak TW, Egido J, Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL. Lipocalin-2 deficiency or blockade protects against aortic abdominal aneurysm development in mice. *Cardiovasc Res*. 2016;111:262–273. doi: 10.1093/cvr/cvw112.
32. Hemdahl AL, Gabrielsen A, Zhu C, Eriksson P, Hedin U, Kastrup J, Thorén P, Hansson GK. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:136–142. doi: 10.1161/01.ATV.0000193567.88685.f4.
33. Sung HK, Chan YK, Han M, Jahng JWS, Song E, Danielson E, Berger T, Mak TW, Sweeney G. Lipocalin-2 (NGAL) attenuates autophagy to exacerbate cardiac apoptosis induced by myocardial ischemia. *J Cell Physiol*. 2017;232:2125–2134. doi: 10.1002/jcp.25672.
34. Cheng L, Xing H, Mao X, Li L, Li X, Li Q. Lipocalin-2 promotes m1 macrophages polarization in a mouse cardiac ischemia-reperfusion injury model. *Scand J Immunol*. 2015;81:31–38. doi: 10.1111/sji.12245.
35. Yang B, Fan P, Xu A, Lam KS, Berger T, Mak TW, Tse HF, Yue JW, Song E, Vanhoutte PM, Sweeney G, Wang Y. Improved functional recovery to IR injury in hearts from lipocalin-2 deficiency mice: restoration of mitochondrial function and phospholipids remodeling. *Am J Transl Res*. 2012;4:60–71.
36. Kolkhof P, Delbeck M, Kretschmer A, Steinke W, Hartmann E, Bärfacker L, Eitner F, Albrecht-Küpper B, Schäfer S. Finerenone, a novel selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonist protects from rat cardiorenal injury. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;64:69–78. doi: 10.1097/FJC.0000000000000091.
37. Van der Heiden K, Cuhlmann S, Luong le A, Zakkar M, Evans PC. Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease. *Clin Sci*. 2010;118:593–605. doi: 10.1042/CS20090557.
38. Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pousyssegur J,

- Taylor CT. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:18154–18159. doi: 10.1073/pnas.0602235103.
39. Yin H, Li P, Hu F, Wang Y, Chai X, Zhang Y. IL-33 attenuates cardiac remodeling following myocardial infarction via inhibition of the p38 MAPK and NF-κB pathways. *Mol Med Rep*. 2014;9:1834–1838. doi: 10.3892/mmr.2014.2051.
40. He Q, Zhou W, Xiong C, Tan G, Chen M. Lycopene attenuates inflammation and apoptosis in post-myocardial infarction remodeling by inhibiting the nuclear factor-κB signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2015;11:374–378. doi: 10.3892/mmr.2014.2676.
41. Onai Y, Suzuki J, Maejima Y, Haraguchi G, Muto S, Itai A, Isobe M. Inhibition of NF-κB improves left ventricular remodeling and cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H530–H538. doi: 10.1152/ajpheart.00549.2006.
42. Xu D, Wang A, Jiang F, Hu J, Zhang X. Effects of interleukin-37 on cardiac function after myocardial infarction in mice. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:5247–5251.
43. Frantz S, Hu K, Bayer B, Gerondakis S, Strotmann J, Adamek A, Ertl G, Bauersachs J. Absence of NF-kappaB subunit p50 improves heart failure after myocardial infarction. *FASEB J*. 2006;20:1918–1920. doi: 10.1096/fj.05-5133fje.

Novelty and Significance

What Is New?

- NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) mediates aldosterone-induced cardiac fibrosis in human cardiac fibroblasts.
- The increase in cardiac NGAL levels is dependent on mineralocorticoid receptor activation.
- NGAL blockade protects against cardiac fibrosis, inflammation, and dysfunction after myocardial infarction (MI).
- NGAL exerts its profibrotic effects through NFκB (nuclear factor-κB) activation.
- NGAL is associated with lower left ventricular ejection fraction in post-MI patients.

What Is Relevant?

- The data demonstrate the beneficial effects of NGAL blockade after 3 months of experimental MI and could be a new biotarget in pathological situations in which mineralocorticoid receptor is involved, such as in MI.

Summary

This study demonstrated that NGAL levels increase a short time after MI and play an important role in the cardiac remodeling associated with MI. This may have important consequences for cardiac function. The inhibition of NGAL decreased cardiac fibrosis in experimental MI, as well as aldosterone-induced collagen synthesis in human cardiac fibroblasts.



Hypertension

Aldosterone Target NGAL (Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin) Is Involved in Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction Through NF κ B Pathway

Ernesto Martínez-Martínez, Mathieu Buonafine, Ines Boukhalfa, Jaime Ibarrola, Amaya Fernández-Celis, Peter Kolkhof, Patrick Rossignol, Nicolas Girerd, Paul Mulder, Natalia López-Andrés, Antoine Ouvrard-Pascaud and Frédéric Jaisser

Hypertension. published online October 23, 2017;

Hypertension is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Copyright © 2017 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 0194-911X. Online ISSN: 1524-4563

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://hyper.ahajournals.org/content/early/2017/10/20/HYPERTENSIONAHA.117.09791>

Data Supplement (unedited) at:

<http://hyper.ahajournals.org/content/suppl/2017/10/17/HYPERTENSIONAHA.117.09791.DC1>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Hypertension* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Hypertension* is online at:
<http://hyper.ahajournals.org/subscriptions/>

ONLINE SUPPLEMENT

THE ALDOSTERONE TARGET NGAL IS INVOLVED IN CARDIAC REMODELING AFTER MYOCARDIAL INFARCTION THROUGH NFKB PATHWAY

Ernesto Martínez-Martínez¹, Mathieu Buonafine¹, Ines Boukhalifa², Jaime Ibarrola³, Amaya Fernández-Celis³, Peter Kolkhof⁴, Patrick Rossignol⁵, Nicolas Girerd⁵, Paul Mulder², Natalia López-Andrés^{3,5}, Antoine Ouvrard-Pascaud^{*2}, Frédéric Jaisser^{*1}.

¹INSERM, UMRS 1138, Team 1, Centre de Recherche des Cordeliers, Pierre et Marie Curie University, Paris Descartes University, Paris, France. ²Inserm U1096, UFR Médecine-Pharmacie, Rouen, France. ³Cardiovascular Translational Research. Navarrabiomed (Miguel Servet Foundation), Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona. Spain. ⁴BAYER AG, Cardiology Research, Wuppertal, Germany. ⁵INSERM, Centre d'Investigations Cliniques-Plurithématique 1433, UMR 1116 Université de Lorraine, CHRU de Nancy, French-Clinical Research Infrastructure Network (F-CRIN) INI-CRCT, Nancy, France.

*Both authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Dr. Frédéric Jaisser. INSERM U1138, Centre de Recherche de Cordeliers, Team 1. 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006, Paris, France. Tel: +33144278106. Fax: +33144276421
E-mail: frederic.jaisser@inserm.fr

This file includes:

- 1 supplemental method
- 4 supplemental references
- 2 supplemental tables
- 5 supplemental figures

SUPPLEMENTAL METHODS

Post-myocardial infarction cohort

The study population was comprised of 119 patients who were successfully reperfused following a first acute STEMI, included in a prospective monocentric cohort study (Relation Between Aldosterone and Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction - REMI Study), performed in a university hospital between April 2010 and December 2013.¹ Patients underwent cardiac magnetic resonance (CMR) during the first four days of the acute event and at the six-month follow-up. The study was approved by an institutional review committee and the subjects gave informed consent. It was sponsored by the Nancy CHRU.

Myocardial infarction

Experiments conformed to the 2010/63 directive of the EU and the *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* of the US National Institute of Health (No.85-23). Left coronary artery ligations were performed in eight-week-old male NGAL KO C57BL/6J mice (NGAL KO-MI, n = 6-13) and wild type littermates (WT-MI; n = 6-13) under anesthesia (3.6mg/kg xylazine, IP, plus 2% isoflurane). Analgesia was induced using buprenorphine (0.05 mg/kg, SC) just after induction of anesthesia and after 6, 12, 24, and 48 h following coronary artery ligation. The snare was not tied for sham-operated mice (WT-Sham; n=6-9). Finerenone (1 mg/kg/day) was administered as a food additive for seven days, starting the day after MI (Fine-MI).

LV Hemodynamics

Mice were anesthetized (Inactin 50mg.kg⁻¹, IP) and the carotid artery cannulated with a pressure-volume catheter (SPR839, Millar-Instruments, USA) to record arterial pressure (mmHg) and heart rate, after which the catheter was advanced into the LV. Pressure-volume loops were recorded at baseline, and during loading, by gently occluding the abdominal aorta with a cotton swab, allowing the calculation of dp/dt_{max} and dp/dt_{min} (mmHg/s), LV end-systolic and end-diastolic pressures (mmHg), and LV end-systolic and end-diastolic pressure-volume relations as indicators of load-independent LV passive compliance and contractility, respectively, using IOXTM software (EMKA, France).

Echocardiography

Mouse echocardiography was performed at three months post-MI in isoflurane anesthetized closed-chest mice (1%; 1.5 mL/min; Baxter), using a Vivid 7 ultrasound echograph equipped with a M12L linear probe, operating at 14 MHz, and fitted out with Echopac PC software (GE medical). In brief, a two-dimensional short axis view of the LV was obtained at the level of the papillary muscle, and the M-mode tracing was recorded. LV Diastolic and Systolic Diameters (LVDD; LVSD) were measured by the leading-edge method, according to the American Society of Echocardiography guidelines. Fractional Shortening (FS) was calculated as previously described.² In addition, a pulsed Doppler of the LV outflow was performed to obtain heart rate and time velocity integral (TVI) to calculate stroke volume (mL/beat) and cardiac output (mL/min).

Cardiac magnetic resonance (CMR)

Imaging was performed on a General Electric 3T system (General Electric 3T signa hdxt). Cine imaging for cardiac morphology and function was performed using the

steady-state free precession technique. To evaluate LV ejection fraction (LVEF), the outline of the endocardial border of the left ventricle was manually traced on all slices of each phase, in the short axis view, by an experienced cardiologist or radiologist using standard software (Mass Research software, version V2013-EXP, Leiden University Medical Center). Volumes were computed using Simpson's method of disk summation, whereby the sum of cross-sectional areas was multiplied by slice thickness. The quantitative determination of EF was calculated using left ventricular end-diastolic volume (LVEDV) and left ventricular end-systolic volume (LVESV) estimates as follows: $LVEF=(LVEDV-LVESV)/LVEDV$.

Histology

Mice were sacrificed by cervical disruption at seven days or three months post-MI. Hearts were rapidly excised and arrested in ice-cold saturated KCl buffer. The LV was dissected before being snap-frozen in liquid nitrogen for Western-blot analyses or embedded in Tissue-Tek for histological analyses. Infarct size [total infarction perimeter/(epicardial LV perimeter + endocardial LV perimeter) x100] and LV fibrosis (evaluated as the percentage under polarized light at a magnification of x20) were calculated in 6-10 μ m-thick mid-LV frozen sections stained with Sirius Red using Image Pro-Plus (version 6.3) software. For myocyte cross sectional area, mid-LV cryosections (6-10 μ m) were fixed in acetone and stained according to standard protocols using wheat germ agglutinin WGA-A488 (1:100; Invitrogen). Photographs were taken at x20 magnification using fluorescence microscope (AxioImager Z1; Carl-Zeiss). Mean cross sectional area were measured using Image Pro-Plus 6.3 in 6-8 fields / heart and an average of 16 cardiomyocytes / field.

Cell culture

Human cardiac fibroblasts were obtained from Promocell and maintained in medium (Fibroblast Media 3). Cells were cultured according to the manufacturer's instructions and used between passages 5 and 7. Cells were stimulated with aldosterone (10^{-8} M, Sigma), finerenone (10^{-6} M, Bayer), or recombinant hNGAL (500 ng/mL, R&D Systems) for 24 h for protein analysis. The doses were chosen based on previous studies.^{3,4}

For the study of the intracellular pathways, cells were treated with recombinant hNGAL for 5, 10, 30, and 60 min. The chemical inhibitors PD98059 (Sigma Aldrich) and BAY 11-7082 (Sigma Aldrich) were added at 10^{-5} mol/L 1 h prior to NGAL stimulation.

Transfection of cells with siRNA

Cells were seeded into 6-well plates at 70% confluence and transfected with a pool of three NGAL target-specific siRNAs (GeneCust) using MATra-si (IBA), according to the manufacturer's recommendations. Cells were allowed to recover for 24 h before stimulation. Scrambled siRNAs were used as a control.

Western blot analysis

Total protein aliquots of 20 μ g were prepared from either cell extracts or cardiac non-infarcted homogenates and electrophoresed on SDS polyacrylamide gels and transferred to Hybond-c Extra nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). Membranes were incubated with primary antibodies for: NGAL (Abcam; dilution 1:500), CD 3 (Santa Cruz; dilution 1:100), CD45 (Santa Cruz; dilution 1:100), CD68 (Abcam; dilution 1:100), CD80 (Santa Cruz; dilution 1:100), α -SMA (Santa Cruz; dilution 1:250), Collagen type I (Santa Cruz; dilution 1:500), Collagen type III (Santa Cruz;

dilution 1:500), ERK1/2 and ERK1/2-P (Thr202/Tyr204) at 1/1000 (Cell Signaling), NFκB and NFκB-P (Ser536) at 1/1000 (Cell Signaling), STAT3 and STAT3-P (Tyr705) at 1/1500 (Cell Signaling) and β-actin (Sigma; dilution 1:1000) as a loading control. After washing, the blots were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody, and binding revealed by ECL chemiluminescence (Amersham). After densitometric analyses, optical density values were expressed as arbitrary units. Results are expressed as an n-fold increase over the values of the control group in densitometric arbitrary units. All Western Blots were performed at least in triplicate for each experimental condition.

ELISA

Aldosterone plasma levels, cardiac NGAL protein levels, IL-6 and collagen type I in cell supernatants were measured by ELISA according to the manufacturer's instructions (Diagnostic Biochem Canada and R&D Systems).

Statistics

Data are presented as the means ± SEM. Student's t test (2-tailed) was used to compare paired groups of independent samples. ANOVA with Bonferroni adjustment for post-hoc tests was used for multiple comparisons.

Continuous data from the REMI cohort are presented either as the means + SD or the median (25-75 percentile). A paired t-test was used to compare values obtained at baseline and six months. The associations between baseline NGAL levels and changes in NGAL levels with LVEF recovery were evaluated using multivariable linear regression models. The outcome variable of this model was the change in the LVEF between baseline and six months, expressed as a continuous variable. Thus, a positive Beta value provided by the linear regression model indicates greater LVEF recovery (i.e. an increased LVEF within six months of the baseline evaluation). Adjustment variables were selected *a priori* based on their known association with post-myocardial infarction remodeling.

Data analysis was performed using GraphPad Prism V6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA) Software Inc and SAS version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA). The predetermined significance level was $P < 0.05$.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Huttin O, Marie PY, Benichou M, Bozec E, Lemoine S, Mandry D, Juilliere Y, Sadoul N, Micard E, Duarte K, Beaumont M, Rossignol P, Girerd N, Selton-Suty C. Temporal deformation pattern in acute and late phases of ST-elevation myocardial infarction: incremental value of longitudinal post-systolic strain to assess myocardial viability. *Clin Res Cardiol.* 2016;105:815-826.
2. Banquet S, Gomez E, Nicol L, Edwards-Levy F, Henry JP, Cao R, Schapman D, Dautreux B, Lallemand F, Bauer F, Cao Y, Thuillez C, Mulder P, Richard V, Brakenhielm E. Arteriogenic therapy by intramyocardial sustained delivery of a novel growth factor combination prevents chronic heart failure. *Circulation.* 2011;124:1059-1069.
3. Tarjus A, Martinez-Martinez E, Amador C, Latouche C, El Moghrabi S, Berger T, Mak TW, Fay R, Farman N, Rossignol P, Zannad F, Lopez-Andres N, Jaisser F. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, a Novel Mineralocorticoid Biotarget, Mediates Vascular Profibrotic Effects of Mineralocorticoids. *Hypertension.* 2015;66:158-166.

4. Martinez-Martinez E, Calvier L, Fernandez-Celis A, Rousseau E, Jurado-Lopez R, Rossoni LV, Jaisser F, Zannad F, Rossignol P, Cachofeiro V, Lopez-Andres N. Galectin-3 blockade inhibits cardiac inflammation and fibrosis in experimental hyperaldosteronism and hypertension. *Hypertension*. 2015;66:767-775.

SUPPLEMENTAL TABLES

Table S1: LV remodeling and functional parameters three months after myocardial infarction in WT-Sham and NGAL KO-Sham mice

Parameter	WT-Sham	NGAL KO-Sham
SBP, mm Hg	86.6±1.9	82.7±4.3
DBP, mm Hg	51.7±5.5	51.0±6.6
+dP/dt, mm Hg/s	5219±528	5079±613
-dP/dt, mm Hg/s	-4873±550	-4608±352
LVESP, mm Hg	85.05±1.39	82.87±4.70
LVESPVR, mm Hg/RVU	19.29±1.05	21.16±1.15
LVEDP, mm Hg	2.73±0.95	3.13±0.46
LVEDPVR, mm Hg/RVU	1.43±0.28	1.35±0.14
BW, g	34.0±0.7	33.0±1.4
HW/TL, mg/mm	8.54±0.41	8.20±0.35
LVW/TL, mg/mm	6.25±0.30	5.95±0.29
MCSA (A.U.)	40.21±1.8	42.67±1.3
LV collagen density, %	2.30±0.6	3.02±0.4

SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; +dP/dt: the first derivative of LV pressure rise over time; -dP/dt: the first derivative of LV pressure decline over time; LVESP: LV end-systolic pressure; LVESPVR: LV end-systolic pressure–volume relation; LVEDP: LV end-diastolic pressure; LVEDPVR: LV end-systolic pressure–volume relation; BW: body weight; HW: heart weight; LVW: left ventricular weight; TL: tibia length. MCSA: myocyte cross sectional area.

Table S2: Echocardiography data at seven days post-MI.

Parameter	WT-Sham	WT-MI	NGAL KO-MI	NGAL KO-Sham
BW, g	29.8±0.4	25.9±0.8***	27.6±0.5*	29.6±0.7
LVEDS, mm	2.8±0.1	4.5±0.2***	3.6±0.2**†	2.4±0.1
LVEDD, mm	4.1±0.1	5.2±0.2***	4.5±0.1†	3.8±0.1
FS, %	32.8±1.1	13.9±1.6***	18.6±2.0***	39.3±1.9
SV, mL/beat	0.09 ±0.003	0.079±0.005	0.086±0.004	0.089±0.004
CO, mL/min	44.0±1.4	40.4±2.5	43.2±2.1	46.5±1.4

BW: body weight. LVEDS and LVEDD: LV end-systolic and end-diastolic diameters. FS: Fractional Shortening. SV: Stroke volume. CO: Cardiac output. *p<0.05; **p < 0.01;***p < 0.001 vs. WT-Sham; †p < 0.05 vs. WT-MI.

SUPPLEMENTAL FIGURES

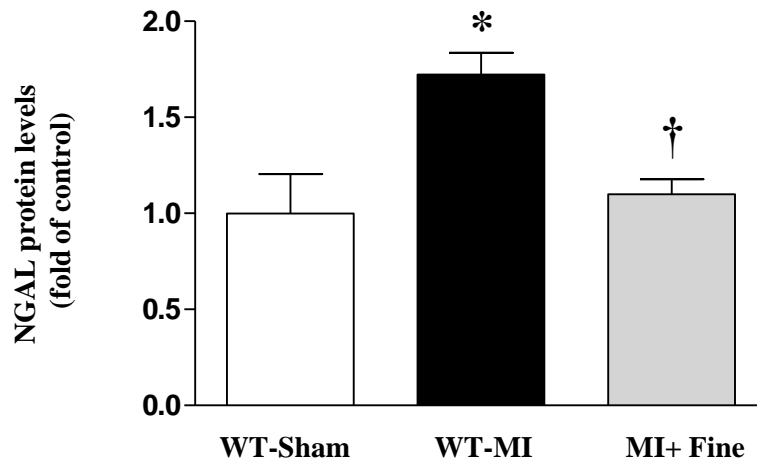


Figure S1: NGAL protein levels in WT-Sham, WT-MI and MI treated with finerenone mice. Histogram bars represent the mean±SEM. *p<0.05 vs. WT-Sham; †p<0.05 vs. WT-MI.

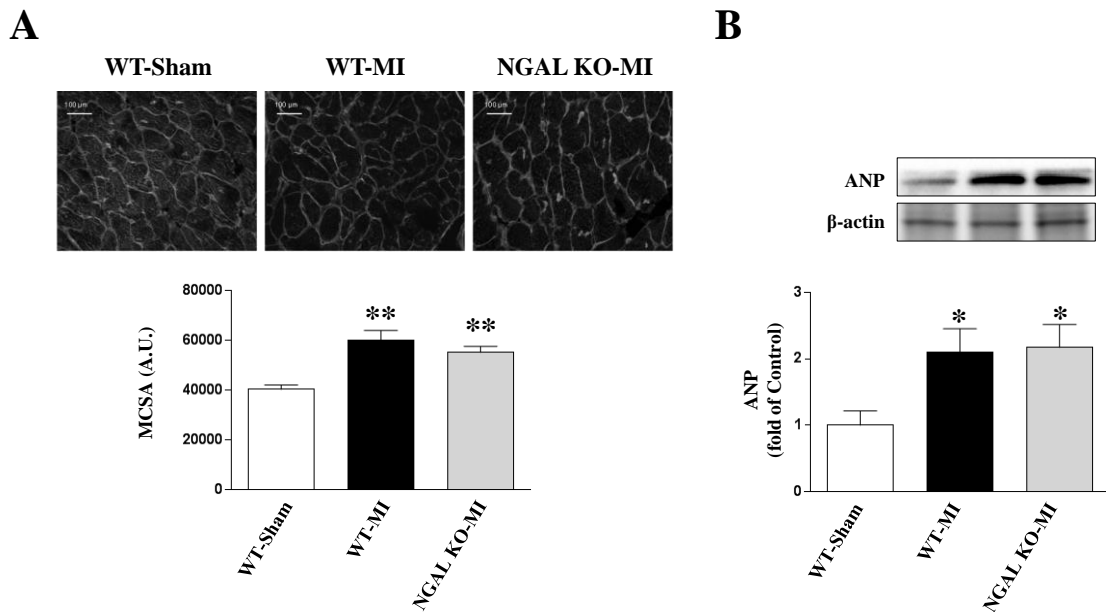


Figure S2: Myocyte cross sectional area (MCSA) (A) and atrial natriuretic peptide (ANP) (B) protein levels at three months post-MI in WT-Sham, WT-MI, and MI NGAL KO mice. Scale bar 100 μ m. Histogram bars represent the mean \pm SEM in arbitrary units. *p < 0.05; **p < 0.01 vs. WT-Sham.

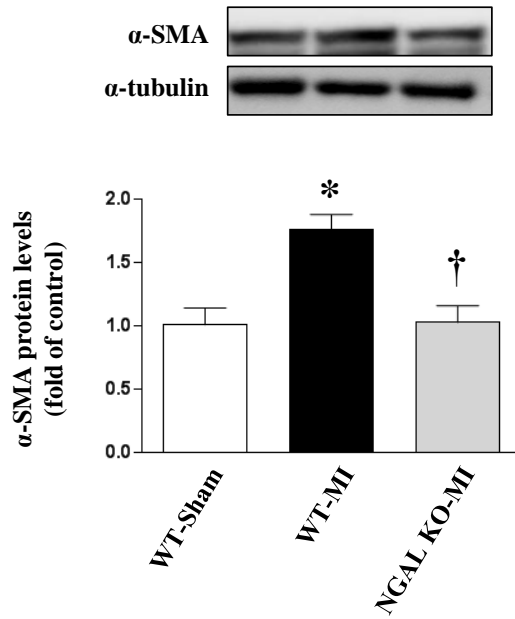
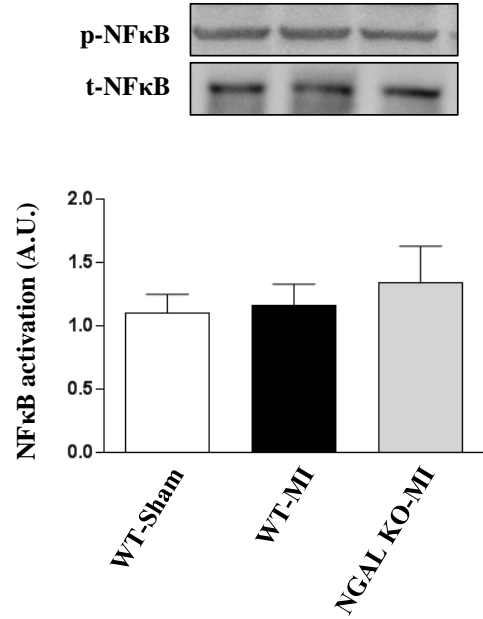
A**B**

Figure S3: Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) (**A**) and phosphorylation of NF κ B (**B**) protein levels at three months post-MI in WT-Sham, WT-MI, and MI NGAL KO mice. Histogram bars represent the mean \pm SEM in arbitrary units. * $p < 0.05$ vs. WT-Sham; † $p < 0.05$ vs. WT-MI.

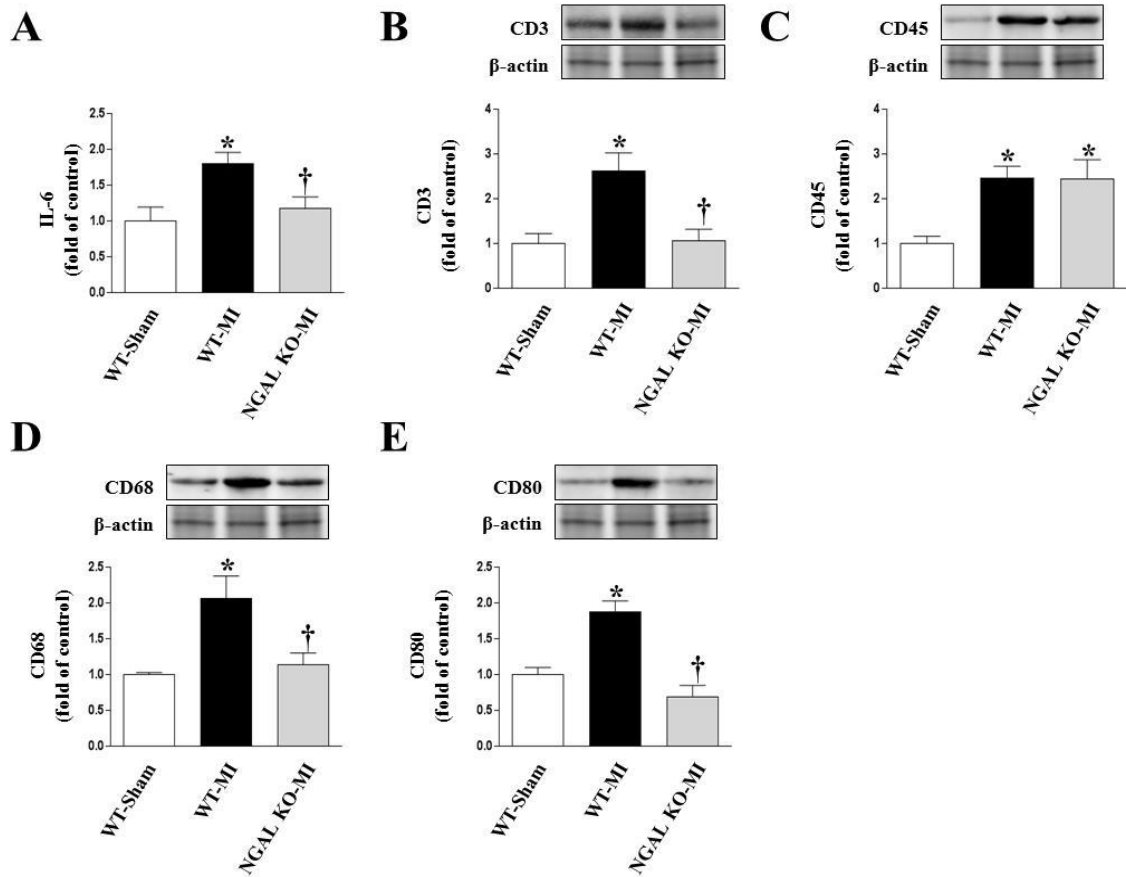


Figure S4. NGAL deletion improves cardiac inflammation three months after myocardial infarction. IL-6 (A), CD3 (B), CD45 (C), CD68 (D) and CD80 (E) in WT-Sham, WT-MI, and NGAL KO-MI mice. Histogram bars represent the mean \pm SEM in arbitrary units normalized to β -actin. * $p < 0.05$ vs. WT-Sham; † $p < 0.05$ vs. WT-MI.

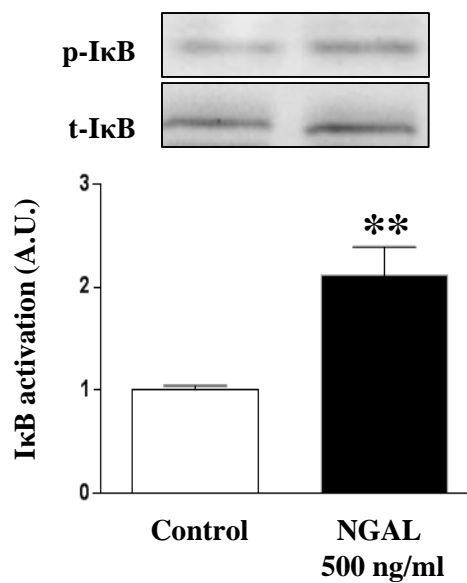


Figure S5: Phosphorylation of I κ B in human cardiac fibroblasts treated with NGAL (500 ng/mL). Histogram bars represent the mean \pm SEM in arbitrary units normalized to total I κ B. **p < 0.01 vs. Control.

Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis Reduces Myocardial Edema and Fibrosis Leading to Improved Cardiac Function Following Myocardial Infarction

Orianne Henri, MS; Chris Poueche, BS; Mahmoud Houssari, MS; Ludovic Galas, PhD; Lionel Nicol, PhD; Florence Edwards-Lévy, PhD; Jean-Paul Henry, BS; Anais Dumesnil, BS; Inès Boukhalfa, MS; Sébastien Banquet, PhD; Damien Schapman, MS; Christian Thuillez, MD, PhD; Vincent Richard, PhD*; Paul Mulder, PhD*; Ebba Brakenhielm, PhD

Background—The lymphatic system regulates interstitial tissue fluid balance, and lymphatic malfunction causes edema. The heart has an extensive lymphatic network displaying a dynamic range of lymph flow in physiology. Myocardial edema occurs in many cardiovascular diseases, eg, myocardial infarction (MI) and chronic heart failure, suggesting that cardiac lymphatic transport may be insufficient in pathology. Here, we investigate in rats the impact of MI and subsequent chronic heart failure on the cardiac lymphatic network. Further, we evaluate for the first time the functional effects of selective therapeutic stimulation of cardiac lymphangiogenesis post-MI.

Methods and Results—We investigated cardiac lymphatic structure and function in rats with MI induced by either temporary occlusion (n=160) or permanent ligation (n=100) of the left coronary artery. Although MI induced robust, intramyocardial capillary lymphangiogenesis, adverse remodeling of epicardial precollector and collector lymphatics occurred, leading to reduced cardiac lymphatic transport capacity. Consequently, myocardial edema persisted for several months post-MI, extending from the infarct to noninfarcted myocardium. Intramyocardial-targeted delivery of the vascular endothelial growth factor receptor 3-selective designer protein VEGF-C_{C152S}, using albumin-alginate microparticles, accelerated cardiac lymphangiogenesis in a dose-dependent manner and limited precollector remodeling post-MI. As a result, myocardial fluid balance was improved, and cardiac inflammation, fibrosis, and dysfunction were attenuated.

Conclusions—We show that, despite the endogenous cardiac lymphangiogenic response post-MI, the remodeling and dysfunction of collecting ducts contribute to the development of chronic myocardial edema and inflammation-aggravating cardiac fibrosis and dysfunction. Moreover, our data reveal that therapeutic lymphangiogenesis may be a promising new approach for the treatment of cardiovascular diseases. (*Circulation*. 2016;133:1484-1497. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020143.)

Key Words: edema ■ edema, cardiac ■ fibrosis ■ heart failure ■ lymphatic vessels ■ therapeutics
■ vascular endothelial growth factor C ■ ventricular remodeling

The lymphatic system plays a crucial role in the maintenance of tissue fluid balance and immune surveillance in most vascularized tissues. The heart carries an elaborate lymphatic network, first described by Rudbeck.¹⁻³ The heart depends heavily on its lymphatics for the return to the blood circulation of extravasated macromolecules and fluids.⁴ Accordingly, surgical obstruction of cardiac lymphatics rapidly leads to myocardial edema with well-described acute, and chronic, as well, deleterious effects on cardiac function.⁵⁻⁷ Clinically detectable myocardial edema is a frequent finding

in the acute phase of myocardial ischemia,⁸ initially because of vascular hyperpermeability.⁹⁻¹¹ Concurrently, there is rapid infiltration of neutrophils, macrophages, and other immune cells, which participate in the inflammatory tissue response to injury. These cells perform important beneficial roles such as the removal of dead cells and debris and the stimulation of reparative or regenerative processes, including angiogenesis.^{12,13} However, cardiac inflammation also has many

Clinical Perspective on p 1497

Received July 24, 2015; accepted February 19, 2016.

From Inserm (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) U1096, Rouen, France (O.H., C.P., M.H., L.N., J.-P.H., A.D., I.B., S.B., C.T., V.R., P.M., E.B.); Normandy University & University of Rouen, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, France (O.H., C.P., M.H., L.G., L.N., J.-P.H., A.D., I.B., S.B., D.S., C.T., V.R., P.M., E.B.); PRIMACEN, Cell Imaging Platform of Normandy, Inserm, Mont-Saint-Aignan, France (L.G., D.S.); PICTUR, In Vivo Imaging Platform, University of Rouen, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, France (L.N., C.T., P.M.); Reims Institute of Molecular Chemistry, UMR 7312 CNRS-URCA, University of Reims Champagne Ardenne, France (F.E.-L.); and Rouen University Hospital, Department of Pharmacology, France (C.T.).

*Drs Richard and Mulder contributed equally.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circ.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020143/-/DC1>.

Correspondence to Ebba Brakenhielm, PhD, Inserm U1096, 22 Boulevard Gambetta, 76183 Rouen, France. E-mail Ebba.Brakenhielm@inserm.fr
© 2016 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020143

deleterious effects, including induction of blood vascular rarefaction and dysfunction and stimulation of cardiac fibrosis, contributing to the development of chronic heart failure.¹⁴ Furthermore, many inflammatory mediators, and oxygen radicals generated during inflammation, as well, negatively affect lymphatic function, causing impairment of lymph flow and initiation of lymph edema and chronic inflammation.^{15,16} It is noteworthy that clinically detectable myocardial edema, extending beyond the infarct zone, may persist for up to 6 to 12 months post-myocardial infarction (MI) in humans, which is suggestive of lymphatic insufficiency.^{17,18}

Whether cardiac lymphatic dysfunction occurs after myocardial injury, and the impact this may have on myocardial fluid balance and cardiac inflammation, remains to be investigated. Moreover, although the advent of molecular lymphatic markers has fueled investigations into lymphatic anatomy, function, and growth in many organs,^{19–21} only a handful of articles have assessed lymphangiogenesis in the heart. It was recently shown that cardiac lymphangiogenesis and lymphatic remodeling occur in humans with cardiovascular diseases, such as infective endocarditis, acute or chronic myocardial ischemia, and terminal chronic heart failure.^{22,23} However, little information exists on the functional role of cardiac lymphangiogenesis in the native heart, and it is unknown whether insufficient lymphangiogenesis contributes to chronic myocardial edema, inflammation, and fibrosis in cardiovascular diseases.

Stimulation of lymphatic vessel growth (therapeutic lymphangiogenesis) has been proposed as a treatment to resolve peripheral edema of different etiologies, including secondary lymphedema.²⁴ Promisingly, experimental research over the past decade has shown that stimulation of lymphangiogenesis may reduce edema and limit or resolve chronic inflammation.^{25,26} To the best of our knowledge, targeted stimulation of cardiac lymphangiogenesis has never before been attempted in the MI setting.

Here, we present a molecular study of the cardiac lymphatic tree describing the endogenous lymphangiogenic response to myocardial injury and its impact on cardiac lymphatic function, myocardial interstitial fluid balance, and immune cell infiltration. Furthermore, we investigate for the first time whether targeted intramyocardial lymphangiogenic therapy may exert beneficial effects on cardiac remodeling and function post-MI.

Methods

Animals and Reagents

Male Wistar rats (220 g) were obtained from Janvier. Animal housing and experiments were in accordance with National Institutes of Health guidelines, and the study ethically approved by the Normandy University regional review board according to French and EU legislation (project no. 01181.01). Recombinant rat vascular endothelial growth factor (VEGF)-C_{C152S} was purchased from Reliatech. Sources of antibodies and other reagents are listed in the online-only Data Supplement Methods (Tables I through III in the online-only Data Supplement).

Surgical Model

Left ventricular (LV) MI was induced by left coronary artery anterior descending branch ligation (permanent model) or occlusion (45

minutes of ischemia; temporary model) as previously described.²⁷ Albumin-alginate microparticles, loaded or not with VEGF-C_{C152S}, were injected in the LV free wall after reperfusion in the temporary MI model.

Functional Evaluations

Echocardiography, MRI, and Hemodynamics

Echocardiography was performed in sedated rats as previously described.²⁷ MRI analyses were performed in anesthetized rats, as described,²⁷ and for T2-mapping of cardiac water content by using a 4.7T horizontal bore scanner (Bruker). Invasive hemodynamic assessment of cardiac function was performed by LV catheterization as previously described.²⁸ See online-only Data Supplement Methods.

Lymphangiography

Invasive cardiac lymphangiography was performed at 4, 8, or 12 weeks post-MI. Fluorescent quantum dots (Molecular Probes) were injected intramyocardially, and fluorescein isothiocyanate-dextran (Sigma-Aldrich) was injected intravenously, followed by macroconfocal imaging (TCS LSI, Leica) of the anterolateral epicardium. Images were assembled using NIH ImageJ software for 3D reconstruction of cardiac surface blood and lymphatic vascular networks. For details see online-only Data Supplement Methods.

Gravimetry

Cardiac water content was evaluated by wet weight–dry weight method after desiccation of tissues for 5 days at 65°C, similar to what has been described.²⁹

Immunohistochemistry and Histology

Immunohistochemistry

Hearts were arrested in diastole and either fixed in 3% paraformaldehyde or snap-frozen. Whole hearts or sequential cryosections (8 μm) were immunolabeled by using lymphatic markers (LYVE, Podoplanin, Prox-1, vascular endothelial growth factor receptor 3 [VEGFR3], FOXC2, and CCL21), blood vessel markers (CD31, SMA), immune cell markers (CD68, CD11b, CD11c), and wheat germ agglutinin for cardiomyocyte contours. 4',6-Diamidino-2-phenylindole provided nuclear stain. Signals were visualized with either peroxidase-based colorimetry or immunofluorescence. Images were assembled using ImageJ software and 3D-modeled using Amira software (FEI). For details, see online-only Data Supplement Methods.

Histology

Cardiac cryosections (8 μm) were stained with Sirius Red. Infarct size was calculated as: (%) Infarct area/total LV area. Cardiac interstitial collagen density (fibrosis) in noninfarct areas was evaluated as described.²⁷ For details, see online-only Data Supplement Methods.

Western Blot

Cardiac LV samples were extracted, and denatured samples were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and blotted to nitrocellulose membranes incubated with antibodies as detailed in online-only Data Supplement Methods.

Statistics

Data are presented as mean±standard error of the mean. Differences between multiple groups were evaluated by parametric 1-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test for samples with normal distribution and n>7 rats/group, or alternatively for samples with non-Gaussian distribution, or n<8 rats/group, using nonparametric Kruskal-Wallis analysis followed by the Dunn post hoc test. Parametric Pearson or nonparametric Spearman rank order tests were used for evaluating correlations. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism5.

Results

Remodeling of Cardiac Lymphatics Post-MI

First, we performed immunohistochemical analyses to assess the molecular and structural profile of the cardiac lymphatic network in the LV of healthy, adult rats. The density of intramyocardial LYVE-1⁺ lymphatics was 10 times lower than the corresponding density of CD31⁺ blood vessels; whereas the blood vessel-to-cardiomyocyte ratio was \approx 1:1, the lymphatic-to-cardiomyocyte ratio was 1:10 (Figure 1A through 1F, L, Figure IA in the online-only Data Supplement). Cardiac LYVE-1⁺ lymphatic vessels expressed VEGFR3 (Figure IB and IC in the online-only Data Supplement) and Prox-1 (online-only Data Supplement Figure IE). In the subepicardium, LYVE-1⁺/VEGFR3⁺ precollector-like vessels of at least 20 μ m in diameter also expressed podoplanin (Figure 1C and 1D, Figure IC in the online-only Data Supplement). However, in midmyocardial areas lymphatic podoplanin expression was less frequent (Figure ID in the online-only Data Supplement). Indeed, the vast majority (>80%) of LYVE-1⁺ vessels were small (lumen diameter <5 μ m) lymphatic capillaries that showed variable expression of VEGFR3, were negative for podoplanin, and devoid of smooth muscle cells (Figure IIA in the online-only Data Supplement), and did not express macrophage markers (Figure IIB through IID in the online-only Data Supplement). The intramyocardial lymphatics drain centrifugally, with each cardiac contraction, toward the superficial epicardial lymphatic network composed of both blunt-ended capillaries and larger precollectors and valved collecting ducts (Figure 1M, Figure III in the online-only Data Supplement), which empty into periaortic and paratracheal lymph nodes.^{2,30}

Next, we investigated the remodeling of the cardiac lymphatics following MI induced by permanent ligation of the left coronary artery anterior descending branch. The lymphatic density in the infarct scar literally exploded by 12 weeks post-MI in comparison with sham rat levels (1042 ± 100 versus 141 ± 7 LYVE-1⁺ lymphatics/mm²; $P < 0.001$). The infarct lymphangiogenesis essentially involved generation of small, capillary lymphatics but also some large, sac-like LYVE-1⁺ vessels lacking podoplanin expression (Figure IVA in the online-only Data Supplement). Beyond the infarct, in adjacent LV free wall areas, we found that, whereas the lymphatic capillary density was unaltered in the midmyocardium (Figure IVC in the online-only Data Supplement), it progressively increased in the subepicardium during development of chronic heart failure, reaching $138 \pm 8\%$ ($P < 0.01$) of sham levels by 12 weeks (Figure 1A). This increase in cardiac lymphatics occurred concomitant with a significant decrease in myocardial blood capillary, and arteriolar densities, as well, reduced to 74% ($P < 0.001$) and 78% ($P < 0.05$) of sham levels by 12 weeks, respectively (Figure 1E through 1H). The increase in subepicardial lymphatic density was associated with a transient decrease in podoplanin⁺ vessel density, and the relative percentage of LYVE-1⁺/podoplanin⁺ precollectors was reduced to $57 \pm 10\%$ ($P < 0.001$) of sham levels at 4 weeks post-MI (Figure 1C and 1D, Figure IVB in the online-only Data Supplement). Vessel size analyses revealed that the

percentage of open vessels (diameter >5 μ m) was \approx 6% of all LYVE-1⁺ vessels in healthy sham rats, and all these essentially subepicardial vessels were podoplanin⁺ (Figure 1I, Figure 1B and 1C in the online-only Data Supplement). MI significantly reduced the percentage of open vessels because of preferential growth of small lymphatic capillaries. Furthermore, the mean diameter among remaining open vessels was reduced to $58 \pm 5\%$ ($P < 0.01$) of sham levels at 4 weeks, leading to a transient reduction by $76 \pm 6\%$ ($P < 0.001$) of the total area of open cardiac lymphatics (Figure 1J and 1K).

Thus, whereas MI was associated with a significant increase in the density of lymphatic capillaries, extending well beyond the infarct to the subepicardium of noninfarct areas, there was progressive relative rarefaction of larger precollector vessels (15–50 μ m diameter) that may influence the lymphatic drainage capacity of the heart. Moreover, the superficial epicardial lymphatic network also underwent significant remodeling, again extending beyond the scar region (Figure 1K).

Molecular Regulation of Cardiac Lymphangiogenesis

Next, we assayed the levels of lymphangiogenic regulators VEGF-A, VEGF-C, and VEGFR3 in cardiac samples. In agreement with previous studies, we found that, whereas VEGF-A levels, peaking early after ischemia,⁹ were reduced to sham levels by 12 weeks post-MI, the cardiac levels of VEGF-C and VEGFR3 remained elevated, and even tended to increase, from 4 to 12 weeks (Figure 2A), in support of active cardiac lymphangiogenesis. The cardiac VEGF-C may in part be derived from recruited macrophages, where its expression is induced by both inflammatory mediators and osmotic pressure-regulated pathways.^{31,32}

Alteration of Cardiac Lymphatic Transport and Myocardial Fluid Balance Post-MI

In view of the structural alterations of the cardiac lymphatic network post-MI, we investigated cardiac lymphatic function. Cardiac lymphangiography, based on a macroconfocal ex vivo imaging approach developed in our laboratory, revealed attenuated lymphatic transport by 4 weeks, and partially restored transport capacity by 12 weeks post-MI (Figure 2B). This transient functional deficit mirrors the timeline of structural modifications, notably the decrease in the percentage of precollectors and total area of open lymphatics (Figure 1D and 1K), indicating that transport function and lymphatic precollector structure, rather than lymphatic capillary density, are linked.

Similar to previous studies,⁸ we found that cardiac water content, as a proxy for myocardial edema, was increased in the LV infarct zone for up to 16 weeks post-MI (Figure 2C). Moreover, we also detected significantly increased water content in the noninfarcted LV free wall for at least 4 weeks post-MI (Figure 2C). These findings of slowly dissipating myocardial edema, extending to noninfarcted areas and persisting long after the acute ischemia-induced vascular hyperpermeability has subsided,¹⁰ point to insufficient cardiac lymphatic transport as a limiting factor for reinstatement of cardiac fluid homeostasis post-MI.

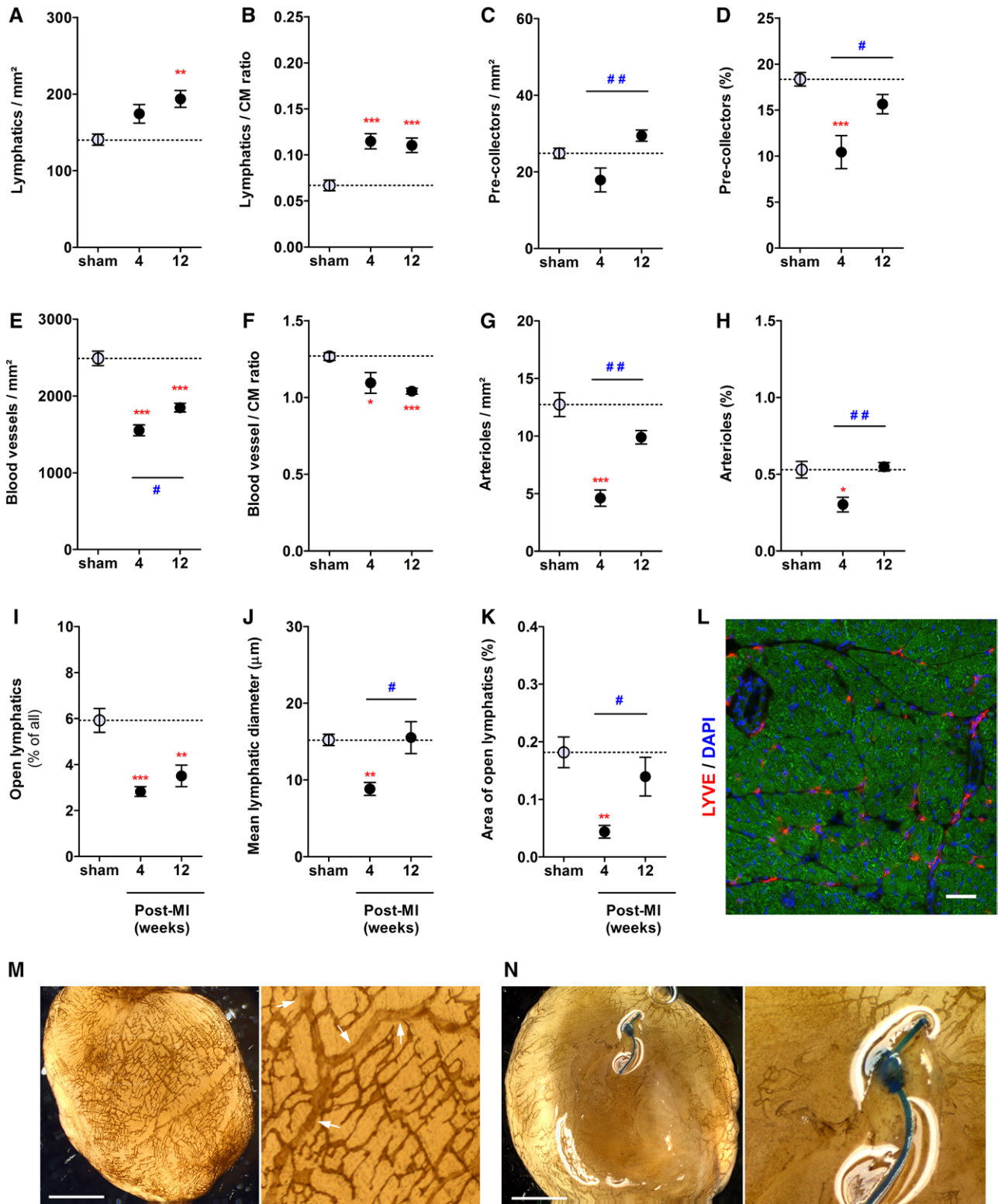


Figure 1. Alterations of cardiac lymphatics following MI. LYVE-1⁺ lymphatic density (A), LYVE-1⁺ lymphatic-to-cardiomyocyte (CM) ratio (B), LYVE-1⁺/podoplanin⁺ precollector density (C), and percentage of podoplanin⁺ vessels (among LYVE-1⁺ lymphatics; D) in noninfarcted LV subepicardium following MI induced by permanent LCAAd ligation (n=8–13 rats/group). Dotted line indicates healthy sham levels. CD31⁺ blood vessel density (E), CD31⁺ blood vessel-to-CM ratio (F), SMA⁺ arteriolar density (G), and percentage of arterioles (among CD31⁺ blood vessels; H) in rat myocardium (n=8–16 rats/group). Lymphatic vessel sizes were evaluated, and the frequency of open lymphatics (diameter>5 μm) among LYVE-1⁺ vessels was calculated (I). Average vessel diameter among open lymphatics (J), and total open lymphatic area per mm² (K). (n=8–10 rats/group). Example of the rat subepicardial lymphatic network (L): LYVE-1 (red); cardiomyocytes (green); nuclei (blue). Scale bar, 50 μm. Colorimetric whole-mount imaging of epicardial surface lymphatics in healthy sham rats (M) or at 4 weeks post-MI (N). Valved collectors indicated by white arrows in inset (M). Permanent LCAAd ligation in blue (N). Scale bar, 2 mm. Values represent mean±SEM. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs sham. #P<0.05; ##P<0.01 as indicated. LCAAd indicates left coronary artery anterior descending branch; LV, left ventricle; MI, myocardial infarction; and SEM, standard error of the mean.

Downloaded from <http://circ.ahajournals.org/> by guest on November 26, 2017

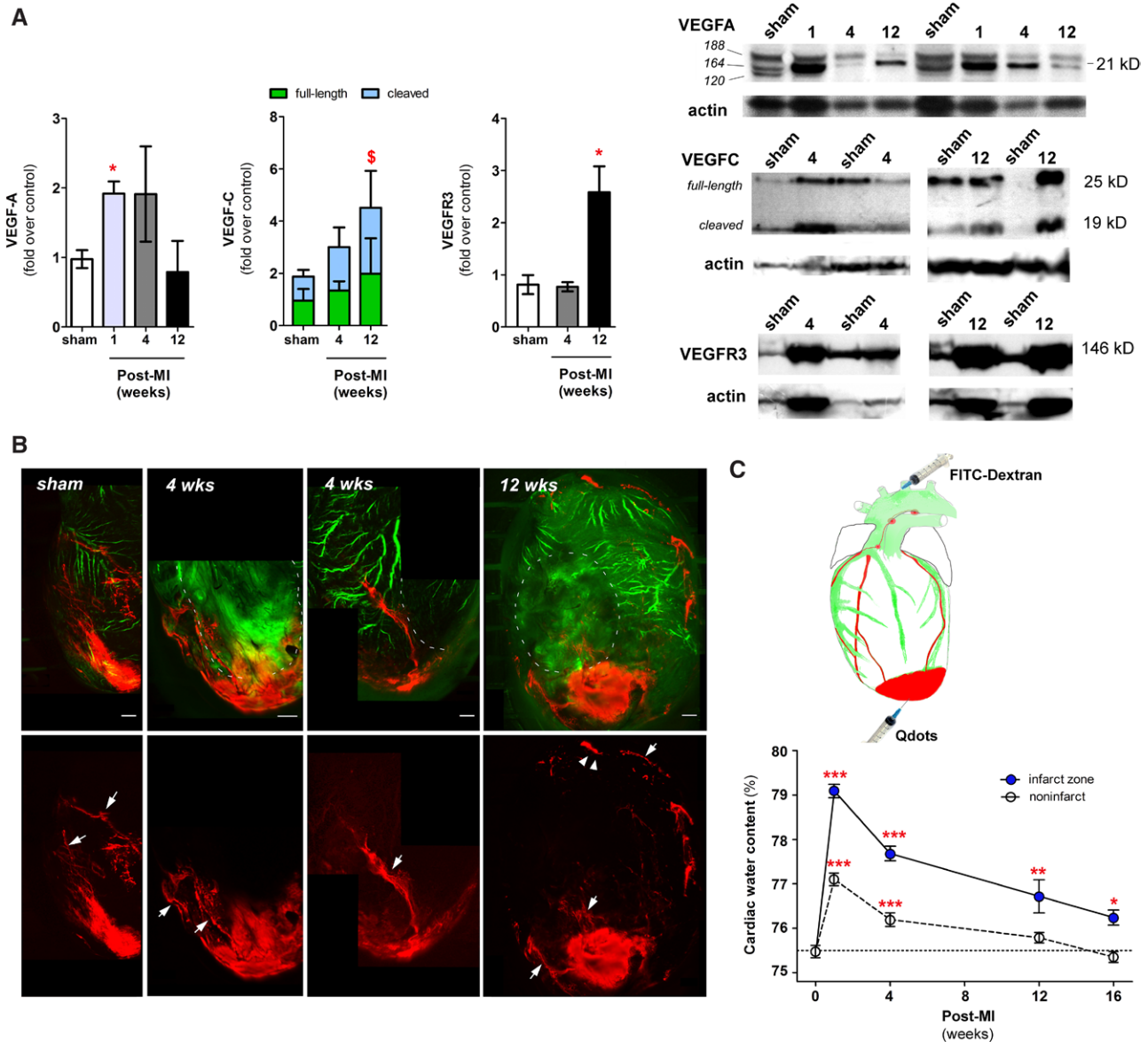


Figure 2. Alteration of lymphangiogenic regulators, cardiac lymphatic transport, and myocardial fluid balance post-MI. **A**, Relative cardiac protein levels of VEGF-A, VEGF-C, and VEGFR3 evaluated in healthy sham and at 1 week, 4 weeks, or 12 weeks post-MI. Values represent mean±SEM of fold above sham of protein levels normalized to actin. Several VEGF-A bands were observed, notably in sham, corresponding to 188, 164, and 121 amino acid VEGF-A isoforms. VEGF-C also migrated as 2 bands, corresponding to full-length and cleaved growth factor, respectively (n=4–10 rats/group). **B**, Cardiac lymphangiography. **Left**, Macroconfocal imaging of the cardiac surface (anterolateral views) in a sham rat, and at 4 weeks or 12 weeks post-MI. Scale bar, 1 mm. White lines indicate infarct area. White arrows in the bottom row indicate transporting lymphatics, and double arrowheads indicate periaortic lymph nodes. **Right**, Illustration of the setup used for evaluating cardiac lymphatic transport capacity: fluorescent quantum dots (red) are injected intramyocardially in the apex where they are captured by superficial cardiac lymphatics and transported toward the heart base and periaortic draining lymph nodes through 1 or several of the main cardiac collectors. The blood vasculature is visualized by intravenous injection of FITC-dextran (green). Images are captured at a time point when, in healthy sham rats, quantum dots have reached the cardiac lymph nodes. **C**, Gravimetric analyses of cardiac water content in the infarct (●) vs noninfarct (○) LV wall following MI (n=7–22 rats/group). \$P=0.08; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs sham. FITC indicates fluorescein isothiocyanate; LV, left ventricle; MI, myocardial infarction; SEM, standard error of the mean; VEGF, vascular endothelial growth factor; and VEGFR3, vascular endothelial growth factor receptor 3.

Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis by Targeted Delivery of VEGF-C_{C152S}

To assess whether lymphangiogenic therapy might improve cardiac lymphatic transport and reduce cardiac water imbalance post-MI, we developed a targeted approach using microparticle-based intramyocardial delivery of the VEGFR3-selective designer protein VEGF-C_{C152S}.³³ Our biodegradable, injectable albumin-alginate microparticles release bioactive

growth factors, including VEGF-C_{C152S}, over several weeks, as assessed in vitro (Figure VA through VC in the online-only Data Supplement), leading to increased therapeutic efficacy over naked protein delivery, and spatiotemporally controlled effects, as well, as demonstrated previously.²⁷

One of the many advantages of our microparticle-based approach is that it is associated with minimal immunological interference, as opposed to adenoviral therapy, which in

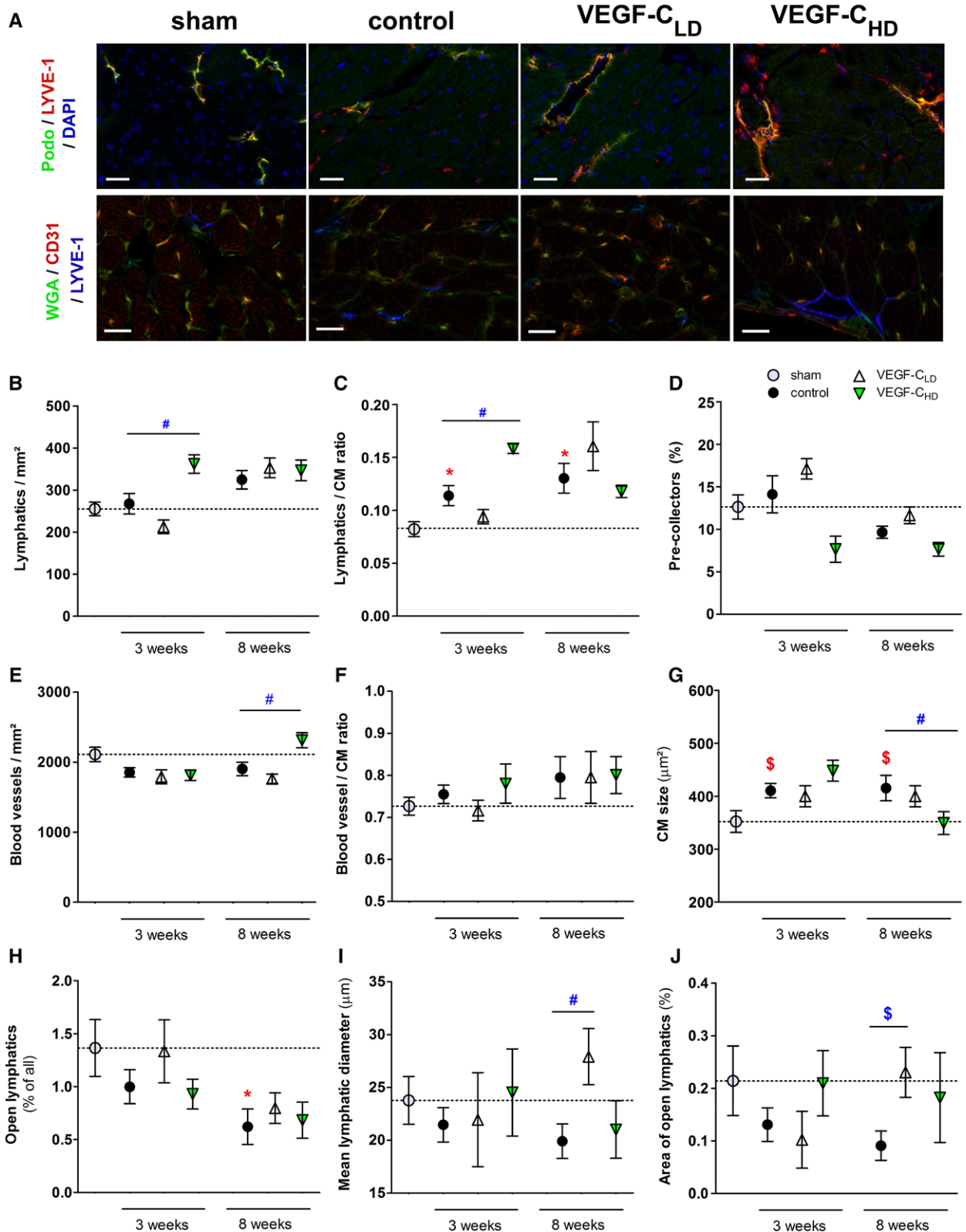


Figure 3. Targeted delivery of VEGF-C_{C152S} selectively stimulates cardiac lymphangiogenesis. Examples of rat subepicardial lymphatics (A): **Top row**, LYVE-1⁺ (red)/podoplanin⁺ (green) precollectors; nuclei, blue. **Bottom row**, Cardiomyocytes (green); CD31⁺ blood vessels (red); LYVE-1⁺ (blue). LYVE-1⁺ lymphatic density (B), LYVE-1⁺ vessel-to-CM ratio (C), and relative density of podoplanin⁺ precollectors (D) in the noninfarcted subepicardium at 3 weeks or 8 weeks post-MI (n=6–13 rats/group). CD31⁺ blood vessel density (E) and CD31⁺ blood vessel-to-CM ratio (F), and cardiomyocyte sizes (G) (n=7–11 rats/group). Frequency of open lymphatics (diameter>5 μm) among LYVE-1⁺ vessels (H), lymphatic vessel diameter (I), and total area of open lymphatics (J) (n=5–11 rats/group). Dotted line indicates healthy sham levels (C). Controls (●) and VEGF-C_{C152S}-treated rats (low dose, Δ; high dose, ▼). Values represent mean±SEM. \$P=0.08; *P<0.05 vs sham; #P<0.05 as indicated. Scale bar, 50 μm. CM indicates cardiomyocyte; HD, high dose; LD, low dose; MI, myocardial infarction; SEM, standard error of the mean; and VEGF, vascular endothelial growth factor.

addition may lead to lymphatic uptake and transport of active virions.³⁴ In contrast, our microparticles are small enough to be readily injectable, yet large enough to be entrapped between cardiomyocytes at the injection site, thus limiting spatially, in addition to temporally, the release of bioactive factors.

We opted for a temporary occlusion MI model in our subsequent studies because of its higher pertinence to the clinical situation, and to avoid confounding effects on cardiac lymphatic transport caused by inadvertent permanent ligation of one of the main cardiac collectors that run alongside the left coronary artery anterior descending branch (Figures 1M and 2B). Our experimental design included sham-operated animals, MI controls injected with empty microparticles, and 2 groups of VEGF-C_{C152S}-treated MI rats: low-dose (1.5 µg/rat: VEGF-C_{LD}) and high-dose VEGF-C (5 µg/rat VEGF-C_{HD}) (Figure VD and VE in the online-only Data Supplement). Despite similar infarct sizes at 3 weeks and 8 weeks post-MI, the cardiac hypertrophy, present in control MI rats by 8 weeks, was less pronounced in VEGF-C_{HD}-treated rats (Figure VIA through VIC in the online-only Data Supplement), suggesting attenuated LV remodeling in the group receiving high-dose VEGF-C_{C152S}.

Similar to our findings in the permanent ligation model, control MI rats displayed an endogenous capillary lymphangiogenic response together with lymphatic remodeling in the infarct (Figure VID through VIH in the online-only Data Supplement). However, neither lymphatic capillary density nor lymphatic sizes in the infarct area were further increased by VEGF-C_{C152S} therapy, in comparison with controls (Figure VIF, VIG, and VIH in the online-only Data Supplement).

In the adjacent subepicardium of the noninfarcted LV free wall, the lymphangiogenic response in controls was slower than in the permanent ligation model, and the lymphatic capillary density was still not significantly increased by 8 weeks post-MI, although capillary-to-cardiomyocyte ratios were already increased by 3 weeks (Figure 3A through 3C). Furthermore, only VEGF-C_{HD} significantly increased lymphatic capillary density and lymphatic-to-cardiomyocyte ratios in the subepicardium by 3 weeks in comparison with controls (Figure 3A through 3C), and further tended to increase midmyocardial lymphatic density (Figure VIIA through VIID in the online-only Data Supplement), indicating an accelerated cardiac lymphangiogenesis. By 8 weeks, the lymphatic capillary densities were similar among all 3 MI groups, demonstrating that VEGF-C_{C152S} therapy increased the speed, but not the extent, of the cardiac lymphangiogenic response post-MI. However, in this temporary MI model, where the relative rarefaction of LYVE-1⁺/podoplanin⁺ precollectors was less pronounced (Figure 3D), VEGF-C_{C152S} therapy did not significantly alter precollector densities, indicating lymphatic capillary expansion as the main effect. The MI-induced myocardial blood vessel rarefaction was less pronounced in controls in this temporary occlusion MI model (Figure 3E). Although higher blood capillary density was observed at 8 weeks in the VEGF-C_{HD} group, this was the result of simultaneously decreased cardiac hypertrophy (Figure 3G), and the blood capillary-to-cardiomyocyte ratio was unaffected by VEGF-C_{C152S} therapy (Figure 3F), indicating the absence of effects on myocardial angiogenesis. Furthermore, MI-induced arteriolar rarefaction

was also not altered by VEGF-C_{C152S} therapy (arteriolar density: 65±3%, *P*<0.05, and 64±5%, *P*<0.01, of sham levels at 8 weeks in controls and VEGF-C_{HD} groups, respectively).

Vessel size analyses revealed that the frequency of open lymphatics (diameter>5µm) was reduced by 8 weeks in controls because of the preferential growth of small lymphatic capillaries (Figure 3H). However, neither open vessel mean diameter (Figure 3I) nor total area of open intramyocardial lymphatics (Figure 3J) were significantly reduced in comparison with sham rats in this temporary occlusion MI model. Although VEGF-C_{C152S} therapy did not increase the frequency of open vessels, again indicating capillary expansion as the main effect, VEGF-C_{LD} treatment, but not VEGF-C_{HD}, did limit MI-induced slimming-remodeling of precollectors (Figure 3I). This led to an increase (154±52% of control levels, *P*=0.08) in the total area of open lymphatics in the noninfarcted subepicardium of VEGF-C_{LD}-treated rats (Figure 3J).

Assessment of the Epicardial Lymphatic Network Remodeling and Function

In the surface epicardial lymphatic network, examined by whole mount, virtually all vessels, ranging from LYVE-1 highly expressing capillaries to LYVE-1 weakly expressing valved collectors, were positive for podoplanin (Figure 4, Figure VIII in the online-only Data Supplement). However, some podoplanin⁺ structures were negative for LYVE-1, confirming LYVE-1 as the most selective and consistent marker of intra- and epicardial lymphatics (Figure 4, Figure I in the online-only Data Supplement). Temporary left coronary artery anterior descending branch occlusion, similar to permanent ligation, led to almost complete loss of draining lymphatics over the infarct, and to severe remodeling of epicardial lymphatics in the adjacent, noninfarcted LV surface, as well (Figure 4). Three-dimensional modeling, followed by vessel-size profiling, revealed that the relative frequency of small lymphatics (<15 µm diameter, blue-green) was increased in control and VEGF-C_{LD} groups by 8 weeks post-MI (Figure 4). In contrast, in VEGF-C_{HD}-treated rats, the frequency of larger (>30 µm diameter, red) epicardial precollectors was increased in comparison with sham and controls. This prevention by VEGF-C_{HD} treatment of MI-induced epicardial lymphatic profile shifting, together with increased intramyocardial lymphatic density (Figures 3B, 3C, and 4), but also the enlargement of intramyocardial lymphatics, as observed in VEGF-C_{LD}-treated rats (Figure 3I and 3J), could potentially lead to improved cardiac lymphatic drainage in comparison with MI controls. However, cardiac lymphangiography revealed no major improvement in lymphatic transport capacity in the anterior LV surface (encompassing both infarct and peri-infarct regions) of VEGF-C_{LD}-treated versus controls at 8 weeks post-MI (Figure 5).

Effect of Therapeutic Lymphangiogenesis on Myocardial Edema, Inflammation, and Cardiac Fibrosis

Despite the lack of evidence of macroscopically improved cardiac lymphatic function in the VEGF-C_{LD}-treated group, we investigated whether our lymphangiogenic therapy influenced myocardial fluid balance post-MI. Similar to

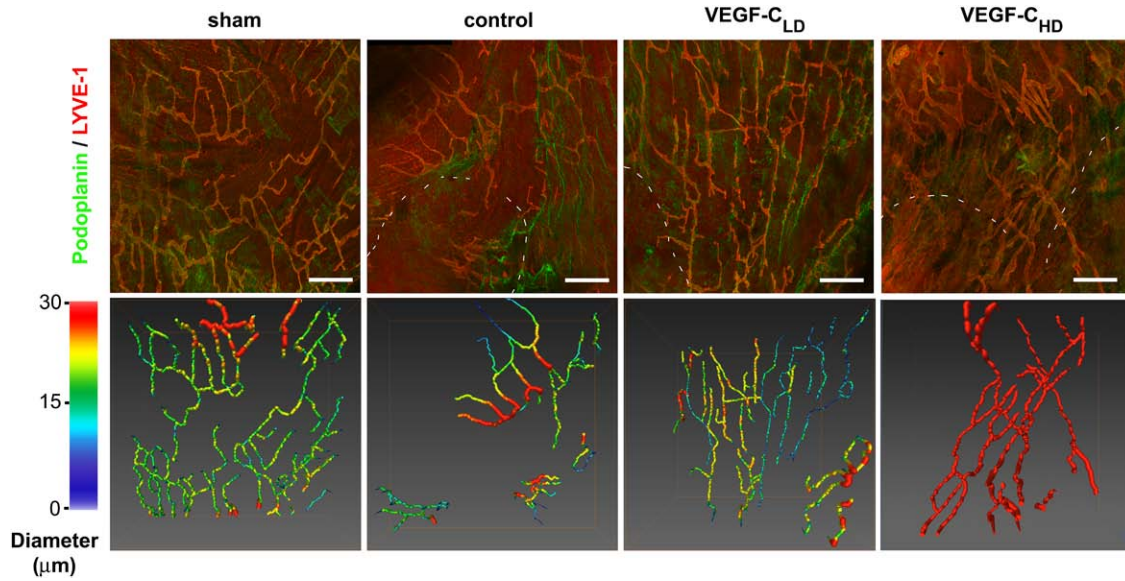


Figure 4. Remodeling of cardiac surface lymphatics post-MI. Whole-mount labeling of epicardial surface lymphatics in healthy rats (sham) or in the LV infarct (dotted white line) border zone at 8 weeks post-MI in controls or VEGF-C_{C152S}-treated rats. Scale bar, 500 μm. Examples of 3D modeling of the epicardial LYVE-1⁺ lymphatic network at mid-LV level with color coding of lymphatic diameters. Color bar: 0 to 30 μm vessel diameter. HD indicates high dose; LD, low dose; LV, left ventricle; MI, myocardial infarction; and VEGF, vascular endothelial growth factor.

our observations in the permanent ligation model, cardiac water content was significantly increased in controls for up to 8 weeks post-MI (Figure 6). Again, the myocardial edema extended from the infarct to noninfarcted areas. In VEGF-C_{HD}-treated rats, the MI-induced myocardial water imbalance, assessed by gravimetry, was reduced by 3 weeks in the noninfarcted LV free wall and septum, but not in the infarct or right ventricle (Figure 6A). In the VEGF-C_{LD} group, there

was no difference from MI controls in cardiac water content at 3 weeks (data not shown), and, by 6 weeks, only a small, nonsignificant reduction was found (−10±3% of T2 signal, *P*=0.12), as assayed by MRI T2 mapping (Figure 6B and 6C). However, by 8 weeks, there was a significant reduction of both right ventricular and total cardiac water content, as assessed by gravimetry, in VEGF-C_{LD} rats in comparison with controls (Figure 6E).

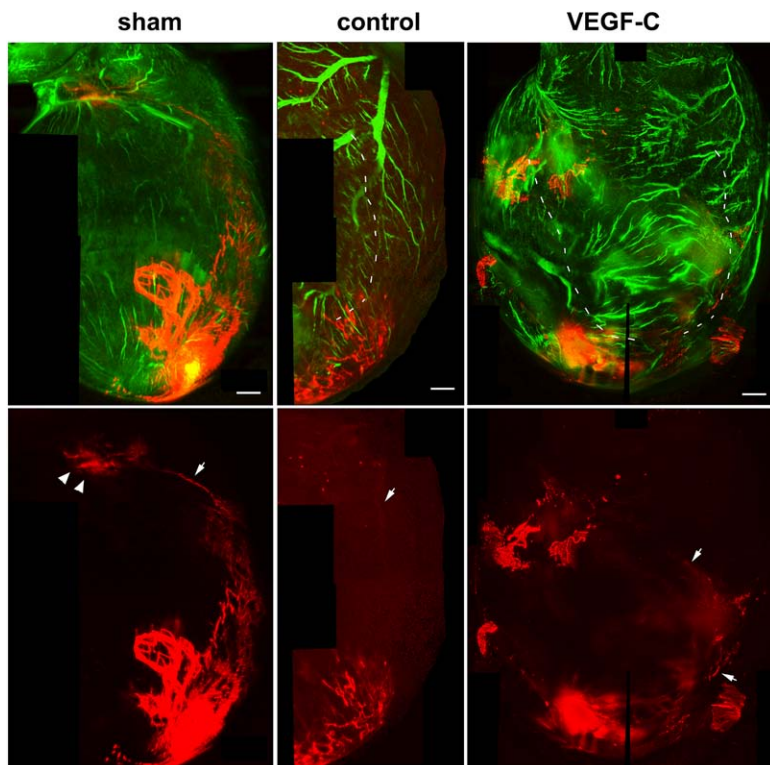


Figure 5. Altered cardiac lymphatic transport post-MI. Cardiac lymphangiography: examples of quantum dot transport from apex to heart base through epicardial surface lymphatics in healthy rats (sham), and reduced acute transport capacity in the peri-infarct area (infarct border traced in white dotted line) at 8 weeks post-MI in controls and VEGF-C_{LD}-treated rats. Quantum dots (red); FITC-dextran-labeled cardiac blood vessels (green). **Bottom row,** White arrows indicate transporting lymphatic collectors and double arrowheads draining periaortic lymph nodes. Scale bar, 1 mm. FITC indicates fluorescein isothiocyanate; MI, myocardial infarction; and VEGF, vascular endothelial growth factor.

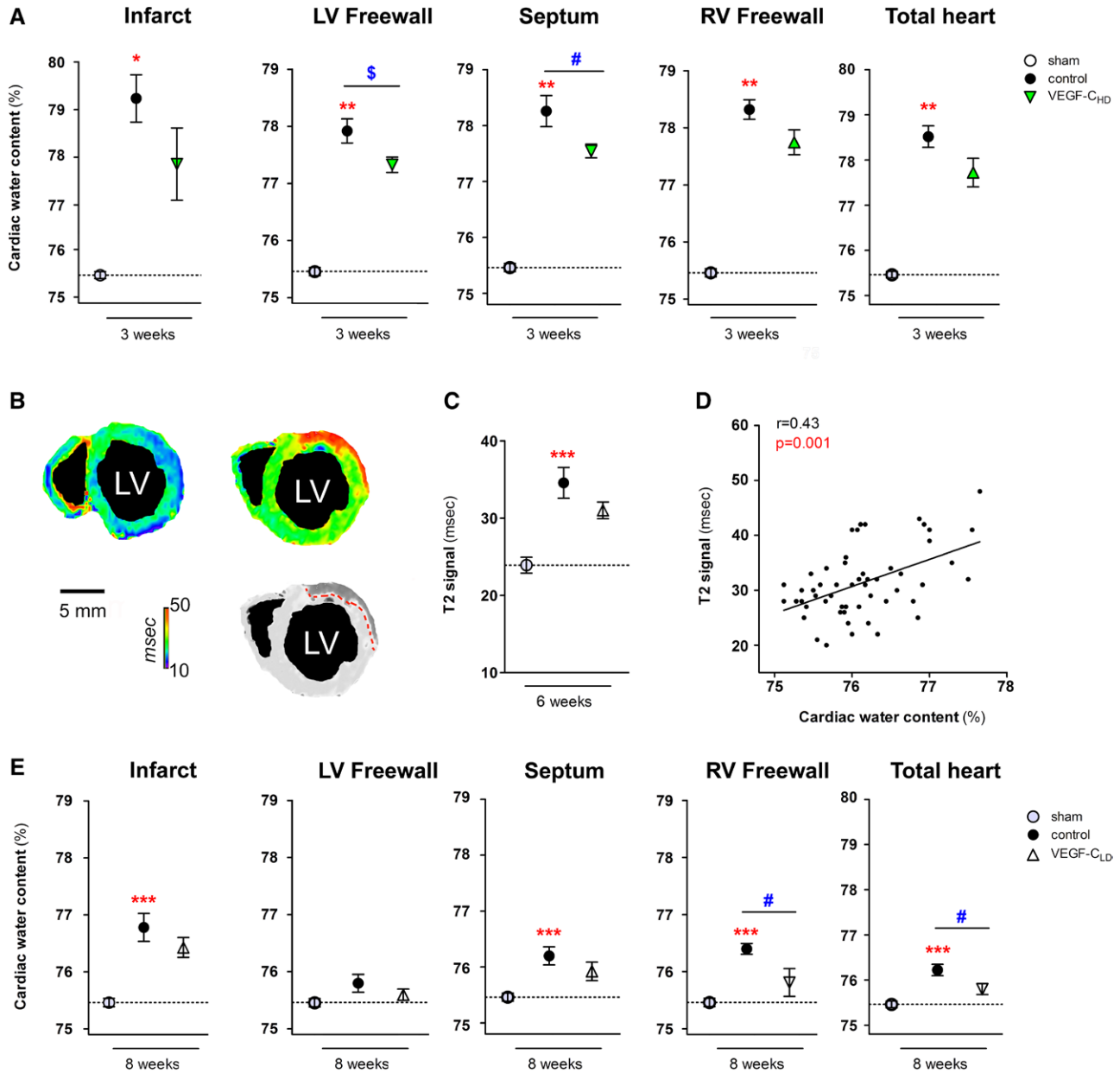


Figure 6. Therapeutic lymphangiogenesis improves myocardial water balance post-MI. **A**, Gravimetric assessment of cardiac water content at 3 weeks post-MI ($n=4-11$ rats/group). **B**, Examples of cardiac MRI T2 mapping and a native view indicating the infarct region. Color-coded MRI images show edematous (red/yellow, **Right**) infarct and peri-infarct areas of the LV in a control at 8 weeks post-MI in comparison with baseline (sham) T2 signals (turquoise/blue, **Left**). Color bar indicates range of T2 signal intensity (ms). **C**, MRI-based quantification of cardiac water content (T2 map signal intensity, ms) in the LV free wall at 6 weeks post-MI. **D**, Correlation of T2 map signals with gravimetric measures of cardiac water content. Data pool corresponds to individual measurements obtained in sham rats and at 8 weeks post-MI, r =Spearman correlation coefficient. **E**, Gravimetric assessment of cardiac water content at 8 weeks ($n=8-11$ rats/group). Dotted lines indicate healthy sham levels (○). Controls (●) and VEGF-C_{C152S}-treated rats (low dose, ▲; high dose, ▼). Values represent mean±SEM. * $P<0.05$; *** $P<0.001$ vs sham. \$ $P=0.07$; # $P<0.05$ as indicated. LV indicates left ventricle; MI, myocardial infarction; RV, right ventricle; SEM, standard error of the mean; and VEGF, vascular endothelial growth factor.

Apart from the role of lymphangiogenesis in restoring interstitial fluid balance, expansion and remodeling of cardiac lymphatics may influence the extent, duration, or quality of the inflammatory response to myocardial injury. Examining infarcted (Figure 7B) and noninfarcted (Figure 7A and 7C) LV at 3 weeks post-MI, when the acute inflammatory response has subsided, we found that VEGF-C_{C152S} treatment led to a dose-dependent reduction in CD68⁺ macrophage levels in both the infarct (VEGF-C_{HD}: $48\pm3\%$ of control levels, $P<0.05$) and the

noninfarcted LV (VEGF-C_{HD}: $68\pm5\%$ of controls, $P<0.05$). By 8 weeks, immune cell infiltration was similarly reduced in controls (data not shown), indicating that targeted delivery of VEGF-C_{C152S} modulates the duration, but not the extent, of the inflammatory response in the chronic phase of MI. This may involve increased egress of immune cells, notably antigen-presenting cells such as macrophages and dendritic cells, by cardiac lymphatics. Indeed, CD68⁺ cells were occasionally observed in the lumen of intramyocardial lymphatics

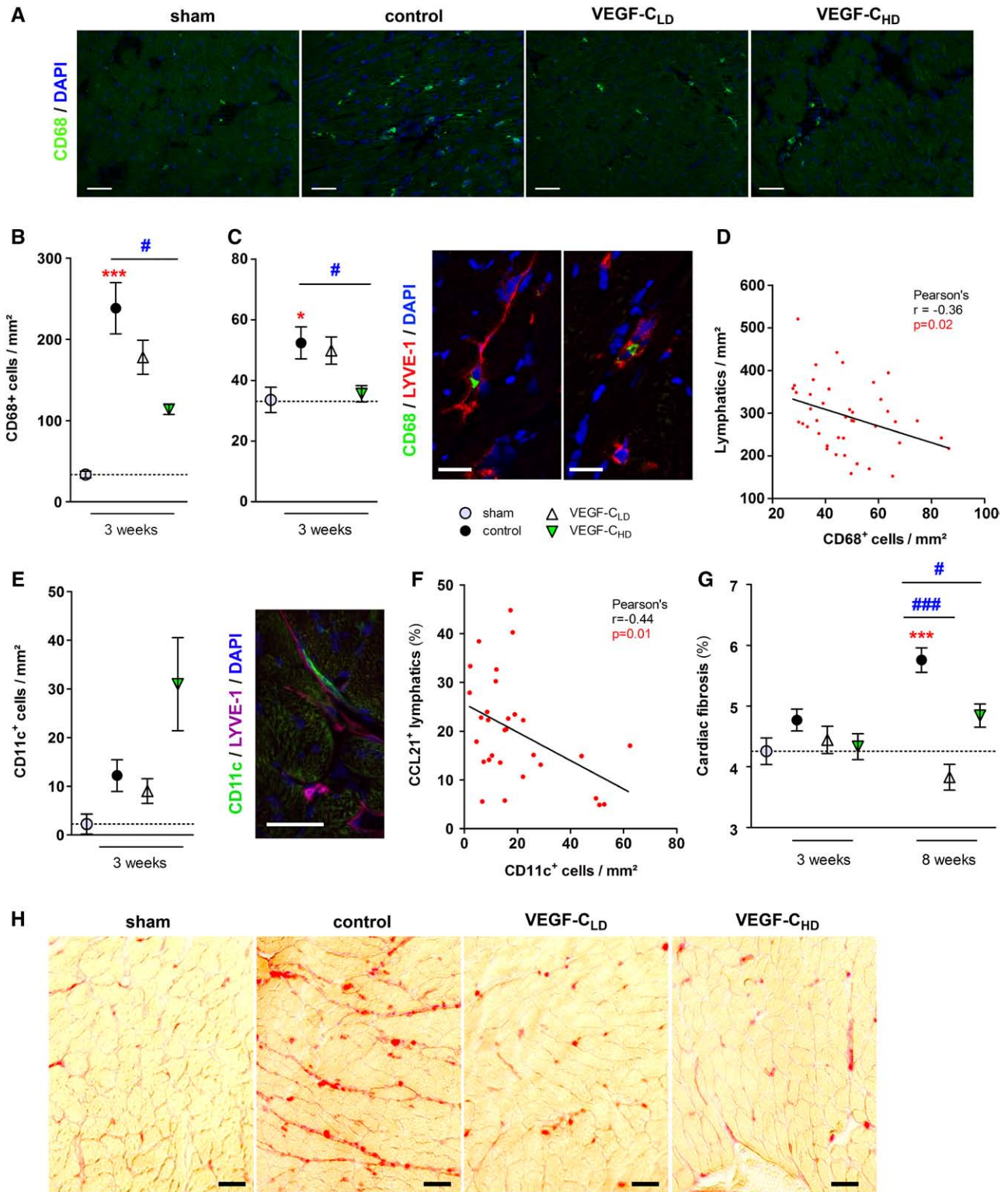


Figure 7. Therapeutic lymphangiogenesis limits macrophage levels and cardiac fibrosis. **A**, Examples of macrophage infiltration in noninfarcted LV at 3 weeks post-MI. Quantification of CD68⁺ macrophage density in infarct (**B**) and noninfarcted LV (**C**) (n=5–11 rats/group). CD68⁺ cells (green) were occasionally observed in the lumen of precollector lymphatics (red). **D**, Correlation between macrophages and intramyocardial lymphatic density. **E**, Quantification and example of CD11c⁺ dendritic cell density in the noninfarcted LV. **F**, Correlation between dendritic cells and CCL21-expressing lymphatics. Quantification (**G**) and examples (**H**) of interstitial cardiac collagen levels in noninfarcted LV at 3 weeks and 8 weeks post-MI (n=5–10 rats/group). Values represent mean±SEM. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ vs sham. # $P < 0.05$; ### $P < 0.001$ as indicated. Scale bar, 50 μ m. DAPI indicates 4',6-diamidino-2-phenylindole; HD, high dose; LD, low dose; LV, left ventricle; MI, myocardial infarction; SEM, standard error of the mean; and VEGF, vascular endothelial growth factor.

(Figure 7C, Figure IIB through IID in the online-only Data Supplement), and CD68⁺ cell density correlated inversely with lymphatic density (Figure 7D), but not with CCL21 expression. Lymphatic-selective expression of the chemokine CCL21 has been shown to regulate immune cell clearance.³⁵ We found that VEGF-C_{HD} treatment led to a nonsignificant increase in CD11c⁺ dendritic cell density (Figure 7E) associated with a trend for lower CCL21 expression levels in subepicardial lymphatics in the noninfarct LV, but not in the infarct, in comparison with controls (Figure VIII in the online-only Data Supplement). Indeed, in agreement with a prominent role for this chemokine in directing dendritic, but not macrophage, cell egress, we found that cardiac CD11c⁺ density correlated inversely with lymphatic CCL21 expression (Figure 7F).

Both myocardial edema and inflammatory mediators released by immune cells, including macrophages, stimulate collagen production in fibroblasts leading to the initiation of cardiac fibrosis extending to noninfarcted areas.^{36,37} Whereas interstitial collagen levels in controls were significantly increased by 8 weeks post-MI in comparison with sham (135±5% of sham levels, $P < 0.001$), we remarkably found that cardiac fibrosis was completely prevented in VEGF-C_{C152S}-treated rats (Figure 7G and 7H).

Effect of Therapeutic Lymphangiogenesis on Cardiac Perfusion and Function

Reduction of myocardial edema and immune cell infiltration may influence cardiac perfusion levels even in the setting of unaltered arteriolar densities. However, MRI analyses performed at 6 weeks post-MI revealed only a weak tendency for improvement of cardiac perfusion in VEGF-C_{HD} rats in comparison with controls (127±17%, $P = 0.08$ versus controls, Figure 8A).

Echocardiography showed limitation of LV dilation (LV end-diastolic diameter and LV end-systolic diameter) at 3 weeks, but not at 6 weeks post-MI, in VEGF-C_{HD}-treated rats (Figure 8B through 8D). Furthermore, LV fractional shortening was not altered by VEGF-C_{C152S} therapy (Figure 8E). In contrast, invasive hemodynamic assessment, by LV catheterization, performed at 8 weeks, uncovered substantial and significant improvement of cardiac diastolic function (compliance, LV end-diastolic pressure-volume relation) in both VEGF-C_{C152S}-treated groups, and a smaller improvement of systolic function (contractility, LV end-systolic pressure-volume relation), significant only in VEGF-C_{HD}-treated rats (Figure 8F through 8I).

Discussion

We found that MI leads to the loss of lymphatic collectors in the scar region, deleterious remodeling of precollectors extending to noninfarcted regions of the LV, and expansion of the subepicardial capillary lymphatic network. These modifications are associated with transient lymphatic transport dysfunction, causing poor myocardial water handling and persistent edema. Remarkably, although VEGF-C_{C152S} therapy dose-dependently stimulated lymphatic capillary growth in the heart, it also reduced MI-induced relative rarefaction and remodeling of epicardial/subepicardial large podoplanin⁺ precollectors, increasing the total area of open lymphatics

accessible for active transport. This development, seen at 8 weeks post-MI, coincided with significant improvement of cardiac water content in the VEGF-C_{LD} group, and prevention of cardiac fibrosis and dysfunction. However, in the VEGF-C_{HD} group, both myocardial fluid balance and cardiac immune cell infiltration were already reduced by 3 weeks when only lymphatic capillary density, but not total open lymphatic area, was significantly different from controls. It is possible that VEGF-C_{C152S} therapy may have influenced lymphatic chemokine signaling other than CCL21 leading to improved active lymphatic uptake and removal of macrophages before expansion of lymphatic precollector and collector vessels.^{35,38} Conversely, inhibition of cardiac lymphangiogenesis has been reported to protect allogeneic heart transplants against rejection by limiting lymphatic transport of activated antigen-presenting cells.³⁵

We found, similar to previous reports,^{39–41} that the infarct zone was teeming with lymphatic capillaries, with no further increase in VEGF-C_{C152S}-treated rats. The remarkable endogenous lymphangiogenic response is likely induced by the rich exudate and prolymphangiogenic immune cells found in the scar, similar to the situation in skin inflammation.³¹ Despite this lymphatic capillary hypervascularity, the evidenced destruction of precollector and collector vessels in the scar epicardium supports our observations of severely altered lymphatic drainage over the infarct, and explains the persistent edema and inflammation of the region. On the other hand, in the bordering noninfarcted LV wall, where VEGF-C_{C152S} therapy led to partial rescue of epicardial/subepicardial precollectors from MI-induced remodeling, cardiac lymphatic transport was still found to be inefficient when acutely challenged in our lymphangiography approach. However, given that we observed reductions in both cardiac water content and macrophage density in noninfarcted myocardium, the structural and molecular effects of VEGF-C_{C152S} treatment seem to have sufficed for improving physiologically relevant lymphatic drainage of the heart.

The marginal decrease in cardiac water content observed with VEGF-C_{HD} therapy, in comparison with controls (0.8% reduction at 3 weeks), may seem anodyne, but given the heart's exquisite sensitivity to changes in interstitial fluid volume, linked to its immediate impact on interstitial fluid pressure in this organ,² even small changes may significantly impact cardiac function. Indeed, an increase in cardiac water content by as little as 2.5% leads to a 30% to 40% reduction in cardiac output.^{42,43} Furthermore, the remarkable improvement of cardiac function seen with our lymphangiogenic therapy is likely attributable to a combination of both direct (interstitial fluid pressure normalization) and indirect (cardiac fibrosis) effects of limiting myocardial edema. Different from lymphatic networks in other organs,^{44,45} notably the essential absence of smooth muscle cells on cardiac precollectors, and only sparse muscular cells on its collecting ducts,³⁰ the heart largely depends on extrinsic factors for regulation of its lymphatic drainage. Consequently, cardiac contractile (systolic) dysfunction is likely a major contributing factor to the insufficient cardiac lymphatic drainage observed post-MI.^{46,47}

VEGF-C therapy has previously been investigated in clinical trials in patients with myocardial ischemia. However, these

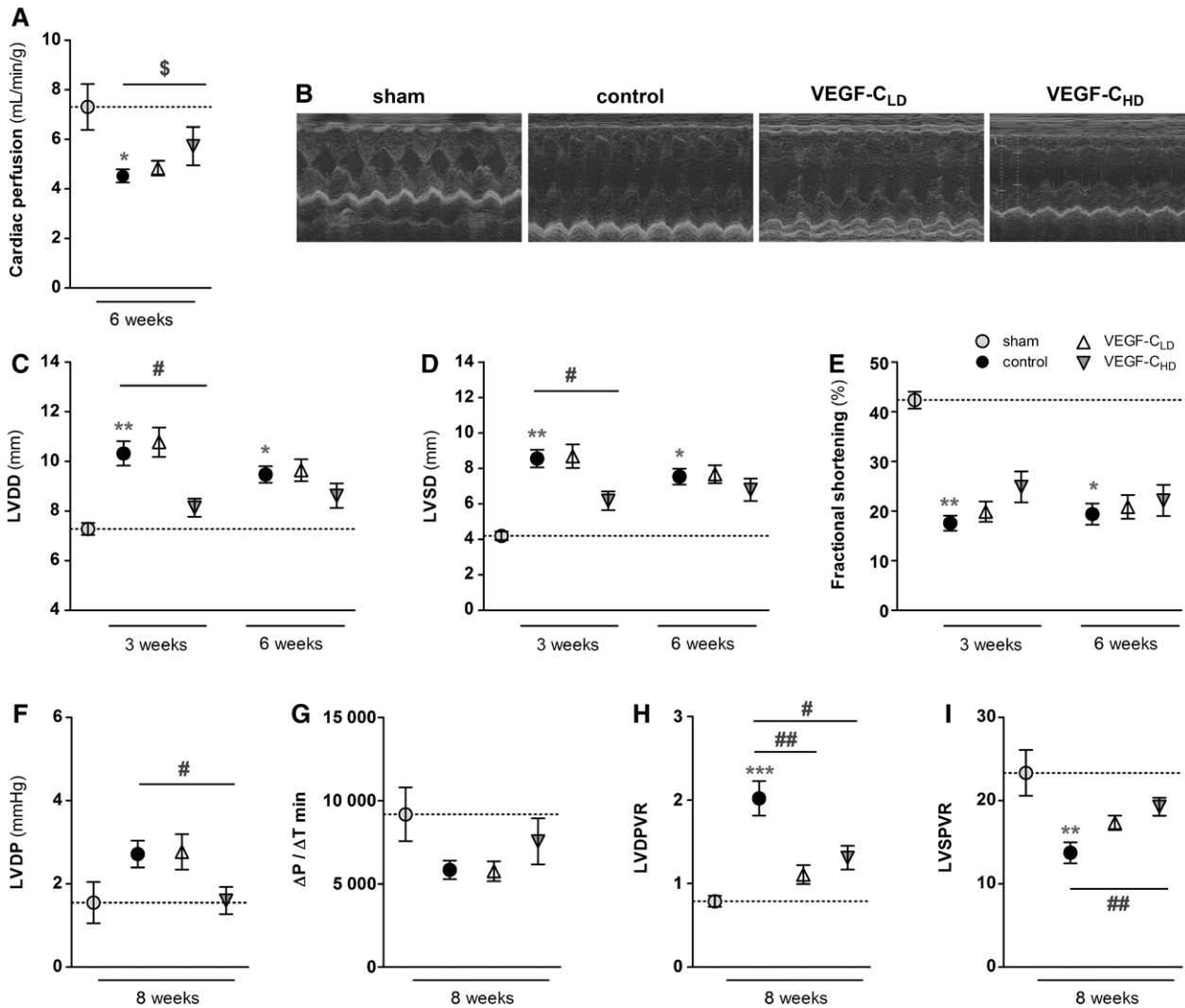


Figure 8. Functional cardiac impact of therapeutic lymphangiogenesis. **A**, MRI analyses of cardiac blood perfusion at 6 weeks post-MI (n=5–13 rats/group). **B**, Examples of echocardiography time-motion views. Evaluation of LV cavity dimensions in end-diastole (LVDD, **C**), end-systole (LVSD, **D**), and fractional shortening (FS, **E**) by echocardiography at 3 weeks and 6 weeks (n=4–13 rats/group). Hemodynamic assessment at 8 weeks of LV end-diastolic pressure (LVDP, **F**), dP/dT min (**G**), LV end-diastolic pressure-volume relation (LVDPVR, **H**), and LV end-systolic pressure-volume relation (LVSPVR, **I**) (n=7–13 rats/group). Values represent mean±SEM. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001 vs sham. \$*P*=0.08; #*P*<0.05; ##*P*<0.01 as indicated. LV indicates left ventricle; SEM, standard error of the mean; and VEGF, vascular endothelial growth factor.

trials were performed with the native protein almost 15 years ago, with the rationale at the time being that VEGF-C (also called VEGF-2) would stimulate cardiac angiogenesis.^{48,49} Of note, although VEGF-C in its spliced, mature form indeed may activate VEGFR2 in blood endothelial cells, leading to stimulation of angiogenesis,^{50,51} it is a far more powerful activator of VEGFR3 on lymphatic endothelial cells leading to the stimulation of lymphangiogenesis. Surprisingly, in retrospect, the potential effects of VEGF-C therapy on cardiac lymphatics and dependent parameters, including myocardial edema, inflammation, and fibrosis, were completely overlooked in these early studies. It thus remains unknown whether VEGF-C gene or protein therapy in humans stimulated cardiac lymphangiogenesis, and further if this mechanism may have contributed to any beneficial cardiac functional effects in patients. Our current findings strongly support renewed interest in VEGF-C as a potential therapeutic option for ischemic heart disease, notably

in patients with signs of chronic myocardial edema and inflammation. Conversely, our study indirectly suggests that humans with genetic or acquired lymphangiogenic deficits²⁰ may be at increased risk to develop chronic myocardial edema and severe cardiac dysfunction in the advent of increased blood vascular permeability, eg, during myocardial ischemia.

Most studies on therapeutic lymphangiogenesis have focused on gene or protein delivery of VEGF-C, which stimulates both sprouting lymphangiogenesis and lymphatic vessel enlargement (lymphatic hyperplasia). In addition, mature native VEGF-C, acting on VEGFR2, may also increase blood as well as lymphatic vascular permeability, causing transient lymphatic dysfunction.^{48,52,53} However, over the past decade, many additional growth factors have been found to stimulate lymphangiogenesis, including VEGF-A, angiopoietins, platelet-derived growth factors, insulin-like growth factors, fibroblast growth factor 2, and hepatocyte growth factor.^{24,54} It is still unknown

what growth factor(s) therapy yields stable lymphatic vessels that durably increase lymphatic transport. Although in our study, VEGF-C_{C152S} monotherapy was sufficient to improve lymphatic network structure and reduce edema, future studies should perhaps envisage the use of growth factor combinations.⁵⁵ Indeed, developmental studies have shown that multiple growth factors are necessary for the correct differentiation and patterning of lymphatic endothelial cells into a functional lymphatic system. Interestingly, a recent study revealed synergistic stimulation of corneal lymphangiogenesis by using VEGF-C combined with fibroblast growth factor 2.⁵⁶

In conclusion, our data show that MI leads to significant remodeling of the cardiac lymphatic network with an endogenous lymphangiogenic response that is insufficient to prevent lymphatic transport dysfunction and initiation of chronic myocardial edema. Promisingly, targeted lymphangiogenic therapy improves both precollector remodeling and capillary lymphangiogenesis, leading to accelerated resolution of myocardial edema and inflammation, and prevention of cardiac fibrosis and dysfunction. Our study represents a striking example of a previously unexplored aspect of cardiac pathophysiology, which may significantly impact future therapeutic options for patients with MI or chronic heart failure.

Acknowledgments

We thank Françoise Lallemand, Annie Lejeune, and Sylvanie Renet for help with histology and molecular analyses, Pr Michaël Molinari and Dr Nicolas Bercu for access and help with electron microscopy, Dr Anna Ratajska for whole-mount suggestions, and Drs Antoine Ouvrard-Pascaud, Benjamin Dubourg, and Pr Jean-Nicolas Dacher for discussions on MRI. We acknowledge funding from the French Fondation de la Recherche (to Dr Brakenhielm), Rouen University (Dr Richard), Inserm (Dr Richard), the French Ministry of Research/Rouen University PhD funds (Ms Henri), and Inserm/Haute Normandie Region PhD funds (M. Houssari).

Disclosures

None.

References

- Shore LR. The lymphatic drainage of the human heart. *J Anat*. 1929;63(pt 3):291–313.
- Bradham RR, Parker EF, Barrington BA Jr, Webb CM, Stallworth JM. The cardiac lymphatics. *Ann Surg*. 1970;171:899–902.
- Miller AJ. The grossly invisible and generally ignored lymphatics of the mammalian heart. *Med Hypotheses*. 2011;76:604–606. doi: 10.1016/j.mehy.2011.01.012.
- Levick JR, Michel CC. Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle. *Cardiovasc Res*. 2010;87:198–210. doi: 10.1093/cvr/cvq062.
- Kline IK, Miller AJ, Katz LN. Cardiac lymph flow impairment and myocardial fibrosis. Effects of chronic obstruction in dogs. *Arch Pathol*. 1963;76:424–433.
- Ludwig LL, Schertel ER, Pratt JW, McClure DE, Ying AJ, Heck CF, Myerowitz PD. Impairment of left ventricular function by acute cardiac lymphatic obstruction. *Cardiovasc Res*. 1997;33:164–171.
- Cui Y. The role of lymphatic vessels in the heart. *Pathophysiology*. 2010;17:307–314. doi: 10.1016/j.pathophys.2009.07.006.
- Mehlhorn U, Geissler HJ, Laine GA, Allen SJ. Myocardial fluid balance. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2001;20:1220–1230.
- Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol*. 1996;270(5 pt 2):H1803–H1811.
- Weis S, Shintani S, Weber A, Kirchmair R, Wood M, Cravens A, McSharry H, Iwakura A, Yoon YS, Himes N, Burstein D, Doukas J, Soll R, Losordo

- D, Cheres D. Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2004;113:885–894. doi: 10.1172/JCI20702.
- Weis SM, Cheres DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*. 2005;437:497–504. doi: 10.1038/nature03987.
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204:3037–3047. doi: 10.1084/jem.20070885.
- Barbay V, Houssari M, Mekki M, Banquet S, Edwards-Lévy F, Henry JP, Dumesnil A, Adriouch S, Thuillez C, Richard V, Brakenhielm E. Role of M2-like macrophage recruitment during angiogenic growth factor therapy. *Angiogenesis*. 2015;18:191–200. doi: 10.1007/s10456-014-9456-z.
- Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res*. 2002;91:988–998.
- Zawieja DC, Greiner ST, Davis KL, Hinds WM, Granger HJ. Reactive oxygen metabolites inhibit spontaneous lymphatic contractions. *Am J Physiol*. 1991;260(6 pt 2):H1935–H1943.
- Aldrich MB, Sevcik-Muraca EM. Cytokines are systemic effectors of lymphatic function in acute inflammation. *Cytokine*. 2013;64:362–369. doi: 10.1016/j.cyto.2013.05.015.
- Nilsson JC, Nielsen G, Groenning BA, Fritz-Hansen T, Sondergaard L, Jensen GB, Larsson HB. Sustained postinfarction myocardial oedema in humans visualised by magnetic resonance imaging. *Heart*. 2001;85:639–642.
- Manrique A, Gerbaud E, Derumeaux G, Cribier A, Bertrand D, Lebon A, Dacher JN. Cardiac magnetic resonance demonstrates myocardial oedema in remote tissue early after reperfused myocardial infarction. *Arch Cardiovasc Dis*. 2009;102:633–639. doi: 10.1016/j.acvd.2009.05.006.
- Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*. 2002;1:219–227.
- Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med*. 2011;17:1371–1380. doi: 10.1038/nm.2545.
- Zheng W, Aspelund A, Alitalo K. Lymphangiogenic factors, mechanisms, and applications. *J Clin Invest*. 2014;124:878–887. doi: 10.1172/JCI17603.
- Dashkevich A, Bloch W, Antonyan A, Fries JU, Geissler HJ. Morphological and quantitative changes of the initial myocardial lymphatics in terminal heart failure. *Lymphat Res Biol*. 2009;7:21–27. doi: 10.1089/lrb.2008.1010.
- Kholova I, Dragneva G, Cermakova P, Laidinen S, Kaskenpaa N, Hazes T, Cermakova E, Steiner I, Ylä-Herttuala S. Lymphatic vasculature is increased in heart valves, ischaemic and inflamed hearts and in cholesterol-rich and calcified atherosclerotic lesions. *Eur J Clin Invest*. 2010;41:487–497.
- Norrmén C, Tammela T, Petrova TV, Alitalo K. Biological basis of therapeutic lymphangiogenesis. *Circulation*. 2011;123:1335–1351. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.704098.
- Huggenberger R, Ullmann S, Proulx ST, Pytowski B, Alitalo K, Detmar M. Stimulation of lymphangiogenesis via VEGFR-3 inhibits chronic skin inflammation. *J Exp Med*. 2010;207:2255–2269. doi: 10.1084/jem.20100559.
- Lähteenvuo M, Honkonen K, Tervala T, Tammela T, Suominen E, Lähteenvuo J, Kholová I, Alitalo K, Ylä-Herttuala S, Saari A. Growth factor therapy and autologous lymph node transfer in lymphedema. *Circulation*. 2011;123:613–620. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.965384.
- Banquet S, Gomez E, Nicol L, Edwards-Lévy F, Henry JP, Cao R, Schapman D, Dautreux B, Lallemand F, Bauer F, Cao Y, Thuillez C, Mulder P, Richard V, Brakenhielm E. Arteriogenic therapy by intramyocardial sustained delivery of a novel growth factor combination prevents chronic heart failure. *Circulation*. 2011;124:1059–1069. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.010264.
- Mulder P, Barbier S, Chagraoui A, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Renet S, Lerebours G, Mahlberg-Gaudin F, Thuillez C. Long-term heart rate reduction induced by the selective I(f) current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation*. 2004;109:1674–1679. doi: 10.1161/01.CIR.0000118464.48959.1C.
- Luo Z, Diaco M, Murohara T, Ferrara N, Isner JM, Symes JF. Vascular endothelial growth factor attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*. 1997;64:993–998.
- Ratajska A, Gula G, Flaht-Zabost A, Czarnowska E, Ciszek B, Jankowska-Steifer E, Niderla-Bielinska J, Radomska-Lesniewska D. Comparative and

- developmental anatomy of cardiac lymphatics. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:183170. doi: 10.1155/2014/183170.
31. Kataru RP, Jung K, Jang C, Yang H, Schwendener RA, Baik JE, Han SH, Alitalo K, Koh GY. Critical role of CD11b+ macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution. *Blood*. 2009;113:5650–5659. doi: 10.1182/blood-2008-09-176776.
 32. Wiig H, Schröder A, Neuhofer W, Jantsch J, Kopp C, Karlsen TV, Boschmann M, Goss J, Bry M, Rakova N, Dahlmann A, Brenner S, Tenstad O, Nurmi H, Mervaala E, Wagner H, Beck FX, Müller DN, Kerjaschki D, Luft FC, Harrison DG, Alitalo K, Titze J. Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. *J Clin Invest*. 2013;123:2803–2815. doi: 10.1172/JCI60113.
 33. Joukov V, Kumar V, Sorsa T, Arighi E, Weich H, Saksela O, Alitalo K. A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities. *J Biol Chem*. 1998;273:6599–6602.
 34. Burton JB, Johnson M, Sato M, Koh SB, Mulholland DJ, Stout D, Chatziioannou AF, Phelps ME, Wu H, Wu L. Adenovirus-mediated gene expression imaging to directly detect sentinel lymph node metastasis of prostate cancer. *Nat Med*. 2008;14:882–888. doi: 10.1038/nm.1727.
 35. Nykänen AI, Sandelin H, Krebs R, Keränen MA, Tuuminen R, Kärpänen T, Wu Y, Pytowski B, Koskinen PK, Ylä-Herttuala S, Alitalo K, Lemström KB. Targeting lymphatic vessel activation and CCL21 production by vascular endothelial growth factor receptor-3 inhibition has novel immunomodulatory and antiarteriosclerotic effects in cardiac allografts. *Circulation*. 2010;121:1413–1422. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.910703.
 36. Davis KL, Laine GA, Geissler HJ, Mehlhorn U, Brennan M, Allen SJ. Effects of myocardial edema on the development of myocardial interstitial fibrosis. *Microcirculation*. 2000;7:269–280.
 37. Moriwaki H, Stempien-Otero A, Kremen M, Cozen AE, Dichek DA. Overexpression of urokinase by macrophages or deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1 causes cardiac fibrosis in mice. *Circ Res*. 2004;95:637–644. doi: 10.1161/01.RES.0000141427.61023.f4.
 38. McKimmie CS, Singh MD, Hewit K, Lopez-Franco O, Le Brocq M, Rose-John S, Lee KM, Baker AH, Wheat R, Blackbourn DJ, Nibbs RJ, Graham GJ. An analysis of the function and expression of D6 on lymphatic endothelial cells. *Blood*. 2013;121:3768–3777. doi: 10.1182/blood-2012-04-425314.
 39. Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Tanaka M, Shimokawa R, Kimura-Matsumoto M, Morita H, Sato S, Kamata I, Ishii T. Lymphangiogenesis in myocardial remodeling after infarction. *Histopathology*. 2007;51:345–353. doi: 10.1111/j.1365-2559.2007.02785.x.
 40. Sun QN, Wang YF, Guo ZK. Reconstitution of myocardial lymphatic vessels after acute infarction of rat heart. *Lymphology*. 2012;45:80–86.
 41. Klotz L, Norman S, Vieira JM, Masters M, Rohling M, Dubé KN, Bollini S, Matsuzaki F, Carr CA, Riley PR. Cardiac lymphatics are heterogeneous in origin and respond to injury. *Nature*. 2015;522:62–67. doi: 10.1038/nature14483.
 42. Laine GA, Allen SJ. Left ventricular myocardial edema. Lymph flow, interstitial fibrosis, and cardiac function. *Circ Res*. 1991;68:1713–1721.
 43. Dongaonkar RM, Stewart RH, Geissler HJ, Laine GA. Myocardial microvascular permeability, interstitial oedema, and compromised cardiac function. *Cardiovasc Res*. 2010;87:331–339. doi: 10.1093/cvr/cvq145.
 44. Wick N, Haluza D, Gurnhofer E, Raab I, Kasimir MT, Prinz M, Steiner CW, Reinisch C, Howorka A, Giovanoli P, Buchsbaum S, Krieger S, Tschachler E, Petzelbauer P, Kerjaschki D. Lymphatic precollectors contain a novel, specialized subpopulation of podoplanin low, CCL27-expressing lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol*. 2008;173:1202–1209. doi: 10.2353/ajpath.2008.080101.
 45. Lutter S, Xie S, Tatin F, Makinen T. Smooth muscle-endothelial cell communication activates Reelin signaling and regulates lymphatic vessel formation. *J Cell Biol*. 2012;197:837–849. doi: 10.1083/jcb.201110132.
 46. Taira A, Morishita Y, Arikawa K, Murata K, Hamada Y, Akita H. Flow velocity of cardiac lymph and contractility of the heart: an experimental study. *Ann Thorac Surg*. 1977;23:230–234.
 47. Mehlhorn U, Davis KL, Burke EJ, Adams D, Laine GA, Allen SJ. Impact of cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest on myocardial lymphatic function. *Am J Physiol*. 1995;268(1 pt 2):H178–H183.
 48. Witzensichler B, Asahara T, Murohara T, Silver M, Spyridopoulos I, Magner M, Principe N, Kearney M, Hu JS, Isner JM. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol*. 1998;153:381–394. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65582-4.
 49. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, Schatz RA, Asahara T, Isner JM, Kuntz RE. Phase ½ placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*. 2002;105:2012–2018.
 50. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J*. 1997;16:3898–3911. doi: 10.1093/emboj/16.13.3898.
 51. Cao Y, Linden P, Farnebo J, Cao R, Eriksson A, Kumar V, Qi JH, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:14389–14394.
 52. Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y, Thyberg J. Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res*. 2004;94:664–670. doi: 10.1161/01.RES.0000118600.91698.BB.
 53. Tammela T, Saariisto A, Holopainen T, Lyytikä J, Kotronen A, Pitkonen M, Abo-Ramadan U, Ylä-Herttuala S, Petrova TV, Alitalo K. Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nat Med*. 2007;13:1458–1466. doi: 10.1038/nm1689.
 54. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med*. 2002;196:1497–1506.
 55. Cao Y. Therapeutic angiogenesis for ischemic disorders: what is missing for clinical benefits? *Discov Med*. 2010;9:179–184.
 56. Cao R, Ji H, Feng N, Zhang Y, Yang X, Andersson P, Sun Y, Tritsaris K, Hansen AJ, Dissing S, Cao Y. Collaborative interplay between FGF-2 and VEGF-C promotes lymphangiogenesis and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:15894–15899. doi: 10.1073/pnas.1208324109.

CLINICAL PERSPECTIVE

The pathophysiological role of the lymphatic system has become increasingly recognized over the past decade, extending from control over interstitial fluid balance to regulation of inflammation, but also impacting tumor metastasis in patients who have cancer. However, the lymphatic network of the heart has been largely neglected. Although therapeutic lymphangiogenesis is currently being proposed as a novel treatment against edema or chronic inflammation in peripheral organs, it has remained unknown whether lymphangiogenesis in the heart may impact cardiac function, notably in cardiovascular diseases such as myocardial infarction and chronic heart failure, characterized by myocardial edema and inflammation. In this study, we show that myocardial infarction induces severe cardiac lymphatic network remodeling and lymphatic transport dysfunction, which together with insufficient lymphangiogenesis contribute to the initiation of chronic myocardial edema and inflammation. Furthermore, we assessed the impact of selective targeted lymphangiogenic therapy in the heart. Promisingly, we demonstrate for the first time that cardiac therapeutic lymphangiogenesis is beneficial post-myocardial infarction because it leads to expedited lymphatic clearance of both excess tissue fluids and infiltrating macrophages. As a result, cardiac fibrosis, remodeling, and dysfunction are reduced. Our findings provide new mechanistic insight into the pathophysiology of cardiac remodeling and dysfunction, and open up novel therapeutic approaches to treat cardiovascular diseases including, but not limited to, myocardial infarction and chronic heart failure. Notably, our data may bring renewed interest in vascular endothelial growth factor C therapy for ischemic heart disease, because they provide a new rationale for the clinical trials that were already performed with this angiogenic/lymphangiogenic growth factor 15 years ago.

Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis Reduces Myocardial Edema and Fibrosis Leading to Improved Cardiac Function Following Myocardial Infarction

Orienne Henri, Chris Pouehe, Mahmoud Houssari, Ludovic Galas, Lionel Nicol, Florence Edwards-Lévy, Jean-Paul Henry, Anais Dumesnil, Inès Boukhalfa, Sébastien Banquet, Damien Schapman, Christian Thuillez, Vincent Richard, Paul Mulder and Ebba Brakenhielm

Circulation. 2016;133:1484-1497; originally published online March 1, 2016;
doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020143

Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Copyright © 2016 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the
World Wide Web at:

<http://circ.ahajournals.org/content/133/15/1484>

Data Supplement (unedited) at:

<http://circ.ahajournals.org/content/suppl/2016/03/01/CIRCULATIONAHA.115.020143.DC1>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation* is online at:
<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental methods

Preparation, characterization, and loading of albumin-alginate microparticles

Albumin-alginate microspheres were prepared using a transacylation reaction in emulsion. This method avoids the use of toxic cross-linking reagents or volatile solvents, while allowing the formation of microparticles made of a stable and biocompatible network of covalently linked protein and polysaccharide¹. Briefly, 6 mL of an aqueous phase consisting of 2 % propylene glycol alginate (FMC BioPolymer) and 20 % human serum albumin (LFB) in water was emulsified in 40 mL of isopropyl myristate (SDF) at a stirring speed of 3000 rpm. After 5 min stirring, 2 mL of a 2 % NaOH solution in 95 % (v/v) ethanol (Charbonneaux-Brabant) was added and agitation was continued for 15 min to allow the transacylation reaction to occur. Then, 2 mL of an 8.5 % (v/v) acetic acid solution in ethanol was added for neutralization of the emulsion. After 15 more min, agitation was stopped and the microspheres were then washed, congealed and lyophilized.

The particles were sized by laser diffraction granulometry (Coulter) and scanning electron microscopy (LEO 982 microscope) was performed on lyophilized samples after coating with a thin layer of Au/Pd.

Microparticles were passively loaded with growth factors by imbibition, as previously described². Briefly, rat VEGF-C_{C152S} was added at the dose of 1-10 microgram per mg desiccated microparticles. After swelling of the microparticles in the VEGF-C-containing solution for 60 min at +4°C, they were resuspended in an artificial interstitial fluid mimetic release buffer as described to a final concentration of 4 mg microparticles/mL in sterile eppendorf tubes. Microparticle-suspensions were incubated at 37°C at 3 rpm and aliquots were taken every to every other day to determine the daily release levels of VEGF-C using ELISA (Reliatech).

To verify that the microparticle-released VEGF-C_{C152S} retained full bioactivity, we assayed its effects on stimulation of VEGFR3-expressing PAE cell proliferation *in vitro*. Briefly, PAE-VEGFR3 cells were

plated in 12-well plates and incubated in DMEM medium supplemented with 1% fetal calf serum for cell cycle arrest 24h prior to stimulation of cell proliferation with either recombinant “fresh” VEGF-C_{C152S} (Reliatech), or the same protein released from our microparticles at the concentrations of 50 and 100 ng/mL. After 48h in culture, the released VEGF-C_{C152S} displayed the same stimulation of cell proliferation as the “fresh” growth factor (WST-1 colorimetric assay), confirming full retention of bioactivity of the microparticle-released recombinant growth factor.

For lymphangiogenic therapy, loading was performed in the same manner at the dose of 5 or 10 microgram rat VEGF-C_{C152S} per mg microparticles, and the solution was resuspended at the concentration of 7.5 mg/mL before intramyocardial injections. The total dose per rat heart was 1.5 (low dose) or 5 microgram (high dose) of VEGF-C_{C152S} distributed equally in four spots in the anterolateral LV free wall.

Surgical model

Left ventricular (LV) MI was induced by LCA ligation (*permanent* model) or occlusion (45 min of ischemia; *temporary* model) in ketamine-xylazine-anaesthetized, mechanically-ventilated rats. Albumin-alginate microparticles, loaded or not with VEGF-C_{C152S}, were injected in the LV freewall after reperfusion in the temporary MI model. Total dose of VEGF-C_{C152S} was 1.5µg/heart in the low-dose group “VEGF-C_{LD}” and 5µg/heart in the high-dose group “VEGF-C_{HD}”.

Functional evaluations

Echocardiography

Non-invasive echocardiography was performed in sedated (Sodium Methohexital: 50mg/kg IP) rats at 3 and 6 weeks post-MI using a Vivid 7 ultrasound echograph equipped with a M12L linear probe operating at 14MHz and outfitted with Echopac PC software (GE medical).

Hemodynamics

Invasive hemodynamic assessment of cardiac function was performed by LV catheterism at 8 weeks post-MI using a Millar probe (model SPR-838) connected to a pressure-conductance unit (MPCU-200, Millar).

MRI

MRI analyses were performed in anaesthetized (Sodium Methohexital: 50 mg/kg IP) rats at 6 weeks post-MI (temporary model) for cardiac perfusion analysis, as previously described², and for T2-mapping of cardiac water content using a 4.7 T horizontal bore scanner (Bruker). Briefly, after adiabatic double inversion pulses to cancel the blood signal in the cavities and the blood flow T2 contribution, a single slice 12 spin echo readout was acquired in short axis views located at the base of the papillary muscles. The acquisition was synchronized with cardiac rhythm to acquire the signal only during diastole. The T2 map was generated after exponential regression using paravision 5.1 software.

Lymphangiography

Invasive cardiac lymphangiography was performed in anaesthetized (ketamine-xylazine) rats at 4, 8 or 12 weeks following MI (permanent and temporary MI models). Briefly, 10 μ L fluorescent quantum dots (20 pmol QDot₆₅₅, Molecular Probes) was injected intramyocardially in the apex of the heart. After 20 minutes, 0.8 mL of a 30 mg/mL solution of FITC-dextran (M_w : 500 kDa, Sigma-Aldrich) was injected intravenously, followed by animal sacrifice and extraction of the heart subsequently arrested in diastole and mounted for macroconfocal imaging (Leica). Anterolateral cardiac views were acquired by assembling partially overlapping fields. Cardiac areas lacking quantum dot signals were omitted from imaging to expedite the process (about 8-10 microscopic fields required for full anterior view of the heart with 10 min. acquisition time per field) generating occasionally only partial views of the heart. 3D images were assembled using Image J software (NIH) for reconstruction of perfused cardiac blood vasculature and quantum dot-filled epicardial draining lymphatics.

Structural and molecular evaluations

Western Blot

Cardiac tissue samples (LV infarct, freewall and septum pooled) were extracted using a standard Tris SDS lysis buffer including protease inhibitors. Bradford method was used to determine total protein concentrations. Samples were denatured for 10 min at 95°C, and 150 or 300 µg protein per sample were separated by 4-12% bis-Tris SDS-PAGE, followed by transfer to either 0.22 µm (VEGF-A, VEGF-C) or 0.45 µm (VEGFR3) HyBond ECL membranes (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) during 90 min at 100 V (Mini Trans-Blot Cell; Bio-Rad Laboratories). Membranes were incubated over night at +4°C with primary antibodies diluted in PBS/milk (**table 1**). After repeated washing, horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (goat anti-rabbit, goat anti-rat, or goat anti-mouse, Jackson ImmunoResearch Laboratories) were used. Target proteins were visualized using an ECLplus chemiluminescence kit (Lumi-Light, Roche Molecular Biochemicals) and bands were analyzed using Image J software. For VEGF-A blots, several bands were visible (notably in sham rats) ranging from 18-28 kD in size. These correspond to rat VEGF-A 120, 164 and 188 a.a. isoforms. All three bands were included in the densitometric analyses to quantify total VEGF-A. Absolute densitometric levels were normalized to beta-actin, probed after brief incubation of membranes in stripping buffer (GeneBio Application), and reported values represent averages of duplicate samples run on separate gels ($n=3-10$ rats/group) expressed as *fold of sham* levels.

Table 1. Antibodies used for Western Blot:

antigen	code	supplier	species reactivity	host	dilution	target size
VEGF-C	ab9546	Abcam	mouse, rat	rabbit	1/500	19-25 kDa
VEGFR3	ab51874	Abcam	mouse, rat	rat	1/100	146 kDa
VEGF-A	sc-507	Santa Cruz	human, rat	rabbit	1/100	18-28 kDa
beta-actin	sc-8432	Santa Cruz	human, rat	mouse	1/500	43 kDa

Immunohistochemistry

Cardiac sections were cut on a cryostat (8 μ m or 30 μ m thickness) and collected on SuperFrost plus glass slides. After fixation in acetone for 10 min, non-specific binding sites were blocked using Dako Diluent, followed by Biotin-Avidin Blocking kit (Thermo Scientific) when streptavidin (SA)-conjugates were used to detect biotinylated secondary antibodies. Primary antibodies, diluted in blocking buffer, were incubated on the sections at r.t. for 1h (**table 2**), followed by repeated washing in PBS and incubation with secondary antibodies for 30 minutes to 1h (**table 3**). Double or triple stainings were performed sequentially, and negative controls included omission of primary antibodies. Slides were mounted in Vectashield containing DAPI, and images were acquired using x5, x10, x20, or x40 objectives on a Zeiss epifluorescence microscope (AxioImager J1) equipped with an apotome and Axiovision Mosaic X software (Zeiss). Images were analyzed by an operator blinded to the treatment groups using ImageJ software (NIH).

Table 2. Primary antibodies used for immunohistochemistry:

antigen	article	supplier	species reactivity	host	dilution
alpha SMA	F3777	Sigma Aldrich	mouse, rat	mouse	1/100
CCL21	AF457	RnD system	mouse, rat	goat	1/100
CD11c	MCA1441	AbD Serotec	rat	mouse	1/200
CD31/PECAM	555026	BD	rat	mouse	1/100
CD68/macrosialin	MCA341R	Biorad	rat	mouse	1/400
FOXC2	Ab55004	Abcam	human, rat	mouse	1/100
Lyve-1	103-PA50	Reliatech	mouse, rat	rabbit	1/1000
Podoplanin	104-M4	Reliatech	rat	mouse	1/400
Prox-1	AF2727	RnD system	human, rat	goat	1/50
VEGFR3	AF743	RnD system	human, rat	goat	1/200

Table 3. Secondary antibodies used for immunohistochemistry:

reactivity	article	supplier	dilution
SA fluoprobe 547 H	FP-CA5570	Interchim fluoroprobes	1/1500
Donkey anti-mouse FITC	715-095-151	Jackson Immunoresearch	1/400
Donkey anti-rabbit Cy3	711-165-152	Jackson Immunoresearch	1/400

Donkey anti-rabbit Cy5	711-605-152	Jackson Immunoresearch	1/400
Donkey anti-goat FITC	A50-201D2	Bethyl Laboratories	1/400
Donkey anti-goat Cy3	A50-201D3	Bethyl Laboratories	1/400
Biotinylated donkey anti-goat	RPN10251	GE Healthcare	1/300

Image analysis of cardiac sections

Blood vessels were defined as strongly CD31-positive structures. These clearly differed from lymphatic vessels that either lacked or displayed very weak CD31 signal. Conversely, in adult rat hearts, both sham and post-MI, blood vessel endothelial cell were consistently found not to express lymphatic markers: LYVE-1, Podoplanin, Prox-1, or VEGFR3. Blood to cardiomyocyte ratios were evaluated in sections double stained for CD31 and WGA imaged at x40. Individual endothelial cells were not counted, rather vessels structures were assessed. If two vessels were adjacent and partly overlapping, they were counted as two vessels. For one vessel that divides into two branches, two vessels were counted.

Arterioles were defined as smooth muscle actin-positive, CD31-positive vessels with a diameter <150 micrometers. Photos were captured at x10.

Lymphatic vessels were defined as strongly LYVE-1-positive structures. These clearly differed from CD68-expressing macrophages that either lacked or displayed very weak LYVE-1 signal. However, in the infarct zone (1-3 months post-MI), large, rounded CD68⁺ macrophages were found weakly positive for LYVE-1 and/or VEGFR3. These macrophages, also differing in size and morphology from the elongated cell body and nucleus typical of lymphatic endothelial cells, were however readily excluded from lymphatic counts in the infarct. Additional analyses with the marker Prox-1, particularly useful in the infarct (where no or only few Prox-1⁺ cardiomyocytes reside), revealed that these CD68⁺/LYVE-1⁺/VEGFR3⁺ infarct macrophages, in contrast to true CD68⁻/LYVE-1⁺/VEGFR3⁺ lymphatics, lack Prox-1 signal (*data not shown*). Photos were captured at x5, x10, x20 or x40.

Pre-collectors were identified as LYVE-1-positive structures co-expressing podoplanin. Intramyocardial “open” vessels (diameter >5 μm) expressed LYVE-1, VEGFR3, Podoplanin,, and often CCL21, and were

preferentially located in the subepicardium, rather than in the mid-myocardium. To assess the size and frequency of open lymphatic vessels, an average of $2.2 \pm 0.2 \text{ mm}^2$ of the LV freewall, or $0.4 \pm 0.1 \text{ mm}^2$ of the infarct zone, was imaged and analyzed for each rat. The absolute density (open/ mm^2) was measured and used to calculate relative open density (open/ mm^2 normalized to LYVE-1+ lymphatics/ mm^2 ; “*open lymphatics % of total*”). Lumen areas were measured and used to calculate mean vessel diameter. The parameter “*area of open lymphatics, %*” was calculated as the total sum of all measured open vessel areas divided by the total LV area analyzed for each rat.

The sizes of intramyocardial capillaries ranged from $<5\text{-}15 \text{ }\mu\text{m}$ diameter, precollectors $20\text{-}50 \text{ }\mu\text{m}$ diameter, and collectors $50\text{-}200 \text{ }\mu\text{m}$ diameter, as assessed in cardiac cryosections. In whole mount stainings of the epicardial surface layer lymphatics, vessels were larger (as not compressed in-between cardiomyocytes): blunt-ended capillaries ranged from $10\text{-}80 \text{ }\mu\text{m}$ in diameter, pre-collector segments that drain these initial lymphatics ranged from $50\text{-}100 \text{ }\mu\text{m}$, and larger, valved collectors of $100\text{-}200 \text{ }\mu\text{m}$ in diameter were observed.

Whole mount

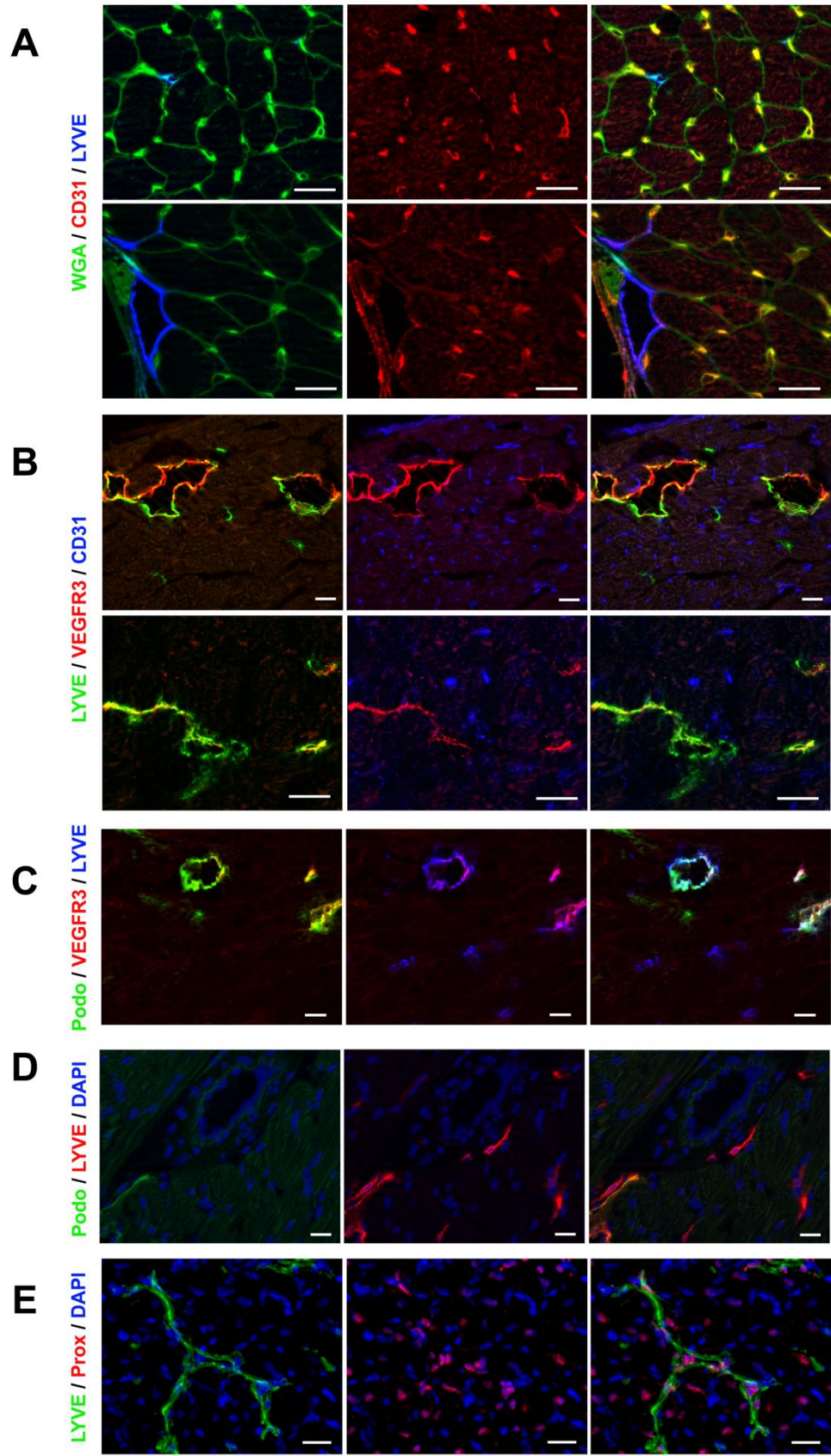
Hearts were arrested in diastole and fixed in 3% paraformaldehyde for 6h at $+4^\circ\text{C}$. Following dehydration in graded methanol baths, and post-fixation in Dent's fixative, samples were either directly rehydrated (for fluorescence imaging) or first bleached in 3% H_2O_2 to block endogenous peroxidases (for colorimetric samples). After extensive blocking of non-specific binding sites and tissue permeation with Triton-X100, the cardiac surface lymphatics were revealed using LYVE-1 (rabbit polyclonal, Reliatech, $1/500$) and/or podoplanin (mouse monoclonal, Reliatech, $1/250$)-reactive antibodies visualized using either peroxidase-coupled secondary reagents (antirabbit N-Histofin, Cosmo Bio) followed by DAB colorimetric development and direct imaging under a dissecting light microscope, or using fluorescence-coupled secondary antibodies (Cy3-conjugated donkey antirabbit, $1/400$, and Cy5-conjugated goat anti mouse, $1/400$) followed by macroconfocal imaging (Leica). Z-stacked images were acquired from partially overlapping fields in the anterior surface of the heart. About 10-12 microscopic fields were required for a

full anterior view of the heart. With as long as 20-30 minutes acquisition time per field, only partial views of the heart were technically feasible for macroconfocal whole mount fluorescence imaging of cardiac surface lymphatics in rats. Images were assembled and 3D projected using Image J software (NIH). 3D-modeling (skeletonization) and vessel profile analyses were performed using Amira software (FEI).

Histology

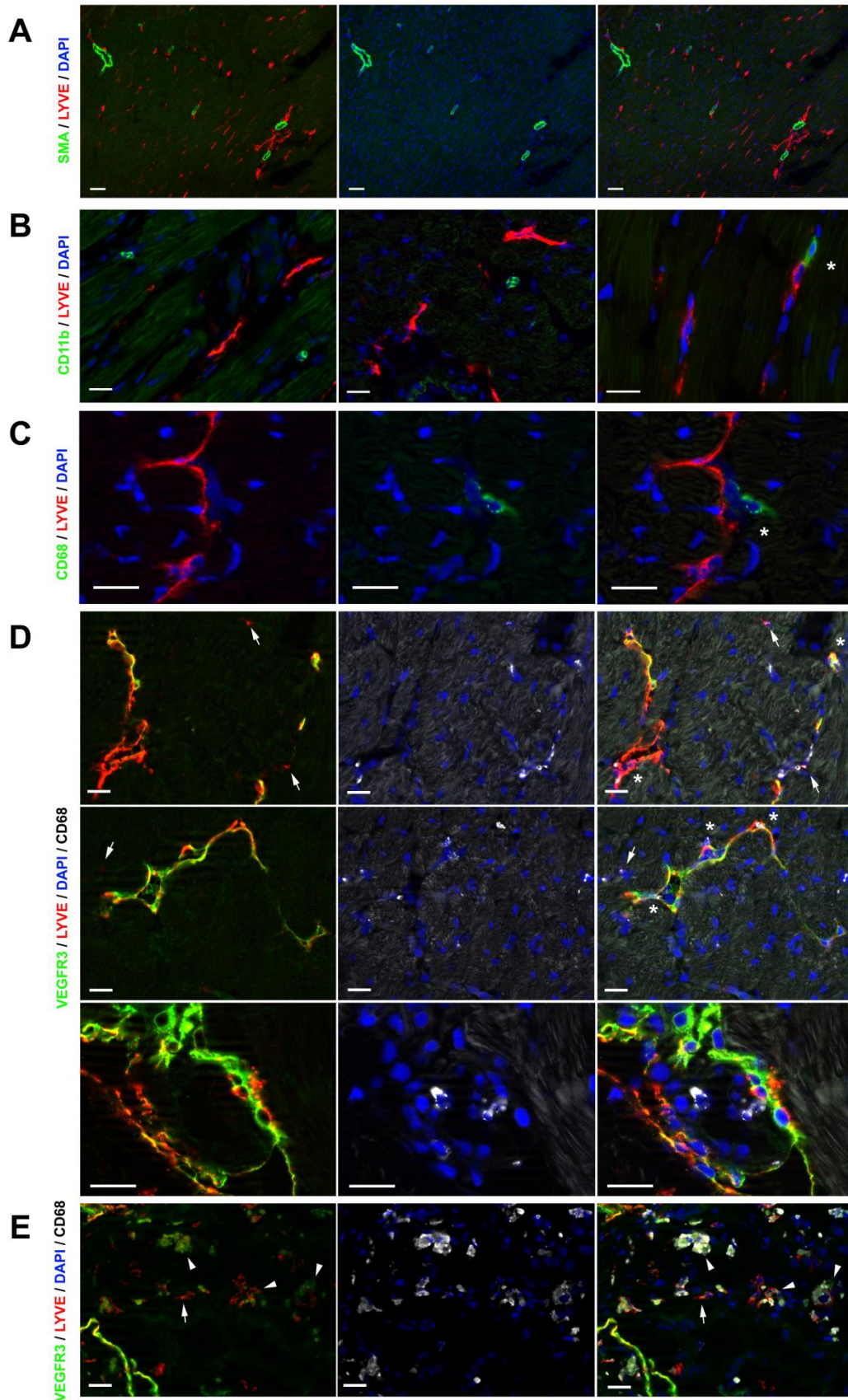
Cardiac cryosections (8 μ m) of rat hearts were processed for Sirius Red staining as described³². Infarct sizes were evaluated in 4-5 sections spanning the LV, and calculated as: (%) Infarct area/ Total LV area. Cardiac interstitial collagen density (“*fibrosis*”) was evaluated in Sirius Red-stained sections imaged on a light microscope (Zeiss) equipped with a *x20* objective. Image analysis was performed in ImageJ using an in-house developed macro-program.

Supplemental Figures



Suppl. Figure 1 Molecular profile and structure of intramyocardial lymphatics

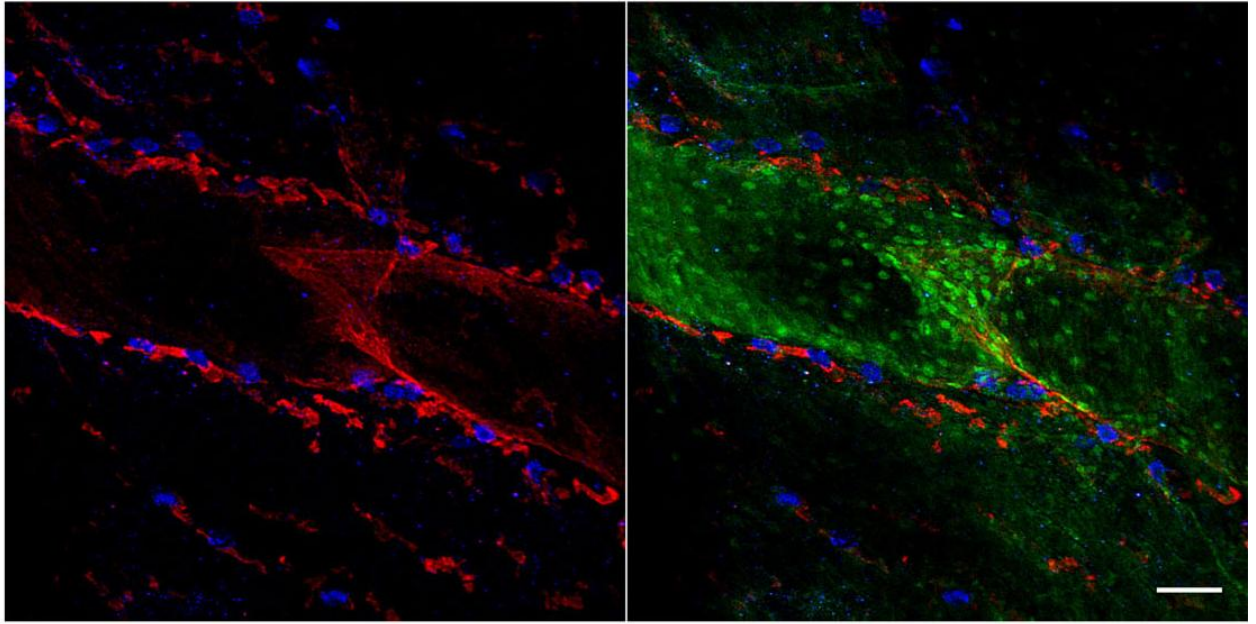
Immunohistochemical analyses of intramyocardial lymphatics in rats revealed that only lymphatics, but not blood vessels (CD31⁺, *red*), expressed LYVE-1 (*blue*, **a**). Lymphatics ranged from small, "closed" capillaries (upper row, **a**), to large, "open" lymphatics (vessel lumen >5 μm, bottom row, **a**). The lymphatic-to-cardiomyocyte ratio, visualized by co-staining for wheat geam agglutinin (WGA, *green*), was about 10 times lower than the blood-to-cardiomyocyte ratio (**a**). VEGFR3 (*red*) was strongly expressed in a subset of LYVE⁺ vessels (**b**, **c**), but was not present in blood vessels (CD31, *blue*, **b**). In the subepicardium, many VEGFR3⁺ LYVE⁺ vessels expressed Podoplanin (*green*, **c**) and these frequently displayed "open" lumen, and were designated as precollectors. In contrast, in mid-myocardial regions of the LV lymphatic podoplanin expression and "open" lumen was less frequent, and here the lymphatic network was essentially composed of small capillaries (**d**). LYVE-1 (*green*) lymphatics, as well as surrounding cardiomyocytes, expressed Prox-1 (*red*, **e**). Scale bar = 20 μm. Photos taken using x20 or x40 objectives.



Suppl. Figure 2 Molecular profile of intramyocardial lymphatics vs. macrophages

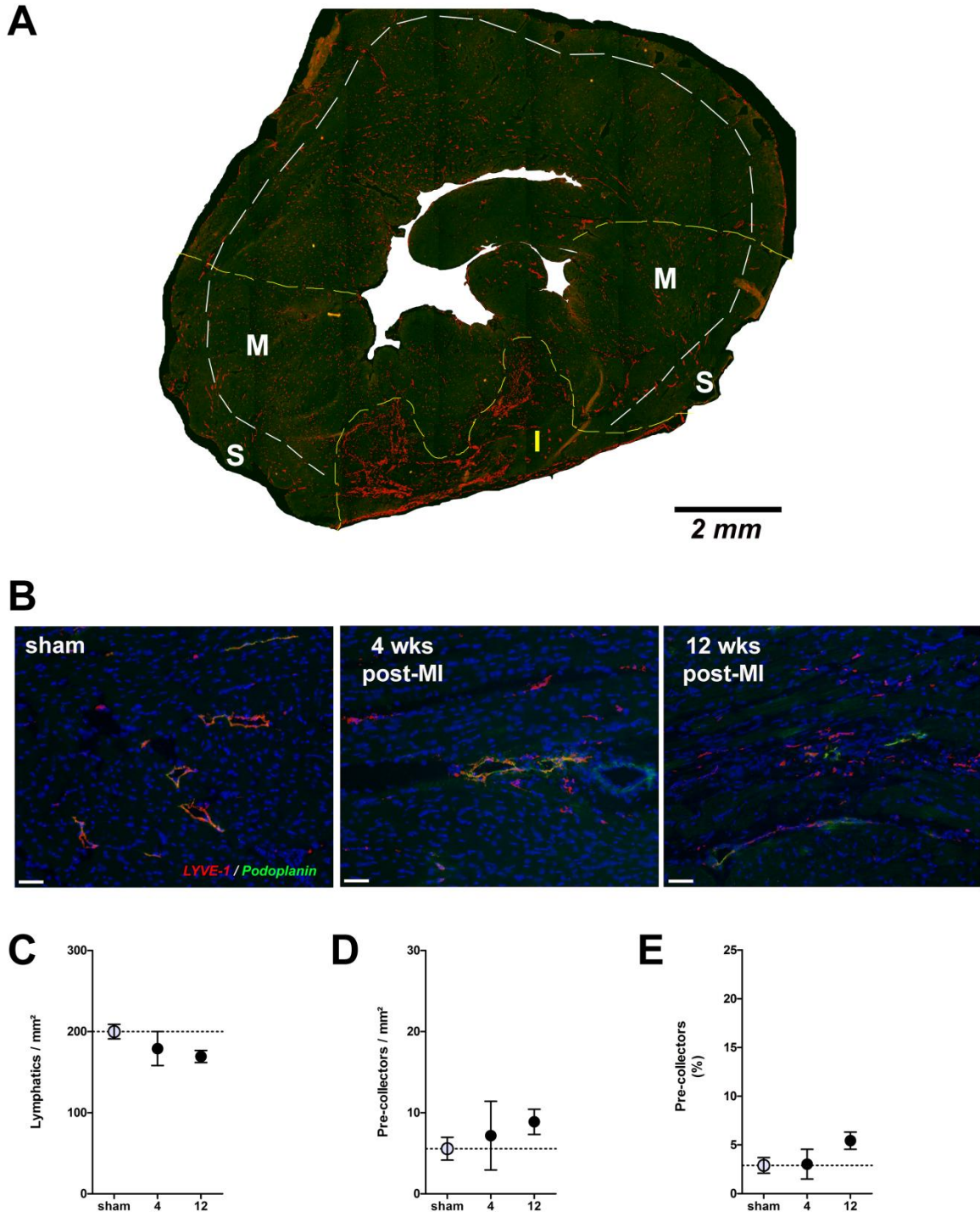
Immunohistochemical analyses of intramyocardial lymphatics in rats revealed that only arterioles, but not lymphatics (LYVE-1⁺, *red*), were coated with smooth muscle cells (SMA, *green*, **a**). Cardiac CD11b⁺ macrophages (*green*) did not express LYVE-1 (*red*), but were sometimes found in the close vicinity of lymphatic vessels (**b**). Further, LYVE⁻ CD68⁺ macrophages (*green*) were seen entering strongly LYVE-1 expressing (*red*) lymphatics (white asterix, **c**). Some CD68⁺ macrophages (*white*) were weakly positive for LYVE-1 (*red*, white arrow), but generally did not express VEGFR-3 (*green*, **d, e**). In the infarct scar, at 1 month post-MI, many large, rounded CD68⁺ macrophages (*white*) were found to be weakly positive for LYVE-1 (*red*) and/or VEGFR3 (*green*) (white arrowhead, **e**). Scale bars = 50 μm in **a**; 20 μm in **b-e**. Photos taken using x10, x20, or x40 objectives.

PROX / LYVE / FOXC2



Suppl. Figure 3 Structure of epicardial surface collector lymphatics

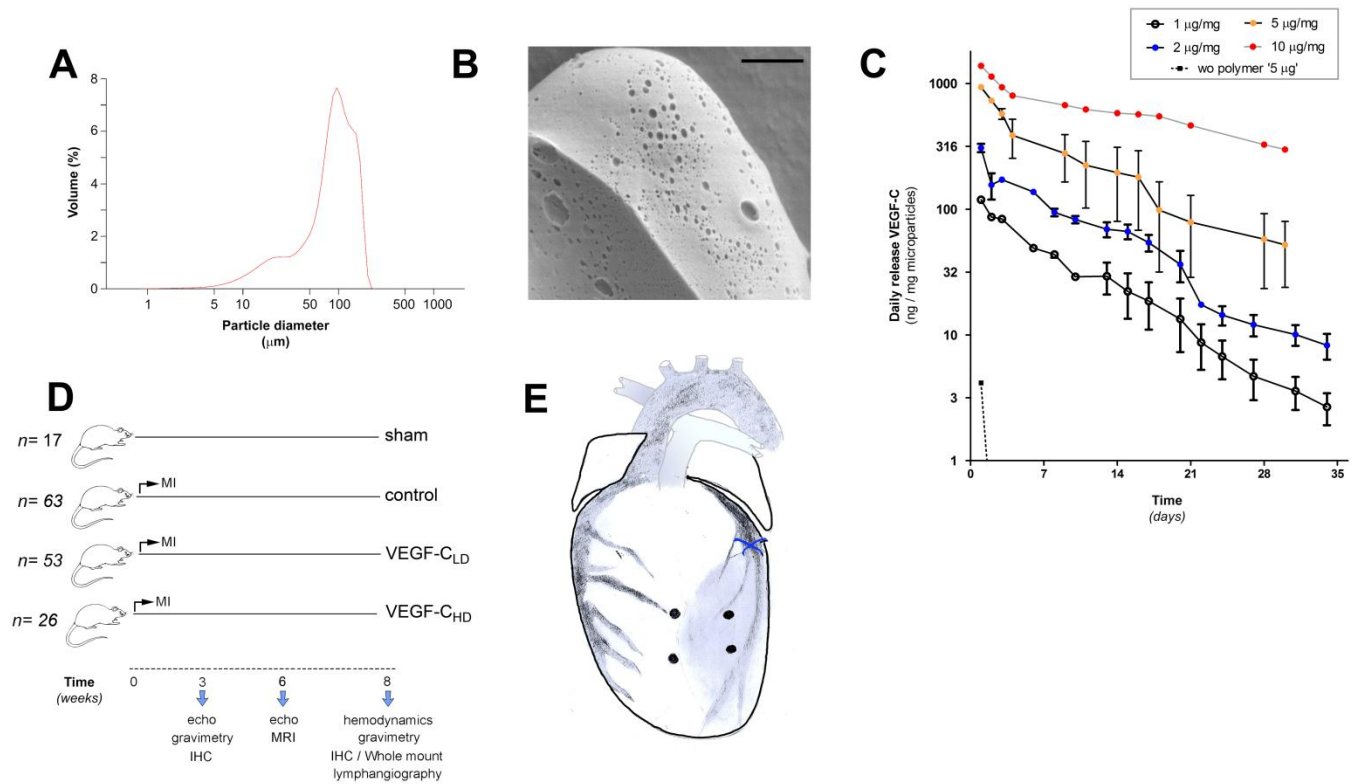
Immunohistochemical whole mount analysis of rat LV surface lymphatics revealed that epicardial collecting vessels of 100-200 μm in diameter contain bicuspid valves, outlined by Prox-1 (*green*), LYVE-1 (*red*), and FOXC2 (*blue*) staining. Scale bar = 50 μm . Maximal intensity 3D projection of a 280 μm z stack image taken using a Leica macroconfocal.



Suppl. Figure 4 Rarefaction of subepicardial precollectors and absence of lymphangiogenic remodeling in mid-myocardium after MI

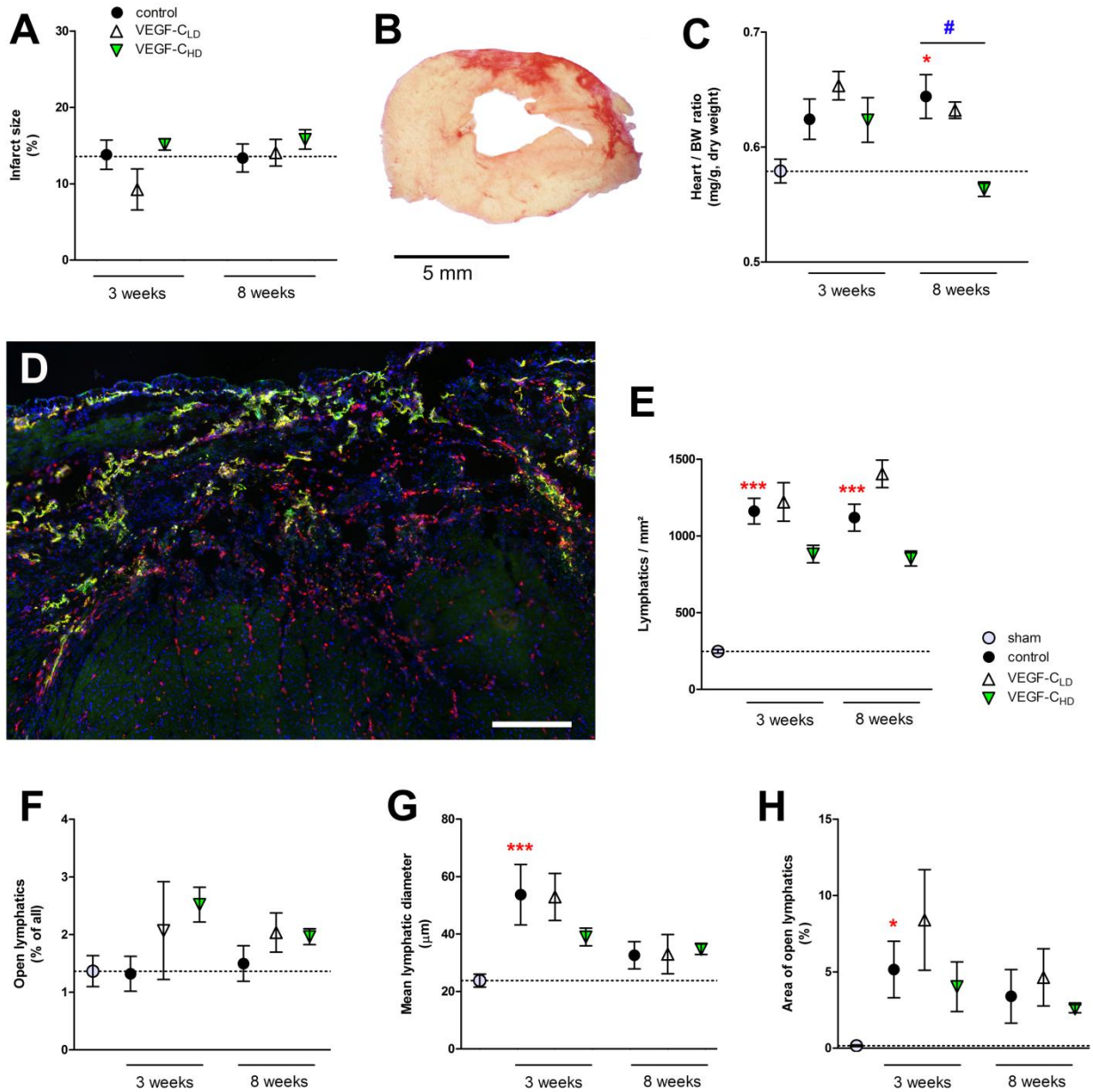
Schematic illustration of infarct (“I”) vs subepicardial (“S”) vs mid-myocardial (“M”) regions in the non-infarcted LV free wall (a). LYVE-1⁺ lymphatics (red), cardiomyocytes (green). Examples of LYVE-1⁺ (red) and podoplanin⁺ (green) double-labeled lymphatic pre-collectors in the subepicardium of healthy (sham) rats, and at 4 or 12 weeks post-MI (b). Nuclei (blue). Mid-myocardial LYVE-1⁺ lymphatic density

(c), podoplanin⁺ LYVE-1⁺ pre-collector density (d), and percentage podoplanin⁺ (among LYVE-1⁺ lymphatics; e). Values represent mean \pm SEM ($n = 8-9$ rats/group). Scale bars = 2 mm (a), or 50 μ m (b)



Suppl. Figure 5 Targeted delivery of VEGF-C_{C152S} by albumin-alginate microparticles

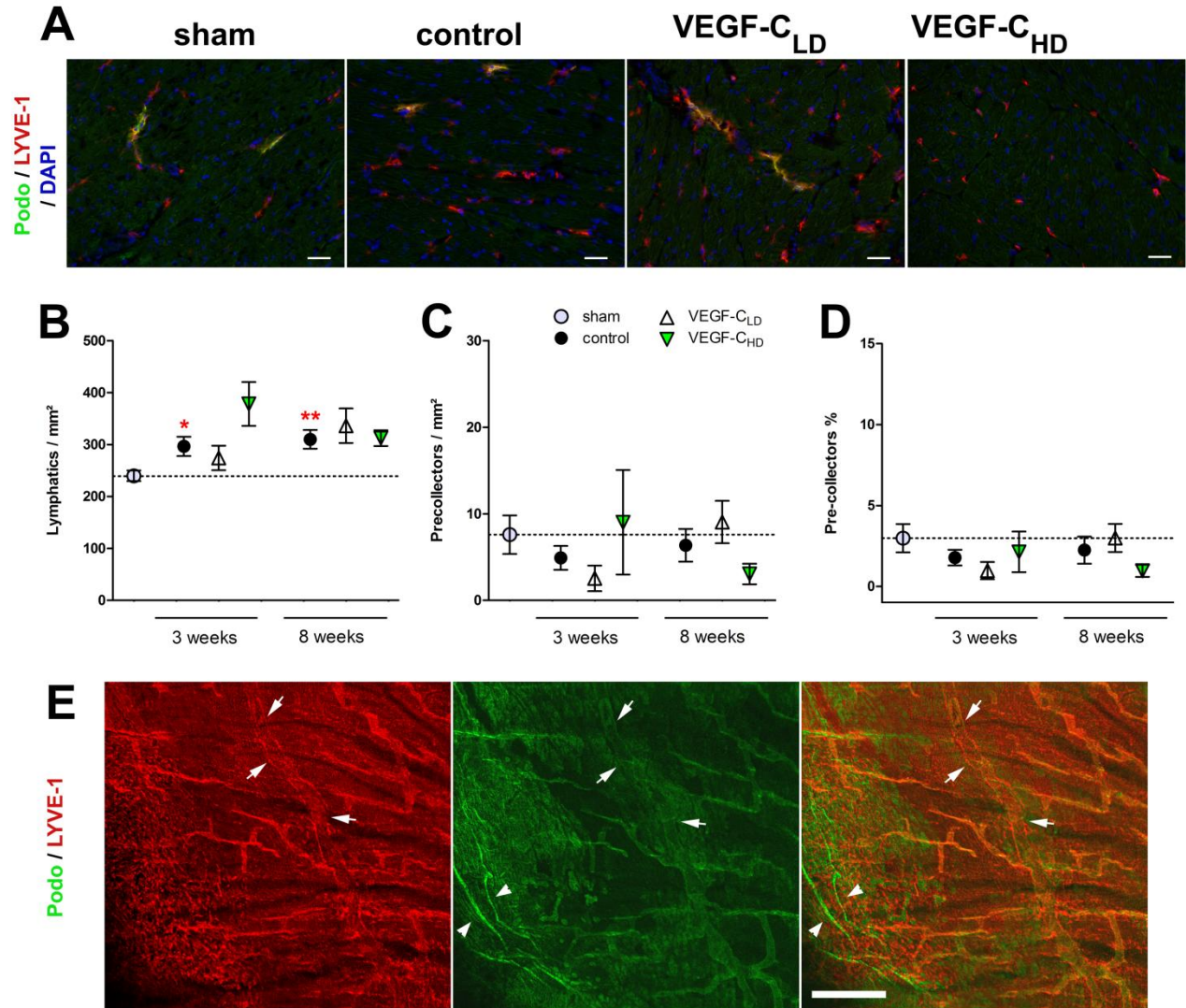
Albumin-alginate microparticles displayed an average diameter of $90 \pm 50 \mu\text{m}$, as determined by granulometry (a), and a porous surface and interior (b), as revealed by scanning electron microscopy. Scale bar = $5 \mu\text{m}$. The daily release rate (c) of VEGF-C_{C152S} was proportional to the payload (amount growth factor per mg of microparticles): at $5 \mu\text{g}$ VEGF-C_{C152S} per mg microparticles (the payload used in our *in vivo* study for low dose treatment) the daily release levels by 14 days of incubation was around 200 ng VEGF-C_{C152S} per mg microparticles. *In vivo*, we applied 0.3 mg microparticles/heart for a total dose of $1.5 \mu\text{g}$ VEGF-C_{C152S} per rat (“VEGF-C_{LD}”), or 0.5 mg microparticles/heart for a total dose of $5 \mu\text{g}$ VEGF-C_{C152S} per rat (“VEGF-C_{HD}”). Experimental setup used in our therapeutic lymphangiogenesis study (d-e): Control and “VEGF-C” male Wistar rats were exposed to 45 min of ischemia (induced by temporary *LCad* occlusion), followed by 10 minutes of reperfusion, after which microparticles loaded or not with VEGF-C_{C152S} were injected intramyocardially in 4 spots of the LV free wall. Sham operated rats were exposed to thoracotomy without tying of the snare. Structural and functional evaluations were carried out as indicated.



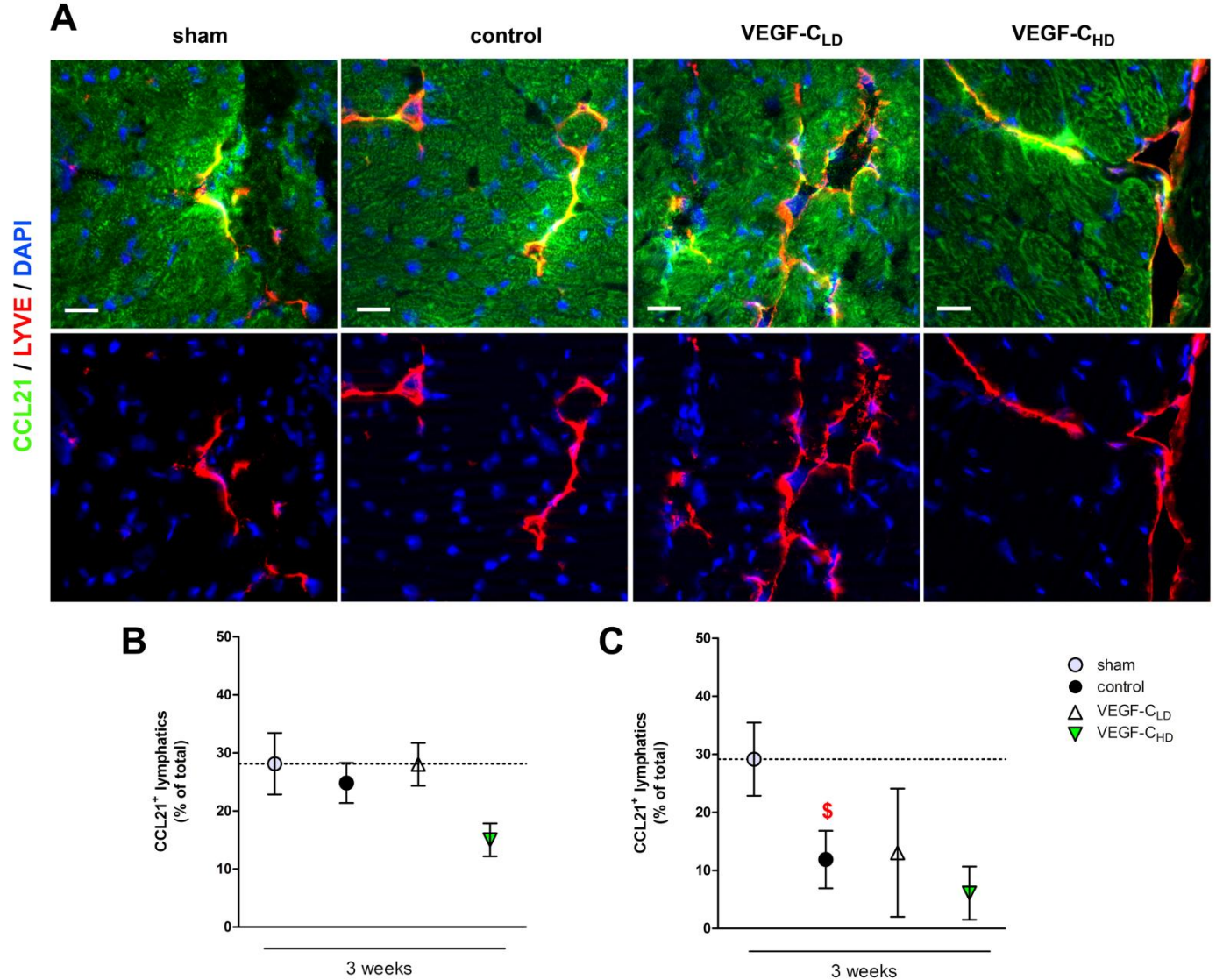
Suppl. Figure 6 Infarct size and infarct lymphatic remodeling during VEGF-C_{152S} therapy in temporary occlusion model of MI

Infarct sizes were determined in serial histological sections stained with sirius red (a-b). Infarct size, assayed at 3 and 8 weeks post-MI ($n = 5-11$ rats/group). Dotted line indicates average infarct size. Body weight gain was not different between groups throughout the study. Cardiac dry weight to body weight ratio (c) ($n = 5-13$ rats/group). Example of infarct zone podoplanin⁺ (green) LYVE-1⁺ (red) lymphatics at 1 month post-MI (d). Quantification of LYVE-1⁺ lymphatic density (e), relative frequency of “open” lymphatics (diameter >5 μm) (f), “open” lymphatic mean vessel diameter (g), and total area of open lymphatics/mm² (h). ($n = 6-13$ rats/group). Control rats (filled circles) and VEGF-C_{152S}-treated rats (low dose, open triangles; high dose, filled triangles) at 3 or 8 weeks post-MI. Healthy sham rats (open circle).

One-way ANOVA (f, g, h) or Kruskal Wallis (a, c, e): * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs sham. # $p < 0.05$ as indicated. Scale bar = 500 μm .



Suppl. Figure 7 Lymphangiogenesis in mid-myocardium following VEGF-C_{152S} therapy
 Examples of LYVE-1⁺ (red) capillaries and few podoplanin⁺ (green) lymphatics in the mid-myocardium of the non-infarcted LV (a). Scale bar = 50 μ m. Mid-myocardial LYVE-1⁺ lymphatic density (b), podoplanin⁺ LYVE-1⁺ “pre-collector” density (c), and percentage podoplanin⁺ lymphatics (among LYVE-1⁺ vessels; d). Dotted line indicates healthy sham levels. Control rats (filled circles) and VEGF-C_{152S}-treated rats (low dose, open triangles; high dose, filled triangles) at 3 or 8 weeks post-MI. Healthy sham rats (open circle). (n=5-13 rats/group) Values represent mean \pm SEM. Kruskal Wallis (b-d): * p<0.05; ** p<0.01 vs sham. Example of LYVE-1⁺ podoplanin⁺ lymphatics (ranging from blunt-ended ‘terminal’ capillaries to larger pre-collectors and collector lymphatics) in the anterior cardiac surface of a healthy, adult rat as visualized by macroconfocal whole mount fluorescence imaging (e). White arrows point to weakly LYVE-1⁺ podoplanin⁺ lymphatic collectors endowed with valves. White arrow head point to unidentified podoplanin⁺ structures that lack LYVE-1 expression. Scale bar = 500 μ m.



Suppl. Figure 8 Cardiac lymphatic CCL21 expression following VEGF-C_{C152S} therapy

Examples of CCL21 expression (*green*) in LYVE-1⁺ (*red*) lymphatics in the subepicardium of the non-infarcted LV (**a**). Note the grainy appearance of the CCL21 signal, representing lymphatic secretion (*yellow*) and extracellular matrix deposition (*green*) of the chemokine. Scale bar = 20 μm. Photos taken at x20. Quantification of lymphatic CCL21 expression (presented as % of CCL21 positive LYVE-1⁺ vessels) among all subepicardial lymphatics in the non-infarct LV freewall (**b**), or in the infarct scar lymphatics (**c**). Dotted line indicates healthy sham levels. Control rats (*filled circles*) and VEGF-C_{C152S}-treated rats (low dose, *open triangles*; high dose, *filled triangles*) at 3 weeks post-MI. Healthy sham rats (*open circle*). (*n*=4-10 rats/group). Values represent mean ± SEM. Kruskal Wallis (b, c):\$,*p*=0.07 vs sham.

Supplemental References

1. Callewaert M, Millot JM, Lesage J, Laurent-Maquin D, Edwards-Levy F. Serum albumin-alginate coated microspheres: role of the inner gel in binding and release of the KRFK peptide. *Int J Pharm.* 2009;366(1-2):103-110.
2. Banquet S, Gomez E, Nicol L, Edwards-Levy F, Henry JP, Cao R, Schapman D, Dautreux B, Lallemand F, Bauer F, Cao Y, Thuillez C, Mulder P, Richard V, Brakenhielm E. Arteriogenic therapy by intramyocardial sustained delivery of a novel growth factor combination prevents chronic heart failure. *Circulation.* 2011;124(9):1059-1069.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



REVIEW

Electron microscopy approach for the visualization of the epithelial and endothelial glycocalyx



Visualisation du glycocalyx épithélial et endothélial par une approche en microscopie électronique

L. Chevalier^{a,*}, J. Selim^c, D. Genty^b, J.M. Baste^{c,d}, N. Piton^b,
I. Boukhalfa^c, M. Hamzaoui^c, P. Pareige^a, V. Richard^c

^a Normandie University, Unirouen, INSA Rouen, CNRS, GPM-UMR6634, 76000 Rouen, France

^b Department of Pathology, Rouen University Hospital, 76000 Rouen, France

^c Inserm, U1096, Normandie University, Unirouen, 76000 Rouen, France

^d Department of Thoracy Surgery, Rouen University Hospital, 76000 Rouen, France

Available online 12 May 2017

KEYWORDS

Glycocalyx;
Lanthanum;
Transmission Electron
Microscopy;
Perfusion fixation;
Electron scattering;
Chemical contrast

Summary This study presents a methodological approach for the visualization of the glycocalyx by electron microscopy. The glycocalyx is a three dimensional network mainly composed of glycolipids, glycoproteins and proteoglycans associated with the plasma membrane. Since less than a decade, the epithelial and endothelial glycocalyx proved to play an important role in physiology and pathology, increasing its research interest especially in vascular functions. Therefore, visualization of the glycocalyx requires reliable techniques and its preservation remains challenging due to its fragile and dynamic organization, which is highly sensitive to the different process steps for electron microscopy sampling. In this study, chemical fixation was performed by perfusion as a good alternative to conventional fixation. Additional lanthanum nitrate in the fixative enhances staining of the glycocalyx in transmission electron microscopy bright field and improves its visualization by detecting the elastic scattered electrons, thus providing a chemical contrast.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: laurence.chevalier@univ-rouen.fr (L. Chevalier).

MOTS CLÉS

Glycocalyx ;
Lanthane ;
Microscopie
électronique en
transmission ;
Perfusion ;
Contraste chimique

Résumé Cette étude présente un protocole expérimental pour la visualisation du glycocalyx en microscopie électronique. Le glycocalyx est un réseau tridimensionnel principalement composé de glycoprotéines, glycolipides et protéoglycanes associés à la membrane plasmique. Il suscite depuis moins d'une décennie d'un regain d'intérêt en raison de son rôle majeur dans la physiologie et pathologie vasculaire. Dès lors la visualisation du glycocalyx requiert des techniques adaptées car sa préservation reste difficile, dû à son organisation fragile qui reste particulièrement sensible aux différentes étapes de préparation pour la microscopie électronique. Dans cette étude, la fixation chimique par perfusion a été réalisée et reste une bonne alternative à la fixation conventionnelle par immersion. La supplémentation de la solution de fixation par le nitrate de lanthane permet de réhausser le contraste du glycocalyx en microscopie électronique transmission champ clair et d'utiliser la diffusion élastique des électrons pour son observation en contraste chimique (STEM-HAADF).

© 2017 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

The outer surface layer of the plasma membrane is covered by a complex gel like network named the glycocalyx mainly made up of oligosaccharides chains linked to lipid, intrinsic protein and absorbed peripheral proteins of the cellular membrane. Glycocalyx covers large amount of cellular type as suggested by Bennet [1] and was observed by electron microscopy for the first time by Luft [2]. Its appearance in fine structure varies from cell to cell as well as its composition in glycoproteins, glycolipids and proteoglycan. Those structural differences contribute to the wide biological functions of the glycocalyx based on the properties of its constitutive membrane glycoconjugates.

Intestinal glycocalyx

In the intestinal epithelium, the glycocalyx is imaged as a uniform layer of dense filamentous material, surrounded by the microvilli of the enterocytes and is rich in glycoproteins and glycolipids. Glycoproteins have oligosaccharides chains covalently bounded to the peptide backbone by N-linkage to the asparagine amino acid. The carbohydrate chains are generally branched and contain sugar residues as acetyl glucosamine, acetyl galactosamine, galactose, mannose, glucose and sialic acid (or neuraminidic acid). The terminal position of the sialic acid provides negative charge to the glycocalyx surface [3]. In addition to oligosaccharides polymers, specific hydrolytic enzymes (like disaccharidase or peptidase) and glycosyltransferases as well as protein carrier, are referred to reside inside the intestinal glycocalyx. Because of its vicinity to the extracellular medium, glycocalyx ensures firstly a protective role of the enterocytes membrane against proteolytic degradation [4]. Furthermore, the specific glycosyl pattern, exhibited at the outer surface membrane, is involved in cell recognition and adherence. As a consequence, glycocalyx may play a key role similarly to antigens, but also as a receptor for hormones, interferons, lectines, pathogenes and may contribute to a turnover process or a molecular trafficking.

Endothelium glycocalyx

For the past decade, several studies have described the endothelium glycocalyx, as an important factor in vascular physio- and pathology [5], giving rise to increase knowledge about its composition to have a better understanding of its structure and function relationships [6]. Heparan sulfate, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, keratin sulfate and hyaluronic acid are identified as the five major glycosaminoglycans (GAG), where the heparan sulfate and chondroitin sulfate are the most abundant proteoglycans in the vascular endothelium glycocalyx. The glycoproteins, which form the endothelium glycocalyx, belong to the proteins' family of immunoglobulins, integrins and selectins. The last one is predicted to have an important role in the cell-cell interaction, especially between leucocytes and endothelial cells. Embedded in this glycosylated matrix, are found soluble plasmatic proteins and proteoglycans to preserve the integrity of the glycocalyx. In this organization, chains of hyaluronic acid link each other by hydrogen bond, to form strength and long hyaluronan-hyaluronan complex as illustrated in Fig. 1 and constitute a highly-hydrated gel which maintain an osmotic pressure to the surface of the matrix [7,8]. In addition to these properties of recognition site and cell interaction, endothelium glycocalyx is described to have an important action in the vascular permeability [9] by limiting the movement of molecule and water flow closed to the tight junctions [8,10] and, by the way, to preserve the homeostasis. Settled as a real vascular barrier, the most relevant involvement of endothelium glycocalyx is its role in the mechanotransduction regulation and the associated "shear-stress" effects [11]. Relationships between shear stress and morphological changes of endothelium are now well advanced restoring an interest for the investigations of the glycocalyx ultrastructure by electron microscopy [11–13]. Such approaches require reliable techniques to preserve the glycocalyx in a native state and to image it correctly in term of contrast. The appearance of the glycocalyx depends really of the procedure employed in the electron microscopy preparation. A dynamic but fragile structure, the glycocalyx is rapidly degraded when it is removed from its natural environment [14]. Furthermore, its glycosylated

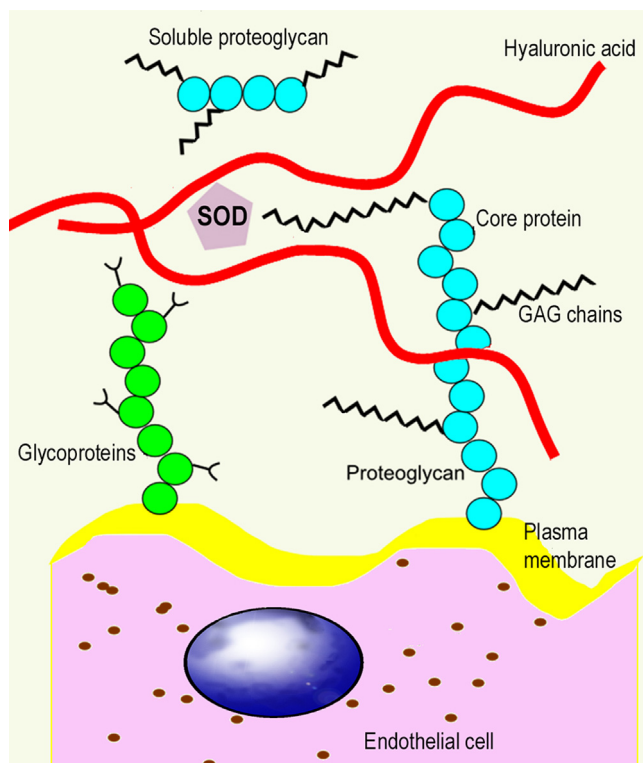


Figure 1 Schematic representation of the endothelium glycocalyx organization (modified from Reitsma et al. 2007).

constituents, protruding freely in the cellular outer space, are able to be extracted by the different solvents used during the dehydration steps, by disrupting low-energy bonding. Therefore, only a fraction of the glycocalyx anchored in the plasma membrane by intrinsic glycoprotein or glycolipids is supposed to be well-preserved giving rise to a biased evaluation of the thickness. Due to its high sensitivity, visualization of the glycocalyx by electron microscopy remains, anyway, challenging and requires pertinent tools and methodology. The aim of this work was to report a simple methodology to investigate intestinal and vascular endothelium glycocalyx by electron microscopy. Perfusion fixation was applied using aldehydes fixatives enriched with lanthanum ions. Fixation and staining procedures will be discussed in regard of ultrastructural glycocalyx findings.

Material and method

Animals

The experiments were performed on male Wistar rats weighting 400–500 g obtained from Janvier Labs (Saint-Berthevin, France). Animal housing and experiments were in accordance with National Institute of Health guidelines and the study ethically approved by the Normandy University regional review board according to French and EU legislation (n° APAFIS 7454). Rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of Xylazine (0.40 mg/kg) and ketamine (12 mg/kg). The right femoral vein was cannulated with a 16-gauge catheter (Introcan Safety, BBraun Medical) to administer the heparin (1000 IU/kg) solution before

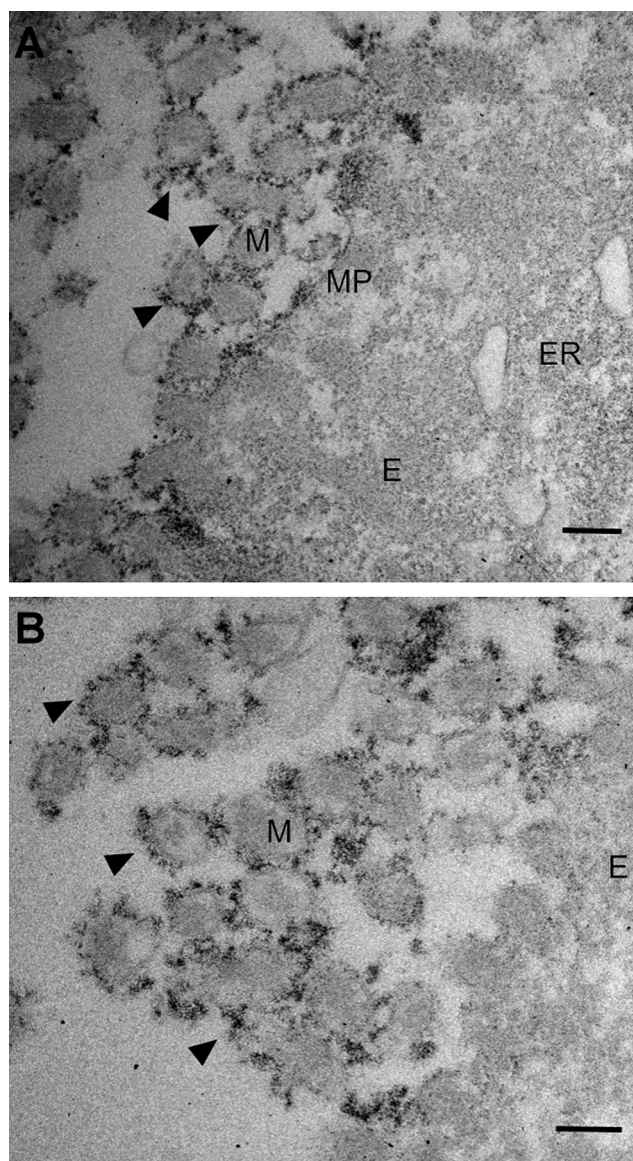


Figure 2 Bright field electron micrographs of enterocytes: fixation is performed by perfusion with aldehydes fixatives supplemented with lanthanum nitrate. Lanthanum highlights a fine dense electron layer (black head arrow) all around microvilli. E: enterocytes; ER: endoplasmic reticulum; M: microvilli, MP: plasma membrane. Scale bar = 100 nm.

fixatives one. Investigations were assessed on both small intestinal tissues and pulmonary artery.

Electron microscopy sample preparation

Two male Wistar rats were perfused through femoral vena with 5 mL of fixatives containing 2% glutaraldehyde EM grade (EMS), 2% sucrose supplemented with 2% nitrate lanthanum hexahydrate (Fluka) in cacodylate buffer 0.1 M pH 7.4. The lungs were exteriorized and dissected out under stereomicroscope in order to isolate the pulmonary artery and to obtain small cross-sections (four per rat). During the dissection steps, tissues are kept immersed in fixatives solution to preserve from collapse or degradation by air contact. Same

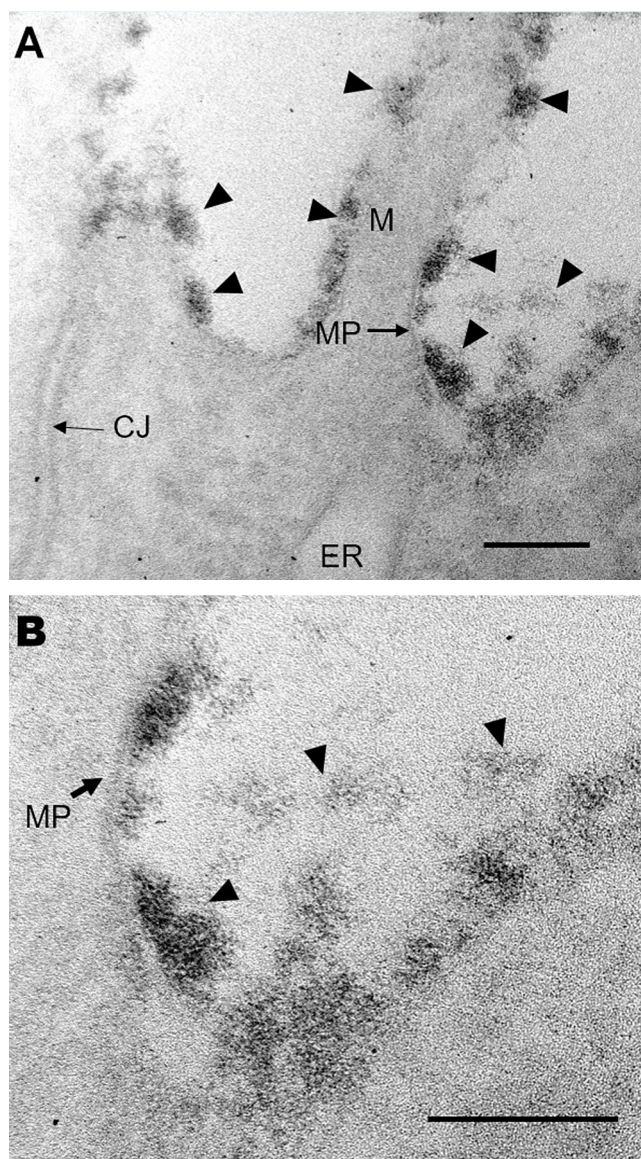


Figure 3 Bright field electron micrographs showing the fine structure of enterocytes glycocalyx (black head arrow) and its distribution at plasma membrane surface. CJ: cellular junction; ER: endoplasmic reticulum; M: microvilli, MP: plasma membrane. Scale bars = 100 nm.

procedure is applied to the sampling of intestinal tissue, from one rat only used to excise four biopsies. *Ex-vivo* tissue specimens are fixed again for 1h at 4 °C in the same fixatives solution previously used for perfusion. They were subsequently rinsed in buffer without glutaraldehyde and post-fixed 1h at +4 °C with 2% osmium tetroxide (Carlo Erba) and 2% lanthanum nitrate. After brief rinsing, sample dehydration is performed with graded series of ethanol, ended with anhydrous acetone at 4 °C. Infiltration was done in Epon resin (PolySciences) under vacuum and polymerization is processed at 59 °C for 18 h. Ultrathin sections (50–60 nm, ultracut UCT, Leica) were collected on gold –600 mesh grids and stained 7 min with uranyl-less solution (Delta-Microscopie), which contain a mixture of gadolinium and lanthanum salts.

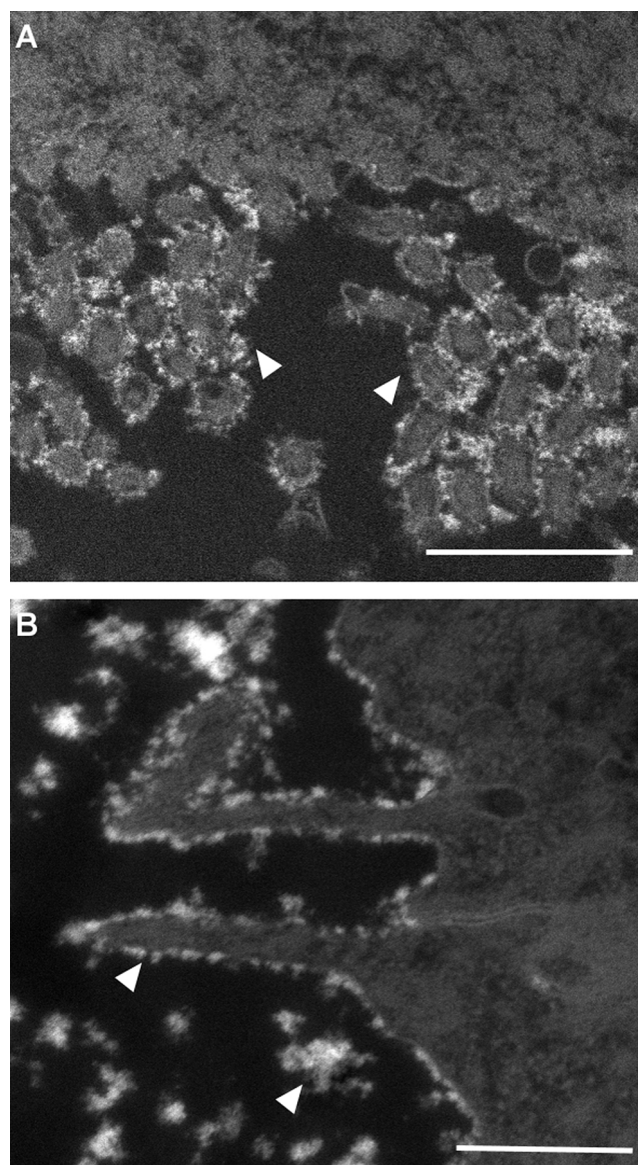


Figure 4 STEM-HAADF electron micrographs of enterocytes stained with lanthanum salts. Glycocalyx (white head arrow) appears as white bundles both at the surface of microvilli and in the intestinal lumen. Scale bar = 0.5 μ m.

TEM Observations

Sections were observed in bright field using a JEOL FX 2010 Transmission Electron Microscope (TEM) operating at 200 kV and equipped with a LaB6 cathode, ES500 W Erlangshen CCD camera (Gatan) driven by Digital Micrograph as software (Gatan). Complementary observations have been carried out on a JEOL JEM-ARM200F HR-TEM having analytical specifications (energy dispersive spectrometry [EDS], energy electron loss spectrometry [EELS], energy filtered [EFTEM]) and setting with a field emission gun (FEG) and probe aberration corrector. This microscope allowed us to acquire images in scanning-transmission mode using high angle annular dark field detector (STEM-HAADF). Based on the electron-matter interaction, electrons submitted to high elastic scattering are collected by annular detector resulting in dark field

images and contrast are dependent of the atomic number of collided atoms. Therefore, heavy chemical species appeared brighter than light one.

Results

Enterocyte glycocalyx

Lanthanum nitrate salts added to fixative solution highlight a fine electron dense layer covering enterocytes membrane (Fig. 2). This fine layer distinguishes easily from the cytosolic matrix and is abundantly presents all around microvilli observed in cross section. At highest magnification, the fine dense layer appears as filamentous granular packed material thought to be the glycocalyx in regard of its architecture with one side attached to the plasma membrane and the other branched protruding in the extracellular space (Fig. 3). The distribution of intestinal glycocalyx does not seem uniform keeping some membrane area free of cell-coat, whereas others are densely covered. The use

of electron-scattered in STEM-HAADF mode improves the visualization of the glycocalyx which displays a white bundles pattern along the plasma membrane of enterocytes (Fig. 4). Such chemical contrast results in the reactivity of Lanthanum cations, which possess a high atomic number ($Z = 57$) and induce elastic electron scattering at high angle. As observed in Fig. 4, we notice that glycocalyx does not appear very developed, with a thickness in the range of 20–25 nm in contrast of its usual description in the literature (100–500 nm) [4]. Furthermore, an abundant fraction of glycocalyx is detached from the plasma membrane and located in the luminal space of the intestine (Fig. 4B).

Endothelium glycocalyx

Prior to our investigations, we tried a standard fixation protocol. We proceeded by the excision of the left pulmonary artery and fixed the biopsy by plunging in an aldehydes fixatives solution supplemented with ruthenium red, during 2H in cacodylate buffer 0.1M pH7.4 at +4°C. In such

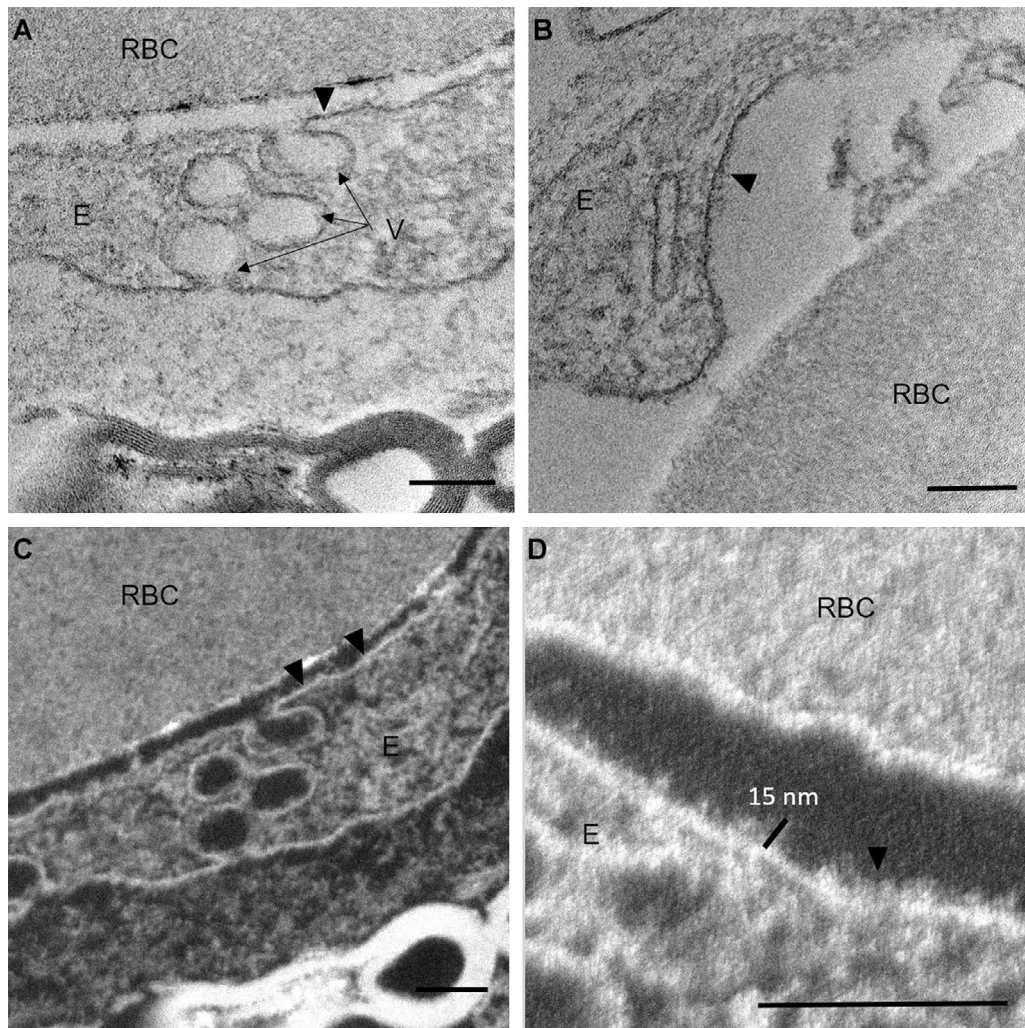


Figure 5 Electron micrographs of pulmonary artery fixed by standard procedure using a fixative solution supplemented by ruthenium red. Black head arrow indicates the preserved fraction of glycocalyx. A–B. Bright-field TEM micrographs. C–D. STEM-HAADF images. E. endothelial cell; RBC: red blood cell; V: endo/exocytose vesicles. Scale bars= 100 nm.

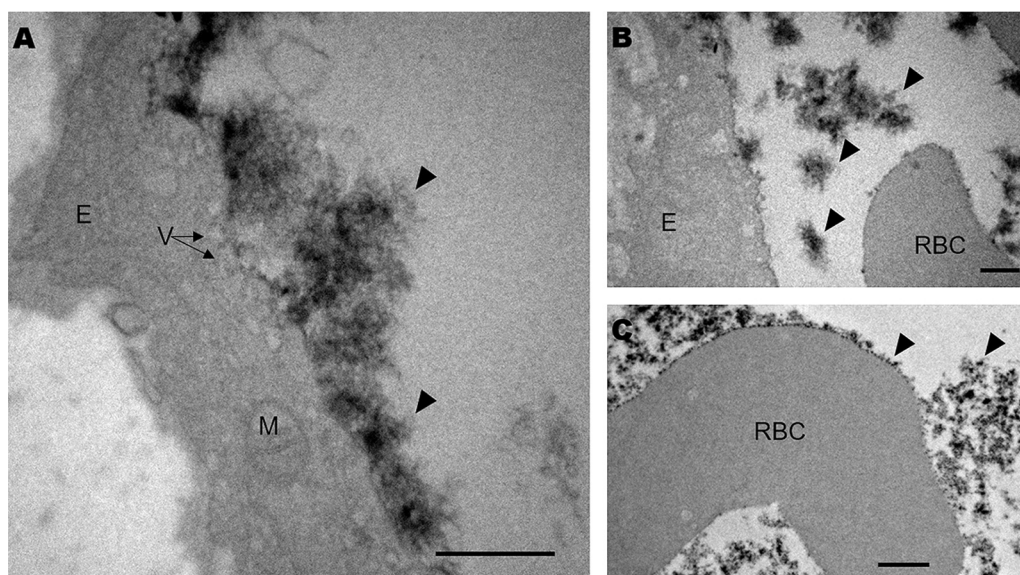


Figure 6 Bright field electron micrographs of endothelium glycocalyx of pulmonary artery. Glycocalyx (black head arrow) is revealed by lanthanum salts and is observed at the outer surface of the endothelium (A), in the lumen of artery (B) and at the surface of red blood cells (C). Scale bars = 0.5 μm .

conditions we examined that glycocalyx was poorly preserved and not clearly distinguishable (Fig. 5). It seems that only the fraction anchored in the plasma membrane (that is glycoproteins with transmembrane domain) kept in place whereas the oligosaccharides side chains have been probably extracted. Therefore, the loss of glycosylated material might explain the low reactivity of ruthenium red and the regular aspect like a straight line given to the plasma membrane. When we applied perfusion techniques, the quality of glycocalyx ultrastructure is consistently improved as shown in Fig. 6. The 3D polysaccharides network is well visualized with similar aspects in packed bundles and heterogeneous distribution, as described previously for intestinal glycocalyx. In addition, we noticed that some red blood cells are covered by cell-coat (Fig. 6C) and this might coincide with the relevant function of the glycocalyx in cellular interaction between endothelium and circulating cells.

Tissue preservation

The preservation of the ultrastructure of pulmonary artery and intestinal tissue is shown in Fig. 7. At low magnification, the cell structure of the pulmonary artery is well preserved, exhibiting the intima and a part of media tunica, which are composed respectively, of epithelial cells (endothelium), connective tissue, internal elastic fibers and smooth muscle cells, external elastic fibers (not visible on the micrographs). The endothelium consists in a cell monolayer in contact with the lumen of the artery. The elastic fibers appear as a white wide strip lining the connective tissue. The cells of smooth muscle are partially visible through their lightly dense cytoplasm (Fig. 7A) or their nucleus (Fig. 7B) enclosed in the connective tissue. In contrast, the intestinal tissue shows huge degradations of mitochondria while the rest of cellular organelles seemed correctly preserved. The epithelium presents enterocytes and goblet cells rich in mucus

droplets (Fig. 7C). Microvilli, at the apical side of enterocytes, constitute the border brush, which is specific of intestinal epithelium (Fig. 7C insert). In the vicinity of the nucleus, the cell border is interdigitating (Fig. 7D). Concerning mitochondria, their integrity is not preserved. They appear with strong alterations, outlined by a round and swollen shape, the disruption of the cristae and the loss of matrix material, indicating that cell have probably suffered during sample preparation.

Discussion

Glycocalyx is now recognized to play a key role in some patho-physiological mechanisms and give rise to particular focus on its dimensions and morphology in electron microscopy. In our work, technical conditions for tissue processing was based on chemical fixation by perfusing the whole animal with aldehydes fixatives solution, supplemented with lanthanum nitrate. It appears that those conditions improve the glycocalyx stabilization compared to usual chemical fixation, but induces experimental artifact. The irregular distribution of the glycocalyx at the outer face of the plasma membrane, as well as the presence in luminal space of free glycocalyx may reflect a lack of preservation. When using chemical fixation, many critical factors are known to affect the fixation quality as pH, ionic composition, osmolality, temperature, affinity of fixatives for cellular components, rate of penetration and method of application, etc. Fixation by perfusion facilitates diffusion of fixatives in the organs but may cause same stress as shear stress due to the pressure applied in the vascular system and may induce glycocalyx alteration. A possible additional effect may be due to postmortem alterations illustrated by the poor preservation of mitochondria in enterocytes (Fig. 7). Although mitochondria are sensitive organelles to ionic changes, we are convinced that swollen mitochondria arose

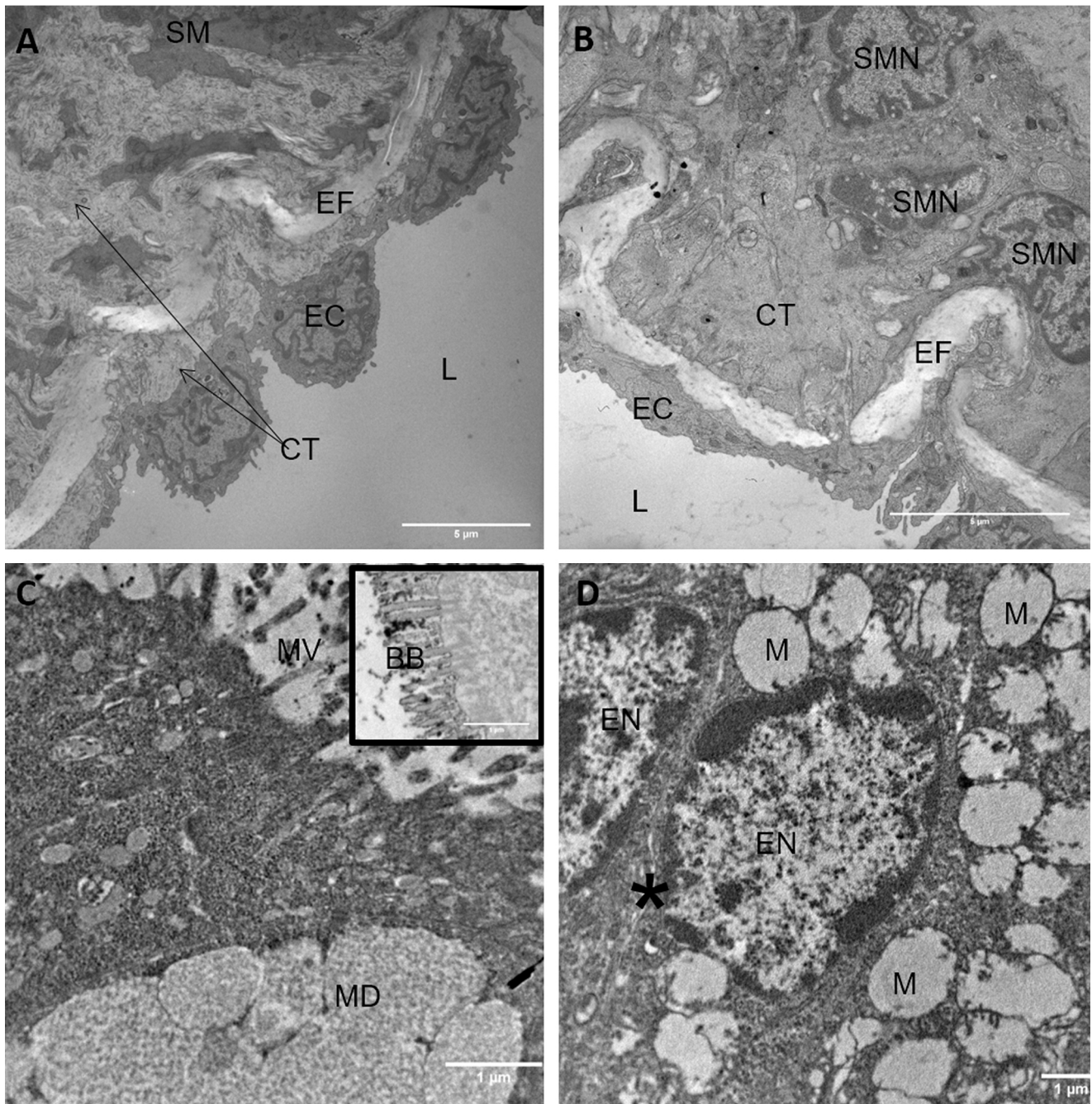


Figure 7 Ultrastructure of pulmonary artery (A–B) and intestinal epithelium (C–D). A–B. Bright field electron micrographs showing the intima and a part of the media tunica. L: lumen of artery; EC: endothelial cells; CT: connective tissue; EF: elastic fibers; SM: smooth muscle cell; SMN: nucleus of smooth muscle cells. Scale bar = 5 μm . C–D. Bright field electron micrographs of intestinal epithelial cells. MD: mucus droplets; MV: microvilli; BB: border brush; M: mitochondria; EN: nucleus of the enterocyte; Asterisk: cell border interdigitating. Scale bar = 1 μm .

from postmortem effects. Indeed, in our study, the vascular perfusion is completed by immersion of pieces of tissue for additional time. According to this procedure, the mode of action of glutaraldehyde fixative is not enough rapid to fix deep cellular structure of organs and allows postmortem artefact to be achieved with subsequent cell injuries. Those effects may explain the differences in cellular structure quality observed between intestinal cells and artery, where

fixatives enter directly in contact with the endothelium. To prevent such alterations, possible alternatives are:

- to add paraformaldehyde to glutaraldehyde solution (with respect of the osmolarity), in order to increase the penetration rate in the tissue;
- to couple vascular chemical perfusion to physical fixation as developed in cryomethods.

Furthermore, the high polysaccharide content of glycocalyx reduces the effectiveness of aldehydes fixatives. Consequently, polysaccharides are more sensitive to solvents during the dehydration and embedding steps and may partially be extracted. As an additional central point, Ebongs et al. [15] suggest that the stabilization of glycocalyx led on the contribution of adsorbed protein. They outline the importance to maintain those proteins and the microenvironment, in general, during sampling and demonstrate the advantages of cryomethods (known to enhance quality of cellular preservation) to overcome those problems. It is clear that the variation in thickness of glycocalyx remains an open question; the main difficulty is to differentiate if those variations come from experimental artifact or not. In a recent study, Hegermann et al. [16] applied perfusion fixation prior to plunge freezing, cryosubstitution and low temperature embedding to investigate endothelial glomerular glycocalyx. Although they used cryomethods, the authors noticed variation in density staining of glycocalyx. They postulated that those variations in thickness might represent a real physiological state and characterize the continuously turnover of glycocalyx.

Glycocalyx visualization

In our study, we demonstrate that the addition of lanthanum nitrate in fixation medium provides an electron-opaque feature, well distinguishable in electron microscopy and contributes to the visualization of glycocalyx. Indeed, the dense layer patterned at the surface of microvilli of intestinal epithelium or the pulmonary artery proves the presence of anionic groups, or mucopolysaccharides, or glycoproteins which are able to react with cationic trivalent lanthanum ions. Because of its composition, glycocalyx is globally negatively charged and may react preferentially with lanthanum ions. Therefore, we assume that the structure labeled by lanthanum is glycocalyx.

Several studies reviewed the use of heavy metal ions such as cationic iron ions or cationic ferritin [17] to overcome the problems of glycocalyx low contrast. In similar action, cupromeronic blue or alcian blue [18] are known to react with mucopolysaccharides, as well as ruthenium red, which display better affinity for chondroitin and heparan sulfate than hyaluronic acid [19]. In the recent study of Akrill et al. [20], a mixture of lanthanum and dysprosium ions was perfused briefly before the aldehyde fixative, revealing the glycocalyx appearance as packed bundles. Due to its high density to electron, Hegerman et al. introduce [16] in fixation procedures, positive colloids of thorium dioxide (cThO₂) which bind specifically to glycosaminoglycan and reveal fine structure of glomerular glycocalyx.

Lanthanum has double advantage to stabilize membrane and to enhance the interactions electrons-matter in TEM imaging process. Indeed, in some conditions, lanthanum does not get through the cells, unless the membrane or tight junction is damaged and is considered as an extracellular marker, especially for polysaccharidic components. The lanthanum has the property to scatter elastic electron at high angle and their detection in STEM-HAADF mode allow to improve the glycocalyx visualization. The results obtained in our study increase the contrast of glycocalyx

at the cell surface, compared to the amorphous cellular matrix and may be helpful to detect low density of cell-coat or to investigate glycocalyx at a higher resolution scale.

Conclusion

In conclusion, the proposed method has pointed out the benefits to combine perfusion fixation with lanthanum salts for the detection of glycocalyx versus conventional protocols. However, we should keep in mind that glycocalyx is a fragile and dynamic structure. To bring new insights on its morphology variations under physio- or pathological conditions, effort should be maintained on the optimization of EM technical procedures.

In particular, the cryomethods [21,22] based on the substitution of chemical by physical steps are known to offer a best alternative to conventional techniques. This approach may be a promising exploring pathway, especially when combined with the properties of lanthanum ions acting as a staining reagent.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

Acknowledgements

The authors thank Pr Philippe Vago (University of Clermont-Ferrand) to provide interest in this work.

References

- [1] Bennet HS. Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *J Histochem Cytochem* 1963;11:14–23.
- [2] Luft JH. Fine structure of capillary and endo-capillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc* 1966;25:1773–83.
- [3] Darnell J, Lodish H, Baltimore D. *Molecular cell biology*, Second ed New York: Scientific American Book Inc; 1990.
- [4] Egberts HJA, Koninkx JFJG, Van Dijk JE, Mouwen JMVM. Biological and pathobiological aspects of the glycocalyx of the small intestinal epithelium. A review. *Vet Q* 1984;6:186–99.
- [5] Chignalia AZ, Yetimakman F, Christiaans SC, Unal S, Bayrakci B, Wagener BM, et al. The glycocalyx and trauma: a review. *Shock* 2016;45:338–48.
- [6] Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Euro J Physiol* 2000;440:653–66.
- [7] Coquerel D, Delile E, Tamion F. Le glycocalyx : tapis protecteur de l'endothélium. *Reanimation* 2013;22:173–80.
- [8] Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, Van Zandvoort MAMJ, Oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions and visualization. *Eur J Physiol* 2007;454:345–59.
- [9] Alphonsus CS, Rodseth RN. The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia* 2014;69:777–84.
- [10] Gao L, Lipowsky HH. Composition of the endothelial glycocalyx and its relation to its thickness and diffusion of small solutes. *Microvasc Res* 2010;80:394–401.
- [11] Lu D, Kassab GS. Role of shear and stretch in vascular mechanobiology. *J R Soc Interface* 2011;8:1379–85.
- [12] Davies PF, Spaan JA, Krams R. Shear-stress biology of the endothelium. *Ann Biomed Eng* 2005;33:1714–8.

- [13] Pahakis MY, Kosky JR, Dull RO, Tarbell JM. The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355:228–33.
- [14] Dane MJC, Van den Berg BM, Lee DH, Boels MGS, Tiemeier GL, Avramut MC, et al. A microscopic view on the renal endothelial glycocalyx. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015;308:F956–66.
- [15] Ebong EE, Malcuso FP, Spray DC, Tarbell JM. Imaging the endothelial glycocalyx in vitro by rapid freezing/freeze substitution transmission electron microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1908–15.
- [16] Hegermann J, Lündorf H, Ochs M, Haller H. Visualization of the glomerular endothelial glycocalyx by electron microscopy using a cationic colloidal thorium dioxide. *Histochem Cell Biol* 2016;145:41–51.
- [17] Curran RC, Clark AE, Lowell D. Acid mucopolysaccharides in electron microscopy: the use of colloidal iron method. *J Anat* 1965;99:427–34.
- [18] Hjalmarsson C, Johansson BR, Haraldsson B. Electron microscopic evaluation of the endothelial surface layer of glomerular capillaries. *Microvasc Res* 2004;67:9–17.
- [19] Hayat MA. Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications. Fourth ed Cambridge University Press; 2000.
- [20] Arkill KP, Qvortrup K, Starborg T, Mantell JM, Knupp C, Michel CC, et al. Resolution of the three-dimensional structure components of the glomerular filtration barrier. *BMC Nephrol* 2014;15–24.
- [21] Quintana C. Cryofixation, cryosubstitution cryoembedding for ultrastructural, immunochemical and microanalytical studies. *Micron* 1994;25:63–99.
- [22] Studer D, Graber W, Al-amoudi A, Egli P. A new approach for cryofixation by high pressure freezing. *J Microsc* 2001;203:285–94.



Inès Boukhalfa

Age 26

+33(0)676815302

ines.boukhalfa@gmail.com

PhD Defense

Education & Degrees

- 2017-2018 ESSEC Business School (Paris)– Advances Master in Marketing, Management & Digital
Specialization in Health marketing & Managemnt
- 2013-2017 Normandy University (Rouen) – PhD in Cardiovascular Pathophysiology
- 2011-2013 Normandy University (Rouen) – Master’s Degree in Physiology and Pathophysiology
- 2008-2011 Normandy University (Rouen) – Bachelor Degree in Cellular Biology and Physiology

Work experience

- 2013-2017 **Inserm U1096 – Endothélium, Valvulopathie & Insuffisance cardiaque (Rouen)**
(4 years) *Project manager - PhD in Cardiovascular pathophysiology*
- Managing and planning collaborative projects
 - Monitoring of scientific literature
 - Scientific communications : international & national conferences
 - Planning and organizing a regional scientific congress
 - Patent filing (Inserm Transfert)
 - 3 publications in international scientific reviews as co-author
 - Planning & managing scientific experiments
 - Developing new protocols in experimental research
 - Teaching for Bachelor Degree & Master’s Degree
- 2011-2013 **Inserm U 1096 – Endothélium, Valvulopathie & Insuffisance cardiaque (Rouen)**
(2 years) *Junior project manager – Internship*
- Monitoring scientific literature
 - Functional, cellular, and molecular evaluation of heart function
 - Planning and managing scientific experiments
- 2010-today **Mère et Fille – Rouen**
(7 years) *Co-founder & Head manager*
- Financial accounting
 - Community manager
 - Business development
 - CRM

Communications related to my PhD work

- August 2016 European Society of Cardiology (Roma, Italy)
- April 2016 Printemps de la Cardiologie (Dijon, France)
- October 2015 Selenium Conference (Sao Paulo, Brazil)
- April 2015 French Society of Pharmacology & Therapeutics (Caen, France)
- April 2015 Printemps de la Cardiologie (Toulouse, France)