



HAL
open science

Rôle de la nicotinamide riboside kinase 2 dans le remodelage cardiaque pathologique

Cynthia Tannous

► **To cite this version:**

Cynthia Tannous. Rôle de la nicotinamide riboside kinase 2 dans le remodelage cardiaque pathologique. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066107 . tel-01773451

HAL Id: tel-01773451

<https://theses.hal.science/tel-01773451>

Submitted on 22 Apr 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.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Ecole doctorale ED394

Présentée et soutenue publiquement le 20 Avril 2017 par

Mlle Cynthia Tannous

Dirigée par **Dr. Mathias Mericskay**

**Rôle de la nicotinamide riboside kinase 2 dans le
remodelage cardiaque pathologique**

Devant le jury composé de :

Pr. Onnik Agbulut

Pr. Luc Bertrand

Dr. Karim Wahbi

Dr. Gareth Lavery

Pr. Geneviève Derumeaux

Dr. Mathias Mericskay

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

A l'issue de la rédaction de ce mémoire, je suis persuadée que la thèse est loin d'être un travail individuel. En effet, je n'aurais pas pu réaliser cette thèse sans le soutien, la générosité et la bonne humeur d'un certain nombre de personnes qui ont largement participé à la réalisation de mon travail doctoral.

Je tiens à remercier dans un premier temps, les membres du jury, à savoir, Pr. Onnik Agbulut pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, Pr. Luc Bertrand et Dr. Karim Wahbi pour avoir jugé mon travail, ainsi que Pr. Geneviève Derumeaux et Dr. Gareth Lavery pour avoir accepté de participer à ce jury. Je leur en suis très reconnaissante.

Je souhaite remercier particulièrement et énormément mon directeur de thèse Dr. Mathias Mericskay, qui m'a encadré depuis mon stage de M2 et jusqu'à aujourd'hui. J'ai beaucoup appris grâce à ses compétences scientifiques et son expertise dans le domaine de la cardiologie qui ont toujours incitées ma curiosité scientifique. Merci pour la bonne formation que tu m'as accordée, pour ta disponibilité, tes conseils avisés et ta direction exigeante à laquelle cette thèse doit beaucoup. Tu m'as appris à être autonome dans ce début de carrière et que rien n'est impossible !

J'adresse mes remerciements au Pr. Bertrand Friguet, pour m'avoir accueillie au sein de l'unité « vieillissement et adaptation biologique ». Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de génétique et physiopathologie des tissus musculaires à l'Université de Pierre et Marie Curie, là où régnaient la qualité scientifique et l'ambiance sympathique, grâce aux qualités professionnelles et humaines du Dr. Zhenlin Li. Je te remercie de m'avoir accueillie dans ton laboratoire ainsi que pour ta gentillesse, ta simplicité, ta modestie et surtout tes conseils très très précieux !

Une partie de ce travail a été réalisée dans l'équipe de Signalisation et Physiopathologie Cardiovasculaire à la faculté de pharmacie de Châtenay Malabry, je remercie également Dr Rodolphe Fischmeister, Dr. Anne Garnier et Dr. Vladimir Veksler, qui m'ont donné la chance de pouvoir travailler dans leur laboratoire et d'apprendre de nouvelles techniques.

Chère Madame Paulin, je vous adresse mes plus sincères remerciements. Merci pour votre surveillance, votre inquiétude et votre générosité envers moi. Je vous remercie pour votre encadrement, vos conseils et toutes vos remarques. J'attends votre visite au Liban...

Ara, « Ara to the rescue », merci pour les belles idées que tu me donnais, pour tes solutions pour avancer, pour ton arrivée au bon moment de la manip où on croit qu'on a raté mais tu nous sauve ! J'apprécie beaucoup ton intelligence et ta façon de réfléchir.

Jeff, « star du labo », « il faut en user mais jamais en abuser ». Merci pour tes conseils, pour la reformulation de mes phrases, pour l'ambiance sympa, pour m'avoir donnée la chance de devenir une star !

Je tiens à remercier Jocelyne, la personne la plus cool du labo, qui m'a appris l'art de la dissection et l'expertise dans les prélèvements. Tu nous comprenais sans avoir besoin de tout te raconter. Merci pour les beaux moments partagés.

Dario, merci d'avoir partagé ton expertise dans la microscopie électronique et pour tes conseils avisés sur mon projet.

Zhigang, merci pour ton aide et surtout pendant les derniers jours de thèse qui sont les plus durs, j'en suis très reconnaissante. Jie, ton sourire et ta gentillesse rendent tout plus agréable.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien en dehors d'une super bonne ambiance. Je remercie énormément mes collègues, mes amis thésards et stagiaires.

Robin, tu as rendu les journées plus drôles. Ton humour a facilité mes derniers mois de thèse, nos « voices » me faisaient souvent du bien et de la motivation, merci beaucoup pour ton aide et ton soutien dans les manips et d'avoir simplifier le déménagement ..

Alééééé, Alex, Maman à Paris, merci pour tes conseils dans tous les domaines, pour tes délicieuses recettes, pour l'ambiance sympa et cool que tu crée. Merci parce que tu me comprenais et pour être là quand je craquais !

Marie-Thérèse, Titi, ondes du Liban, ça m'a vraiment fait plaisir de t'avoir dans le labo. Tu n'as pas réussi à me contaminer pour être aussi calme que toi, mais c'est agréable d'avoir quelqu'un comme toi pendant ma période de stress et qui partage le même goût et les envies de sandwiches libanais !

Medhi, « PhD student », merci pour ta gentillesse et ta simplicité. Merci pour NINJA, le jeu de défoulement et des pauses de rédaction. Tu seras polyglotte, j'en suis sûre ! Bonne chance à Roma. Maakéééé !!!

Alexander, merci pour ton humour et tes « TGIF Beers » ;) Lei, Dan, Julie, Lucile, Mélanie, Fiona, Jérôme, c'est vrai qu'on a pas passé beaucoup de temps ensemble, mais je suis très ravie de vous avoir connu..

Un grand merci à Stef, ma chère amie, ma petite sœur, celle qui me comprend, qui me motive, qui me soutient. Je suis très reconnaissante de t'avoir à mes côtés, jamais pessimiste et toujours à l'écoute, tu as rendu mon séjour plus agréable et amusant.

Walid, « Dr Abi Habib », merci pour ton aide et tes conseils dans tous les domaines, tu m'as appris beaucoup de choses pour pouvoir démarrer le séjour et la thèse à Paris. Tu faisais partie de la famille avec qui j'ai plein de beaux et drôles souvenirs en France.

Mary, « Dr. Zakaria », coloc, sœur, amie d'enfance, d'adolescence, de tous les stades de ma vie. Tu m'as accompagnée, tu m'as comprise, tu m'as motivée, tu m'as fait rire quand j'avais besoin et tu as facilité mon démarrage à Paris. Les moments qu'on a passés ensemble sont agréables, les souvenirs qu'on a seront inoubliables. Merci pour tout, tu es très chère à mon cœur.

Merci à tous mes copains et copines libanais, Mohsen (mfanshan), Sacha, Sarah, Kevin, Souraya, Norma.. Vous avez tous participé à la réalisation de cette thèse..

Je remercie excessivement mon copain. Fad, tu m'as toujours supportée, tu as supporté mes moments de folie ! Tu m'as compris quand j'ai fait mes choix. Merci pour ton soutien et tes efforts. Les mots ne suffisent pas pour exprimer ma gratitude envers toi ! Jtm.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont trop chers, mes parents et mon frère, et que j'ai quelque peu délaissés ces quelques années pour achever cette thèse. Je me suis éloignée, j'ai raté des grands événements, c'était pas facile mais je suis sûre que vous êtes fiers, je ne pourrais jamais vous remercier assez !

Je suis redevable à toi Maman, ma sœur, ma meilleure amie, ma Yoyo. Ton attention, ta motivation, tes encouragements, ton soutien perpétuel, ton optimisme, nos discussions quotidiennes, m'ont accompagnés tout au long de ces années. Je suis là grâce à toi.

Je remercie mon père, Jean, pour avoir toujours accepté mes choix et pour avoir toujours confiance en moi, sans toi je ne serais pas là aujourd'hui. Je suis là grâce à ton soutien et ta fierté.

Alain, mon grand frère, mon cher, le plus drôle, le plus spécial. Ce travail est un témoignage de mon admiration, de ma gratitude et de mon attachement le plus profond envers toi !

Table des matières

INTRODUCTION.....	11
I. Remodelage et insuffisance cardiaque	12
A. Remodelage structural et fibrose	20
1. Organe : hypertrophie concentrique versus excentrique (CMH et CMD).....	20
2. Cardiomyocyte : structure cellulaire et signalisation	24
a) Activation neurohormonale : catécholamine, rénine angiotensine aldostérone	26
b) Signalisation biomécanique : sarcomère, intégrine, disques intercalaires	29
3. Matrice extracellulaire et fibrose.....	41
B. Remodelage métabolique	45
1. Métabolisme énergétique du cœur	45
a) Métabolisme énergétique et phosphorylation oxydative	45
b) Le système Créatine kinase.....	49
2. Remodelage métabolique dans l'insuffisance cardiaque.....	50
a) Déficit énergétique dans le cœur insuffisant.....	50
b) Dysfonction mitochondriale et altération de la navette Créatine/Phosphocréatine	51
3. Régulation du métabolisme énergétique.....	54
a) Voie AMPK et sirt 1	54
b) Régulation par les voies PPAR, PGC1alpha/beta, ERRalpha	56
II. Nouvelle piste: Rôle du NAD dans le cœur.....	59
A. Homéostasie et signalisation du NAD	59
1. Rôle de coenzyme	59
2. La biosynthèse du NAD	60
3. Signalisation Sirtuine /PARP / CD38	66
B. NAD et pathologies cardiaques.....	70
1. Chute de la NAMPT dans le cœur insuffisant.....	70
2. NAD myocardique	70

1. Chute de la NAMPT dans le cœur insuffisant.....	64
2. NAD myocardique	65
III. La kinase Nmrk2: un nouvel acteur dans le remodelage cardiaque	66
A. Profil d'activation dans différentes pathologie cardiaques	66
B. Rôle dans la signalisation intégrine.....	68
C. Biosynthèse du NAD.....	69
OBJECTIFS	71
RESULTATS	73
Article 1: Dilated Cardiomyopathy in Mice Lacking NMRK2/MIBP, a Protein with a Dual Role in NAD+ Synthesis and Integrin Signaling (page 75).	
Article 2: Nicotinamide riboside preserves cardiac functions in a mouse model of dilated cardiomyopathy (page 76).	
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	77
BIBLIOGRAPHIE	86

Tables des illustrations

Figure 1: Représentation schématique du cœur et de la circulation sanguine à travers l'organisme..	14
Figure 2: Représentation schématique des différentes formes de remodelage morphologique de la cellule cardiaque.	17
Figure 3: Remodelage physiologique et remodelage pathologique du VG	19
Figure 4: Cardiomyocytes isolés de souris adulte	21
Figure 5: Système rénine angiotensine aldostérone	24
Figure 6: Représentation schématique d'une fibre musculaire et de la structure et de la composition des sarcomères	26
Figure 7: Représentation schématique des processus moléculaires menant à la contraction des sarcomères.....	27
Figure 8: Structure hétérodimérique de l'intégrine.....	29
Figure 9: Intégrines et MEC.....	32
Figure 10: Positionnement des intégrines, formation de complexes, signalisation et méchanotransduction dans le CM.	35
Figure 11: Les différentes sources d'énergie pour la cellule musculaire cardiaque	44
Figure 12: Représentation schématique de la réaction redox du nicotinamide adénine dinucléotide	56
Figure 13: La biosynthèse, le transport et le catabolisme du NAD et ses intermédiaires dans les compartiments intracellulaires et extracellulaires chez les mammifères.....	57
Figure 14: Voie des pentoses phosphates et voies de synthèse du NAD ⁺ par les précurseurs amidés	60
Figure 15: Activation de la voie de sauvetage du NAD de type II	67
Figure 16: Implication de NMRK2 dans la signalisation intégrine.....	69

Liste des abréviations

ADP: Adénosine Di-Phosphate

AF: Adhésions Focales

AHA: American Heart Association

AMP: Adenosine Mono-Phosphate

AMPK: AMP-activated protein kinase

ANF: Atrial Natriuretic Factor

ANG: Angiotensine

ANT: Translocateur des Nucléotides

Adényliques

AQ: Acide quinolinique

ART: ADP Ribosyl Transférase

AT1R: Angiotensin Type 1 Receptor

ATP: Adenosine Tri-Phosphate

BNP: Brain Natriuretic Peptide

CD: Cluster of Differentiation

CK: Créatine Kinase

CM: Cardiomyocyte

CMD: Cardiomyopathie Dilatée

CMH: Cardiomyopathie Hypertrophique

CO₂: Dioxyde de Carbone

CPT: Carnitine Palmitoyl Transferase

CSE: Cellules Souches Embryonnaires

CTGF: Connective Tissue Growth Factor

DI: Disques Intercalaires

ECA: Enzyme de Conversion de

l'Angiotensine

ERK: Extracellular Signal Related Kinase

ERR: estrogen related receptor

FAD: Flavine Adénine Dinucléotide

FAK: Focal Adhesion Kinase

FE: Fraction d'Ejection

FN: Fibronectine

FOXO: Forkhead Box O

GLUT: Transporteur de Glucose

GPX: Gluthatione Peroxidase

GSK: Glycogene Synthase Kinase

IC: Insuffisance Cardiaque

IM: Infarctus du Myocarde

K: Potassium

LAM: Laminine

MCT: Monocarboxylate Transporter

MEC: Matrice Extracellulaire

MEF: Myogenic Enhancer Factor

MIBP: Muscle Integrin Binding Protein

MMP: Matrix Metalloproteases

MVNR: Myocytes de Ventricules de

Nouveaux-nés de Rats

NA: Acide Nicotinique

Na: Sodium

NaAD: Nicotinate Adénine Dinucléotide

NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADS: NAD synthase

NAM: Nicotinamide

NaMN: Nicotinate Mononucléotide

NAMPT: Nicotinamide Phosphoribosyl

Transférase

NMN: Nicotinamide Mono-Nucleotide

NMNAT: Nicotinamide Mononucléotide

Adénylyl-Transférase

NMRK2: Nicotinamide Riboside Kinase 2

NR: Nicotinamide Riboside

O₂: Dioxygène

PARP: poly ADP ribosyl-polymérase

PCr: Phosphor Créatine

PDH: Pyruvate Deshydrodenage

PE: Phényléphrine

PGC: PPAR gamma Co-activator

PINP: Pro-peptides N-terminaux

PNP: Purine nucléoside pyrophorylase

PPAR: Peroxisome Proliferator Activated

Receptor

RAAS: Renine Angiotensine Aldosterone

System

ROS: Reactive Oxygen Species

SERCA: Pompe Ca du Réticulum

Sarcoplasmique

SIRT: Sirtuine

SNS: Système Nerveux Sympathique

SRF: Serum Response Factor

TAC: Transverse Aortic constriction

TGF: Transformin Growth Factor

TIMP: Tissue Inhibitor of metalloproteases
(inhibiteur tissulaire des MMPs)

TnC: Troponine C

TnI: Troponine I

TnI: Troponine I

TnT: Troponine T

VD: Ventricule Droit

VDAC: Voltage Dependant Anion Channel

VG: Ventricule Gauche

INTRODUCTION

Préambule

L'insuffisance cardiaque est une pathologie fréquente au pronostic sombre. Dans les pays industrialisés, les maladies cardiovasculaires demeurent la première cause de mortalité. En plus d'une forte mortalité, le taux de ré-hospitalisation et le coût pour la société sont importants.

La présente thèse rassemble les études effectuées sur un nouveau modèle impliquant le rôle, dans le cœur, d'une kinase, la nicotinamide riboside kinase 2 (NMRK2), qui n'a jamais été étudiée chez les mammifères. Nmrk2 a été identifiée comme un des gènes les plus fortement induits dans différents modèles de cardiomyopathie dilatée. NMRK2 est également connu sous le nom de MIBP (Muscle Integrin Binding Protein), et a été décrite comme pouvant se lier à l'hétérodimère intégrine $\alpha7/\beta1$ et régulant le dépôt de la laminine dans la matrice extracellulaire (MEC) dans les myoblastes squelettiques en culture, Son deuxième rôle connu en tant que kinase est de phosphoryler une vitamine B3, le nicotinamide riboside (NR), en nicotinamide mononucléotide (NMN) pour produire du NAD, un coenzyme clé dans les réactions d'oxydoréduction du métabolisme énergétique et une cosubstrat utilisé par les sirtuines déacétylase régulant le métabolisme énergétique et la biogénèse mitochondriale.

L'introduction qui suit fait état des connaissances dans les différents aspects de remodelage cardiaque, qui peuvent être qualifiés de structuraux et métaboliques. Elle témoigne de l'importance et de l'originalité du rôle potentiel de cette kinase dans les deux types de remodelage qui nous ont conduits à étudier sa fonction chez la souris en analysant le phénotype d'une souris déficiente en NMRK2.

I. Remodelage et insuffisance cardiaque

Insuffisance cardiaque : Définition-Symptômes-Enjeux médicaux et sociétaux

L'insuffisance cardiaque (IC) est l'incapacité du cœur à effectuer sa fonction de pompe de manière efficace soit parce qu'il est dans l'incapacité de se remplir avec un volume de sang suffisant, on parle alors de dysfonction diastolique, ou parce qu'il est dans l'impossibilité de générer une force suffisante pour se vider suffisamment et expulser le sang vers la circulation pulmonaire (ventricule droit) ou systémique (ventricule gauche), on parle alors de dysfonction systolique. Les deux dysfonctions peuvent exister indépendamment ou coexister. Dans tous les cas, le corps ne reçoit pas la quantité de sang, d'oxygène et de nutriments dont il a besoin pour fonctionner correctement, l'insuffisance cardiaque est en ce sens un syndrome systémique, car elle n'affecte pas que le cœur. C'est «un syndrome clinique complexe» qui peut résulter de dysfonctions structurales, fonctionnelles ou métaboliques, aboutissant à une incapacité du ventricule à se remplir ou éjecter le sang.

Ce syndrome clinique complexe constitue un problème majeur de santé publique qui a été proposé comme «la prochaine épidémie du 21^{ème} siècle» avec une prévalence de plus de 23 millions dans le monde, et on estime que le coût est de 108 milliards de dollars dans le monde entier en 2012 (Cook et al. 2014). Même si la notion «d'épidémie» pour une maladie chronique, d'origine non infectieuse dans la majorité des cas, n'est pas forcément communément admise, il n'en reste pas moins que le vieillissement de la population mondiale et la diffusion des modes de vie sédentaires et du régime de type occidental riche en matières grasses contribue à l'expansion de cette maladie.

Couramment, la définition de l'IC se limite aux stades où les symptômes cliniques sont évidents. Et avant que les symptômes cliniques deviennent évidents, les patients peuvent présenter des anomalies cardiaques asymptomatiques structurelles ou fonctionnelles (dysfonction ventriculaire gauche systolique et diastolique). Ce sont des précurseurs de l'IC, et il est important de les reconnaître et de commencer le traitement à ce stade là, ce qui pourrait réduire la mortalité chez les patients avec dysfonction systolique du ventricule gauche (Investigators 1992; Wang et al. 2003). Les symptômes sont souvent non spécifiques et n'aident pas à séparer entre l'IC et d'autres problèmes. Les symptômes et les signes de l'IC dus à la rétention de fluide peuvent être rapidement résolus avec la thérapie des diurétiques. Les signes comme l'augmentation de la pression veineuse jugulaire, et les impulsions apicales déplacées latéralement, peuvent être plus spécifiques, mais ils sont plus difficiles à détecter et possèdent une reproductibilité faible (Kelder et al. 2011; van Riet et al. 2014).

Les symptômes ou signes chez les patients en IC sont nombreux, les plus communs (selon l'AHA) sont les suivants:

-Un essoufflement (dite dyspnée) au cours d'activité physique (le plus souvent), au repos ou bien au cours du sommeil qui peut survenir subitement et réveiller la personne. Ces personnes ont souvent des difficultés à respirer en position couchée à plat et ont peut-être besoin de soutenir le haut du corps et la tête sur deux oreillers; elles souffrent souvent de fatigue, d'anxiété et d'agitation. Ceci est causé par le fait que le sang se stocke dans les veines pulmonaires qui ramènent le sang des poumons vers le cœur, parce que le cœur n'arrive pas à suivre l'offre. Cela provoque une fuite du liquide dans les poumons.

-Une toux persistante ou une respiration sifflante. La toux produit un mucus et cela est dû au fluide présent dans les poumons.

-L'accumulation d'un excès de liquide dans le corps pouvant créer des œdèmes, avec un gonflement au niveau des pieds, des chevilles, des jambes ou bien un gain de poids. Ceci est causé par le ralentissement du flux sanguin sortant du cœur et le «back up» du sang retournant au cœur dans les veines. Les reins sont moins capables de disposer d'eau et de sodium, ce qui cause en plus une rétention d'eau au niveau des tissus.

-Une fatigue persistante, avec une difficulté avec les activités journalières telles que la marche, monter les escaliers... Le cœur est incapable de pomper suffisamment le sang pour répondre aux besoins des différents tissus du corps. Le corps détourne le sang des organes moins vitaux, particulièrement les muscles et l'envoie au cœur et au cerveau.

Plusieurs autres symptômes plus ou moins spécifiques ou typiques peuvent caractériser l'IC comme le manque d'appétit, des problèmes de digestion, la confusion et l'altération de la pensée; perte de mémoire et sentiment de désorientation, ceci pourrait être dû au changement de niveaux de sodium dans le sang, une augmentation du rythme cardiaque et des palpitations cardiaques, afin de «compenser» la perte de la capacité de pompage, le cœur bat plus vite.

Le diagnostic et le traitement précoce peuvent améliorer la qualité de vie de personnes avec IC. Le traitement de l'IC dépend du type et de la sévérité de l'IC.

La concentration plasmique en peptides natriurétiques constitue un test initial pour diagnostiquer l'IC. A partir d'un certain seuil, les patients en question requièrent une échocardiographie qui constitue le test le plus utile et largement disponible pour les patients avec une possible IC. L'échocardiographie fournit une information immédiate sur la fraction d'éjection, les

fonctions ventriculaires systolique et diastolique, l'épaisseur de paroi, la fonction valvulaire et l'hypertension pulmonaire (Paulus et al. 2007; Voigt et al. 2015). La fraction d'éjection (FE) du ventricule gauche (VG) est un paramètre important pour la détermination de l'efficacité de la fonction de la pompe cardiaque et donc dans le diagnostic et la détection de l'IC. La FE compare la quantité de sang dans le cœur représente le pourcentage de sang éjecté à chaque systole en fonction du volume de remplissage en fin de diastole. Depuis quelques années, une nouvelle forme de syndrome d'IC a émergé ou plutôt a obtenu une reconnaissance clinique car concernant une proportion importante de patients en IC, souvent âgés (chez ces derniers 40 à 50% des cas), qui présentent une fraction d'éjection ventriculaire normale en échocardiographie. On a parfois appelé cette forme d'IC diastolique, mais comme le syndrome n'est pas restreint à la dysfonction diastolique et parfois même cette dysfonction n'est pas étayée formellement par les analyses, la terminologie actuelle qualifie cette forme d'IC à FE préservée (IC-FEp). Dans cette dernière le muscle cardiaque du ventricule gauche semble se contracter correctement, encore qu'une dysfonction systolique subclinique ne soit pas exclue dans certains cas, et dans le cas d'une dysfonction diastolique, le VG ne se relaxe pas comme il faut au cours du remplissage.

Dans l'IC à FE réduite (IC-Fer) qui est aussi qualifiée parfois d'IC systolique, le muscle cardiaque du VG semble ne pas se contracter de façon efficace et moins de sang riche en oxygène est expulsé vers le corps. Il faut noter cependant qu'une FE réduite n'est pas strictement synonyme d'une diminution de la fonction contractile du VG. En effet dans le cas d'une surcharge en volume du VG en fin de diastole, un pourcentage de FE réduit ne fait que refléter un maintien du volume systolique éjecté. Toute fois dans une situation de surcharge en volume chronique, les modifications structurales du myocarde dilaté peuvent aboutir à l'altération des fonctions contractiles. Inversement la FE peut sembler préservée également avec en fait une contractilité réduite si la post-charge est réduite comme dans l'insuffisance mitrale sévère. Il existe maintenant des techniques d'analyses plus pointue des anomalies de remplissage ou de vidage du VG comme des analyses de sous régions de la paroi ventriculaire par doppler tissulaire ou des approches en speckle tracking (suivi de grains intra-myocardiques) qui permettent d'affiner le diagnostic et entreront sans doute dans la pratique clinique dans les années à venir, au moins pour certains patients difficiles à diagnostiquer.

Les objectifs du traitement pour tous les stades de l'insuffisance cardiaque comprennent:

- Traitement de la cause sous-jacente de la maladie, tels que les maladies coronariennes, l'hypertension artérielle ou le diabète

- La réduction des symptômes
- L'arrêt de l'évolution de l'IC
- L'augmentation de la durée et de la qualité de vie

Les traitements comprennent généralement des changements vers un mode de vie sain pour le cœur (arrêter de fumer, éviter l'alcool, perdre ou maintenir son poids, manger sain, des médicaments et des soins continus. Si l'insuffisance cardiaque est sévère, il y aura besoin de procédures médicales ou de chirurgie.

Historiquement, les seules options de traitement médical pour l'IC ont longtemps été les diurétiques et la digoxine, mais la capacité de ces agents pour modifier les résultats a été mise en cause par l'examen des essais cliniques modernes (Roger 2013; von Lueder and Krum 2015).

Au cours des 4 dernières décennies, des bloquants neuro-hormonaux ont été introduits à la pratique clinique, aboutissant à une réduction marquée de morbidité et de mortalité dans l'insuffisance cardiaque chronique avec une fraction d'éjection ventriculaire gauche réduite.

Les médicaments actuellement prescrits par les médecins pour traiter l'insuffisance cardiaque se basent sur le type d'IC et du degré de sévérité. Les plus communs sont les suivants:

-Les inhibiteurs des enzymes de conversion de l'angiotensine (ECA): qui diminuent la pression artérielle et réduit la pression sur le cœur et réduisent le risque d'une future crise cardiaque.

-Les antagonistes de l'aldostérone: déclenche le corps à éliminer l'excès de sodium par l'urine. Cela diminue le volume de sang que le cœur doit pomper.

-Les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine: détendent les vaisseaux sanguins et diminuent la pression artérielle pour diminuer la charge de travail du cœur.

-Les bêta-bloquants: diminuent le débit cardiaque et la pression artérielle afin de diminuer la charge de travail du cœur.

-La digoxine: permet au cœur de battre plus fortement et de pomper plus de sang

-Les diurétiques: dites « water pills », aident à réduire l'accumulation de liquide dans les poumons et le gonflement de vos pieds et les chevilles.

-L'Isosorbide dinitrate/hydralazine hydrochloride: aide à détendre les vaisseaux sanguins de sorte que le cœur ne fonctionne pas assez pour pomper le sang. Des études ont montré que ce

médicament peut réduire le risque de décès chez les Noirs. D'autres études sont nécessaires pour savoir si ce médicament bénéficiera d'autres groupes raciaux.

Il est important de noter qu'actuellement peu de molécules sont disponibles pour traiter le problème de défaillance énergétique qui est pourtant un problème majeur du cœur insuffisant.

A l'heure actuelle, lorsque l'IC s'aggrave, et affecte le mode de vie des patients, les médicaments commencent à devenir inefficaces et incapables de contrôler les symptômes. Les patients ont alors besoin de procédures chirurgicales. Les côtés droit et gauche d'un cœur défaillant pourraient ne plus se contracter en même temps. Cela perturbe la pompe cardiaque. Afin de corriger ce problème, le cardiologue peut implanter différents dispositifs mécaniques comme un dispositif d'assistance ventriculaire gauche, ou un dispositif de resynchronisation cardiaque, un type de stimulateur cardiaque particulier qui aide les deux parties du cœur à se contracter simultanément ce qui amortit A terme, en case de décompensation sévère non corrigible par les dispositifs médicaux, notamment dans les cardiomyopathies dilatées en phase terminale, la seule issue reste la transplantation cardiaque.

Prévalence et coûts socio-économiques de l'insuffisance cardiaque

La prévalence de l'IC constitue 1-2% de la population adulte dans les pays développés, et atteint >10% chez les personnes ayant >70 ans (Ceia et al. 2002; Mosterd and Hoes 2007).

Le risque à vie de l'IC à l'âge de 55 ans est de 33% chez les hommes et 28% chez les femmes (Bleumink et al. 2004). La proportion de patients avec IC à FE réduite, varie entre 22 et 73%, dépendant de la définition appliquée, du cadre technique (les premiers soins, clinique hospitalier, admission hospitalière), de l'âge et du sexe de la population étudiée, de l'occurrence d'un infarctus de myocarde précédent le diagnostic et surtout de l'année de publication (Hellermann et al. 2003; van Riet et al. 2014).

Aujourd'hui, l'IC représente un véritable problème de santé publique. 17.5 Millions de personnes meurent chaque année de maladies cardiovasculaires, ce qui équivaut à ~31% de la totalité des décès dans le monde. Plus de 75% des décès dus aux maladies cardiovasculaires ont lieu dans les pays aux revenus bas ou intermédiaires. 80% des décès dus aux maladies cardiovasculaires sont dus à des crises cardiaques ou des accidents vasculaires cérébraux (Heidenreich et al. 2013). L'AHA estime que le nombre de ces patients augmentera de 25% en 2030. Plus de 40% des patients

d'IC décèdent dans l'année suivant la première hospitalisation (Clegg et al. 2007). En France, environ 150 000 personnes souffrent d'IC avancée.

Alors que l'Afrique, l'Asie, le Moyen-Orient et l'Amérique du Sud ont la majorité de la population mondiale, la plupart des informations sur l'IC provient de l'Amérique du Nord et de l'Europe (Cleland et al. 2003; Bhatia et al. 2006; Fonarow et al. 2010). Cependant, des données dispersées de chaque région sont disponibles; par exemple, la prévalence de l'IC à Oman est de 0.51% (Agarwal et al. 2001). Au Liban, la prévalence de l'IC en 2012 était de 1.8% (Tatari et al. 2015).

En conséquence, le coût est de plus en plus élevé pour la collectivité, 70% des dépenses sont liées aux hospitalisations répétées, 60 à 90% du coût total est imputable aux patients en phase terminale. L'AHA annonce un triplement des coûts directs liés à l'insuffisance cardiaque entre 2010 et 2030 (Stewart et al. 2001). Les coûts imputables à l'insuffisance cardiaque étaient de 39 milliards de dollars aux Etats-Unis en 2006 (Roger et al. 2011). Les coûts directs des patients en phase avancée étaient de 1,6 milliards d'euros en France en 2007 et le coût total des soins de santé cardiovasculaire au Liban était de 104 millions de dollars en 2012 (Tatari et al. 2015).

En dépit des progrès majeurs en pharmacothérapie, notre compréhension des mécanismes pathologiques sous-jacents des points de vue épidémiologiques, cliniques, physiopathologiques, moléculaires et génétiques reste incomplète.

Fonction cardiaque et Remodelage

Le cœur est l'organe central du système cardiovasculaire et dont le rôle fondamental est de pomper le sang afin de fournir l'oxygène et les nutriments aux organes et de transporter le dioxyde de carbone vers les poumons. On distingue deux circulations; la petite circulation qui constitue le passage du sang du cœur droit au cœur gauche en passant par les poumons dont le but est d'oxygéner le sang et le transport de celui-ci du «cœur gauche» vers le «cœur droit» en passant par les organes, correspond pour sa part, à la «circulation systémique» qui vise à approvisionner en oxygène et en nutriments les différents organes de l'organisme (Figure 1).

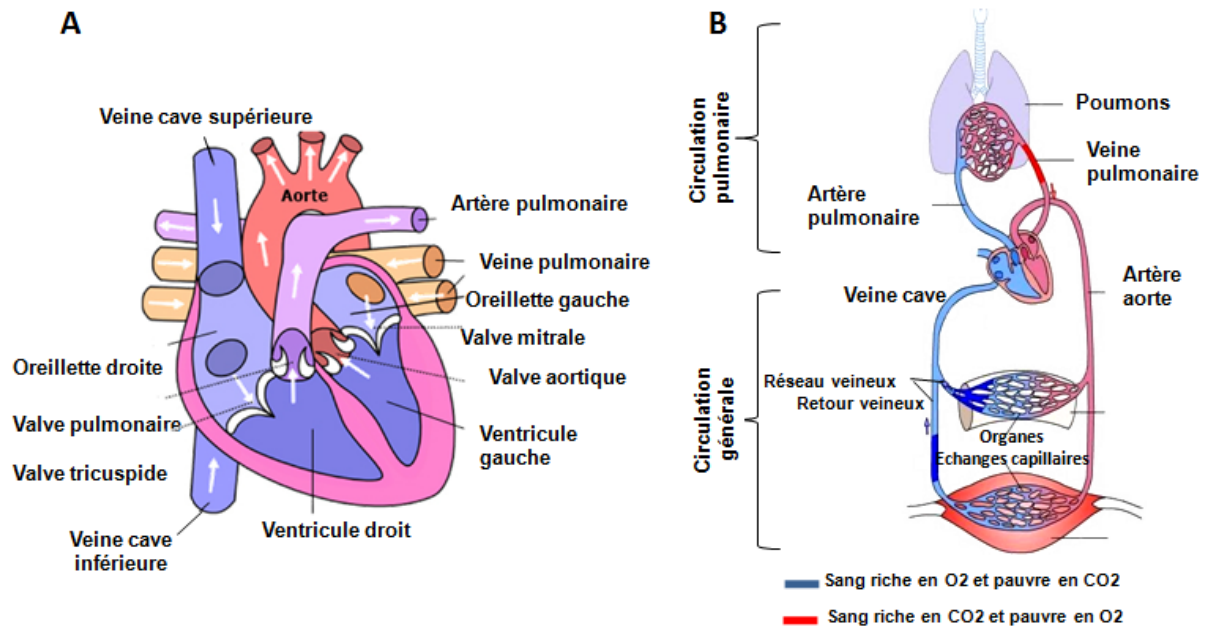


Figure 1: Représentation schématique du cœur et de la circulation sanguine à travers l'organisme

La succession d'une systole ventriculaire et d'une diastole ventriculaire, forme un cycle cardiaque. L'activité électrique périodique engendre l'activité mécanique, dominée par la contraction puis la relaxation des ventricules. La contraction des deux ventricules est synchrone et dure environ un tiers de seconde au repos. Son début coïncide avec la fermeture des valves auriculo-ventriculaires suivie de l'ouverture des sigmoïdes aortiques et pulmonaires. Pendant la systole, les pressions intra-ventriculaires augmentent fortement, ce qui permet l'éjection du sang du ventricule droit vers l'artère pulmonaire et celle du sang du ventricule gauche vers l'aorte (Figure 1). Les valves auriculo-ventriculaires étant fermées, il n'y a pas de reflux vers les oreillettes. *La qualité de l'éjection sanguine systolique* dépend de:

- La *contractilité* du myocarde ventriculaire, propriété intrinsèque des cellules myocardiques qui s'altère au cours des cardiopathies,
- La *pré-charge* ventriculaire,
- La *post-charge* ventriculaire.

En fin de systole, la contraction ventriculaire diminue rapidement, puis apparaît la diastole.

Pendant la diastole, les pressions intra-ventriculaires deviennent plus faibles que celles des oreillettes. Les valves auriculo-ventriculaires s'ouvrent alors qu'au contraire, les sigmoïdes aortiques et pulmonaires se ferment. Le sang provenant du retour veineux par les oreillettes peut alors remplir

les ventricules, sans que le sang déjà éjecté n'y reflue. La durée de la diastole est normalement plus longue que la systole, mais se raccourcit lorsque la fréquence cardiaque s'accélère. La diastole est, comme la systole, un phénomène actif et consomme de l'énergie. En fin de diastole, la contraction des oreillettes (*systole auriculaire*) contribue au remplissage ventriculaire.

Remodelage cardiaque

En réponse à une surcharge de travail, typiquement causée par une stimulation pathologique ou physiologique, le cœur subit un remodelage dit remodelage cardiaque. Le remodelage cardiaque est généralement considéré comme déterminant de l'évolution clinique de l'IC. Il est défini comme modifications de l'expression génomique ou des modifications moléculaires, cellulaires et interstitielles manifestées cliniquement par des changements de taille, forme et fonction du cœur suite à une lésion ou surcharge de pression. Le remodelage cardiaque est influencé par la surcharge hémodynamique, l'activation neuro-hormonale et d'autres facteurs toujours sous enquête.

Bien que les patients ayant un remodelage cardiaque majeur, montrent une altération progressive de la fonction cardiaque, le ralentissement ou l'arrêt du remodelage cardiaque est devenu un objectif de la thérapie de l'IC. On peut également définir le remodelage cardiaque comme une adaptation du myocarde destinée à rétablir une économie musculaire normale en rétablissant l'expression du programme fœtal après un infarctus ou au cours d'une hypertension artérielle.

Le RC peut être décrit comme condition physiologique qui constitue des changements compensatoires au niveau de la proportion et de la fonction du cœur, vu chez les athlètes. Ou bien, il peut être décrit comme une condition pathologique qui peut avoir lieu au cours du vieillissement ou suite à un infarctus du myocarde (IM), une surcharge hémodynamique (sténose aortique, hypertension), une maladie cardiaque inflammatoire (myocardites), une cardiomyopathie dilatée idiopathique ou une surcharge de volume (régurgitation valvulaire). Bien que les étiologies de ces maladies soient différentes, elles partagent différentes voies en termes d'événements moléculaires, biochimiques et mécaniques (Cohn et al. 2000). Il peut aussi être d'origine génétique.

A. Remodelage structural et fibrose

1. Organe: hypertrophie concentrique versus excentrique (CMH et CMD)

Le cœur a la capacité d'augmenter sa taille, et selon le stimulus, cela résulte en une hypertrophie physiologique ou pathologique. L'hypertrophie en elle-même augmente le stress de la paroi ventriculaire en augmentant l'épaisseur de cette paroi. Elle suit la loi de Laplace: le stress de la paroi

(ou tension) est inversement proportionnel à l'épaisseur de la paroi ($tension = (pression \times radius) / (2 \times \text{épaisseur de la paroi})$).

L'hypertrophie cardiaque physiologique entraîne la croissance normale du cœur de la naissance jusqu'au début de l'âge adulte (dite hypertrophie post-natale), la croissance du cœur maternel au cours de la grossesse, et la croissance du cœur chez les athlètes résultant de l'exercice extrême et répétitif. Dans ce cas d'hypertrophie, le cœur ne développe pas de maladie.

Un cœur subissant une hypertrophie physiologique a une perfusion vasculaire et un métabolisme améliorés et le processus de croissance est initié par des voies moléculaires spécifiques de l'hypertrophie physiologique (Maillet et al. 2013).

L'hypertrophie cardiaque pathologique quant à elle, a lieu généralement en réponse à des conditions pathologiques comme l'hypertension et l'infarctus du myocarde ou une maladie des artères coronaires qui favorise éventuellement le remodelage ventriculaire, la dilatation, la fibrose et une diminution du débit cardiaque.

La surcharge de pression et de volume résultent en une hypertrophie concentrique et excentrique des chambres ventriculaires avec respectivement une réplication des sarcomères en parallèle ou en série. Ces modèles divergents d'hypertrophie ont été liés il y a 40 ans à des tensions de paroi différentes dans les deux conditions, avec un stress de paroi systolique suscitant la réplication parallèle des sarcomères et la tension de paroi diastolique, la réplication en séries. Ces observations sont pertinentes pour la pratique clinique, puisqu'elles concernent l'hypertrophie excessive et la dysfonction contractile régulièrement observée chez les patients avec sténose aortique. Les mécanismes de détection du stress dans les cardiomyocytes et l'activation de la mort de cardiomyocyte par le stress de paroi élevé continue à intriguer les scientifiques en recherche cardiovasculaire.

La surcharge de pression entraîne habituellement une hypertrophie concentrique avec un ratio h/R élevé (l'épaisseur de la paroi / rayon du VG). Alors que la surcharge de volume déclenche l'hypertrophie excentrique avec un ratio h/R normal. L'hypertrophie concentrique a été donc considérée comme mécanisme adaptatif, qui empêche l'excès de post-charge pour éviter le raccourcissement myocardique. En revanche, l'hypertrophie excentrique, observée chez les patients avec régurgitation mitrale ou aortique, corrige la tension systolique de la paroi du VG mais ne réussit pas à normaliser la tension diastolique de la paroi du VG.

Dans l'hypertrophie ventriculaire concentrique, les cardiomyocytes croissent principalement direction transversale et moins en longueur, alors que dans l'hypertrophie excentrique, les cardiomyocytes poussent principalement dans la direction longitudinale et peu dans la direction transversale (Grossman and Paulus 2013)(Figure 2).

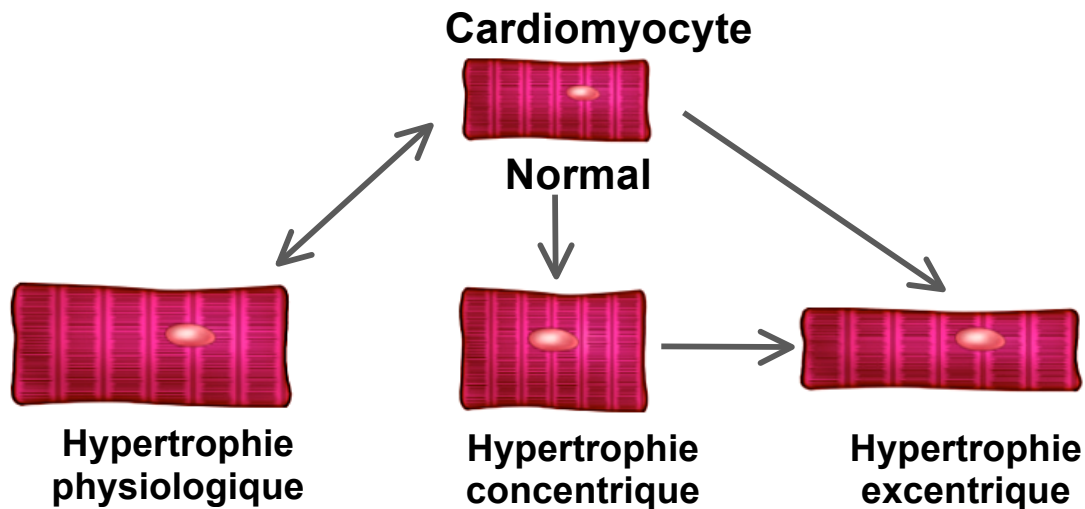


Figure 2: Représentation schématique des différentes formes de remodelage morphologique de la cellule cardiaque.

L'hypertrophie excentrique non pathologique, caractérisée par une augmentation du volume ventriculaire avec une croissance coordonnée de la paroi du ventricule et de l'épaisseur du septum, peut conduire sous conditions pathologiques (infarctus du myocarde) à une dilatation et parfois un amincissement de la paroi (diminution du ratio h/R) avec un allongement des cardiomyocytes aboutissant à une cardiomyopathie dilatée (CMD).

La stimulation physiologique (grossesse ou exercice d'endurance) pourrait de même induire une forme moins prononcée d'hypertrophie excentrique (Heineke and Molkentin 2006).

La CMD constitue une forme d'insuffisance cardiaque associée à une dilatation du ventricule gauche menant à une dysfonction systolique sévère (fraction d'éjection < 0,45 ou taux de raccourcissement < 0,30). La CMD acquise peut se développer secondairement à remodelage post-infarctus (CMD ischémique) ou en réponse à l'hypertension essentielle, notamment chez le sujet âgé. Le diabète constitue un facteur de risque de développement d'une CMD quoiqu'il puisse aussi évoluer vers la CMH chez certains individus (Seferovic and Paulus 2015). Les causes de la CMD peuvent aussi être environnementales, suite à l'exposition à des toxines comme l'alcool ou les anthracyclines, ou une infection entérovirale (myocardite). Enfin les causes génétiques sont majeures dans ce type de remodelage représentant près de 30% des cas. Des mutations dans plus de 30 gènes codant pour la plupart des protéines du cytosquelette ou du sarcomère mais aussi dans certaines

protéines chaperonnes qui ont été identifiées dans les formes monogéniques de CMD(Villard et al. 2011). Toutes les formes de CMD sont, au stade final de l'évolution vers l'insuffisance cardiaque, caractérisées par des altérations majeures du métabolisme énergétique dans le myocarde et de fait, la CMD est aussi une manifestation possible des maladies mitochondriales(Wahbi et al. 2015).

On diagnostique une cardiomyopathie hypertrophique (CMH) lorsqu'il y a une augmentation de l'épaisseur de la paroi ventriculaire destinée à compenser une hypertension ou une zone lésée et les cardiomyocytes individuels augmentent typiquement en épaisseur plutôt qu'en longueur, ce type de remodelage survient habituellement en raison des conditions pathologiques comme l'hypertension chronique ou bien une sténose valvulaire, on parle donc de cardiomyopathie hypertrophique (CMH). La CMH est une maladie de la structure de la cellule cardiaque. Le muscle devient hypertrophié (épaissi) et ses cellules ont une structure anormale. Elle peut se développer à tout âge, particulièrement à l'adolescence et au début de l'âge adulte. La CMH est la cause première de mort subite chez les jeunes de moins de 40 ans. L'entraînement à l'exercice isométrique comme la lutte ou la musculation, induit également une forme moins sévère d'hypertrophie concentrique non pathologique. Le cœur peut passer d'un état normal à un état hypertrophique physiologique. Ces modifications constituent une adaptation à la demande physiologique et sont considérées comme réversibles (Maillet et al. 2013). Cependant chez certains athlètes, la réversion à une morphologie cardiaque «normale» n'est pas systématique après la retraite sportive (Lindsay and Dunn 2007). La CMH pathologique n'est pas facilement réversible et peut conduire au développement d'une insuffisance cardiaque après une phase de transition qualifiée de décompensation (Figure 3).

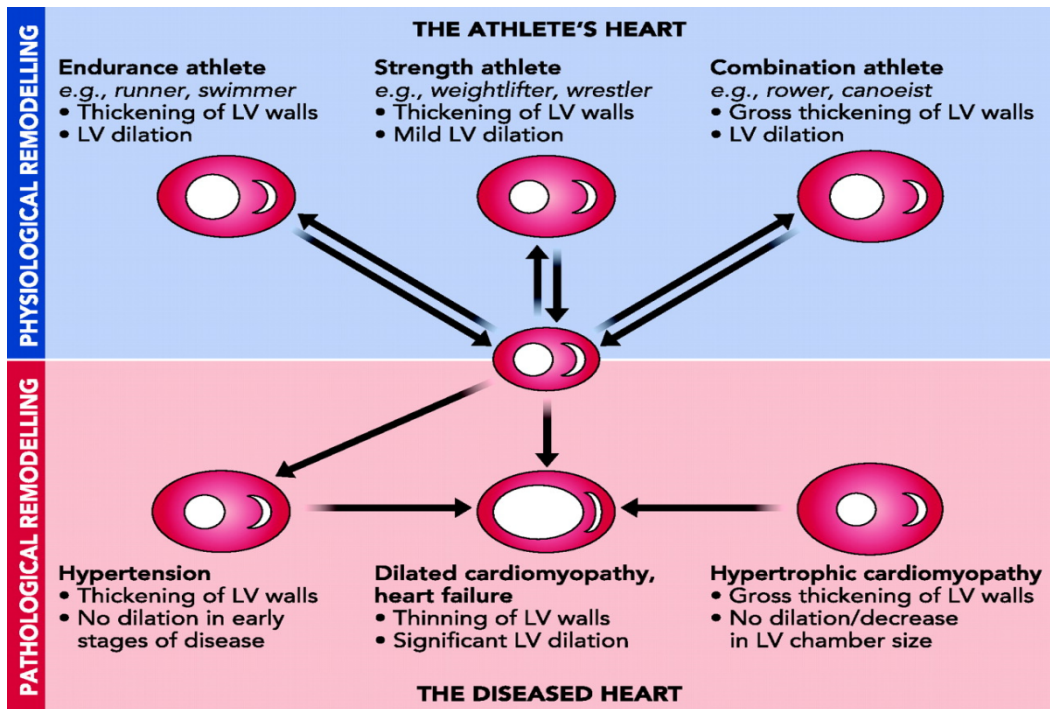


Figure 3: Remodelage physiologique et remodelage pathologique du VG (Weeks and McMullen 2011)

Dans ce type de remodelage, l'épaississement du myocarde altère les fonctions systoliques sans nécessairement affecter drastiquement la fraction d'éjection, mais le plus souvent altère la fonction diastolique, affectant notamment la vitesse de relaxation. Ces modifications peuvent augmenter la pression artérielle dans les ventricules et les vaisseaux sanguins des poumons et affectent la survie et la morphologie des cardiomyocytes. Cela peut perturber la conduction des signaux électriques dans le cœur et entraîner des arythmies.

Il y également des altérations caractéristiques du métabolisme énergétique cardiaque dans la CMH. En général, le processus d'hypertrophie se traduit dans la phase précoce par une augmentation de l'absorption du glucose et de la glycolyse, mais dans la phase tardive de l'insuffisance cardiaque on observe une diminution du métabolisme oxydatif des acides gras et du glucose. (Kolwicz and Tian 2011). Une des enzymes clés de la régulation du métabolisme énergétique cardiaque dont l'activité altérée peut mener au développement d'une cardiomyopathie hypertrophique est l'AMPK, une kinase impliquée dans la réponse au stress énergétique et son activation est capable de limiter le développement de l'hypertrophie cardiaque induite par l'isoproténéról (Zarrinashneh et al. 2008). Des études récentes chez l'homme et les rongeurs, montrent que des mutations de l'AMPK entraînent le développement d'une forme distincte de CMH qui n'est pas associée au myocyte et à la fibrose cardiaque (Taha and Lopaschuk 2007).

2. Cardiomyocyte: structure cellulaire et signalisation

Les cardiomyocytes, qui représentent 85% de la masse cardiaque, sont les cellules contractiles du cœur, et ils contiennent une série d'unités contractiles appelées sarcomères.

Différemment des autres types cellulaires composant le cœur (cellules endothéliales, fibroblastes, cellules immunitaires et cellules pro génitrices), les cardiomyocytes chez les mammifères sont complètement différenciés juste après la naissance et majoritairement perdent leur capacité à proliférer, bien qu'une petite proportion de cardiomyocytes se renouvelle au cours de la vie. En conséquence, si la masse cardiaque peut-être augmentée en partie par la prolifération des fibroblastes, et par l'activité des cellules pro génitrices qui permettraient renouvellement de quelques cardiomyocytes, cette dernière contribution étant très limitée, l'augmentation de la masse a lieu principalement suite à l'hypertrophie individuelle des cardiomyocytes.

Le myocyte constitue le type cellulaire cardiaque majeur impliqué dans le remodelage cardiaque avec les fibroblastes cardiaques, impactant le collagène dans l'interstitium, et la vascularisation coronaire. Des processus pertinents impliquent aussi l'ischémie, la nécrose et l'apoptose.

Dans le cœur embryonnaire, évoluant d'un tube pulsatile à une structure à 4 chambres se contractant de façon cyclique, les forces mécaniques variant en amplitude et en fréquence sont imposées sur les cardiomyocytes en cours de maturation, au cours du développement (Taber 2001; Jacot et al. 2010).

Des altérations régionales de la forme cellulaire ont été observées et considérées comme contribuant à la morphologie globale émergente (Sheehy et al. 2012). Les interactions entre les CM et la MEC causent des changements dans la morphologie cellulaire qui dirige l'orientation des filaments d'actine, l'organisation du sarcomère et la myofibrillogenèse in vitro (Bray et al. 2008). Des études sur des CM en culture ont montré que la morphologie influence aussi un nombre de propriétés fonctionnelles, comme les courants d'ions, la dynamique du calcium et la contractilité suggérant que c'est un paramètre important à prendre en considération lors de la conception des constructions de tissus artificiels (Walsh and Parks 2002; Yin et al. 2004; Alford et al. 2011; Pong et al. 2011).

Les cardiomyocytes sont constamment soumis à des forces de stretch physiques résultant de l'activité contractile du cœur, présentant la possibilité que le mouvement (contraction) du myocarde pourrait activer des voies de signalisation sensibles qui affectent les caractéristiques des cellules cardiaques (Treppe et al. 2007). L'étirement pulsatile est capable de promouvoir l'alignement

parallèle des myocytes de ventricules des nouveau nés de rats (**MVNR**) et induit la signalisation mécano-transductive via l'interaction intégrine β 1-MEC qui est responsable de l'induction de l'expression de la N-cadhérine et de la connexine 43 via l'activation des voies FAK et ERK1/2 (Shanker et al. 2005; Yamada et al. 2005; Salameh et al. 2010). Le niveau d'expression de gènes associés au phénotype hypertrophique et l'isoforme de la chaîne lourde de la myosine est augmenté dans les cultures de MVNRs exposées à un étirement pulsatile (Cadre et al. 1998; Gopalan et al. 2003; Frank et al. 2008). Toutes ces études montrent que les propriétés mécaniques du microenvironnement cellulaire contribuent à la maturation fonctionnelle du myocarde. Le myocarde en fonction est composé de myocytes en forme rectangulaire, dite «*Rod Shaped*» (Figure 4), organisés en un arrangement laminaire qui sert à optimiser la production de forces sarcomériques coopératives.

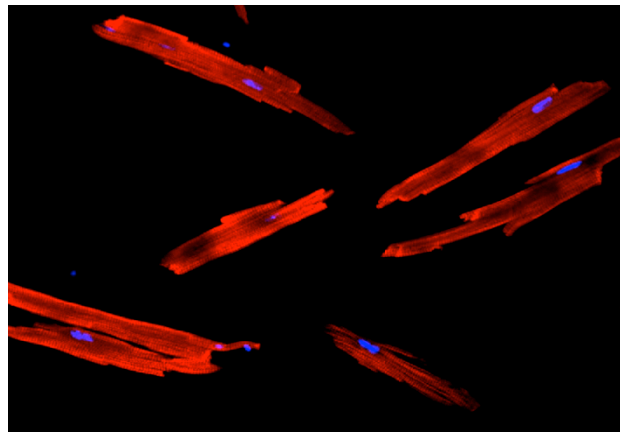


Figure 4: Cardiomyocytes isolés de souris adulte. Image confocale montrant l'actine F (en rouge) et les noyaux (en bleu).

Le système cardiovasculaire est un système très complexe et bien organisé, dans lequel la transduction de signal joue un rôle critique aux niveaux physiologiques et pathophysiologiques. Les éléments cellulaires du cœur et de la paroi vasculaire sont équipés avec une série de récepteurs spécifiques et une machinerie intracellulaire complexe qui facilite et conduit des réponses appropriées aux stimuli extracellulaires. La compréhension des mécanismes à travers lesquels les stimuli extracellulaires modifient les fonctions des cellules dans le cœur et la paroi vasculaire, donne des indications importantes sur la façon dont les perturbations des systèmes de signalisation pourraient causer des situations pathologiques (Wheeler-Jones 2005).

a) Activation neurohormonale: catécholamine, rénine angiotensine aldostérone

Le système rénine angiotensine aldostérone (RAAS) est fortement activé durant l'insuffisance cardiaque et joue un rôle important dans le RC, et il constitue une des réponses compensatoires la plus commune (Hartupee and Mann 2016). Il est indépendant de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Le stimulus majeur pour l'activation du RAAS est la diminution de la pression sanguine systémique associée à une diminution du débit cardiaque suite à une lésion (Dzau et al. 1981).

Cette lésion peut être une lésion aiguë dans le myocarde, comme l'infarctus du myocarde; ou bien une lésion se développant lentement, comme avec la surcharge hémodynamique sur long terme; ou bien en réponse à des variations génétique qui perturbent la fonction contractile. Les changements circulatoires qui découlent de l'altération de la fonction de la pompe myocardique sont détectés par les barorécepteurs artériels périphériques. Ces altérations travaillent collectivement pour maintenir l'homéostasie cardiovasculaire. Les mécanismes compensatoires qui ont été décrits incluent: l'activation du SNS et RAAS qui maintiennent le débit cardiaque par une augmentation de la rétention d'eau et de sel, de la vasoconstriction artérielle périphérique et de la contractilité et des médiateurs inflammatoires (Mann 2015) qui sont impliqués dans la réparation cardiaque.

Collectivement, on appelle ces réponses « activation neurohormonale» (Rouleau et al. 1991). Elles sont dites neurohormones parce qu'elles sont des molécules impliquées dans la pathophysiologie de l'IC avec FE réduite qui sont produites par le système neuroendocrine et affectent le cœur de manière endocrine.

Le RAAS est contrôlé par la rénine, une enzyme d'origine rénale. Le mécanisme de production de rénine par le rein est contrôlé par le système nerveux sympathique et donc par sécrétion de noradrénaline et d'adrénaline. Lors d'une augmentation du tonus sympathique, donc une augmentation de sécrétion de catécholamines et d'adrénaline par ses terminaisons nerveuses, on a une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de la rénine, il en va de même lorsque la natrémie baisse ou la kaliémie augmente.

La rénine clive le précurseur «angiotensinogène» produit par le foie pour donner de l'AngI (angiotensine I). Ni le précurseur, ni l'AngI n'ont une activité biologique puisqu'ils ne possèdent aucune affinité spécifique pour un récepteur. L'AngI est convertie par l'ACE (enzyme de conversion de l'angiotensine) en AngII composée de 8 acides aminés qui agit sur le cortex des glandes surrénales. Il existe trois zones du cortex surrénalien, glucocorticoïdes corticostérone, la réticule (androgènes) et la glomérulaire cible de AngII et qui va produire le minéral corticoïde, l'aldostérone qui agit au niveau du rein et favorise la réabsorption du Na et l'excrétion du K.

Il existe un rétrocontrôle exercé par la concentration plasmatique de Na et K quand la natrémie augmente. Par ailleurs, il existe un contrôle par AngII qui freine ce système. Le cœur sécrète des peptides comme le peptide atrial natriurétique (ANF) et d'autres peptides de même fonction, comme le BNP (brain natriuretic peptide), sont sécrétés par des myocytes «spécialisés» de la paroi atriale, en réponse aux forces de distension de la paroi de l'atrium (donc sous l'effet de la pression veineuse centrale). L'ANF a pour effet principal d'augmenter l'excrétion urinaire de sodium, et donc d'accroître la diurèse (par élimination de l'eau liée au sodium) et le BNP sécrété par le cerveau qui freine la synthèse l'aldostérone et la réabsorption de Na et l'excrétion de K.

Au niveau de l'homéostasie hydro électrolytique, les effets de ce système RAAS sont une augmentation du volume plasmatique par augmentation de la réabsorption au niveau rénal d'eau et de Na qui entraîne par effet osmotique une augmentation de la réabsorption de l'eau, suite à cette augmentation du volume plasmatique, on a une augmentation de la tension artérielle par action directe de l'ANGII ayant des effets vasoconstricteurs.

L'ANGII, principale composante du système RAAS, exerce son effet biologique en se liant avec une affinité biologique élevée à deux sous types de récepteurs, l'AT1R (Angiotensin II type 1 receptor) et l'AT2R (Angiotensin II type 2 receptor) (de Gasparo et al. 2000; Volpe et al. 2003). L'heptapeptide Ang (1-7) est également important dans le système RAAS (Carey and Siragy 2003). Cette Ang (1-7) est clivée à partir de l'ANGII sous l'action de l'ACE2 (Vickers et al. 2002).

Dans des conditions physiologiques et pathologiques, il est connu qu'AT1R joue un rôle important dans le système cardiovasculaire sous l'effet de l'ANGII. Alors que AT2R antagonise l'effet de AT1R prévenant du coup ses effets hypertrophiques et angiogéniques (Levy 2005).

L'ANGII exerce des effets sur différents niveaux, au niveau rénal, elle favorise la réabsorption de Na et l'excrétion de protons il est donc impliqué dans la régulation de la filtration glomérulaire qui est augmentée dans des conditions physiologiques. L'ANGII a également un effet physiopathologique, c'est le rôle diabétogène, il est clairement démontré aussi bien par la recherche fondamentale que par de très nombreux essais cliniques que l'ANGII diminue la sensibilité à l'insuline et qu'elle est en grande partie responsable de l'insulino-résistance et du diabète de type II. Et il a été montré que les antagonistes de l'ANGII peuvent restaurer ou en tous les cas prévenir une insulino-résistance et donc contribuer au traitement de diabète de type II (van Hateren et al. 2015).

Parmi les différents mécanismes activés lorsque le cœur est insuffisant en tant que pompe, il y a une augmentation de la résistance vasculaire périphérique et une expansion du fluide extracellulaire périphérique suite à la rétention hydrosodique (Figure 5).

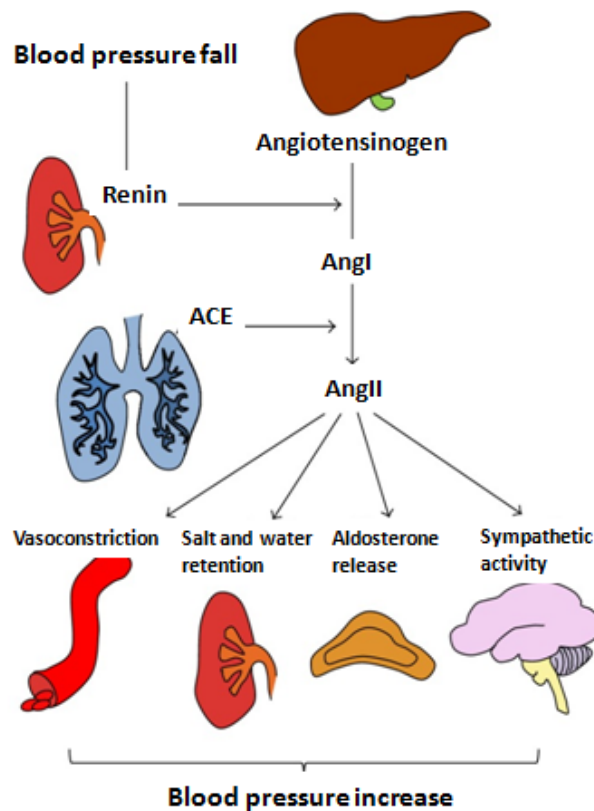


Figure 5: Système rénine angiotensine aldostérone
(Bernardi et al. 2016)

Le système RAAS circulant, est un régulateur clé de la pression sanguine et de l'homéostasie du volume sanguine chez les mammifères, et son produit l'AngII, est impliqué dans l'hypertension, l'hypertrophie cardiaque et vasculaire et la lésion rénale. Récemment, il a été suggéré que l'AngII pourrait également avoir des effets directs sur le cœur y compris la facilitation de la transmission des nerfs sympathiques, l'augmentation de la contractilité cardiaque et initiant le remodelage structurelle résultant en une hypertrophie et une fibrose cardiaque (Weber and Brilla 1991; Dostal and Baker 1999).

L'AngII joue un rôle important dans l'homéostasie cardiovasculaire, il agit comme agoniste vasoactif et induit la contraction des vaisseaux sanguins. Au cours des années, il a été montré que l'Ang II joue un rôle aussi important dans l'hypertension, l'IC, le diabète et les réponses proliférative et inflammatoire. Toutes ces découvertes ont permis le développement de plusieurs classes d'agents pharmacologiques dans le but d'inhiber la synthèse d'AngII (les inhibiteurs des ECA) ou bien de bloquer son action (les antagonistes des récepteurs d'AngII). Ces agents sont largement utilisés dans le traitement de l'hypertension et de l'IC. Différentes études ont été effectuées sur des modèles animaux mettant en évidence les effets cellulaires de l'AngII. Les données initiales montrent le rôle

particulier de ce peptide en tant que agoniste contractile et les signaux qu'il induit dans les cellules musculaires lisses vasculaires et les cardiomyocytes, ainsi que la mobilisation du Ca^{2+} , et l'activation de la protéine kinase C. Il a été montré que l'AngII active la phospholipase C, résultant en une production de l'inositol triphosphate et le diacylglycérol qui sont responsables de la mobilisation du Ca^{2+} . Des études supplémentaires sur des cultures de cellules musculaires lisses montrent que l'une des propriétés de l'AngII est qu'il agit comme agoniste de croissance, en particulier en induisant l'hypertrophie cellulaire, caractérisée par une augmentation de la synthèse protéique et la taille des cellules (Taubman 2003).

b) Signalisation biomécanique : sarcomère, intégrine, disques intercalaires

Sarcomère

La fonction contractile de la cellule musculaire cardiaque est assurée par un panel de protéines. Celles-ci s'organisent en myofibrilles composées de myofilaments épais et fins associés à des protéines de structure et de régulation. La base de l'organisation des myofibrilles est le sarcomère. Ce dernier constitue l'unité fonctionnelle hautement ordonnée du muscle strié. La longueur du sarcomère au repos est d'environ 2,0 μm dans le cœur humain et 2,5 μm dans le muscle squelettique humain.

Les filaments épais sont essentiellement formés de l'assemblage régulier de molécules de myosine

Chaque molécule de myosine est formée de 2 chaînes lourdes identiques et de 2 paires de chaînes légères. Les deux chaînes lourdes de la myosine sont accolées l'une à l'autre : leur longue queue forme un axe torsadé, et leur pôle globulaire émerge du filament épais sous la forme d'une tête double. L'émergence des têtes de myosine se fait selon une disposition générale ayant l'apparence d'un pas de vis. La partie distale des têtes de myosine possède deux sites de fixation, l'un pour l'ATP et l'autre pour l'actine. La tête de myosine possède une activité ATPasique activée au contact de l'actine. Les disques M renferment des filaments de myoméline qui relient entre eux les filaments de myosine et les maintiennent groupés en faisceaux.

La titine (ou connectine) est un filament protéique qui, dans chaque demi-sarcomère, relie chaque filament épais à la strie Z. Composant « élastique », elle maintient l'alignement des filaments épais et oppose une résistance à l'étirement excessif du sarcomère. Elle s'étend de la strie Z jusqu'à la strie M.

Les filaments fins sont essentiellement composés de polymères d'actine

L'actine est une molécule polypeptidique de forme globulaire. La polymérisation des monomères d'actine se fait sous une forme filamentaire. Les polymères d'actine s'accrochent par deux pour former une longue double hélice. Les myofibrilles fines sont formées de l'association de cette double hélice d'actine et de deux protéines régulatrices : la tropomyosine, dimère filamentaire rigide de renforcement, et la troponine, complexe de trois sous-unités polypeptidiques (I, C et T) disposées à intervalles réguliers le long des filaments d'actine, en regard de chaque tête de myosine, et impliquées dans la régulation de la contraction musculaire par le calcium.

Les disques Z sont formés par les filaments d'alpha-actinine, ils servent à relier l'extrémité des filaments fins de chaque sarcomère entre elles et avec les extrémités des filaments fins du sarcomère adjacent. Ils contiennent également une des extrémités des filaments de titine et les filaments intermédiaires de desmine.

Les costamères, analogues aux contacts focaux, servent à attacher les filaments d'actine intracellulaires aux protéines de la MEC, en particulier à la fibronectine, dont les intégrines de la membrane plasmique constituent les récepteurs.

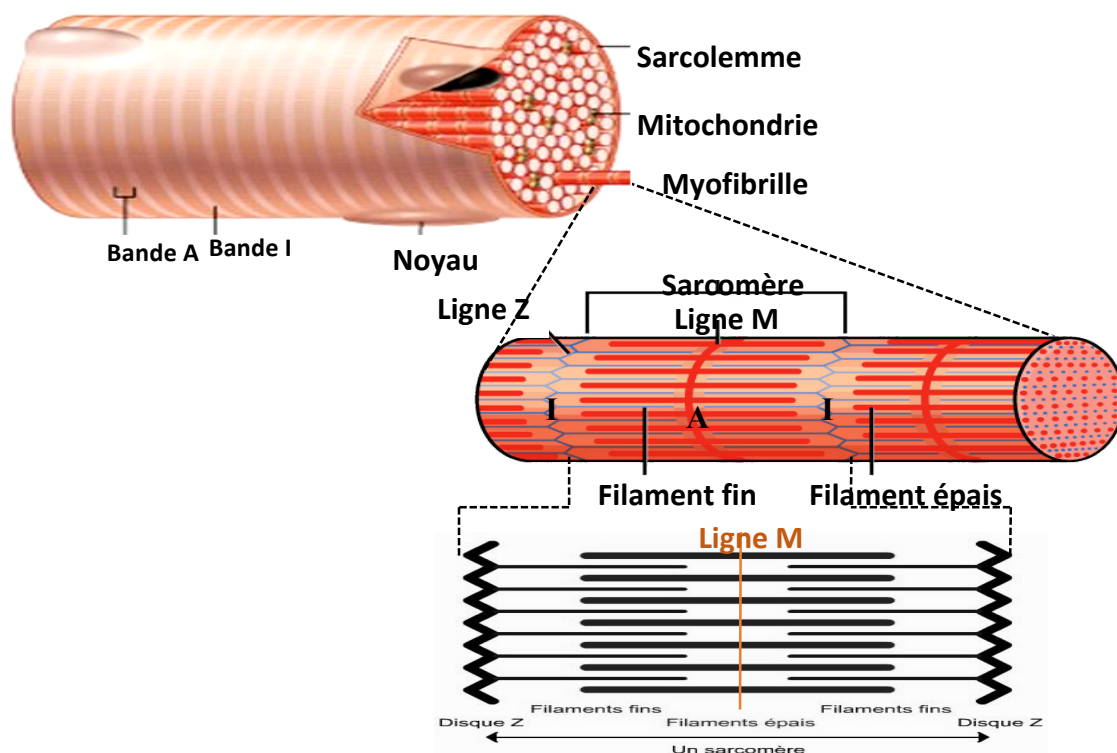


Figure 6: Représentation schématique d'une fibre musculaire et de la structure et de la composition des sarcomères

La contraction cardiaque résulte du raccourcissement des sarcomères. Le complexe des troponines cardiaques présent au niveau des filaments fins régule cette contraction en réponse au calcium (Ca^{2+}). Brièvement, la fixation du Ca^{2+} sur la TnC entraîne un changement conformationnel du complexe des troponines. La tropomyosine se déplace et libère au niveau de l'actine le site d'interaction avec la myosine. L'interaction entre l'actine et la myosine provoque un glissement des filaments fins et ainsi le raccourcissement des sarcomères (Ntelios et al. 2015) (Figure 7).

Ce glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosine résulte de la formation de ponts actomyosines (interaction entre les têtes globulaires de myosine et d'actine) dans la zone de recouvrement des filaments fins et épais. Cette interaction active l'ATPase de la myosine et l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP est rapidement convertie en énergie mécanique permettant le pivotement de la tête de myosine capable d'exercer une traction sur les filaments fins. La force développée est proportionnelle au niveau de recouvrement des filaments fins et épais et au nombre de ponts actomyosine formés. Ces derniers oscillent entre deux états (faiblement ou fortement attachés) en fonction de la fixation de l'ATP, de son hydrolyse et de la libération de phosphate inorganique (Pi). On distingue alors les ponts d'actomyosine faibles (ne produisant pas de force) caractérisés par une oscillation rapide entre les états attaché et détaché et les ponts d'actomyosine forts (responsables de la force produite) et caractérisés par une fréquence d'oscillation lente entre les deux états. Le passage d'un pont faible à un pont fort se fait lors de la libération de Pi. Lorsqu'une nouvelle molécule d'ATP se lie à la myosine, cette dernière se dissocie de l'actine et un nouveau cycle peut démarrer. La force unitaire développée par un pont influence la production de force et les cinétiques de contraction et de relaxation, selon les iso formes des différentes protéines de contraction et les protéines régulatrices ou leur état de phosphorylation (Schaub et al. 2006).

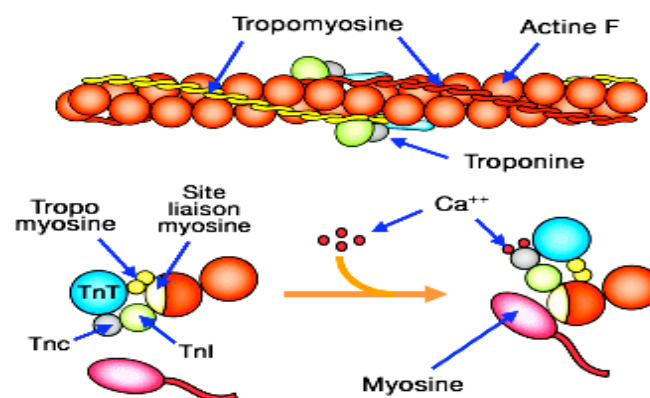


Figure 7: Représentation schématique des processus moléculaires menant à la contraction des sarcomères.

Les disques intercalaires

Les disques intercalaires sont des dispositifs de jonction très particuliers qui assurent la cohésion des cellules myocardiques de l'ensemble du myocarde et permettent d'une part la transmission d'une cellule à l'autre de la tension développée par la contraction des myofibrilles et d'autre part la diffusion rapide de l'excitation d'une cellule à l'autre à travers le cœur. Ces dispositifs de jonction (ou « traits scalariformes » ou « disques intercalaires » ou « stries intercalaires ») visibles en MO aux extrémités de chaque cardiomyocyte sous la forme d'un trait continu globalement transversal mais fait de la succession alternée de segments transversaux et de segments longitudinaux, apparaissent en ME comme constitués de desmosomes, de zonula adherens et de jonctions communicantes.

Les desmosomes sont situés indifféremment au niveau des portions transversales ou longitudinales des traits scalariformes ; les filaments intermédiaires de desmine s'y attachent. Les desmosomes permettent une forte adhésion des cellules entre elles et évitent ainsi que les contractions régulièrement répétées ne les détachent les unes des autres.

Les zonula adherens, situées dans la portion transversale des disques intercalaires, servent également de jonctions d'ancrage cellule-cellule et constituent la zone de liaison entre l'extrémité des filaments d'actine des derniers sarcomères des cellules myocardiques contigües.

Les jonctions communicantes, situées dans la portion longitudinale des disques intercalaires, forment des voies de faible résistance permettant la transmission intercellulaire directe des signaux contractiles. Chaque cardiomyocyte présente une dizaine environ de disques intercalaires avec ses voisins et de l'ordre d'un millier de jonctions communicantes au total, chaque jonction communicante regroupant de nombreux canaux intercellulaires (VOIR FIGURE 9).

Régulation du développement cardiaque par les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs trans-membranaires hétérodimériques, associés non covalamment, ils sont composés de sous-unités α et β , les sous unités α allant de 120 à 180 kDa et les β de 90 à 110 kDa (Hynes 1987; Giancotti and Ruoslahti 1999). Ils se lient à la matrice extracellulaire (**MEC**) et au cytosquelette pour assurer la structure et la fonction du tissu, elles représentent des mécanorécepteurs qui transmettent les forces mécaniques et les changements de la structure de la MEC au cytosquelette et vice versa. Ainsi, en connectant le cytosquelette à la MEC et en contrôlant les interactions cellule-matrice, les intégrines donnent à la cellule la capacité de

percevoir l'environnement, de répondre aux changements de ce dernier et réciproquement de le modifier. Chaque stimulus au niveau de ces récepteurs membranaires et au niveau du groupe restreint de protéines associées, va activer en aval les voies de signalisation qui impliquent une cascade de molécules responsable de l'exécution du programme génique précis tel que l'hypertrophie des cardiomyocytes. Elles agissent comme récepteurs de protéines de la MEC, ainsi que des transducteurs de l'information mécanique à partir de l'environnement cellulaire vers l'intérieur de la cellule et vice versa (Inside-out) (Schwartz 2010) (Figure 8)

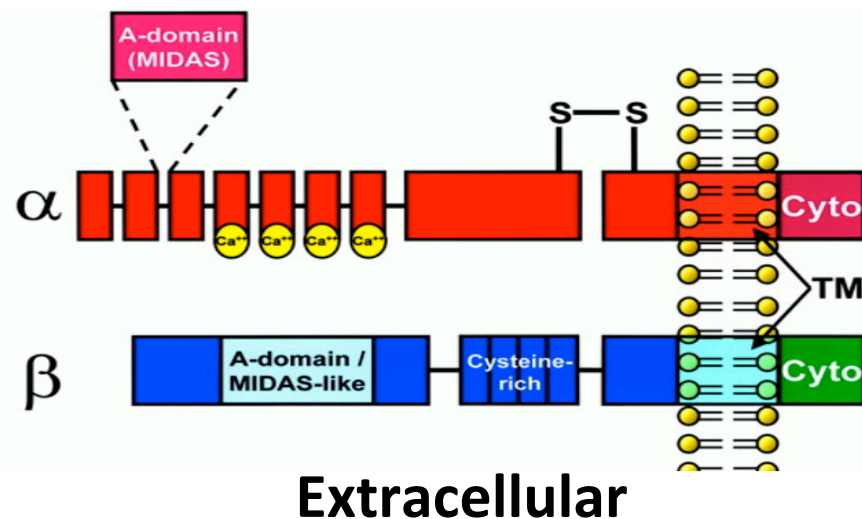


Figure 8: Structure hétérodimérique de l'intégrine

Les sous-unités α et β sont des protéines transmembranaires avec une partie cytoplasmique généralement courte. Le côté N-terminal de la sous unité α est composé de 7 répétitions (3 ou 4 sites de liaison aux cations divalents). Les sous unités α sont divisées en deux groupes. Un groupe possède 200 a.a contenant un site d'adhésion dépendant d'ions métal (MIDAS) et le deuxième groupe contenant un site de clivage post-traductionnel, qui une fois reconnu et clivé, peut convertir ces sous-unités en des dimères chaîne légère/chaîne lourde, liées ensemble par un pont disulfide. Les sous-unités β contiennent également un domaine MIDAS. Le côté C-terminal de la sous unité β du domaine extracellulaire contient 4 domaines riches en cystéine, qui sont liés entre eux par des pont disulfide. De nombreux autres sites dans les sous-unités ont été identifiés par une combinaison de mutagenèse, de formation de chimères, des études de liaison d'anticorps. Ceux là incluent des régions critiques pour la dimérisation des sous unités, l'interaction intégrine-ligand et l'activation des intégrines. TM : transmembranaire ; Cyto : cytoplasmique (Ross and Borg 2001).

La transduction commence avec la liaison d'un ligand à la MEC et l'initiation ultérieure de l'accumulation de plusieurs protéines sur la région cytoplasmique des dimères d'intégrines pour former des complexes d'adhésions focales (AF). Ces protéines incluent les protéines adaptatrices qui lient structurellement les intégrines au cytosquelette en liant l'actine-F (filamenteuse), la charnière

des protéines qui se lient à des protéines des AF, et les molécules de signalisation qui propagent des cascades de signalisation intracellulaires (Israeli-Rosenberg et al. 2014).

Les intégrines et leur adhésion à la MEC sont vitales pour la formation de l'organisme et sa fonction, et ils coordonnent plusieurs événements au cours du développement, comme la prolifération, la différenciation et la migration. Chez les mammifères, plus de 18 sous unités α et 8 sous unités β ont été identifiées, sachant que le myocarde en exprime une petite fraction ; cependant, les patterns d'expression des intégrines sont dynamiques et possèdent des activités diverses, et leur renouvellement peut être déclenché par des forces mécaniques (Meighan and Schwarzbauer 2008; Israeli-Rosenberg et al. 2014). Différents modèles d'inactivation des intégrines, illustrent l'importance de ces protéines dans la cardiomyogenèse, particulièrement les sous-unités $\alpha4$, $\alpha5$ et $\beta1$. Les souris n'exprimant pas l'intégrité $\alpha4$, meurent à E15.5 et présentent des malformations cardiaques dont une absence d'épicaarde et des vaisseaux coronaires, une hémorragie cardiaque (Yang et al. 1995).

Le «knock out» homozygote de l'expression de l' $\alpha5$ est létal au stade embryonnaire E11, et il interfère avec le motif de l'axe mésodermique, conduisant au développement de morphologies cardiaques anormales (Mittal et al. 2013). Dans le cœur, la sous-unité $\beta1$ est la sous unité principale qui dimérise avec toutes les sous unités α présentes. L'inactivation totale de l'intégrine $\beta1$ est létale au stade embryonnaire E5.5. Alors que l'inactivation spécifique dans le cœur, aboutit à divers défauts cardiaques, ces souris invalidées pour l'intégrine $\beta1$ dans le cœur développent une fibrose cardiaque à l'état basal. Elles sont intolérantes à la surcharge hémodynamique par la constriction aortique transverse (TAC) (53% de survie versus 88% chez les contrôles). Au bout de 6 mois, elles développent une cardiomyopathie dilatée, une diminution du métabolisme glycolytique et une perturbation de l'intégrité membranaire (Stephens et al. 1995; Shai et al. 2002). De plus, les cellules souches embryonnaires n'exprimant pas l'intégrine $\beta1$, présentent une expression retardée des marqueurs cardiaques, MHC, MLC-2V et ANF après la mise en place de la différenciation cardiaque, une architecture sarcomérique aberrante et une spécification anormale des cellules atriales, ventriculaires et sinusoidales (Fassler et al. 1996).

De nombreuses études montrent que la signalisation médiée par les intégrines assure la spécification et la différenciation cardiaque. Des études sur des modèles cellulaires de cardiomyogenèse montrent que la composition de la MEC et l'activation des intégrines, jouent un rôle majeur dans ce processus. Par exemple, les cellules souches embryonnaires cultivées en construction de MEC en 3D basée sur la laminine, se différencient plus efficacement en

cardiomyocytes que les cardiomyocytes cultivés sur des substrats de la MEC en 2D (Heydarkhan-Hagvall et al. 2012).

Dans les cultures 3D, il existe plus de points d'ancrage entre les cellules et la MEC, plus d'AF et possiblement plus de signalisation intégrine, soutenant le rôle important que joue les intégrines dans le développement. De plus, même en absence d'addition de facteurs de croissance utilisés pour conduire la cardiomyogenèse, la MEC native est apte à induire la différenciation cardiaque, indiquant que les voies de signalisation cellulaires initiées par l'activation des intégrines via la liaison à la MEC sont des indices de différenciation plus forts que les signaux solubles (Duan et al. 2011).

Dans les CSE déficientes en intégrine $\beta 1$ la différenciation précoce de cardiomyocyte est retardée, mais procède ultérieurement, aboutissant à des cardiomyocytes battants avec des propriétés fonctionnelles affaiblies (Rohwedel et al. 1998; Zeng et al. 2013).

L'ILK (Intégrins line kinase), une molécule de signalisation intracellulaire se liant aux sous unités β de l'intégrité, est directement activée par les intégrités et initie des réponses qui régulent la survie cellulaire, la prolifération et la différenciation (Legate and Fassler 2009).

Les cellules fœtales myocardiques qui sur-expriment ILK, produisent plus d'agrégats de cardiomyoblaste que les cellules contrôles, et l'inhibition de l'expression de ILK réduit la génération de cardiomyoblaste, montrant l'importance de la signalisation intégrine dans la cardiomyogenèse (Traister et al. 2012). En plus des intégrités β , de multiples sous unités α sont exprimées dans les cardiomyocytes dérivés de CSE, par exemple, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 11$ et αv en fonction de la matrice sur laquelle elles sont cultivées, avec des niveaux d'expression de quelques sous unités comme la $\alpha 6$ qui corrèle avec l'expression de marqueurs cardiaques, indiquant le rôle dans la différenciation cardiaque (Thorsteinsdottir et al. 1999; van Laake et al. 2010).

La mécano transduction induite par les intégrines au cours du développement cardiaque

Au cours du développement du myocarde, plusieurs forces mécaniques, actives et passives sont générées. La MEC sécrétée et assemblée par les cellules progénitrices donne aux tissus en développement une intégrité structurelle et résulte en des changements dans la rigidité du tissu.

Comme le tissu cardiaque commence à se plier au cours de la morphogenèse et avec la mise en place du pompage de la chambre, des progéniteurs cardiaques, et les cardiomyocytes ultérieurs sont soumis aux forces d'étirement. Les forces actives et passives sont médiées par les adhésions cellulaires basées sur les intégrines. Les intégrines agissent comme mécano-transducteurs pour passer ces signaux vers l'intérieur de la cellule et altérer la fonction cellulaire.

En plus des voies de signalisation solubles initiées par les intégrines et l'assemblage du complexe d'AF, des liens mécaniques directs existent entre la MEC et le noyau et qui pourraient altérer l'expression de gènes en propageant des ondes mécaniques à la membrane nucléaire pour remodeler directement la chromatine ou ouvrir des pores nucléaires et modifier le transport nucléaire (Wang et al. 2009). De même, les voies de signalisation solubles peuvent être activées elles-mêmes par la force appliquée via les complexes intégrines-AF.

Plusieurs protéines adaptatrices mécano sensibles existent qui contiennent des sites de liaison cryptiques aux kinases qui sont exposés en présence de force pour permettre la phosphorylation et la signalisation en aval (Schwartz 2010). De cette façon, l'étirement active de multiples voies dans les cardiomyocytes et sert de médiateur de plusieurs processus comme la survie, la communication cellule-cellule, la réorganisation structurale et le fonctionnement électro-physiologique (Samarel 2005).

Les cardiomyocytes embryonnaires cultivées sur des substrats de MEC mimant les propriétés mécaniques de tissu cardiaque mature développent des sarcomères plus organisés et présentent un comportement fonctionnel plus organisé que les cellules sur des matrices plus souples ou rigides (Engler et al. 2008; Jacot et al. 2008).

Par contre, d'autres études faites sur les cellules souches embryonnaires humaines indiquent que les cellules sont sensibles aux signaux mécaniques passifs seulement au cours la spécification cardiaque précoce avec une raideur de substrat affectant l'induction du mésoderme, et non pas la différenciation subséquente du cardiomyocyte (Hazeltine et al. 2012).

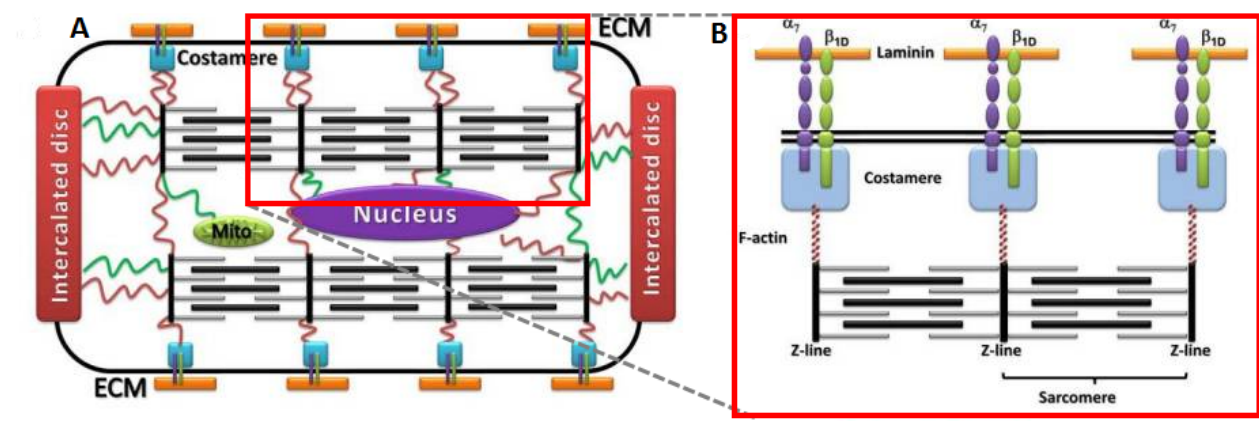


Figure 9: Intégrines et MEC

A. Les intégrines sont en contact avec la MEC, traversent la membrane sarcolemmale au costamère où ils peuvent atteindre le sarcomère en se connectant aux disques Z. Ainsi, ils relient l'ECM au sarcomère à travers la membrane des myocytes et peuvent même transmettre des informations au noyau. Les intégrines sont également localisés dans les disques intercalaires du CM. **B.** Portion

agrandie de A montrant que l'hétérodimère intégrine $\alpha 7\beta 1D$, le récepteur prédominant de laminine dans le CM mature, peut se lier à la MEC à travers le costamère là où l'intégrine forme un complexe de protéines de structure et de signalisation (Israeli-Rosenberg et al. 2014).

Intégrines et signalisation via les kinases cellulaires

Les intégrines n'ont pas d'activité enzymatique, mais elles agissent en activant des molécules en aval (Clark and Brugge 1995). Il y a une activation de tyrosines kinases comme la FAK (focal adhesion kinase) ou bien des GTPase comme la Rho ou Rac et une régulation des composants du cytosquelette comme la taline ou la paxilline. La partie cytoplasmique des intégrines est essentielle dans ce processus et lie plusieurs molécules comme la calreticuline (Coppolino et al. 1997) et la FAK (Schaller et al. 1995), ainsi que la mélusine (Itgb1bp2) et la MIBP (muscle integrin binding protein ou Itgb1bp3) (Li et al. 1999) qui sont toutes les deux exprimées de façon préférentielle dans les muscles striés. En outre, la partie cytoplasmique de l'intégrine se lie directement aux composants du cytosquelette comme la taline et l' α -actinine. Finalement la signalisation à partir des intégrines peut influencer des voies par lesquelles d'autres effecteurs cellulaires peuvent également signaler y compris les kinases AKT, PI3-k (Phosphoinositide 3-kinase) ou MAPK (mitogen activated protein kinase)/ERK (extracellular signal-regulated kinase) toutes importantes dans les processus d'hypertrophie cardiaque.

La régulation de la phosphorylation de protéines est un composant central de toutes les voies de transduction de signal dans les cellules du système cardiovasculaire, ce qui rend ces molécules des cibles intéressantes dans l'intervention pharmacologique. Une des caractéristiques importantes de la phosphorylation protéique est son contrôle réversible; les substrats protéiques sont phosphorylés par des kinases et déphosphorylés par des phosphatases. Le changement dans l'activité des kinases ou des phosphatases ou bien des deux à la fois, régule le degré de phosphorylation d'un substrat.

Les MAPKs des mammifères sont divisées en 5 familles : ERK1/2 (extracellular regulated kinases), P38, les c-jun N-terminal kinases (JNKs), ERK3/4 et ERK5.

Une fonction majeure des cardiomyocytes qui dépend de l'activation de ERK1/2 est la croissance hypertrophique. L'hypertrophie cardiaque est un processus adaptatif qui a lieu en réponse aux stimuli physiologiques et pathologiques incluant l'angiotensine II, l'endothéline 1 et les catécholamines circulantes. Tous ces médiateurs, de même que le stress mécanique, stimulent l'activation de ERK1/2 dans les myocytes cardiaques et utilisent cette voie pour déclencher les événements cytoplasmiques et nucléaires qui facilitent la synthèse protéique et la croissance cellulaire hypertrophique. Une autre molécule de signalisation importante pour la croissance

hypertrophique est la phosphatase calcineurine. La calcineurine est une phosphatase activée par le calcium qui catalyse la déphosphorylation de facteurs de transcriptions cytoplasmiques connus sous le nom de NFATs (nuclear factors of activated T cells). Dans les CM, cette déphosphorylation permet le déplacement des NFATs dans le noyau où ils coopèrent avec d'autres facteurs de transcriptions pour conduire la transcription altérée de gènes hypertrophiques.

Dans l'ischémie/réperfusion, P38 α est activée mais la P38 β est inhibée. De plus, l'activation de P38 α provoque l'apoptose des CM alors que P38 β induit l'hypertrophie des CM. Les JNKs sont aussi impliquées dans l'hypertrophie cardiaque et l'insuffisance cardiaque (Kumhune et al. 2012).

Le taux de phosphorylation des protéines cardiaques peut être modulée par l'O-GlucNAcylation, une autre forme de modification post-traductionnelle qui a lieu au niveau des résidus sérine et thréonine. Elle constitue un mécanisme important dans la régulation de différents processus cellulaires en interférant ou modulant l'action des kinases et phosphatases sur les protéines cellulaires. Elle est favorisée lors de l'hypertrophie cardiaque pathologique et son action est mutiforme et variable selon le type d'hypertrophie. Les protéines O-GlucNAcylées sont impliquées dans la régulation de la contraction des myofilaments (α -actin, MHC, TnT), le traitement du calcium (PLN), le métabolisme (IR,IRS), la mitochondrie (VDAC, complexe I et IV) et l'expression de gènes vis des facteurs de transcriptions (NFAT, ER α/β) (Mailleux et al. 2016).

Intégrines et Matrice extracellulaire

Dans le cœur adulte, les interactions cellule-MEC produisent un substrat structural, chimique et mécanique essentiel pour une homéostasie normale et pour les adaptations aux signaux pathophysiologiques. Sachant que les intégrines constituent les récepteurs principaux de la MEC, leur expression et leur fonction sont importantes pour une fonction cardiovasculaire normale chez l'adulte.

Dans des modèles d'hypertrophie cardiaque, de cardiomyopathie dilatée et d'infarctus du myocarde, des changements spectaculaires se produisent dans l'organisation des composants de la matrice, par exemple une altération dans l'expression de collagène, fibronectine, ostéopontine, ténacine et d'autres composants de la MEC.

De multiples facteurs sont responsables de la réponse hypertrophique et les intégrines constituent une part importante du processus. La surexpression de l'intégrine β 1 a été liée à la réponse hypertrophique des cardiomyocytes de nouveau-nés induite par les agents α ₁ adrénergiques (>350%) alors que l'inhibition de la fonction de signalisation de l'intégrine β 1 réduit cette réponse hypertrophique (Pham et al. 2000).

Des études mécanistiques ont impliqué les contacts d'adhésion cellulaire comme médiateurs de transduction de force. Plusieurs voies de signalisation associées aux intégrines comme la phosphoinositide 3-kinase/protéine kinase B et les voies p38 se sont avérées être activées en réponse à un stress mécanique, suggérant que les intégrines pourraient jouer le rôle de médiateurs des signaux mécaniques externes et aboutir à une amélioration de la différenciation et de la maturation des cardiomyocytes (Young et al. 2014).

La liaison des intégrines aux protéines de la matrice extracellulaire, génère des signaux intracellulaires. Cette signalisation est importante pour la croissance cellulaire, la migration et la survie. La FAK (Focal Adhesion Kinase) a été identifiée comme candidat primaire pour la signalisation médiée par l'intégrine dans la cellule (Hanks et al. 1992; Schaller et al. 1992; Miyamoto et al. 1995). L'adhésion à la MEC par l'intermédiaire des intégrines pourrait aussi affecter l'activation de MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) indépendamment de la FAK (Lin et al. 1997). La FAK est aussi connue pour son rôle d'association avec plusieurs molécules de signalisation en aval incluant la famille des kinases src, p130cas et la PI3K. Les intégrines se lient aux protéines du cytosquelette comme la taline et l' α -actinine (Schaller and Parsons 1994) (Figure 10).

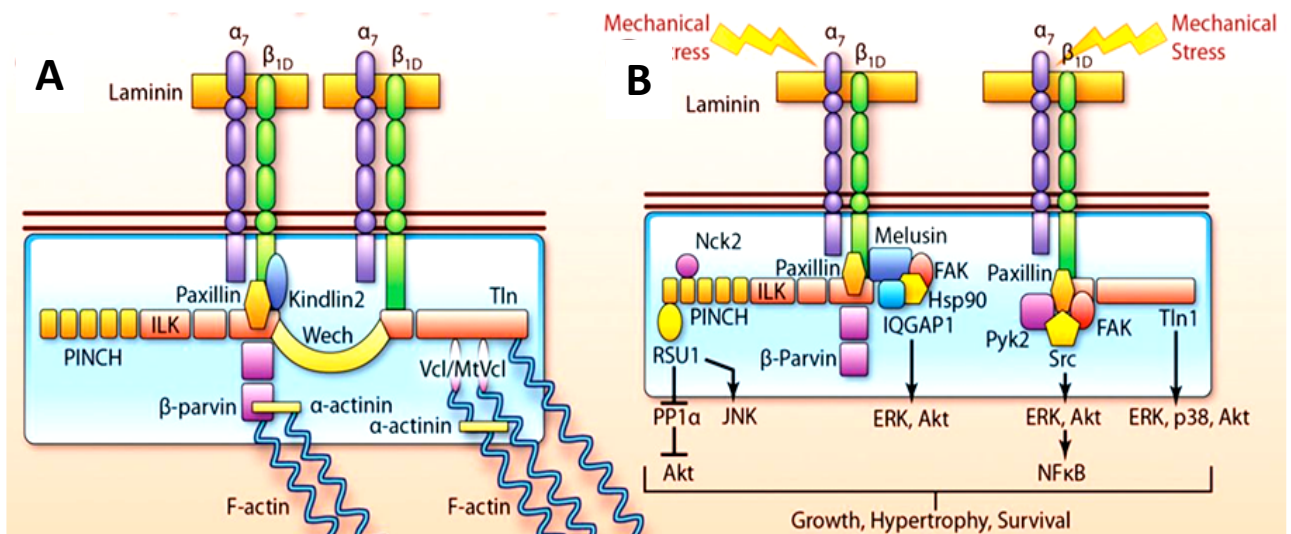


Figure 10: Positionnement des intégrines, formation de complexes, signalisation et méchanotransduction dans le CM.

A. Quelques connecteurs structuraux importants se lient aux queues de l'intégrine dans le CM. Les intégrines lient et agrègent des adaptateurs et des protéines de signalisation comme l'Intégrin Linked Kinase (ILK), la focal adhesion kinase (FAK), la vinculine (Vcl), la kindline, PINCH, la parvine, l'actinine et l'actine. Ces connecteurs permettent la liaison du cytosquelette subsarcolemal au sarcomère et permet également la propagation de signaux bidirectionnels à travers la membrane cellulaire. La formation de complexe entre les intégrines et la MEC permet la direction des signaux de la MEC vers la cellule, c'est la signalisation dite «outside-in». L'assemblage des protéines sur les queues cytoplasmiques des intégrines peut activer les intégrines, changer leur conformation, et permettre des interactions améliorées des intégrines avec les ligands de la MEC, ce processus est dit «inside-out». **B.** Illustration des voies de signalisation des intégrines dans les CM soumis à un stress

biomécanique. Lorsque les intégrines liées aux ligands de la MEC (ex : la laminine) sont stimulées mécaniquement, ils assemblent de nouvelles protéines sur leur domaine intracellulaire cytoplasmique et orchestrent en aval une variété de voies comme Akt, c-Jun, JNK, ERK, p38 ou nuclear factor κ -light chain enhancer of B cells (NF κ B). En retour, des événements cellulaires comme la croissance cellulaire, l'hypertrophie, la survie cellulaire ou la mort cellulaire ont lieu. MtVcl: metavinculin; PP1 α : protein phosphatase 1 α ; Pyk2: proline-rich tyrosine kinase-2; and RSU1: Ras-suppressor-1 (Israeli-Rosenberg et al. 2014).

Dans une étude faite sur un modèle murin de TAC (transverse aortic constriction) de dix minutes, créant une surcharge en pression sur le VG, les principaux effets de ce type de remodelage sur le ventricule gauche sont d'augmenter la phosphorylation de FAK et de ERK1/2 et si la TAC est maintenue plusieurs jours, on observe une surexpression des intégrines α 1, α 5 et β 1 et une augmentation de l'expression des sous unités intégrines α 7 et β 1D qui sont déjà des sous-unités exprimées de façon dominante dans le muscle strié (Babbitt et al. 2002).

De même, une autre équipe a démontré que la mélusine, une protéine d'interaction avec le domaine cytoplasmique de l'intégrine β 1, est cruciale dans la réponse hypertrophique à une surcharge hémodynamique (TAC). Les souris mutantes mélusine $-/-$, présentent une structure et fonction cardiaque normale à l'état basal, mais une fois soumises à la TAC, elles développent un remodelage cardiaque anormal se développant en CMD et une dysfonction cardiaque plus sévère que les contrôles. En revanche la réponse de ces mutants était identique à celle des contrôles suite à une administration chronique d'angiotensine II ou de phényléphrine à des doses qui n'augmentent pas la pression sanguine et cela en absence de stress cardiaque biomécanique. L'analyse des événements de signalisation intracellulaires induits par la surcharge de pression, a montré que la phosphorylation de la GSK-3 (glycogène synthèse kinase 3) a été inhibée chez les mutants mélusine. Ainsi, la mélusine est indispensable pour protéger le cœur de la dilatation au cours de la surcharge de pression chronique en détectant le stress mécanique. La mélusine s'est révélée être une protéine chaperonne. Les protéines chaperonnes sont capables de faciliter la formation de complexes supramoléculaires et les changements conformationnels associés à l'activation/désactivation de molécules de signalisation. En particulier, la mélusine active la signalisation AKT et ERK1/2, protège les CM de l'apoptose et induit une réponse hypertrophique compensatoire dans différentes conditions pathologiques (Sorge and Brancaccio 2016).

3. Matrice extracellulaire et fibrose

Le myocarde est un muscle strié. C'est un tissu hétérogène composé de différents types cellulaires: les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cardiomyocytes. Une fonction cardiaque normale nécessite une architecture solide, flexible et résistante aux contraintes mécaniques. La matrice extracellulaire (MEC) du myocarde soutient la cohésion du tissu, alors que le cytosquelette assure le

mouvement cellulaire et le maintien de l'organisation intracellulaire lors des cycles de contraction-relaxation. Les liens moléculaires qui existent entre la MEC et le cytosquelette via des complexes de protéines transmembranaire (intégrines, complexe sarcodystroglycane) constituent un lien physique entre les cellules et la MEC. La dynamique des interactions entre la MEC et le cytosquelette joue un rôle important dans l'activation de multiples voies de signalisation.

La MEC est un réseau protéique macromoléculaire favorisant l'intégrité du myocarde et assurant la transmission des forces électriques et mécaniques entre les cardiomyocytes pendant la systole et la diastole; les myocytes et les fibroblastes sont maintenus par la MEC. Cette dernière est principalement constituée de: protéines structurelles, comme le collagène et l'élastine, des protéines adhésives comme la laminine, la fibronectine, collagènes de types IV et VI, des protéines antiadhésives, comme la ténascine, la thrombospondine et l'ospéontine, des protéoglycans, des enzymes telles les métalloprotéinases qui contrôlent l'organisation et la composition de la MEC. Les protéines de structures de la MEC interagissent au niveau cellulaire avec les intégrines, véritables récepteurs transmembranaire de la MEC. Les protéoglycans contribuent à l'architecture du réseau de la MEC et lient des facteurs de croissance participant aux échanges intercellulaires et favorisant le remodelage. Les cardiomyocytes sécrètent les collagènes de types IV et VI, la laminine et les protéoglycans. Les collagènes de types I et III, la fibronectine ainsi que les métalloprotéinases sont synthétisés principalement par les fibroblastes. La MEC exerce différents effets sur le phénotype des cellules du système cardiovasculaire via la modulation de la synthèse et dégradation de ses composants.

Les collagènes

Cinq types de collagène (I, III, IV, V et VI) ont été identifiés dans le cœur adulte. Dans un cœur adulte sain, le collagène représente 2 à 4 % du myocarde (Segura et al. 2014). Il existe un équilibre entre la production et la dégradation de ces fibres en réponse à l'ischémie, la tension pariétale et l'inflammation. Les collagènes de types I et III sont les plus abondants dans le cœur (Zannad and Pitt 2009), ils transmettent les forces au travers le myocarde et non seulement maintiennent l'organisation tridimensionnelle du tissu pendant le cycle contraction-relaxation mais contribuent aux propriétés viscoélastiques du myocarde (Bishop 1998). Les fibres de type I sont majoritaires (85%) mais moins spécifiques du cœur ; elles confèrent la force élastique, la résistance à l'étirement et la déformation. Alors que les fibres de type III sont moins abondantes mais plus spécifiques du myocarde, leur propriété principale étant l'élasticité.

Ce réseau collagénique est actif métaboliquement ; la durée de son turnover est évaluée entre 80 et 120 jours (Laurent 1987).

Les fibres de collagènes dans le myocarde, sont des substrats des MMPs (métalloprotéinases) de la matrice. La famille des MMP-1 possède le plus d'affinité au collagène et dégrade préférentiellement les fibres de types I et III (D'Armiento 2002). MMP-1 participe à la dégradation de 40% du collagène nouvellement synthétisé dans différents tissus. La dégradation par les MMPs donne des pro-peptides C-terminaux (PICP, PIIICP) et pro-peptides Nterminaux (**PINP** : aminoterminal propeptide of type I procollagen, **PIIINP** : aminoterminal propeptide of type III procollagen) en proportions équivalentes. L'activité des MMPs est inhibée par les « tissue inhibitors of metalloproteinases » (TIMPs). Il existe donc un équilibre entre les MMPs et les TIMPs permettant ainsi de conserver l'architecture de la MEC. L'affaiblissement du réseau fibreux, consécutif à l'activation des protéases de la MEC, permet un glissement des myocytes les uns par rapport aux autres, favorisant ainsi la dilatation du ventricule (Deschamps and Spinale 2005).

Les collagènes de types IV et VI, composants de la lame basale, possèdent une séquence RGD (arginine, glycine, acide aspartique) qui permet l'interaction des molécules avec les intégrines et qui favorise l'adhérence cellulaire. Leur expression augmente dans le cœur de rat avec surcharge de pression et lors de l'IC. Ces isoformes de collagène non fibrillaires pourraient être impliquées dans les changements d'interactions entre MEC et cellules.

La laminine

Les laminines sont des glycoprotéines majeures des lames basales ; elles sont présentes au niveau des cardiomyocytes. La molécule de laminine est formée par l'association de trois chaînes (α , β et γ de masse moléculaire 400, 210 et 200 KDa), semblables mais non identiques et codées par des gènes différents. La laminine contrôle les processus cellulaires de migration, de multiplication et de différenciation de façon contraire à ceux induits par la FN. La liaison de la laminine aux intégrines $\beta 1$ en particulier à l'intégrines $\beta 1 D$ constitue un élément clé de la transmission des signaux mécaniques (Brancaccio et al. 2006).

Dans le muscle strié, la laminine 211, dite laminine $\alpha 2$, $\beta 1$, $\gamma 1$, aussi appelée mérosine, prédomine. Le niveau de laminine $\alpha 2$ semble être principalement contrôlé lors du développement, car la transcription de la chaîne $\alpha 2$ est stable lors de l'hypertrophie cardiaque expérimentale ou dans le cœur humain défaillant (Oliviero et al. 2000).

Dans le muscle cardiaque, l'alpha dystroglycan via son interaction avec la chaîne $\alpha 2$ de la laminine 211, crée une connexion importante à la MEC, formant un lien entre le sarcolemme et la MEC (Lapidos et al. 2004). Une dysfonction ventriculaire est observée chez les enfants atteints de

dystrophie musculaire liée à la déficience en mérosine (laminin $\alpha 2$) avec une fraction d'éjection réduite (43%) (Jones et al. 2001).

La fibrose cardiaque

La fibrose cardiaque ou dépôt de collagène, est caractéristique de remodelage pathologique, c'est le résultat de modifications dans l'équilibre de la MEC ; elle est l'un des éléments majeurs du remodelage ventriculaire gauche dans différentes cardiopathies (CMD, CMH, cardiopathies ischémiques).

Bien que la fibrose contribue à la rigidité, c'est la qualité de la MEC et non pas la quantité qui est la plus importante. La fibrose perturbe la coordination du couplage myocardique excitation-contraction dans la systole et la diastole. Dans un cœur sain, les cardiomyocytes sont connectés ensemble par un syncytium électrique qui permet une contraction temporellement couplée. La transmission de la contraction systolique est facilitée par un réseau de fibres de collagènes de types I et III qui constituent les composants majoritaires de la MEC cardiaque. Suite à la contraction, il y a un processus de relaxation active au cours de la diastole. Weber et Shirwany ont montré que la résistance à la traction du collagène de type I est similaire à celui de l'acier ce qui le rend évident que la MEC soit le déterminant majeur de la rigidité cardiaque au cours de la diastole (Shirwany and Weber 2006).

Les myofibroblastes produisent une différente MEC que les fibroblastes et modifient l'équilibre des MMPs et leurs inhibiteurs (TIMPs) pour induire la fibrose. Le changement dans la MEC modifie les signaux que les cardiomyocytes reçoivent de leur environnement, aboutissant à des changements de niveaux d'expression de gènes associés avec l'hypertrophie et la dysfonction contractile. Finalement, la voie TGF- β favorise le dépôt de cette fibrose, sachant qu'elle permet le dépôt de la MEC en augmentant la synthèse du collagène et de la fibronectine et en diminuant la dégradation de la MEC par induction d'inhibiteurs de protéase. Les cytokines inflammatoires et le système rénine-angiotensine le favorisent également.

On distingue deux types de fibroses myocardiques : le type réactif et le type réparateur.

-Le type réactif fait suite à une réaction initiale fibrotique péri-vasculaire avec extension interstitielle après une atteinte vasculaire coronaire

-Le type réparateur permet la constitution d'un tissu cicatriciel, suite à une perte de substance en cardiomyocytes après nécrose, par accumulation de collagène (Weber and Brilla 1991; Spinale 2007).

La fibrose est un des éléments clé du pronostic des patients insuffisants cardiaques en favorisant la rigidité ventriculaire et l'hétérogénéité myocardique conduisant au risque de mort subite et d'insuffisance cardiaque terminale.

La fibrose est une caractéristique pathologique commune à de nombreuses formes de maladies cardiaques, qui incluent l'infarctus du myocarde (IM), les cardiomyopathies ischémiques, dilatées et hypertrophiques et l'IC. La base cellulaire de la fibrose est l'accumulation adverse de collagène et d'autres protéines de la MEC, ce qui perturbe la fonction ventriculaire et prédispose le cœur à des arythmies.

TGF- β (Transforming Growth factor β), un stimulateur puissant de la production du collagène par les fibroblastes cardiaques, est induit en réponse à une lésion cardiaque. La liaison de TGF- β à ses récepteurs de surface cellulaire, active la voie en aval SMAD, qui régule la transcription de plusieurs gènes clés de fibrose, qui incluent ceux qui codent pour la CTGF (Connective Tissue Growth Factor), la fibronectine et le PAI (Plasminogen Activator Inhibiter). Le TGF- β réduit la production de collagénase et stimule l'expression des inhibiteurs des métalloprotéases (TIMP), résultant en une inhibition de la dégradation de la MEC et aboutissant à une accumulation excessive de matrice. Bien que, le ciblage de la voie TGF- β paraît prometteur dans la thérapeutique anti-fibrotique, l'effet sur le système cardiovasculaire est ambigu. En plus de ses fonctions pro-fibrotiques, TGF- β joue un rôle important dans la re-sténose post-angioplastie, le remodelage post-IM (résultant en une IC) et de nombreuses autres pathologies fibrotiques (Ouzounian et al. 2008). Contrairement aux effets pléiotropes de TGF- β , CTGF régule la voie de fibrose, plus spécifiquement en induisant la prolifération de fibroblastes et la production de MEC dans les désordres fibrotiques (Daniels et al. 2009). Cependant la fibrose cardiaque est multifactorielle et plusieurs aspects de ce trouble restent à élucider et des niveaux supplémentaires de régulation doivent être considérés. Par exemple notre équipe a montré que les niveaux de CTGF sont sous le contrôle de mécanismes activateurs, comme le facteur de transcription SRF, et répresseurs comme le microARN miR-133 (Angelini et al. 2015).

B. Remodelage métabolique

1. Métabolisme énergétique du cœur

a) Métabolisme énergétique et phosphorylation oxydative

Le cœur est souvent présenté comme un «omnivore» métabolique. Il est capable d'utiliser tous les substrats endogènes (glycogène, corps cétoniques, acides aminés) ou exogènes (lipides,

glucose, lactate). Dans le cas normal, les principales sources sont issues de la β -oxydation des acides gras, du glucose et du lactate. Dans le cas pathologique, un remodelage métabolique a lieu.

Le cœur constitue le tissu le plus oxydatif de l'organisme, sa production d'énergie dépend jusqu'à 90% du métabolisme oxydatif (Ventura-Clapier et al. 2011), c'est-à-dire que cette production est couplée à la consommation d'oxygène, ce qui rend l'activité cardiaque très dépendante de l'apport en oxygène. Le cœur est responsable de 11% de la consommation totale d'oxygène de l'organisme sachant qu'il ne représente que 0.4% de la masse corporelle (Wilding et al. 2006). Pour pouvoir répondre aux besoins de l'organisme, il doit ajuster ses systèmes énergétiques en permanence. Des altérations du métabolisme énergétique du myocarde sont associées à des pathologies cardiaques.

L'ATP est le donneur d'énergie ubiquitaire de la cellule. Il contrôle les mécanismes cellulaires vitaux comme la synthèse protéique, le flux ionique, les cascades de signalisation, la croissance et la prolifération cellulaire, il régule également la contraction des CM. L'activité de pompe cardiaque provient de la contraction cyclique des CM qui est assurée par l'interaction entre les myofilaments d'actines et de myosine. La relaxation du CM requiert une baisse de la concentration cytosolique en Ca^{2+} assurée par la SERCA2a, la pompe à Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique qui a une forte activité ATPase requise pour contrer le gradient de concentration de l'ion, et par l'intense activité ATPase de la tête de la myosine qui permet la dissociation du complexe acto-myosine.

Par ailleurs, le CM étant une cellule excitable, il dispose d'un nombre important de pompes et d'échangeurs ioniques au niveau du sarcolemme qui contribuent également à la consommation d'énergie. La pompe électrogénique Na^+/K^+ ATPase joue notamment un rôle important, étant un récepteur pour les glycosides cardiaques, effectuant un effet inotropique positif en inhibant l'activité enzymatique, diminuant ainsi la force de conduction pour l'échange Na/Ca au cours de la dépolarisation. Son rôle principal est de transporter le Na (sodium) à l'extérieur et le K (potassium) vers l'intérieur du CM. Il existe une corrélation entre l'altération de la fonction cardiaque et la concentration de l'ATPase Na^+/K^+ (Schwinger et al. 2003).

Dans les conditions normales de contraction, l'activité de ces ATPases fait utiliser le cœur environ 1mM d'ATP/s. Ainsi ses faibles réserves en énergie (~8mM d'ATP et 15 mM de phosphocréatine) ne permettent que quelques secondes d'autonomie. Par exemple, le cœur humain effectue 95000 battements par jour en consommant plus de 30 kg d'ATP avec une réserve en ATP inférieure au gramme. Son stock ne lui permet que 3 battements. Il consomme plus d'énergie par gramme que tout autre organe. Le métabolisme cardiaque se doit donc se fonctionner en «flux tendu». L'ATP fournit l'énergie chimique qui alimente la fonction contractile du myocarde.

Relativement de grandes vitesses de synthèse d'ATP sont nécessaires pour maintenir les fonctions systoliques et diastoliques normales. L'essentiel de cet ATP provient du métabolisme oxydatif, la réaction de la créatine kinase (CK) sert de réserve d'énergie principale.

Lors d'un effort, le cœur utilise jusqu'à 95% de sa capacité oxydative, ce qui correspond à 20 μ moles d'O₂ par gramme de cœur et par minute (Mootha et al. 1997). La consommation d'O₂ par rapport à la production d'ATP peut varier selon le type de substrat utilisé. En effet pour une molécule d'ATP, les acides gras sont plus consommateurs d'O₂ que le glucose. La consommation d'oxygène peut être multipliée par 5 selon les substrats utilisés et l'état de l'activité du cœur.

Phosphorylation oxydative

Le métabolisme oxydatif a lieu au sein des mitochondries qui sont des structures spécialisées très dynamiques, sphériques ou bien en forme de bâtonnets ou même en réseau, animées de mouvements de fusion ou de fission rapides. La mitochondrie est constituée d'une membrane externe juxtaposée à une membrane interne formant dans l'espace matriciel des invaginations tubulaires ou lamellaires parfois connectées par des structures tubulaires. Les mitochondries font partie de l'architecture cellulaire, elles interagissent avec le cytosquelette et des moteurs moléculaires comme les dynéines.

La mitochondrie constitue le lieu de convergence des voies métaboliques de la dégradation des glucides et des lipides. La glycolyse cytosolique aboutit au pyruvate; celui-ci est importé dans la mitochondrie, décarboxylé par le complexe de la pyruvate déshydrogénase (**PDH**) donnant de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) et des équivalents réduits (NADH et FADH₂). La vitesse d'entrée des acides gras dans la cellule dépend principalement de leur concentration plasmatique. Les acides gras sont activés dans le cytosol sous forme d'acyl-CoA. Ces acides gras à longue chaîne doivent donc être importés dans la mitochondrie par un système de transporteurs spécifiques comportant les deux isoformes de la carnitine palmitoyl transférase (CPT-1 et 2). Dans la mitochondrie, les acides gras sont dégradés par les enzymes responsables de la β -oxydation et donnent des molécules d'acétyl-CoA qui constituent des molécules communes à la dégradation des sucres et des graisses.

Le résultat énergétique de l'oxydation complète de 1 mole de palmitate est de 7 moles de FADH₂, de 7 moles de NADH et de 8 moles d'acétyl-CoA, ce qui se traduit finalement par environ 108 moles d'ATP après le cycle de Krebs et le métabolisme de la chaîne de transport des électrons (ETC).

Alors que pour le stockage et le métabolisme de carbohydrate, le glucose rentre dans les myocytes par les transporteurs de glucose, GLUT1 et GLUT4, localisés dans la membrane sarcolemmale et les vésicules microsomaies intracellulaires (Katz et al. 1995).

Le transport de glucose cardiaque dépend de la concentration du glucose dans le sang et de l'activité de GLUT1 et GLUT4; ce dernier est principalement régulé par l'insuline. La première étape du métabolisme du glucose intracellulaire est la phosphorylation, après laquelle le glucose entre en glycolyse ou bien sera stocké sous forme de glycogène. L'ATP du myocarde qui provient directement de la glycolyse représente 4% de l'ATP total (Kobayashi and Neely 1979).

La glycolyse divise une seule molécule de glucose en 2 molécules de pyruvate et forme 2 molécules d'ATP et 2 molécules de NADH. Malgré la contribution relativement faible de l'ATP total au cours de conditions normales, la contribution glycolytique est relativement augmentée dans des conditions ischémiques ou anaérobiques. La glycolyse est la voie métabolique primaire pour le principal réservoir de carbone, le glycogène. L'ATP dérivé par la glycolyse, pourrait jouer un rôle supplémentaire dû à sa localisation proche des canaux ioniques, augmentant la relaxation diastolique par la recapture du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique et pour une fonction optimale de l'ATPase Na^+/K^+ pour maintenir un gradient électrochimique.

Dans le cœur normal, 60-90% de l'acétyl-CoA proviennent de la β -oxydation des acides gras et 10-40% de l'oxydation du pyruvate. Sa dégradation est effectuée dans la matrice mitochondriale par la suite des réactions constituant le cycle de KREBS qui produit des équivalents réduits (NADH et $FADH_2$) ainsi qu'une petite quantité d'ATP.

L'utilisation des acides gras et des hydrates de carbone est régulée. L'activité de CPT-1 est fortement inhibée par le malonyl-CoA produit par l'acétyl-CoA carboxylase à partir de l'acétyl-CoA cytosolique. Cette étape est essentielle pour le contrôle de l'utilisation de l'acide gras par la mitochondrie. L'oxydation du glucose est quant à elle contrôlée par la vitesse d'oxydation des acides gras, à travers la régulation de la PDH par les concentrations intra-mitochondriales d'acétyl-CoA et de NADH.

La production d'ATP mitochondriale est basée sur la théorie chimio-osmotique émise par Peter Mitchell en 1916. Les molécules de NADH produites par la β -oxydation et le cycle de KREBS sont oxydées par le complexe I de la chaîne respiratoire, donc transfèrent leurs électrons à cette chaîne. Le complexe II oxyde le $FADH_2$ produit par la β -oxydation et le cycle de KREBS. Ainsi les équivalents réduits issus de l'oxydation des substrats énergétiques cèdent leurs électrons à un système de transporteurs qui est la chaîne respiratoire située sur la membrane interne de la

mitochondrie qui, par une cascade de réactions d'oxydoréduction, amène ces électrons jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène moléculaire. L'énergie libérée au cours de ce passage d'électrons est utilisée pour l'exportation de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intra-membranaire. Les électrons se déplacent vers des composés aux potentiels d'oxydation plus positifs et la libération progressive de l'énergie pendant le transfert d'électrons est utilisée pour pomper les protons H⁺ dans l'espace intra-membranaire par les complexes I, III et IV. Ce gradient de protons génère une force motrice de rotation du domaine F₀ de l'ATP synthase (complexe V) qui permet de fournir l'énergie nécessaire à la fusion d'un ADP et d'un phosphate, une réaction fortement endergonique. L'ATP est ensuite transporté vers l'espace inter-membranaire par le translocateur des nucléotides adényliques (ANT), puis vers le cytosol via le «le canal d'anions dépendant de la tension» (Voltage Dépendant Anion channel (VDAC)). L'ATP peut également être immédiatement utilisé par la Créatine kinase mitochondriale (mtCK) qui est couplée à l'ANT et convertit réversiblement l'ATP et la créatine (Cr) en ADP, immédiatement réutilisable par l'ATP synthase et en créatine phosphate (PCR) (voire aussi paragraphe suivant)

Ces mécanismes permettent un contrôle strict des concentrations d'ADP et d'ATP dans le muscle cardiaque (Weiss et al. 2005) (Figure 11).

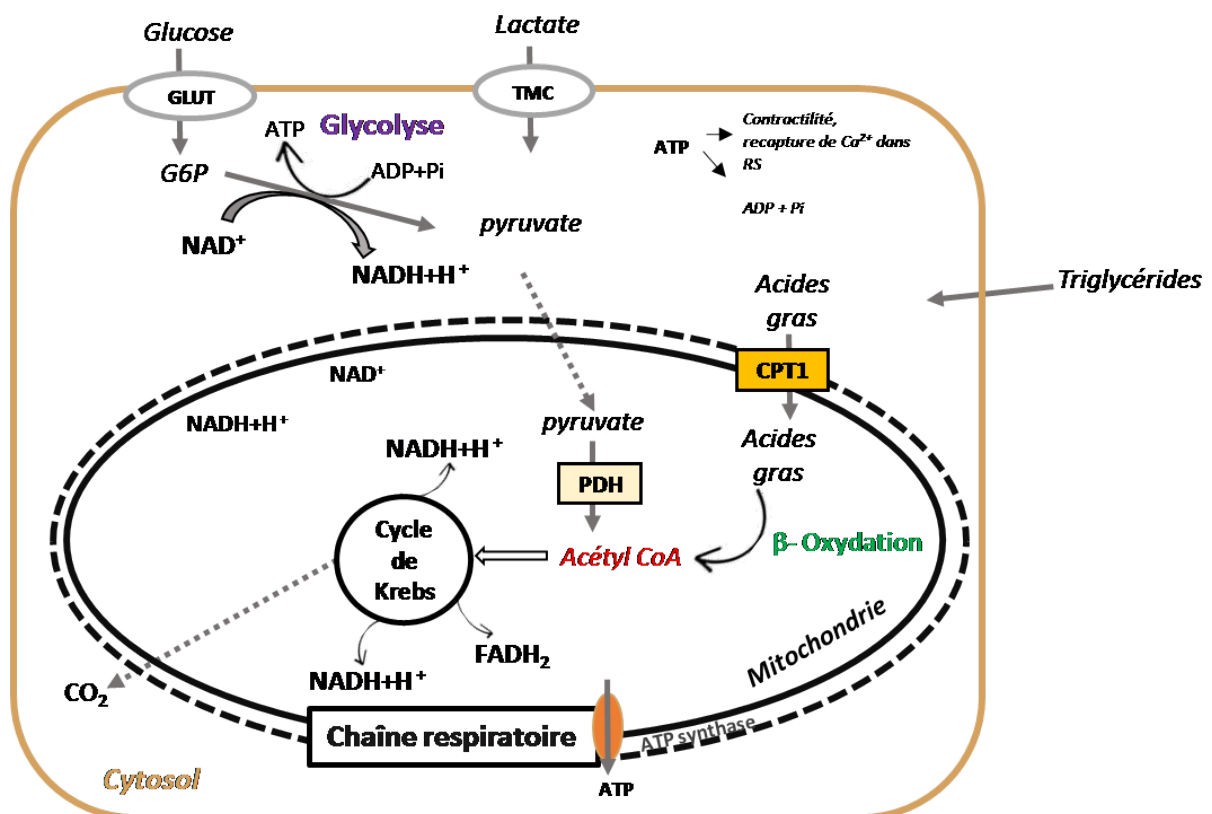


Figure 11: Les différentes sources d'énergie pour la cellule musculaire cardiaque

Bien que l'oxydation des acides gras et des glucides mitochondriaux constitue la source principale de production d'ATP dans le cœur, il devient de plus en plus évident que l'oxydation d'autres substrats énergétiques, tels que les cétones et les acides aminés à chaîne courte, peuvent également contribuer à la production d'énergie (Lopaschuk and Ussher 2016).

b) Le système Créatine kinase

Il nécessite des complexes enzymatiques à la création de microenvironnements au voisinage des sites consommateurs d'ATP, pour distribuer l'énergie dans le CM. Dans ce contexte, la créatine kinase (CK) assure le transfert d'une liaison riche en énergie entre l'ATP et la phosphocréatine (PCr). Il existe deux sous-unités de CK cytosolique, la B pour «brain» et la M pour «muscle type». Ces deux sous-unités sont capables de former trois isoenzymes dimériques MM, BB et MB. De plus, il existe deux sous-unités de la CK mitochondriale, une forme ubiquitaire et une forme sarcomérique. Elles peuvent exister sous formes dimérique ou octamérique (Wyss et al. 1992). Alors que la CK mitochondriale est directement impliquée dans la formation de la phosphocréatine, la CK cytosolique régénère de l'ATP à partir d'ADP et de PCr. Elle agit comme un régénérateur local d'ATP. Cette organisation est nécessaire pour les fonctions musculaires, l'ADP, inhibiteur des ATPases, doit être rapidement régénéré, ce qui permet de maintenir localement un ratio élevé ATP/ADP près des enzymes consommatrices aussi bien au niveau de la myofibrille qu'au niveau du réticulum sarcoplasmique. Le transfert et l'adressage de l'énergie aux complexes consommateurs sont assurés par ce système CK/PCr jouant un rôle à la fois dans la production d'énergie et dans la consommation.

2. Remodelage métabolique dans l'insuffisance cardiaque

a) Déficit énergétique dans le cœur insuffisant

Les mécanismes conduisant à l'insuffisance de la pompe cardiaque ont de multiples origines. Cela inclue la surcharge de pression, l'ischémie cardiaque (résultant de l'altération de la circulation artérielle coronaire ou l'infarctus), les cardiomyopathies et les défauts dans les gènes codant des protéines ayant des fonctions contractiles, impliquées dans l'organisation du cytosquelette, de la matrice extracellulaire et des protéines mitochondriales (Ventura-Clapier et al. 2004).

Ces défauts ont comme résultats : un déséquilibre entre la capacité du cœur à éjecter le sang et les besoins de l'organisme, un remodelage de la structure cardiaque initialement pour compenser la fonction altérée. Dans l'IC, la dépression de la force contractile n'est pas compensée par une

dépression concomitante de la consommation d'énergie ce qui conduit à un découplage mécanoénergétique (Schipke 1994; Saavedra et al. 2002).

Dans le cœur insuffisant, une des anomalies les plus importantes altérant la synthèse de phosphate à haute énergie, est une diminution de la réserve coronaire qui peut diminuer l'apport en nutriments et en oxygène aux cardiomyocytes au cours des charges de travail élevées.

Le cœur est un omnivore métabolique, capable de répondre à ces besoins en énergie par l'oxydation des acides gras, du glucose et du lactate et d'autres substrats oxydables. Malgré le rétrocontrôle par l'utilisation des acides gras et du glucose, le cœur fonctionne mieux lorsqu'il oxyde les deux substrats simultanément (Taegtmeyer 2000). Dans l'IC, il y a un «shift» vers l'utilisation du glucose comme substrat principal, c'est une inversion vers un substrat énergétique fœtal avec une diminution de l'expression des enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras (Sack et al. 1996; Razeghi et al. 2001). Un switch précoce des A.G aux carbohydrates dans l'hypertrophie résulte en une fonction cardiaque améliorée tant que le glucose s'oxyde (Taegtmeyer 2000). Une augmentation de la glycolyse et des enzymes glycolytiques est observée dans l'hypertrophie, mais les niveaux de l'oxydation du glucose sont diminués et plus le lactate s'accumule. Plus le processus de remodelage avance vers un stade non compensé, plus l'adaptation métabolique devient insuffisante avec une plus faible capacité d'oxydation du glucose, conduisant à une efficacité diminuée (Leong et al 2003).

Dans l'IC chez l'homme, les niveaux d'expression des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4 et la glycogène synthèse sont diminués (Razeghi et al. 2001; Razeghi et al. 2002). Par contre il y a une augmentation du niveau d'expression du transporteur de lactate MCT1 dans un modèle d'IC, ce qui peut favoriser le transport de lactate (Johannsson et al. 2001). L'IC n'est pas accompagnée d'une induction des voies glycolytiques et l'IC en fin de stade entraîne une diminution des enzymes glycolytiques (De Sousa et al. 1999; Dzeja et al. 1999). Ceci est vrai pour les cardiomyopathies dilatée et hypertrophique (Kalsi et al. 1999). L'inactivation de Gut4 induit une hypertrophie cardiaque (Abel et al. 1999), alors que la surexpression de Glut1 normalise le ratio PCr/ATP et est protecteur contre le développement de l'IC induite par la surcharge de pression (Liao et al. 2002).

Une diminution du ratio PCr/ATP est observée dans les cœurs défailants humains et dans les modèles animaux. Chez l'homme, la PCr et l'ATP sont diminués (Beer et al. 2002) et la diminution du ratio PCr/ATP est décrite comme signe de mortalité pour la défaillance cardiaque congénitale (Neubauer et al. 1997). Cependant les mécanismes moléculaires qui mènent à l'altération des flux énergétiques et de la contractilité ne sont pas bien connus. L'augmentation de l'ADP, inhibant les ATPases impliqués dans le couplage excitation-contraction, pourraient être un des points sensibles pour la mise en place de la pathologie (De Sousa et al. 1999).

b) Dysfonction mitochondriale et altération de la navette Créatine/Phosphocréatine

L'IC chronique est associée avec des anomalies morphologiques de la mitochondrie: augmentation du nombre, diminution de la taille et une intégrité structural compromise (Schaper et al. 1991). La lésion mitochondriale est positivement corrélée avec des indices de sévérité d'IC comme la noradrenaline dans le plasma (norepinephrine), la pression du ventricule gauche en diastole et la fraction d'éjection (Sabbah et al. 1992).

Dans l'IC humaine et expérimentale, des diminutions dans l'activité des complexes de la chaine respiratoire ou du cycle de Krebs on été décrits. L'expression diminuée des protéines mitochondriales est liée à une capacité de synthèse d'ATP limitée et des anomalies cinétiques de phosphate à haute énergie (Ning et al. 2000).

De plus, les taux de consommation d'oxygène défectueux et la régulation mitochondriale émoussée par les accepteurs de phosphate AMP, ADP et créatine sont en faveur d'une production d'énergie myocardique plus faible en HF via la phosphorylation oxydative (Sanbe et al. 1995; Sharov et al. 1998; De Sousa et al. 1999).

Vu la forte corrélation entre la consommation d'oxygène et le travail, la capacité oxydative diminuée du myocarde insuffisant limitera la fonction cardiaque au moins pour les charges de travail élevées. Par contre, même dans les conditions basales, les niveaux cellulaires d'ATP et de PCr et du ratio PCr/ATP, sont tous contrôlés par la phosphorylation oxydative, sont altérés dans l'IC.

Le couplage de la CK mitochondriale à la phosphorylation oxydative diminuée est observe dans des modèles animaux de cardiomyopathies et pourrait être un marqueur de transition entre l'hypertrophie compensatoire et l'insuffisance (Veksler and Ventura-Clapier 1994). Suggérant une perte généralisée de la coordination entre le cytosol et la mitochondrie ; et une altération de la signalisation énergétique. Cela est responsable de l'altération des flux énergétiques et du ration PCr/ATP diminué, et de l'incapacité du myocarde défaillant d'adapter sa production d'énergie à l'utilisation d'énergie aussi bien que de mobiliser sa réserve contractile (Liao et al. 1996).

Par ailleurs, la CK mitochondriale peut moduler la transition de la perméabilité mitochondriale en présence de l créatine (Dolder et al. 2003). La chute dans la miCK cardiaque pourrait rendre le pore de transition mitochondrial pus prédisposé à s'ouvrir favorisant la mort cellulaire apoptotique pouvant avoir lieu dans l'IC. En outre, l'efficacité des ATPases dépend d'une alimentation énergétique adéquate et du retrait efficace des produits finaux de l'hydrolyse de l'ATP.

En effet, l'ATP et l'ADP exercent une cinétique (par des constantes d'affinité et d'inhibition) ainsi qu'un contrôle thermodynamique sur la transduction d'énergie. En particulier, un défaut dans la capacité du RS à accumuler le calcium est considéré comme participant dans la pathophysiologie de l'IC.

Le cœur défaillant est un organe en état de déficit énergétique. Un certain nombre d'études ont montré qu'il y a une diminution des niveaux d'ATP et de phosphocréatine au niveau du myocarde. L'ATP myocardial peut diminuer de 30 % à 40 % dans le cœur défaillant par rapport au cœur normal en raison d'une inadéquation entre l'offre et la demande de l'ATP (Lopaschuk and Ussher 2016).

L'analyse de la fonction mitochondriale au cours de l'évolution de la maladie, montre que l'hypertrophie cardiaque compensatoire est associée avec une augmentation de la capacité mitochondriale oxydative dans le cœur et dans l'IC, les mitochondries présentent une dysfonction prononcée. Par exemple, Doenst et al. Rapportent que le profil d'oxydation des substrats prédit la progression de l'IC chez le rat avec une constriction aortique (Doenst et al. 2010).

L'oxydation du glutamate, substrat du complexe I, présente un profil diphasique avec une augmentation précoce suivie par une chute qui coïncide avec une diminution de la contractilité et de la fraction d'éjection. La diminution de contractilité est précédée par une diminution de l'oxydation des acides gras. Lors de l'addition de découpleur, la consommation d'oxygène augmente de façon similaire dans les cœurs normaux perfusés aux catécholamines et les cœurs en surcharge de pression mais pas dans les cœurs en insuffisance, indiquant que la phosphorylation oxydative est préservée en hypertrophie compensatoire et est diminuée en IC (Gong et al. 2003).

Un profil similaire a été décrit dans le muscle squelettique; Schrepper et al démontrent une réponse mitochondriale diphasique dans le muscle squelettique en réponse à la surcharge de pression cardiaque chronique avec une augmentation précoce de la phosphorylation mitochondriale oxydative et un déclin plus tardif qui coïncide avec la transition de l'hypertrophie cardiaque vers l'IC chronique.

On constate que la diminution des capacités respiratoires (Dépendantes de l'ADP) a lieu lorsque la consommation d'oxygène a été mesurée en présence de glutamate+malate dans les fibres cardiaques isolées des cœurs de rat (Garnier et al. 2003) de chien (Sharov et al. 1998) et de l'homme (Sharov et al. 2000) en cardiomyopathie dilatée et également en surcharge de pression et dans l'IC induite par ischémie (Sanbe et al. 1993). De manière similaire, le cœur humain insuffisant connaît des

défauts précoces dans la respiration mitochondriale liée au complexe I et l'oxydation des acides gras ainsi que dans l'appareil de phosphorylation (Lemieux et al. 2011).

Différents défauts mitochondriaux ont été reportés dans les complexes de la chaîne de transport d'électrons et des composés impliqués dans la phosphorylation au niveau des mitochondries du cœur dans l'IC de différentes étiologies (Rosca and Hoppel 2009). Des altérations dans les composés de phosphorylation ont été caractérisés par une diminution du niveau d'expression et de l'activité de l'ATP synthase, dans le cœur de cochon en IC ischémique induite par la ligature de l'artère coronaire circonflexe gauche (Liu et al. 2001), et également chez les chiens ayant une CMD (McCutcheon et al. 1992) et les personnes avec une CMD (Unverferth et al. 1988). L'activité du complexe V est fortement diminuée dans le cœur et le muscle squelettique d'animaux atteints d'une IC induite par une stimulation (Marin-Garcia et al. 2001; Moe et al. 2004). Des anticorps anti-adénine nucléotide translocase (ANT) sont présents dans le plasma de patients atteints de cardiomyopathie dilatée et ils inhibent le transport nucléotidique des mitochondries cardiaques (Schultheiss and Bolte 1985). Schultheiss et al ont trouvé une diminution dans la capacité de transport de l'ANT dans le tissu cardiaque explanté de patients atteints de CMD (Schultheiss 1992) associée à une augmentation du taux total de l'ANT (Sylvén et al. 1993).

L'analyse des tissus cardiaques humains révèle un changement dans l'expression de l'isoforme ANT caractérisée par une augmentation de l'ANT1 et une diminution de l'ANT2, ce qui restreint la fonction ANT. Une modification de l'expression de l'isoforme ANT a également été observée dans les biopsies endomyocardiques lors des premiers stades de la cardiomyopathie dilatée, ce qui suggère que le défaut de l'ANT peut causer le déficit énergétique et la progression de la HF. Le changement de l'ANT se produit également dans les maladies cardiaques inflammatoires, mais il est absent dans la cardiomyopathie ischémique, valvulaire et hypertrophique (Dorner and Schultheiss 2000).

3. Régulation du métabolisme énergétique

a) Voie AMPK et sirt 1

L'AMPK (AMP-activated protein kinase) a été formellement identifiée en 1987 comme étant l'unique enzyme responsable de l'inhibition conjointe de la synthèse du cholestérol et des acides gras. Grâce à son clonage en 1994, les rôles de l'AMPK ont pu être mieux définis. L'AMPK est alors apparue comme un senseur métabolique incontournable permettant l'ajustement précis des besoins et disponibilités énergétiques cellulaires.

Chez les mammifères, les cellules doivent maintenir une balance énergétique positive et stable, caractérisée par un rapport ATP/ADP élevé (ratio 10/1). La perturbation de cette balance énergétique par un facteur environnemental mène à une chute de la production d'ATP. Le rapport ATP/ADP ainsi que le rapport ATP/AMP sont alors automatiquement modifiés par l'intervention de l'adénylate kinase. L'activation de l'AMPK est déterminée par l'augmentation du rapport AMP/ATP, en réponse aux épisodes de stress énergétique comme l'absence de glucose, l'exercice physique, l'ischémie ou l'hypoxie. Une fois activée, l'AMPK participe au maintien de l'homéostasie énergétique cellulaire en contrôlant, à court terme, l'activité de certaines enzymes et à long terme, l'expression de certains gènes, la plupart impliqués dans le métabolisme énergétique (Foretz et al. 1998; Foretz et al. 2005). Ainsi, afin de réajuster la balance énergétique cellulaire, l'activation de l'AMPK stimule des voies cataboliques impliquées dans la synthèse d'ATP (oxydation des acides gras, glycolyse) et inhibe des voies anaboliques ou consommatrices d'ATP (synthèse des protéines, de cholestérol et des acides gras). Ce système senseur du métabolisme énergétique constitue un mécanisme de survie cellulaire hautement conservé chez les eucaryotes.

Contrôle du métabolisme myocardique par l'AMPK

Le cœur doit produire quotidiennement près de 35 kg d'ATP pour assurer son activité contractile et son rôle de pompe. Il tire son énergie de l'oxydation de substrats comme les acides gras et le glucose. Pour cela, un apport continu en oxygène est fourni par les artères coronaires. Le rétrécissement ou l'occlusion d'une artère coronaire produit une diminution de la perfusion du myocarde (ischémie) et par conséquent une réduction de l'apport en substrat et en oxygène. En l'absence d'oxygène, le métabolisme oxydatif cesse et la glycolyse (glucose exogène et glycogénolyse) devient la seule voie métabolique susceptible de produire de l'ATP. Face à cette situation de stress métabolique, la glycolyse est stimulée, permettant de fournir un minimum d'énergie pour maintenir la survie cellulaire. L'AMPK joue un rôle clé dans cette stimulation. D'une part, l'activation de l'AMPK entraîne une translocation du transporteur de glucose GLUT-4 au niveau de la membrane plasmique facilitant la pénétration du glucose dans le cardiomyocyte par un mécanisme indirect (Russell et al. 1999).

De plus, les voies anaboliques consommatrices d'énergie sont inhibées au cours de l'ischémie. Ainsi, la synthèse des protéines (responsable de 30 % de la consommation d'ATP en métabolisme basal) est réduite par phosphorylation et inhibition du facteur d'élongation eEF-2 par l'AMPK, rendant impossible l'élongation des chaînes peptidiques. Lorsque la perfusion myocardique est rétablie, le métabolisme oxydatif est à nouveau possible et l'oxydation des acides gras devient la

source principale d'énergie fournissant de 80 % à 90 % de la production d'ATP. Le mécanisme moléculaire proposé fait, une fois de plus, intervenir l'AMPK par son action sur l'ACC, facilitant la pénétration des acides gras dans la mitochondrie et donc leur oxydation. Il a été en effet démontré que l'AMPK reste active au cours des premiers moments de la réperfusion provoquant une inhibition de l'ACC, une diminution de la concentration en malonyl-CoA et donc une augmentation de l'oxydation des acides gras (Sambandam and Lopaschuk 2003). L'importance de l'AMPK dans la protection métabolique du cœur ischémique a été bien démontrée grâce à l'utilisation de modèles murins d'inactivation génique ou de transgénèse. L'isoforme $\alpha 2$ de l'AMPK est essentielle pour la protection métabolique : les cœurs isolés perfusés de souris AMPK $\alpha 2$ ^{-/-} développent une contracture de manière plus précoce et plus importante lorsqu'ils sont soumis à un épisode ischémique. Celle-ci est le résultat d'une chute plus rapide d'ATP. La surexpression cardiaque d'une forme dominante négative de l'AMPK inhibe l'activation de l'AMPK, la stimulation de la glycolyse et la production de lactate au cours de l'ischémie et entraîne une aggravation des lésions ischémiques (mort cellulaire) (Xing et al. 2003; Russell et al. 2004). De même, l'AMPK a été impliquée dans les effets cardioprotecteurs de l'adiponectine en inhibant l'apoptose des cardiomyocytes (Shibata et al. 2005).

L'AMPK contrôle l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique en agissant en coordination avec un autre senseur énergétique, la SIRT1, lysine désacétylase dépendante du NAD⁺ (Canto et al. 2009). L'AMPK améliore l'activité de SIRT1 en augmentant les niveaux cellulaires en NAD⁺, résultant en la désacétylation et la modulation de l'activité des cibles en aval SIRT1 qui incluent PGC1 α (peroxisome proliferator activated receptor) et les facteurs de transcriptions FOXO1 et FOXO3a. La désacétylation de ces cibles médiée par la SIRT1 induite par AMPK, explique plusieurs effets biologiques convergents de l'AMPK et SIRT1 sur le métabolisme énergétique (Price et al. 2012)

Le polyphénol, resvératrol (2,3,4'-trihydroxystilbene), présent dans le vin rouge, a attiré l'attention scientifique vu son rôle protecteur vis-à-vis de la fonction cardiaque et possède également une activité anti tumorale (Jang et al. 1997).

Des souris traitées avec une dose modérée de resvératrol, montre une augmentation de la fonction et la biogenèse mitochondriale, l'activation de AMPK et l'augmentation du niveau du NAD cellulaire dans le muscle squelettique, alors que le KO de Sirt1 n'a aucun de ces avantages lorsqu'il est traité avec du resvératrol à faible ou forte dose, ce qui indique que SIRT1 joue un rôle essentiel dans la capacité de doses modérées de resvératrol de stimuler AMPK et améliorer la biogenèse mitochondriale in vitro et in vivo.

La restriction calorique induit une augmentation du niveau d'expression des Sirt1-4 en ARNm et protéines dans les cardiomyocytes, suggérant que ces sirtuines jouent un rôle essentiel pour médier une réponse à la restriction calorique dans les cardiomyocytes in vitro et in vivo. Ces résultats pourraient être importants pour atténuer les maladies associées au vieillissement et notamment les maladies cardiovasculaires.

b) Régulation par les voies PPAR, PGC1alpha/beta, ERRalpha

On constate dans plusieurs modèles d'IC qu'il y a une chute d'expression des facteurs de transcriptions directement impliqués dans la biogénèse mitochondriale et la régulation des enzymes du métabolisme énergétique comme les facteurs Pgc1 α et β (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma cofactors) ou Err α (Estrogen receptor related) sans que la cause de cette chute soit bien comprise (Schilling and Kelly 2011).

La production constante d'ATP est vitale pour le tissu cardiaque, afin qu'il puisse effectuer sa fonction contractile. Les CM doivent être capables de reprogrammer leur capacité métabolique énergétique pour répondre aux besoins de l'organisme. Le niveau d'expression de gènes métaboliques constitue un mécanisme important dans cette régulation. Les coactivateurs transcriptionnels, PPAR γ co-activateur 1 (PGC-1) α et β avec leurs récepteurs nucléaires cibles, les récepteurs liés à l'œstrogène (ERR) α et γ sont impliqués dans de multiples voies de transduction d'énergie mitochondriale et de génération d'ATP à l'état basal et en réponse au stress physiologique. Les cibles connues de PGC1 dans le cœur incluent des récepteurs nucléaires (ERR α , ERR γ , PPAR α , PPAR β/δ) et des facteurs de transcriptions (NRF-1 et MEF2) (Finck and Kelly 2007).

Le réseau PGC-1 sert à réguler en coordination l'expression de nombreux gènes impliqués dans les voies mitochondriales comme la β -oxydation des acides gras, la phosphorylation oxydative, la synthèse d'ATP et la biogénèse mitochondriale.

L'expression de PGC1 α et β est évidente dans les tissus aux grands besoins énergétiques et à forte capacité oxydative, comme le cœur, le tissu adipeux brun, le rein et le muscle squelettique lent (Puigserver et al. 1998; Lin et al. 2002).

L'expression de PGC1 α est fortement induite au niveau transcriptomique via l'action d'une variété de voies de signalisation, PGC1 voit son niveau d'expression augmenter en réponse à une exposition au froid, au jeûne et à l'exercice. De manière intéressante, l'induction de l'activité de PGC1 paraît suffisamment efficace pour induire les voies du métabolisme énergétique comme la

thermogenèse adaptative, la biogenèse mitochondriale et l'oxydation des acides gras (Goto et al. 2000; Lehman et al. 2000).

Au cours de la période post-natale précoce, le cœur subit un changement d'utilisation de substrat du glucose et l'oxydation du lactate dans la période fœtale, vers une dépendance de la B oxydation des acides gras mitochondriale après la naissance. Ce « shift » métabolique s'accompagne par une augmentation du niveau d'expression de PGC-1 α et β de la biogenèse mitochondriale (Lehman et al. 2000; Lai et al. 2008).

Il a été montré que la surexpression de PGC-1 α dans les cardiomyocytes in vitro et in vivo dans des souris transgéniques est capable d'induire la prolifération mitochondriale (Lehman et al. 2000). Par contre, les souris ayant une perturbation combinée de PGC1 α / β , présentent une altération de la biogenèse périnatale et elles meurent quelques jours après la naissance d'une IC (Lai et al. 2008).

Ces résultats montrent que les coactivateurs de PGC1 sont importants pour la maturation métabolique post-natale et la fonction cardiaque. De même dans le cœur adulte, PGC-1 α et β jouent un rôle assez important et crucial. Les cœurs déficients pour PGC-1 α se développent normalement mais ils possèdent une capacité oxydative des acides gras altérée et réduite, une tolérance à l'exercice diminuée, une réserve cardiaque réduite en dobutamine. Et le niveau d'expression de gènes impliqués dans la B oxydation des acides gras et la biogenèse mitochondriale est diminuée (Lin et al. 2004; Arany et al. 2005; Leone et al. 2005; Lai et al. 2008; Lehman et al. 2008).

Cependant, une surexpression chronique de PGC-1 α dans le cœur, conduit à des anomalies mitochondriales structurales significatives et une cardiomyopathie sévère mais réversible (Russell et al. 2004). Ainsi, PGC-1 α et β constituent de potentiels régulateurs de la prolifération et la fonction mitochondriale et du métabolisme «carburant» dans le cœur adulte. De plus, PGC-1 α et β peuvent également réguler l'expression de gènes codant pour les «éliminateurs» des espèces réactives l'oxygène (radicaux libres) (ROS). La production des ROS est associée à plusieurs maladies comme l'IC, l'athérosclérose, le diabète et la neurodégénération. In vitro, l'induction du stress oxydant par l'hydrogène peroxyde, conduit à une augmentation de l'expression de PGC-1 α et β et des superoxyde dismutases SOD1 et 2, sensibles aux ROS, la catalase et la glutathione peroxidase (GPX1).

De manière intéressante, l'induction des molécules de défense contre les ROS, est dépendante des co-activateurs de PGC1. La pertinence de cette réponse est validée in vivo par le fait que les souris PGC1a KO présentent une expression diminuée des molécules antioxydantes et sont plus susceptibles vis a vis des maladies neurodégénératives (St-Pierre et al. 2006).

ERR α et ERR γ induisent un nombre de fonctions biologiques des coactivateurs de PGC-1. L'expression de ERR α et γ augmente dramatiquement dans le cœur après la naissance en parallèle avec le profil d'expression des coactivateurs de PGC-1 et ses gènes cibles (Huss et al. 2002; Alaynick et al. 2007).

De plus, les souris ERR γ KO ne réussissent pas à faire la transition vers un métabolisme oxydatif de acides gras dans le cœur après la naissance, similairement aux souris double KO PGC-1 α/β (Alaynick et al. 2007; Lai et al. 2008). Encore, la surexpression de ERR α induit l'expression de gènes mitochondriaux et de l'oxydation des acides gras d'une manière similaire au profil qu'on observe dans la surexpression de PGC-1 (Huss et al. 2004). Ainsi, les coactivateurs PGC-1 et les membres de la famille ERR sont des partenaires centraux dans la régulation du métabolisme cardiaque et du flux oxydatif mitochondrial.

Le facteur de transcription SRF (serum response facteur) est activé par différentes voies biomécaniques dans l'hypertrophie du myocarde (Kawahara et al. 2007). SRF est désactivé au niveau transcriptionnel dans certaines formes de CMD comme les laminopathies (Ho et al. 2013) ou clivé au niveau protéique suite à une infection entérovirale conduisant à une CMD et dans l'insuffisance cardiaque chez l'homme par la caspase 3 (Chang et al. 2003).

Un modèle inductible d'inactivation ciblée du gène SRF dans le cœur chez la souris adulte (SRFHKO), conduit au développement d'une CMD (Parlakian et al. 2005). Différents cribles transcriptomiques et protéomiques ont été réalisés pour comprendre la réponse du myocarde à la perte d'expression de SRF. Ils ont permis de montrer que SRF « co-régule » des gènes impliqués dans la contraction et les flux énergétiques (ex : actine cardiaque, myosine, créatine kinase musculaire,..) (Diguet et al. 2011) ou des microARNs comme miR-1 impliqué dans la réponse hypertrophique et la régulation des flux calciques (Tritsch et al. 2013) ou les miR-378 et -378* impliqués dans la réponse hypertrophique et la régulation du métabolisme (Mallat et al. 2014).

II. Nouvelle piste: Rôle du NAD dans le cœur

A. Homéostasie et signalisation du NAD

1. Rôle de coenzyme

Une piste émergente dans le domaine de l'étude du remodelage métabolique et transcriptionnel est la signalisation médiée par le coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide NAD.

Le NAD est un coenzyme clé des réactions d'oxydo-réduction du métabolisme énergétique qui, sous sa forme réduite NADH, constitue le principal donneur d'électrons à la chaîne respiratoire.

Bien que l'altération de l'homéostasie de l'ATP soit largement étudiée dans le contexte du vieillissement et de l'insuffisance cardiaque, on sait beaucoup moins sur la régulation de l'homéostasie du coenzyme NAD, en dépit de son rôle majeur en tant que coenzyme de réactions d'oxydoréduction dans le métabolisme énergétique. L'oxydation du glucose et des acides gras conduisent à la réduction du NAD oxydé (NAD⁺) en NADH (Figure 12). La glycolyse se produisant dans le cytosol produit deux molécules de NADH. Ce NADH cytosolique est reconverti en NAD⁺ par la lactate dehydrogenase, notamment dans la glycolyse anaérobie avec conversion du pyruvate en lactate, et par la malate déshydrogénase qui initie le transfert des équivalents réducteurs aux mitochondries suivant le système de navette malate-aspartate, plus active dans les cellules à métabolisme oxydatif comme les CM. La β -oxydation des acides gras a lieu à l'intérieur de la mitochondrie, et génère une flavine adénine-2 (FADH₂) molécule, une molécule de NADH et une acétyl-coenzyme A pour chaque cycle de clivage de deux atomes de carbone. Par exemple, une molécule palmitate à 16 carbone génère sept molécules de NADH et FADH₂ et huit molécules d'acétyl coenzyme A. Comme le cycle de Krebs produit trois molécules de NADH et une seule molécule de FADH₂ par cycle, le NADH est le principal donneur d'électrons à la chaîne de transport des électrons dans les mitochondries.

En plus de cette fonction dans le métabolisme énergétique, le NAD est aussi le précurseur du Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP), par l'intermédiaire de la phosphorylation médiée par la NAD kinase ou bien la nicotinamide nucléotide trans-hydrogénase mitochondriale. Dans toutes ces fonctions en tant que coenzyme pour les réactions d'oxydo-réduction du métabolisme énergétique, le recyclage de NAD⁺ et NAD ne modifie pas le pool total de NAD. Cependant, plusieurs voies cellulaires existent et constituent des consommateurs nets de NAD⁺ (Mericskay 2016).

2. La biosynthèse du NAD

Les voies de biosynthèse du NAD ont été découvertes lors de l'étude d'une maladie appelée pellagre qui était fréquente en Amérique du sud et chez les paysans américains au 19^{ème} siècle dont les symptômes sont le dermatite, la diarrée, la démence et la fatigue. Un des traitements précoces de cette maladie de carence en vitamine, était la consommation de 1,5 à 2 litres de lait de vache (Goldberger 1914). En 1937, le nicotinamide (**NAM**) et l'acide nicotinique (**AN**) ou niacine, ont été identifiés comme facteurs préventifs de la pellagre et le tryptophane a été découvert par la suite

comme molécule préventive de la pellagre également (Trammell et al. 2016). Le nicotinamide et l'AN, contiennent un cycle pyridine qui peut être utilisé pour former le NAD⁺ en 2 ou 3 étapes enzymatiques. Le tryptophane participe à la voie *de novo* de synthèse du NAD, nécessitant de nombreuses étapes enzymatique. Le tryptophane peut également être incorporé dans les protéines, oxydé comme carburant et converti en plusieurs autres métabolites comme la sérotonine. Un apport de 50 à 60 mg de tryptophane est considéré comme l'équivalent niacine de 1 mg de nicotinamide ou d'acide nicotinique.

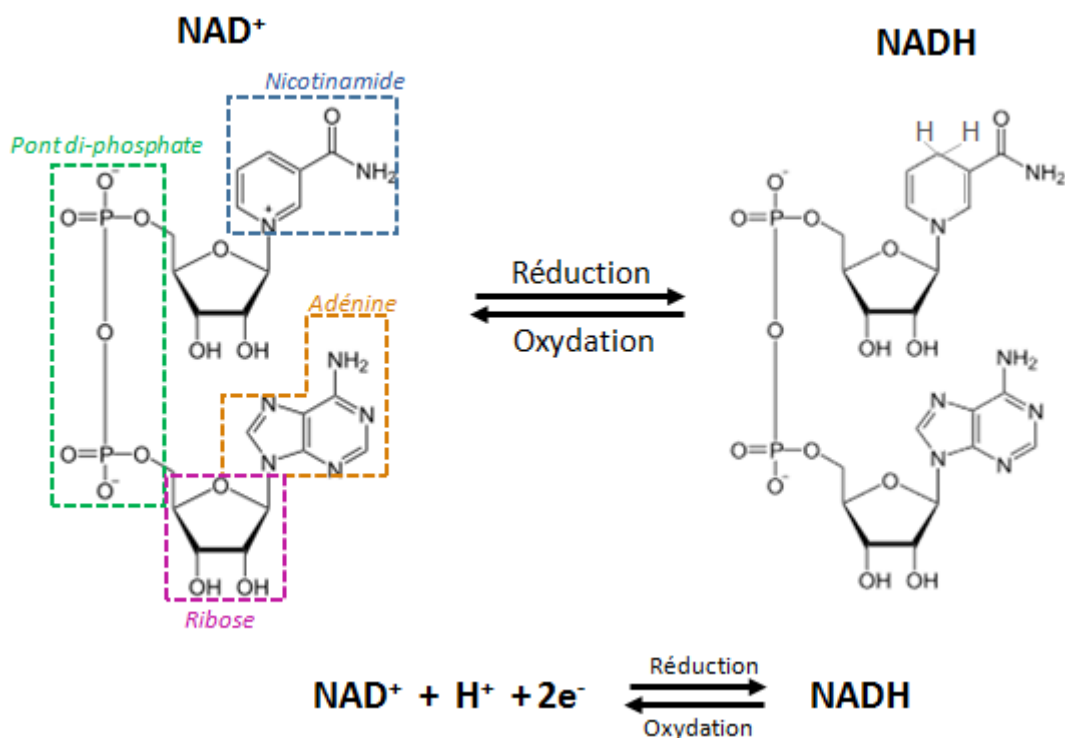


Figure 12: Représentation schématique de la réaction redox du nicotinamide adénine dinucléotide

Les précurseurs vitaminiques du NAD⁺ sont appelés vitamines B3 et existent sous 3 formes : l'acide nicotinique (AN) et le nicotinamide (NAM) comme nous l'avons dit précédemment, mais aussi une nouvelle forme étudiée plus récemment, le nicotinamide riboside (NR) (Bieganowski and Brenner 2004; Belenky et al. 2007). En effet, une grande partie de l'équivalent niacine dans l'alimentation est en effet le NAD⁺ lui-même qui est hydrolysé au cours de la digestion en nicotinamide et nicotinamide riboside. Mais les vitamines B3 peuvent aussi provenir du catabolisme intracellulaire du NAD.

Voie des précurseurs non amidés: Un intermédiaire clé de la voie *de novo* issue du tryptophane, est l'acide quinolinique (AQ), le produit final de la voie des kynurenine, qui est converti ensuite en trois étapes en nicotinate mononucléotide (NaMN), puis en nicotinate adénine dinucléotide (NaAD⁺) grâce à l'action des nicotinamide mono nucléotide adénylyl transférases (NMNAT). Le NaAD⁺ est donc un dinucléotide non amidé qui nécessite l'action de la NAD synthase (NADS) pour devenir du NAD⁺. La NADS des mammifères est connue comme une protéine cytosolique homo hexamérique ; elle catalyse la réaction d'amidation qui convertit le NaAD en NAD, en utilisant l'ATP et la glutamine comme co-substrat donneur de groupe amide (De Ingeniis et al. 2012). Le NaMN peut être également synthétisé directement à partir de l'AN dans la voie de Preiss-Handler. Le rôle essentiel de NMNAT et NADS a été confirmé par des expériences de délétion et de knock down du gène dans différents organismes (Conforti et al. 2011; Gilley et al. 2013). Même si aucune évidence n'a été mise en évidence à ce jour, concernant l'implication de la NADS dans les conditions pathologiques, des altérations du gène codant pour la NMNAT, ont été récemment liées au cancer (Stavrum et al. 2013).

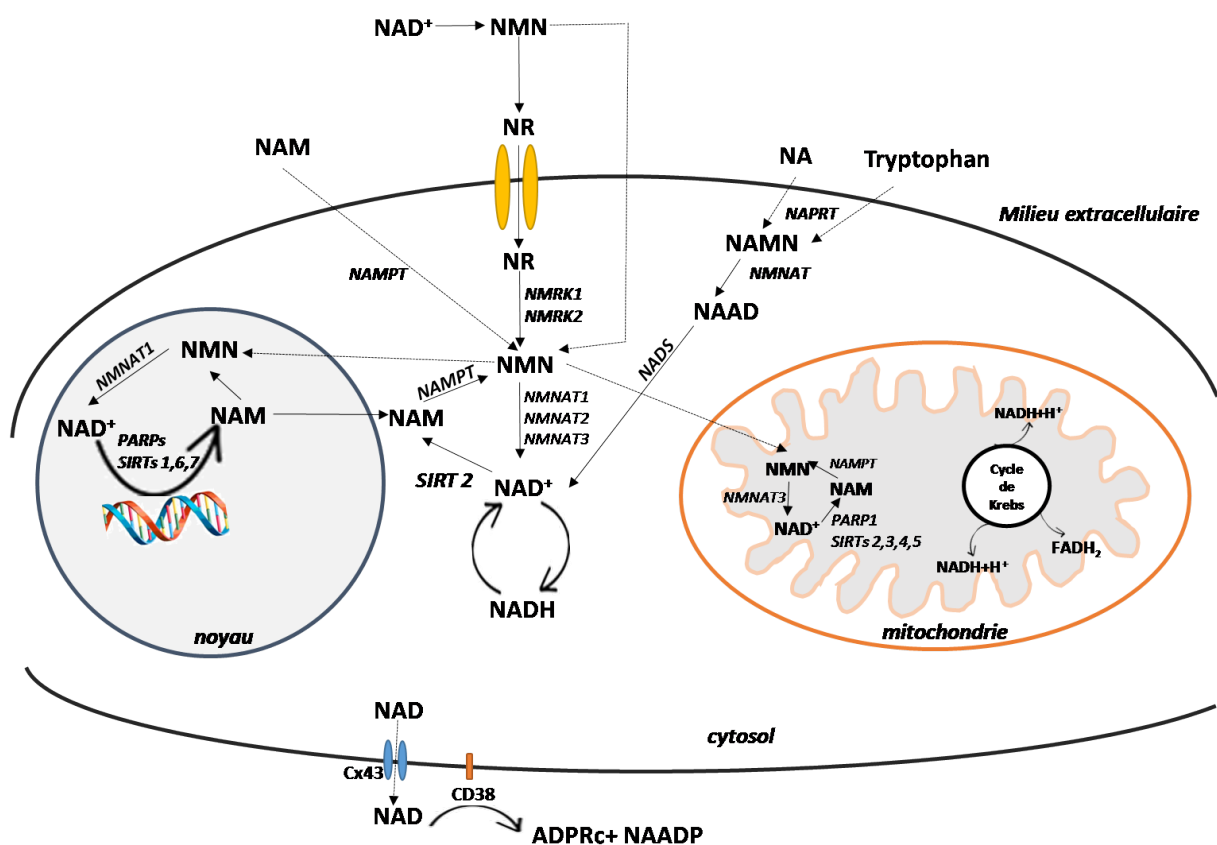


Figure 13: La biosynthèse, le transport et le catabolisme du NAD et ses intermédiaires dans les compartiments intracellulaires et extracellulaires chez les mammifères

Voies des précurseurs amidés: le NAM et le NR sont des précurseurs déjà porteurs du groupe amide. Ils sont convertis en nicotinamide mononucléotide (NMN), et ensuite en NAD^+ sans avoir besoin de la NADS. Le NAM est le substrat de la nicotinamide phosphoribosyl transférase (NAMPT) qu'elle fusionne à un phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) issu de la première étape de synthèse commune à tous les nucléotides pour former le NMN (Figure 14). Elle consomme à cette occasion une molécule d'ATP pour effectuer dans le même temps une autophosphorylation permettant l'activité catalytique.

Deux voies utilisent du NR pour synthétiser le NAD (Bogan and Brenner 2008). La principale voie est une réaction catalysée par deux isoformes de nicotinamide riboside kinase chez les mammifères (NMRK1, 2) qui utilise l'ATP pour phosphoryler le NR, générant du NMN, (figure 14) (Bieganowski and Brenner 2004; Belenky et al. 2007). En outre, la liaison glycosidique du NR peut être cassée par des purines nucléoside phosphorylase (PNP), et le nicotinamide (NAM) libéré de cette réaction est réutilisé par la NAMPT (Belenky et al. 2009). L'activité de cette voie est mal connue chez les mammifères.

Une fois le NMN formé à partir du NAM ou du NR, ce sont les mêmes enzymes NMNAT utilisées dans la voie de novo (TRP) et Preiss-Handler (AN) qui fusionnent le NMN à une adénine pour former le NAD^+ . Chez les mammifères, la NMNAT est représentée par trois produits de gènes différents : l'isoforme nucléaire NMNAT1, l'isozymecytosolique NMNAT2, et l'isoforme mitochondriale NMNAT3 (Magni et al. 2004; Zhai et al. 2009). Elles représentent des propriétés différentes in vitro (Sorci et al. 2007; Orsomando et al. 2012), mais elles catalysent la même réaction d'adénylation ATP-dépendante, en utilisant soit le NMN soit le NaMN comme substrats, pour donner les dinucléotides correspondants. Par conséquent, elles opèrent de façons équivalentes dans les voies de synthèse du NAD^+ à partir des précurseurs amidés et non amidés.

Les connaissances récentes sur la distribution physiologique dans les tissus des mammifères des métabolites liés au NAD^+ et au NADH, n'ont cessé de croître grâce au progrès des méthodes de détection analytiques (Formentini et al. 2009; Evans et al. 2010). La preuve du rôle joué dans la biologie cellulaire par certains précurseurs, comme le NMN et le NR a émergé récemment (Canto et al. 2012). Par contre, malgré la connaissance approfondie sur les plans génétiques et biochimiques des enzymes de la biosynthèse du NAD, on n'a qu'une connaissance partielle de la distribution de leurs activités dans les différents tissus. Cela est essentiellement dû au manque d'essais adaptés pour mesurer leurs activités dans les extraits brut. La plupart des informations actuelles se posent en effet à partir d'expériences de quantification de l'ARNm et des protéines. D'un autre côté, une vue

d'ensemble sur la physiologie de la biosynthèse du NAD, indique que les voies amidées et non amidées ont des contributions relatives au pool total de NAD différentes selon les tissus. Dans le foie par exemple, toutes les enzymes des voies décrites dans la figure 13 sont connues pour être présentes, permettant la conversion en NAD de tous les précurseurs à partir des sources nutritionnelles, peut être pour réalimenter tout l'organisme avec les précurseurs du NAD dans la circulation sanguine (Collins and Chaykin 1972; Micheli et al. 1990). Dans d'autres tissus, inversement, différents niveaux enzymatiques reflètent des besoins métaboliques particuliers et intrinsèques, dépendant aussi de la disponibilité de source de pyridine exogène.

Le tryptophane est reconnu comme source de synthèse de NAD *de novo*, mais il est généralement insuffisant pour maintenir une homéostasie du NAD (Stavrum et al. 2013). La plupart du NAD chez les mammifères est synthétisée à partir du NAM via la voie amidée (Figure 14). Le foie, avec son taux élevé de NAD, représente un tissu crucial où le recyclage du NAM prévaut et la resynthèse du NAD est régulée par la Nicotinaide phosphoribosyl transférase (NAMPT) (Imai 2009).

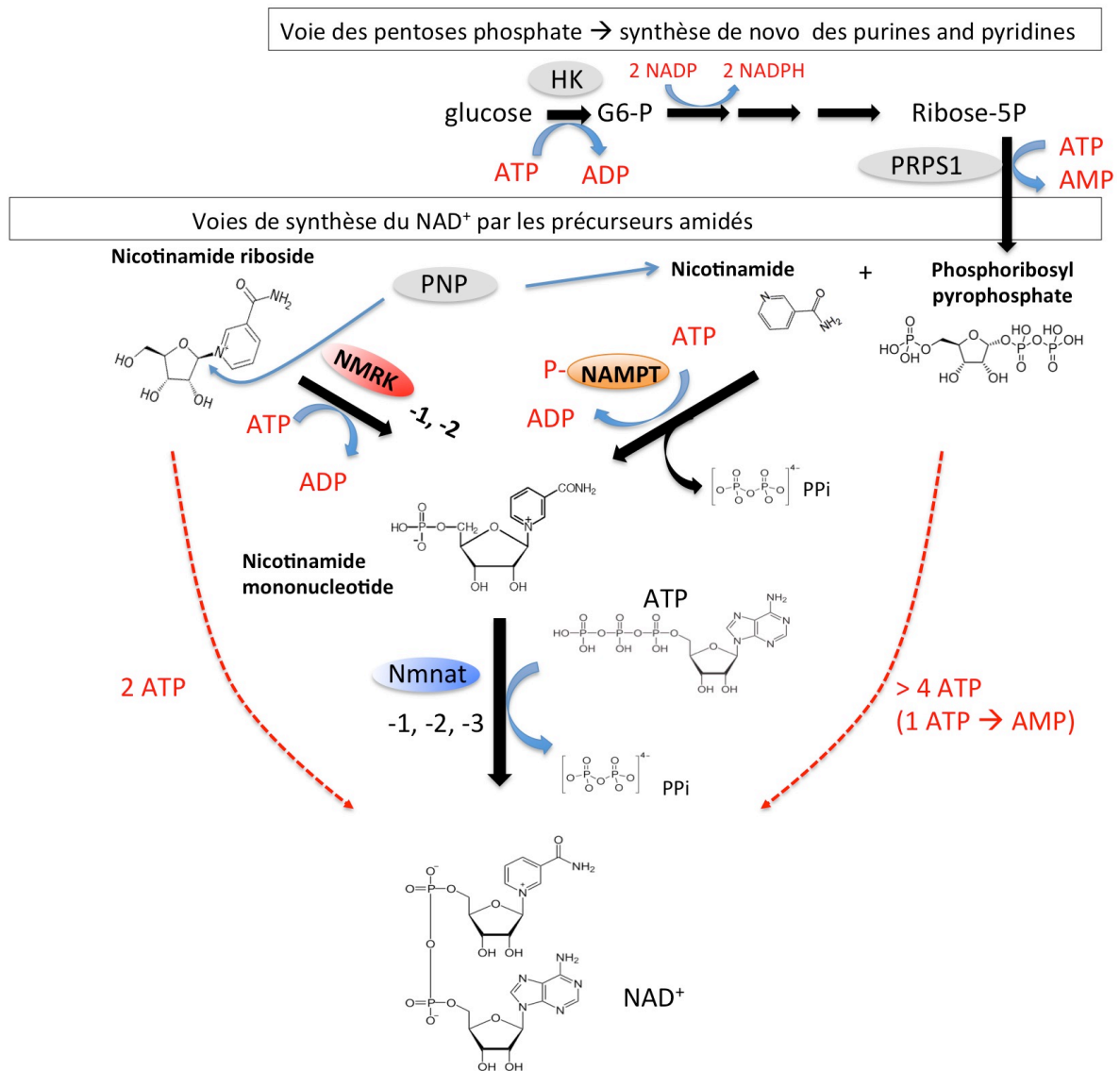


Figure 14: Voie des pentoses phosphate et voies de synthèse du NAD⁺ par les précurseurs amidés

Des études effectuées chez la souris ont montré que l'enrichissement de la nourriture en NR, augmente les niveaux de NAD dans les tissus et active les sirtuines 1 et 3, aboutissant à une amélioration du métabolisme oxydatif et à une protection contre les anomalies du métabolisme induites par un régime riche en matières grasses caractérisé par une fonction mitochondriale déficiente (Canto et al. 2012).

Par ailleurs, une autre étude a montré que le traitement avec le NR, constitue un traitement efficace de la myopathie mitochondriale, il retarde la progression de la maladie en induisant la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique et les tissus adipeux bruns, empêchant les anomalies de l'ultra-structure mitochondriale et la délétion d'ADN mitochondrial (Khan et al. 2014).

Le NAD⁺ a un effet protecteur vis-à-vis des axones dans les neurones en culture. L'exposition à un bruit intense provoque une perte auditive par induction d'une dégénérescence des neurites des ganglions de la spirale qui innervent les cellules ciliées de la cochlée. Le traitement avec le NR a pu empêcher la perte d'audition après l'exposition des souris à un bruit intense. Cet effet protecteur est médié par la Sirt3 mitochondriale, sachant que les souris surexprimant la Sirt3 sont résistantes à la perte d'audition induite par un bruit intense et que la délétion de la Sirt3 abolit l'effet protecteur du NR et l'expression des enzymes de biosynthèse du NAD. Ces études montrent que le NR active la voie NAD⁺-Sirt3, qui réduit la dégénérescence de neurites causée par l'exposition au bruit (Brown et al. 2014).

La supplémentation alimentaire en nicotinamide riboside, dans les cellules des mammifères et les tissus chez la souris, augmente les niveaux de NAD⁺ et active Sirt1 et Sirt3, aboutissant à une amélioration du métabolisme oxydatif et une protection contre les anomalies métaboliques induites par un régime riche en gras (Canto et al. 2012). Yoshino et al ont aussi démontré que le nicotinamide mononucléotide (NMN) améliore l'intolérance au glucose et les profils lipidiques dans le régime riche en matières grasses et le diabète de type 2, partiellement via l'activation de Sirt1 (Yoshino et al. 2011).

Dans le contexte de l'altération et la dérégulation de l'homéostasie du NAD dans des modèles de surcharge de pression et l'ischémie/reperfusion (Pillai et al. 2010; Zhang et al. 2016), des études ont été faites sur l'enzyme NAMPT de la voie de sauvetage du NAM dont l'expression diminue dans ces différents modèles de pathologies cardiaque ainsi que dans le modèle SRF HKO de CMD (Diguët et al 2017, under submission, article 2 de la thèse).

La NAMPT régule les niveaux de NAD⁺ jouant ainsi un rôle dans la survie cellulaire en inhibant l'apoptose et stimulant les flux autophagiques dans les cardiomyocytes. La prévention de la diminution d'expression de Nampt inhibe la lésion cardiaque en réponse à l'ischémie myocardique et la reperfusion et d'autres conditions de stress dans le cœur.

3. Signalisation Sirtuine /PARP / CD38

Cependant, le NAD est une molécule de signalisation en tant que substrat utilisé par différentes enzymes, il y a donc une consommation nette du NAD dans la cellule.

Les différentes familles d'enzymes consommant le NAD sont : Les sirtuines (lysines déacétylases), les poly(ADP) ribosyl-polymérase (PARPs) et l'ectoenzyme CD38.

Les sirtuines

Les sirtuines sont une famille de protéines ayant une homologie avec le gène «Silent information regulator 2» (sir2) dans le *Saccharomyces cerevisiae*, initialement identifié comme facteurs de silence génétique (Gomes et al. 2015).

Les sirtuines ont intrigué de nombreux chercheurs qui étudient le vieillissement vu qu'elles étaient liées d'abord au remodelage de la chromatine, la survie cellulaire la longévité chez la levure (North and Verdin 2004) et elles régulent l'expression des gènes du métabolisme énergétique notamment en condition de stress énergétique et dans le contexte de l'insuffisance cardiaque (Cencioni et al. 2015).

Les sirtuines sont des lysines déacétylases dépendantes du NAD, elles catalysent une réaction unique qui consiste à casser le NAD en Nam et ADP-ribose sur lequel est transféré le groupe acétyl retiré du substrat pour donner du O-acétyl-ADP-ribose (Borra et al. 2004).

Chez les mammifères sept familles de sirtuines sont identifiées et classés en quatre classes:

- SIRT 1, classe I, nucléaire et cytosolique (Déacétylation)
- SIRT 2, classe I, cytosolique et nucléaire (Déacétylation et démyristoylation)
- SIRT 3, classe I, mitochondriale (Déacétylation)
- SIRT 4, classe II, mitochondriale (ADP-ribosylation)
- SIRT 5, classe III, mitochondriale (Déacétylation, démalonylation, désuccinylation)
- SIRT 6, classe IV, nucléaire (Déacétylation, ADP ribosylation)
- SIRT 7, classe IV, nucléolaire (Déacétylation)

La SIRT 1 nucléaire peut activer des facteurs de transcription tels que Pgc1 α impliqué comme nous l'avons vu dans la stimulation du métabolisme énergétique, ou encore FoxO1 impliqué dans la réponse au stress oxydant et la stimulation de l'autophagie. Ceci a bien été démontré dans le muscle squelettique (Gurd 2011; Li et al. 2011; Sin et al. 2014). L'axe Sirt1-FoxOA1 existe dans le cœur (Sin et al. 2014) mais la stimulation par l'exercice de l'axe Sirt1-PGC1 α n'opère pas par exemple dans le cœur comme dans le muscle (Li et al. 2011). Dans le cœur, la surexpression de SIRT1 à un niveau modéré a un effet protecteur, mais à haut niveau, elle est associée au développement de cardiomyopathies (Alcendor et al. 2007).

SIRT2 est importante pour la stabilité des chromosomes pendant la mitose (Inoue et al. 2007). Elle inhibe l'adipogenèse en déacétylant FOXO1 et donc peut être protectrice contre la résistance à l'insuline. De même SIRT2 réprime la réponse inflammatoire dans la souris via la déacétylation de p65 et l'inhibition de l'activité de NF- κ B (Gomes et al. 2015). Les SIRT 3, 4 et 5 principalement localisées dans la mitochondrie, sont des senseurs du stress mitochondrial qui peuvent jouer sur l'activité des enzymes du métabolisme énergétique (Huang et al. 2010).

De plus SIRT3 aurait un effet positif sur le cœur. Lors d'une cardiomyopathie, le taux de SIRT3 est plus faible que dans le cœur sain. Une surexpression de Sirt3 protège le cœur contre le remodelage hypertrophique (Pillai et al. 2010). Les cibles de Sirt3 sont principalement des enzymes mitochondriales comme l'acétyl-coenzyme 1 synthétase qui voient leur activité renforcée lorsqu'elles sont déacétylées et l'ajout de NAD bloque la réponse hypertrophique via l'augmentation de l'activité de SIRT3 (Pillai et al. 2010). La SIRT6 est associée à la chromatine et impliquée dans la stabilité génomique, l'homéostasie du glucose et l'inflammation (Alcendor et al. 2007). Enfin, SIRT7 joue un rôle de la biogenèse ribosomale, régulant à la fois la transcription et l'élongation de l'ARN (Chen et al. 2016). Les souris déficientes en SIRT7 présentent une réduction de l'espérance de vie, une hypertrophie cardiaque et une cardiomyopathie inflammatoire (Vakhrusheva et al. 2008).

Les PARPs

La deuxième catégorie d'enzymes utilisant le NAD est les PolyADPRibosyl polymérase (PARPs) qui catalysent la formation de polymères d'ADP-ribose permettant de recruter les protéines nucléaires de réparation des lésions de l'ADN induites par le stress oxydant.

Certains signaux, comme l'accumulation dans le noyau de calcium, de magnésium ou de polyamines et le stress oxydatif dans la cellule déclenchent l'activation des PARPs (Babbitt et al. 2002). Les PARPs s'associent aussi à certains facteurs de transcriptions spécifiques du muscle cardiaque et squelettique comme TEF-1 ou MyoD et régulent l'activation de gènes musculaires (Butler and Ordahl 1999). L'inactivation des PARPs peut avoir des effets cardioprotecteurs (Jagtap and Szabo 2005), par exemple l'inhibition de PARP-2 protège les cardiomyocytes de l'hypertrophie via l'activation de SIRT1 (Geng et al. 2013).

Une étude indépendante montre que les souris déficientes en PARP-1 sont protégées contre l'hypertrophie induite par l'angiotensine II et la déplétion en NAD, ainsi que par le traitement des cellules avec le resvératrol un activateur de Sir2 α . La diminution des niveaux de Sir2 α par siRNA élimine l'effet protecteur du resvératrol, indiquant ainsi indirectement que l'activation de la PARP menace la survie des cellules en réduisant l'activité des histones désacétylases de classe III (sirtuines)

dépendantes du NAD (Pillai et al. 2006). Ceci montre l'importance du NAD dans le signal de mort cellulaire.

La suractivation de PARP-1 joue un rôle dans l'apoptose des cardiomyocytes et son inhibition protège les cardiomyocytes de l'inflammation et l'apoptose dans la cardiomyopathie diabétique. Plusieurs études ont montré que la forte activation des PARPs survient suite une insuffisance cardiaque et que cette forte activation dans le cœur induit une dérégulation des gènes musculaires et la mort cellulaire des myocytes, sans activation des caspases (Pillai et al. 2005).

Il existe aussi des monoADP-ribose transférases (ART) qui modifient post-traductionnellement les protéines en clivant le NAD et en ajoutant la partie ADP-ribose à certains résidus (Arginines la plupart du temps) de protéines nucléaires ou liées au cytosquelette (ex : intégrine $\alpha 7$, desmine, actine) (Zolkiewska et al, Biochem J, 2005).

Les CD38

Enfin, le NAD est clivé par l'ectoenzyme CD38 pour générer de l'ADP-ribose cyclique, un messenger secondaire dans la signalisation calcique. Le CD38 a une préférence de substrat pour le NADP⁺ par rapport au NAD et il est présent dans le cœur avec de hauts niveaux dans l'endothélium.

L'inhibition de CD38 empêche la déplétion en NADP(H) et préserve la relaxation dépendante de l'endothélium et la génération de l'oxide nitrique avec une récupération accrue de la fonction contractile et une diminution de l'infarctus du myocarde post-ischémie. Ainsi, l'activation de CD38 constitue une cause importante du dysfonctionnement endothélial post-ischémie. Du coup, les agents thérapeutiques qui rétablissent le NADPH et/ou empêchent sa dégradation peuvent être bénéfiques dans le traitement du syndrome coronarien instable et de l'infarctus du myocarde (Reyes et al. 2015).

Ce double rôle du NAD, à la fois comme coenzyme du métabolisme énergétique et comme co-substrat consommé par différentes enzymes cellulaires, place ce métabolite au centre de différentes voies de signalisation pouvant jouer un rôle important dans le remodelage cardiaque, et pourrait exiger une activation des voies de biosynthèse de ce métabolite.

B. NAD et pathologies cardiaques

1. Chute de la NAMPT dans le cœur insuffisant

Le NAD⁺ peut être synthétisé par la voie de novo, mais la majorité est synthétisée par la voie de sauvetage à partir de ses précurseurs, l'acide nicotinique (AN), le (NAM) ou le nicotinamide ribose

(NR). Dans les cellules des mammifères, la conversion de NAM en NAM mononucléotide (NMN) par la NAMPT est l'étape limitante de cette voie. De manière intrigante, Nampt existe sous forme intracellulaire (iNampt) et extracellulaire (eNampt) sous forme d'un dimère actif enzymatiquement et la eNampt, également connue sous le nom de visfatine, est produite par les adipocytes, les cellules mononucléaires, les hépatocytes et les cardiomyocytes. La production extracellulaire de NMN médiée par eNampt a été proposée comme régulant la biosynthèse du NAD intracellulaire dans les tissus métaboliques comme le foie, le tissu adipeux (blanc) chez les souris ayant un diabète induit par un régime gras (Imai 2009). Cette théorie est cependant remise en question par l'incapacité à détecter du NMN dans le plasma sanguin reportée par plusieurs auteurs ((Trammell et al. 2016).

Dans le cœur, le niveau d'expression de la protéine NAMPT est diminué dans les conditions pathologiques comme l'ischémie, l'ischémie/réperfusion, et la surcharge de pression et chez le mutant SRF un modèle de cardiomyopathie dilatée, dans l'infarctus du myocarde et dans ce contexte, un modèle transgénique de surexpression de Nampt est protecteur (Hsu et al. 2009). Par contre, il n'est pas encore connu si la NAMPT est bénéfique ou déterminante pour la pathophysiologie cardiaque et comment la biosynthèse de NAD⁺ dans le myocarde est régulée par la iNampt et la eNampt dans les conditions pathologiques.

2. NAD myocardique

La dysfonction mitochondriale s'accompagne par une hyperacétylation des protéines mitochondriales qui constitue une régulation positive du remodelage pathologique dans l'IC chez la souris et chez l'homme.

La normalisation du ratio NADH/NAD dans le cœur, par des approches génétiques ou pharmacologiques, allège l'hyperacétylation et abolit le mécanisme pathologique et ralentit l'évolution de l'IC.

Dans les tissus cardiaques de patients d'insuffisance cardiaque avec une cardiomyopathie dilatée ou ischémique, il y a un fort niveau d'acétylation comparé aux personnes saines. De plus, la surcharge de pression générée par la constriction aortique (TAC) aboutit à une augmentation du ratio NADH/NAD⁺ et une hyperacétylation des protéines mitochondriales, d'où la corrélation entre l'acétylation des protéines sensibles à NAD⁺ et le développement de l'IC. L'élévation de la synthèse du NAD par l'intermédiaire de la voie de sauvetage du NAD, comme la supplémentation en NMN ou la surexpression de nampt dans le cœur, n'a pas affecté la fonction cardiaque dans les souris contrôles (Lee et al. 2016).

Cette normalisation de ce ratio, restaure l'activité de Sirt 3 inversant ainsi l'hyperacétylation des protéines mitochondriales dans des modèles de pathologie cardiaque comme l'hypertrophie cardiaque comme la TAC ou le traitement avec l'isoprotérol.

Un modèle murin de déficience en complexe I mitochondrial constitue un modèle de compréhension du mécanisme par lequel la dysfonction mitochondriale module la réponse de stress cellulaire via l'acétylation de protéines dépendante du ratio NADH/NAD (Lee et al. 2016).

III. La kinase Nmrk2: un nouvel acteur dans le remodelage cardiaque

A. Profil d'activation dans différentes pathologie cardiaques

Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années au rôle particulier que joue SRF dans l'expression coordonnée de nombreux gènes et le maintien des fonctions cardiaques. SRF est activé par différentes voies biomécaniques dans l'hypertrophie du myocarde (Kuwahara et al. 2007). Inversement, SRF est désactivé au niveau transcriptionnel dans certaines formes de CMD comme les laminopathies (Ho et al. 2013) ou clivé au niveau protéique suite à une infection entérovirale conduisant à une CMD (Chang et al. 2003; Wong et al. 2012). et dans l'insuffisance cardiaque chez l'homme par la caspase 3 (Chang et al. 2003).

Un modèle inductible d'inactivation ciblée du gène SRF dans le cœur chez la souris adulte (SRFHKO), conduit au développement d'une CMD (Parlakian et al. 2005). Différents cribles transcriptomiques et protéomiques ont été réalisés pour comprendre la réponse du myocarde à la perte d'expression de SRF. Ils ont permis de montrer que SRF « co-régule » des gènes impliqués dans la contraction et les flux énergétiques (ex : actine cardiaque, myosine, créatine kinase musculaire,..) (Diguët et al. 2011) ou des microARNs comme miR-1 impliqué dans la réponse hypertrophique et la régulation des flux calciques (Tritsch et al. 2013) ou les miR-378 et -378* impliqués dans la réponse hypertrophique et la régulation du métabolisme (Mallat et al. 2014).

Une analyse du crible Affymetrix réalisée grâce au logiciel Ingenuity pathway a mis en évidence, outre la répression des gènes impliqués dans la contraction et la β -oxydation des acides gras, l'activation d'une voie de sauvetage particulière du NAD. Cette voie est caractérisée principalement par l'activation de la kinase Nmrk2 ainsi que des phosphatases (Acp1, Acp12) d'enzymes 5' nucléotidases (NT5c2, Nt5ecto (CD73) impliquées dans l'homéostasie et les échanges de nucléotides (Figure 15).

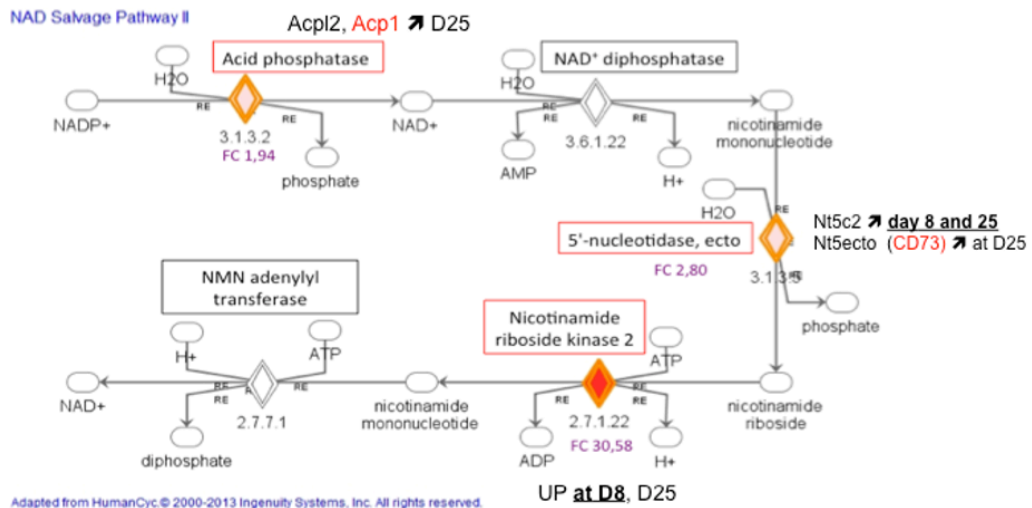


Figure 15: Activation de la voie de sauvetage du NAD de type II

Les phosphatases acides de type Acp1 de large spectre sont connues pour différentes fonctions dont des activités phosphotyrosine phosphatase réprimant la signalisation du récepteur à l'insuline ou de la FAK et riboflavine mononucleotide phosphatase. Son activité sur le NADP est théorique. La 5'-nucléotidases membranaire CD73 permet d'apporter une source de nicotinamide riboside à partir du nicotinamide mononucléotide extracellulaire (Grozio et al. 2013). Les 5'-nucléotidases cytosoliques sont connues pour dégrader l'AMP et l'IMP en adénosine et inosine en situation d'ischémie cardiaque (Bak and Ingwall 1998) mais son rôle n'est pas connu dans la CMD. Leur activité sur le nicotinamide mononucléotide est théorique.

L'activation précoce de la kinase Nmrk2 d'un facteur ≈ 9 dès 8 jours après la perte de SRF, un stade qui est encore asymptomatique sur le plan fonctionnel, a attiré notre attention, ainsi que son augmentation progressive avec la mise en place de la CMD et l'apparition de l'insuffisance cardiaque jusqu'à 30 fois le niveau normal à 25 jours et 57 fois après une administration de phényléphrine (PE, 80 mg/kg/j du jour 10 à 25) accélérant la transition vers l'insuffisance cardiaque dans ce modèle. Ce même traitement PE chez les souris contrôle induit une hypertrophie du VG sans insuffisance cardiaque, et active le gène Nmrk2 d'un facteur 4.6.

Nous avons également interrogé la base de données GEO (Gene Expression Omnibus) pour comprendre si l'expression de Nmrk2 était modulée dans d'autres modèles de pathologie cardiaque. Nmrk2 est clairement induit dans d'autres modèles murins de cardiomyopathie dilatées tel que le modèle Emery-Dreifuss de mutation du gène lamine A H222P (Muchir et al. 2007) (induction confirmée par qPCR dans une étude en collaboration avec A. Muchir, Institut de Myologie, Paris) ou le modèle de surexpression de formes mutées de l'isocitrate déshydrogénase 2 (Akbay et al. 2014). Nmrk2 est également activé chez le double mutant $PGC1\alpha^{-/-}/\beta^{-/-}$ (Martin et al. 2014) et par des procédures comme le pré-conditionnement ischémique (Eckle et al. 2012). Il semble que Nmrk2 est modulé à la hausse ou à la baisse de manière modeste ($<2X$) dans différentes études sur les

cardiomyopathies dilatées humaines, notamment d'origine diabétique (Greco et al. 2012) mais il faut noter que son niveau d'expression de base dans le cœur humain est plus haut que chez la souris. Le profil d'expression de *Nmrk2* dans les cardiomyopathies humaines reste cependant à explorer dans des études plus ciblées.

De manière intéressante, l'induction de *Nmrk2* dans les modèles souris de pathologies cardiaques est à l'opposé de la diminution observée pour l'autre enzyme principale impliquée dans la biosynthèse du NMN qui est la *Nampt* (nicotinamide phosphoribosyltransferase) (**Figure 2**) dans plusieurs modèles de RC tels que l'ischémie-réperfusion, la constriction aortique ou l'administration d'Angiotensine II (Hsu et al. 2014).

B. Rôle dans la signalisation intégrine

La Muscle integrin Binding Protein (MIBP) était le premier nom du gène *Nmrk2*. Il a été montré dans les cellules musculaires C2C12, que cette protéine est impliquée dans la signalisation intégrine. Les études ont montré l'interaction de cette petite protéine de 19 kDa au domaine intracellulaire le plus proche de la membrane, partagé par les deux isoformes d'intégrines $\beta 1A$ et $\beta 1D$. Elle interagit avec l'intégrine $\beta 1$ associée à l'intégrine $\alpha 7$, et sa surexpression stimule via un mécanisme inconnu la phosphorylation de la paxilline et inhibe le dépôt de la laminine dans la matrice extracellulaire (MEC) (Li et al. 2003). Par ailleurs, Il a été montré que sa surexpression dans les cellules musculaires C2C12, perturbe la formation des myotubes (Li et al. 1999).

Cependant l'absence de *Nrk2b* (homologue de *Nmrk2*) chez le poisson zèbre entraîne également un défaut de dépôt de la laminine et des anomalies de la morphologie musculaire, des jonctions myotendineuses discontinues aboutissant à de longues fibres musculaires anormales (Goody et al. 2010) suggérant que le taux d'expression de *Nmrk2* doit être régulé précisément pour obtenir une morphogénèse musculaire et matricielle normale (Figure 16).

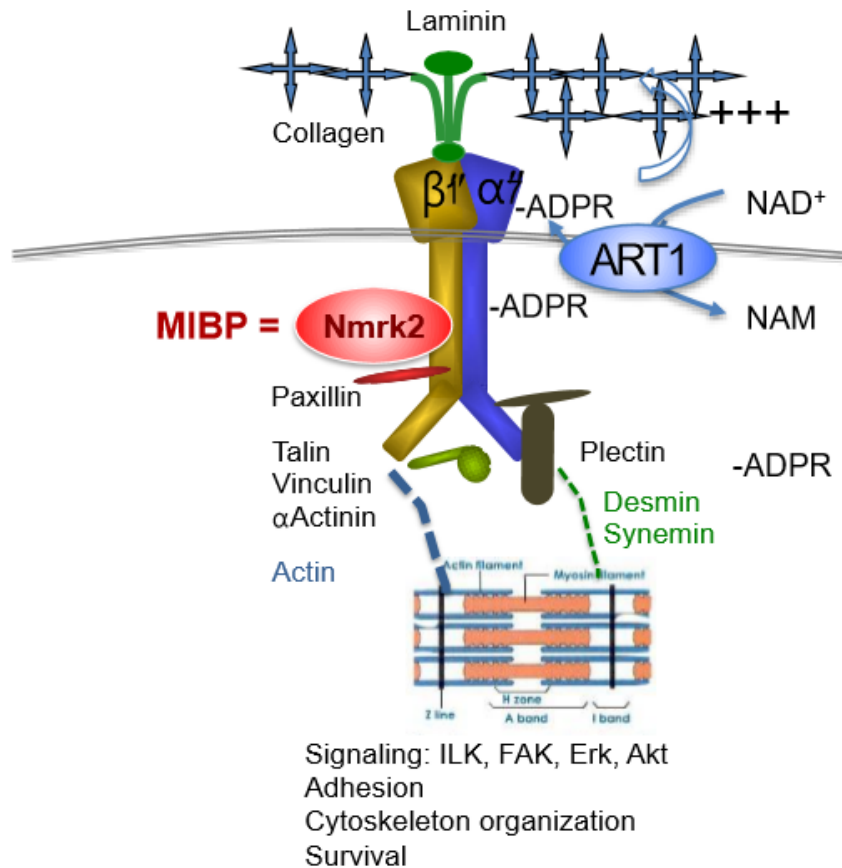


Figure 16: Implication de NMRK2 dans la signalisation intégrine

MIBP interagit avec l'intégrine $\beta 1$ associée à l'intégrine $\alpha 7$, et sa surexpression stimule indirectement la phosphorylation de la paxilline et inhibe le dépôt de la laminine. L'intégrine $\alpha 7$ peut être ADPribosylée par l'ectoenzyme ART1 stimulant son affinité pour la laminine. Le lien entre ce processus et Nmrk2 n'est pas connu.

C. Biosynthèse du NAD

Plus récemment, une fonction complètement nouvelle a été découverte pour cette protéine. En effet, l'équipe de Charles Brenner a cloné le gène *Nrk* impliqué dans la voie de synthèse du NAD chez la levure à partir du NR et a identifié les homologues *Nmrk1* et *Nmrk2* chez l'homme (Bieganowski and Brenner 2004). NMRK2 s'est révélée être similaire à MIBP qui serait issue d'un épissage alternatif du même gène *Nmrk2*.

Nmrk1 semble être exprimée de manière ubiquitaire alors que *Nmrk2* est spécifique des muscles striés (cœur, muscle squelettique) d'après l'interrogation de la banque de donnée GEO (Gene Expression Omnibus). Les mécanismes régulant l'homéostasie du NAD dans le myocarde et le

muscle sont mal connus et la production de NMN précurseur du NAD par la kinase NMRK2 pourrait jouer un rôle dans ces processus.

OBJECTIFS

En dépit des progrès majeurs dans le domaine de la recherche cardiovasculaire et l'amélioration de la prise en charge des patients atteints d'IC, cette maladie reste une maladie grave, de mauvais pronostic et elle constitue toujours l'une des premières causes de mortalité et de morbidité dans les pays développés. En effet, plus de 50% des patients meurent dans les cinq années suivant le diagnostic. La compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents, encore largement inconnus, permettrait de développer des thérapeutiques visant à soigner les causes de l'IC plutôt que les conséquences et ainsi d'améliorer la prise en charge des patients. Le cœur en insuffisance se caractérise par une altération fonctionnelle associée un remodelage structural et une défaillance bioénergétique qui n'est pas actuellement abordée par les approches cliniques classiques. Le nicotinamide adénine dinucléotide est un coenzyme majeur pour les réactions d'oxydoréduction et il constitue le principal donneur d'électrons à la chaîne respiratoire. Il a récemment émergé comme molécule de signalisation avec une large gamme d'activités, allant de calcium (Ca²⁺) signalisation (CD38 ectoenzyme) à la régulation épigénétique de l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif, le métabolisme catabolique et la biogenèse mitochondriale (sirtuines et PARPS)

Notre étude vise à comprendre le rôle de *Nmrk2* dans le cœur à l'état basal et dans le contexte d'un stress cardiaque et déterminer son impact sur la signalisation NAD et la signalisation intégrine qui peuvent toutes les deux jouer un rôle important dans le remodelage cardiaque. La fonction de cette kinase n'a jamais été étudiée *in vivo* chez les mammifères. Nous avons donc généré un modèle d'inactivation du gène *Nmrk2* chez la souris pour déterminer formellement la fonction de ce gène.

Nous nous sommes intéressés en premier temps à l'analyse du phénotype cardiaque des souris *Nmrk2-KO* à l'état basal sur le plan fonctionnel (échocardiographies, tests d'endurance), structural et moléculaire (synthèse et signalisation NAD, signalisation intégrine).

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à analyser le phénotype des souris *Nmrk2 KO* exposées à un stress induisant un remodelage cardiaque : administration d'angiotensine II et/ou stress hémodynamique par constriction de aortique transverse (TAC : transversal aortic constriction). Les réponses en termes de fonction cardiaque, de remodelage et de signalisation analysées chez les souris *Nmrk2 KO* en comparaison avec les souris contrôles. Ces deux premiers points font l'objet de l'article 1.

Enfin, nous avons contribué à une étude les effets de la supplémentation de la nourriture en NR, i) sur le remodelage cardiaque hypertrophique (modèle TAC, analyses en cours) ou ii) sur le remodelage de dilatation en traitant les doubles mutants SRF^{HKO} (article 2).

RESULTATS

Le remodelage cardiaque est associé à des changements majeurs dans le niveau d'expression des gènes. De telles modifications de l'expression génique peuvent être qualifiées de remodelage transcriptionnel au cours duquel on observe de forte variation de l'activité de facteurs de transcriptions comme les facteurs SRF (Serum Response Factor), MEF2 (Myogenic Enhancer Factor), GATA4 ou NFAT. Ce remodelage transcriptionnel peut être considéré comme adaptatif dans certains cas mais souvent la persistance de cette réponse devient maladaptative et joue un rôle majeur dans l'évolution de la pathologie. Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années au rôle particulier de que joue SRF dans l'expression coordonnée de nombreux gènes et le maintien des fonctions cardiaques. SRF est désactivé dans certaines formes de CMD comme les laminopathies (Ho et al. 2013) et dans l'insuffisance cardiaque chez l'homme (Chang et al. 2003).

Dans le laboratoire, a été mis au point un modèle inductible d'inactivation ciblée du gène SRF dans le cœur chez la souris adulte, cette inactivation conduit au développement de CMD (Parlakian et al. 2005). Dans ce modèle de souris, un criblage transcriptomique a permis d'identifier le gène *Nmrk2* comme le gène le plus précocement et le plus fortement induit en réponse à la perte d'expression de SRF et de ses gènes cibles impliqués dans la contraction et les flux énergétiques (ex : actine cardiaque, myosine, créatine kinase musculaire,..) (Diguet et al. 2011) ou des microARNs dépendants de SRF (Tritsch et al. 2013). L'expression de *Nmrk2* augmente d'un facteur 4 dès 8 jours après la perte de SRF, un stade qui est encore asymptomatique, et augmente progressivement avec la mise en place de la CMD et l'apparition de l'insuffisance cardiaque jusqu'à 30 à 50 fois le niveau normal selon les stades. Dans ce modèle de CMD, j'ai participé à un projet qui visait à traiter les souris avec le substrat -NR- de cette kinase NMRK2 et en effet, ce traitement a amélioré de manière remarquable, la fonction cardiaque et a pu limiter le remodelage excentrique (Article 2).

Mon projet de thèse vise à étudier le rôle de la kinase NMRK2 *in vivo*, à l'état basal et dans un contexte pathologique et les résultats de cette étude se résument comme suit :

1. Dans un premier temps, nous avons généré Les souris *Nmrk2* *-/-* par recombinaison homologe, un KO complet a été réalisé. La cassette de sélection utilisée comporte le gène rapporteur Lac Z pour détecter la localisation de la protéine et un gène de résistance à la néomycine. Les résultats montrent que *Nmrk2* est un gène spécifique du muscle strié et du cœur. Les souris sont viables et fertiles.

2. Ensuite nous avons analysé le phénotype des souris Nmrk2-KO exposées à deux types de stress cardiaque : administration d'angiotensine II et TAC. Les souris Nmrk2-KO étaient capables de développer une réponse hypertrophique normale face à l'angiotensine II mais les échocardiographies à partir de 8 semaines de TAC et au cours du vieillissement (6 à 24 mois) montre une diminution plus sévère de la fraction d'éjection cardiaque et le développement d'une CMD se stabilisant toutefois après 12 mois.
3. Au niveau génomique, les RT-QPCR montrent notamment une augmentation du niveau d'expression de l'isoforme lente β de la chaîne lourde de la myosine, à partir de 12 mois.
4. Au niveau métabolique, NMRK2 ne s'avère pas nécessaire pour maintenir le pool total de NAD myocardique en réponse aux stimulations pro-hypertrophiques et chez l'animal jeune et adulte. Par contre, il y a un fort déclin à 24 mois d'âge du niveau d'expression des gènes Nmrk1 et de Nampt, codant pour des enzymes qui comme NMRK2 produisent du nicotinamide mononucléotide précurseur du NAD⁺. Les souris Nmrk2-KO montrent une diminution de 50% des niveaux de NAD à 24 mois.
5. A ce même stade, le complexe intégrine $\alpha 7\beta 1$ est réprimé. Au niveau histologique, les analyses immunofluorescentes et la MET révèlent un défaut dans le dépôt de la laminine au niveau de la lame basale et des espaces intra-cellulaires élargis chez le mutant Nmrk2-KO. Le marquage Rouge Sirius confirme le développement de fibrose cardiaque.

La suite de ce projet sera de mieux comprendre le mécanisme qui mène à ce défaut de dépôt de la laminine. Une de nos hypothèses est en rapport avec le fait que l'intégrine $\alpha 7$ peut être ADP-ribosylée par l'enzyme ART1, ce qui nécessite du NAD⁺ (Zolkiewska et al, Biochem J, 2005). Nous faisons l'hypothèse que NMRK2 pourrait être nécessaire pour la production locale de NAD pour induire cette modification post-traductionnelle, qui a été décrite comme renforçant l'affinité de l'intégrine $\alpha 7$ pour la laminine (Zolkiewska et al, Biochem J, 2005).

Et enfin, la dernière partie du projet concernant plus spécifiquement le rôle de NMRK2 dans la CMD qui se développe chez le mutant SRF nous a mener à générer des doubles mutants Nmrk2-KOxSRF-HKO. Nous avons commencé à croiser le mutant SRFHKO avec le mutant Nmrk2 KO pour empêcher l'induction du gène Nmrk2 chez le mutant SRF-HKO et observer les conséquences en termes de fonction et de remodelage cardiaque, et en terme de temps de survie.

Article 1

Dilated Cardiomyopathy in Mice Lacking NMRK2/MIBP, a Protein with a Dual Role in NAD⁺ Synthesis and Integrin Signaling

Cynthia Tannous^{1, 2}, Robin Deloux¹, Nathalie Mougnot³, Jocelyne Blanc², Dean Burkin⁴, Gareth Lavery⁵, Dario Coletti², Zhenlin Li², Mathias Mericskay^{1, ¶}

¹ INSERM UMR-S 1180, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France.

²INSERM U1164 / CNRS UMR 8256, Biologie de l'Adaptation et du Vieillissement, Institut de Biologie Paris-Seine, Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 6, DHU FAST, Paris, France

³ ICAN, Plateau d'Expérimentation Cœur, Muscle, Vaisseaux, GH Pitié Salpêtrière.

⁴ NV 89557, Department of Pharmacology/MS573, Center for Molecular Medicine, University of Nevada School of Medicine, Reno, U.S.A.

⁵ B15 2TT, Institute of Metabolism and Systems Research (IMSR), College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom.

¶Corresponding author: mathias.mericskay@inserm.fr

ABSTRACT

Aims-Dilated cardiomyopathy (DCM) is a severe heart disease characterized by reduced systolic function, extracellular matrix disorganization and metabolic defects. In various mouse models of DCM, we found a robust increase in the expression of the nicotinamide riboside kinase 2 (*Nmrk2*) implicated in the synthesis of NAD, a major coenzyme in energy metabolism and a signaling molecule used by sirtuins. NMRK2 protein is similar to the muscle integrin binding protein (MIBP) that binds to the integrin $\alpha7\beta1$ heterodimer. The role of *Nmrk2* in the heart is unknown. **Methods and Results-**We generated *Nmrk2-KO* mice that were viable. Young *Nmrk2-KO* mice were able to develop a normal cardiac hypertrophic response to angiotensin-II exposure and transverse aorta constriction (TAC) but follow-up echocardiography until 8 weeks post-TAC and during ageing from 5 to 24 months revealed a more severe decrease in the ejection fraction (EF) and the development of a DCM phenotype. RT-qPCR analysis of cardiac mRNAs showed an increase in the slow, cardiac, β myosin heavy chain isoform starting at 12 months. NMRK2 was not essential to maintain myocardial NAD levels in response to pro-hypertrophic treatments and in young adults. However *Nmrk1* and *Nampt* expression level declined strongly with aging and *Nmrk2-KO* mice displayed a 50% reduction in myocardial NAD levels at 24 months. The $\alpha7\beta1$ integrin complex was repressed at this age. At the histological level, immunofluorescent analyses and electron microscopy revealed a defect in laminin deposition in the basal lamina and enlarged intercellular space in the *Nmrk2-KO* heart. Red sirius staining confirmed the development of cardiac fibrosis. **Conclusion-**The *Nmrk2* gene is required to preserve cardiac function and structure during ageing and becomes a major component of the NAD biosynthetic pathways at late age. Molecular characterization of compounds modulating this pathway could give future therapeutic prospect.

INTRODUCTION

Dilated Cardiomyopathy (DCM) is a severe heart disease characterized by the dilation of the left and right ventricles leading to a systolic dysfunction and reduced ejection fraction, without hypertension or pressure overload or coronary artery disease sufficient to cause global systolic impairment ^[1, 2]. DCM most often leads in its final stage to heart failure (HF) and is the principal cause of heart transplantation in the western world ^[3]. The lack of specific therapeutic options for DCM patient drives the need for further research on the molecular mechanisms involved in the remodeling of cardiac chamber and the transition toward HF to identify new therapeutic avenues for this disease. There are genetic and non-genetic causes to DCM. Mutations in 30 genes encoding mostly but not only cytoskeletal or sarcomeric proteins, have been identified in monogenic forms of DCM though modern high-throughput genome sequencing approaches suggest that multiple gene variants may be involved in some cases ^[2, 4]. Non-genetic causes are linked to exposure to toxins such as alcohol or anthracyclines, or enteroviral infection (myocarditis) but the susceptibility to develop DCM and ultimately HF is likely to be modulated by genetic mechanisms ^[2].

A major issue for the development of therapeutic molecules for rare diseases like DCM resides in the fact that developing drugs for each different subtype of patients with different genetic etiologies is a strategy that can only be supported by public health programs as the economical incentive for pharmaceutical companies is limited. If only for the reason of feasibility, an appealing alternative strategy to a “single cause single cure” approaches to identify potential therapeutic targets that will be common to DCM with different etiologies, allowing designing a drug useful for the largest number of patients. A common feature to many forms of DCM is the combination of cardiac structural remodeling, which involves major alterations in cardiomyocytes shape as well as cell-to-cell and cell-to-extracellular matrix interactions; and metabolic remodeling, which involves mitochondrial dysfunction and depressed energy transfer through the creatine-phosphocreatine shuttle ^[5, 6]. Several gene expression profiling studies performed in different animal models of DCM and human DCM patients have shown that these defects are associated with major changes in the expression level of cardiac genes encoding

sarcomeric proteins, cytoskeleton linkers and components of the plasma membrane complexes like the integrin receptors and the dystrophin-glycoprotein complex connected to the extracellular matrix ^[7, 8]. Genes encoding proteins involved in the regulation of energy metabolism, notably glycolysis, fatty acid β -oxydation and mitochondrial oxidative metabolism are also clearly depressed in DCM ^[9]. Changes in a gene expression level is commonly regarded as an indication of a potential role for the gene product in the pathogenic process or as a possible adaptation mechanism of the organ to activate rescue pathways in response to pathological injuries.

With the aim of identifying pathways common to different forms of DCM, we searched in publicly available data sets from transcriptomic screens directed to cardiac gene expression profiling in DCM. We identified a gene that has two names in different databases, integrin β 1 binding protein 3 (*Itgb1bp3*) or nicotinamideriboside kinase 2 (*Nmrk2*, official symbol), as very strongly upregulated in several animal models of DCM with different etiologies. *Nmrk2* expression is increased in several models of DCM related to phospholamban missense mutation PLNR9C/+ [9], lamin-A H222P mutation (GEO dataset GDS2746) ^[10], isocitrate dehydrogenase 2 mutations (GDS4893) ^[11], cardiac-specific PPAR coactivator 1-alpha (PGC1 α) deletion (GDS4776) ^[12], or transferrin receptor Tfr1 deficiency (GDS4776) ^[13]. In our own model of Serum Response Factor cardiac-specific knock-out mice that develop a severe DCM phenotype evolving to terminal HF, *Nmrk2* is strongly upregulated ([GSE84142](#)) ^[14]. Our examination of recent RNA-seq studies on cardiac biopsies of DCM patients revealed that *Nmrk2* can be upregulated in some individuals though the baseline expression level appears to be higher in human non failing hearts ^[15].

The first identification of this gene and functional analysis of the protein product, of *Itgb1bp3*, the muscle-specific β 1 integrin binding protein (MIBP) came from a yeast two-hybrid screen for β 1 integrin cytoplasmic tail ^[16]. The mRNA of this gene was detected predominantly in the heart in humans. These authors showed that overexpression of MIBP in C2C12 skeletal muscle cell line disrupts the formation of myotubes. MIBP interacts with the α 7 β 1 integrin heterodimer and stimulates via an unknown mechanism the phosphorylation of paxillin, an integrin binding

protein, and inhibits the deposition of laminin the extracellular matrix ^[17]. Strikingly a mutation of the *Nrk2b* gene, the homologue in zebrafish of mammalian *Nmrk2/Itgb1bp3* gene also causes a defect in the deposition of laminin and abnormal muscle morphology ^[18] suggesting that the expression level of *Nmrk2/Itgb1bp3* must be regulated precisely for coherent morphogenesis of muscle and extracellular matrix. In a different field of research, the group of Charles Brenner identified a previously unknown but apparently conserved eukaryotic NAD⁺ biosynthetic pathway mediated by the nicotinamideriboside kinase gene *Nrk1* in yeast and *Nmrk1* and *Nmrk2* genes in humans. *Nmrk2* was described as encoding a 230 amino acid (aa) splice variant (26 kDa) of the previously described 186 aa MIBP protein ^[19]. While MIBP was unable to phosphorylate the nicotinamideriboside, a B3 vitamin precursor of the NAD⁺, the full length NMRK2 was as efficient as NMRK1. In the actual build of GenBank, the human full length predicted isoform 1 is 235 a.a long and the 186 aa MIBP variant is not described anymore, though a different 150 aa variant (isoform 2) is now reported that presents similarities with MIBP.

The mouse *Nmrk2* gene is described in NCBI GenBank as producing a single 195 amino-acids protein (22.4 kDa) that contains the catalytic domain present in human NMRK1 and full-length human NMRK2 proteins with whom it is shares 83% identity.

Considering that *Nmrk2* was involved both in **i)** integrin signaling and extracellular matrix composition which are major altered mechanism in DCM ^[7]; **ii)** synthesis of NAD⁺, a hydride transfer coenzyme in the oxidation of energetic substrate and mitochondrial oxidative phosphorylation metabolism, and a cosubstrate in signaling pathways such as Sirtuins deacetylases, poly(ADPribose) polymerases (PARPs), and CD38 ADP ribosecyclase, regulating energy metabolism,, resistance to oxidative stress and calcium signaling, all important mechanisms involved in cardiac remodeling ^[20], we postulated that *Nmrk2* could play a role in the heart during development or in the adult. Here we present the first analysis of *Nmrk2* knock-out mice showing its important role in cardiac functions and remodeling during ageing.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic mice

All experiments with animals conformed to the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and were approved by the ethics committee Charles Darwin #5 (agreement 00369.01). ES cells heterozygous for the $Nmrk2^{tm1(KOMP)VICg}$ allele were obtained from the Knockout Mouse Project Repository ([KOMP](#)). Definitive null allele was obtained by replacement of all exons and introns of the *Nmrk2* gene by a lacZ reporter gene followed by floxed neomycin resistance gene in VGB6 ES cells in C57BL/6NTac genetic background. ES were implanted in C57BL/6N blastocysts at CNRS-TAAM Transgenic animals facility ([TAAM](#)), Villejuif, France. Mice were maintained in this background. Homozygous *Nmrk2-KO* mice were viable and fertile.

SRF^{HKO} mice bear the tamoxifen-inducible α -MHC-*MerCreMer* transgene and the *Srffloxed* allele (*Sf/Sf*) as described previously ¹⁹. Tamoxifen (Sigma T5648) was administrated by i.p. injection at a dose of 0.7 mg diluted in 100 μ l peanut oil at D0, D1 and D2 to *SRF^{HKO}* mice and *Sf/Sf* littermates used as controls.

Transverse aortic constriction (TAC)

Mice were anesthetized with 2% isoflurane. The neck was opened to release the trachea quietly and gently the skin is cut and the muscle above the trachea gently spread in order to visualize the trachea and to verify that the introduction of the intubation cannula is done correctly. Then the respirator is connected and switched on (about 170 strokes/minute and V = 200 μ l for 30g. TAC was created using 7.0 suture banded between the carotid arteries over a 27-gauge needle. The needle was then gently removed, creating a constriction. The heart accelerates immediately. The 27-gauge needle was then removed and a 6.0 suture was done. Following chest closing and skin suturing, mice were allowed to recover and continued with the experimental process.

Angiotensin-II administration

Angiotensin-II (SIGMA-Aldrich, St Louis, MO, USA, #A9525) was dissolved in 150mM NaCl and 1mM acetic acid. Angiotensin-II was delivered chronically at a rate of 3.0µg/g of body weight/day for 14 days by implanting osmotic mini-pumps (ALZET 2002) subcutaneously.

X-Gal staining

X-Gal detection of the *LacZ* reporter gene product was performed as follows: The embryo as well as the different organs were fixed 30 minutes at 4°C in 1% formaldehyde, 0.02% NP40, 0.01% Sodium deoxycholate in PBS 1X pH 7.4, then washed in PBS 1X solution containing 0.02% NP40, 0.01% and 0.01% Sodium deoxycholate. The coloration was then performed overnight at 30°C with agitation in PBS solution containing 1mg/ml X-Gal, 5mM MgCl₂, 5mM K₃Fe(CN)₆, K₄Fe(CN)₆ 0.02% NP40, 0.01% Sodium deoxycholate^[21].

NicotinamideRiboside supplementation

For NR supplementation experiments, NR (kindly supplied by Chromadex Inc., Irvine, USA) was dissolved in the drinking water at 2 mg/mL in light-protected bottles and changed every 3 days for a period of 40 days. For a measured average water consumption of 6 ml/day/mouse of 25 to 30 g, it corresponds to an average dosage of 400 to 480 mg NR/kg/day.

Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed on lightly anesthetized mice given isoflurane (induction with 2% isoflurane 100% O₂ and maintained with 0.5% isoflurane 100%). Non-invasive measurements of left ventricular dimension were evaluated using Doppler echocardiography (Vivid 7 Dimension/Vivid7 PRO; GE Medical Systems) with a probe ultrasound frequency range of 9–14 MHz. The two-dimensionally guided time motion recording mode (parasternal long-axis view) of the left ventricle (LV) provided the following measurements: diastolic and systolic septal (IVS) and posterior wall thicknesses (LVPW); internal end-diastolic (LVEDD) and end-systolic diameters (LVESD); and heart rate. Each set of

measurements was obtained from the same cardiac cycle. At least 3 sets of measurements were obtained from 3 different cardiac cycles. LV fractional shortening (FS) was calculated using the formula: $(LVEDD-LVESD)/LVEDD \times 100$. LV myocardial volume (LVV), LV end-diastolic volume (EDV), and end-systolic volume (ESV) were calculated using a half-ellipsoid model of the LV. From these volumes, LV ejection fraction (EF) was calculated using the formula: $(EDV-ESV)/EDV \times 100$.

RNA Extraction and Quantification

cDNAs were reverse transcribed from 1.5 µg RNA extracted in TRIZOL (Thermofisher) from cardiac tissue using the superscript II Reverse transcriptase (Life Technologies). Quantitative PCR was carried out on a Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) using Fast Start SYBR Green Master (Roche Diagnostics). Quantification of gene expression was calculated as $R=2^{\Delta\Delta Ct}$ (Ref Cp-target Cp), with GAPDH or HPRT used as a reference. Primers were designed using the NCBI Primer Blast Software.

Western Blot Analysis

Proteins were homogenized in a lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.4) containing protease inhibitors (1mM Phenylmethylsulfonyl fluoride, 5mM EDTA, E64, Aprotinin) and phosphatases inhibitors (1mM Sodium Orthovanadate, 40 mM β-Glycerophosphate, 30mM NaF, 20 mM Sodium pyrophosphate). Equal amounts of proteins (20 to 30 µg) were separated on one-dimensional PAGE using the NuPAGE® Novex® 4–12% Bis-Tris Bolt Gel from [Invitrogen](#) according to the manufacturer's instructions. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond C, Amersham Biosciences) and the blots were saturated in TBS buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 136.8 mM NaCl, and 0.1% (v/v) Tween 20) containing 5% (w/v) milk. Proteins were detected by overnight incubation at 4°C with primary antibodies, followed by HRP-labeled secondary antibodies (1:2500) and then exposed to ECL (OzymeRevelBlot® Plus) and scanned on FUJIFILM LAS3000 systems.

Target Protein	Antibody Supplier. ref #	Dilution
NMRK2 (MIBP)	Gareth Lavery's lab	1:500
Extracellular signal-regulated kinase (ERK)	Cell signaling #4695	1:1000
Phospho-ERK	Cell signaling #4370S	1:1000
Paxillin (PAX)	Cell signaling #2542S	1:1000
Phospho-PAX	Cell signaling #2541S	1:1000
Integrin α 7	Dean Burkin's lab	1:200
GAPDH	Sigma #G9545	1:3000

Immunofluorescence staining

Hearts were harvested after cervical dislocation. Frozen heart sections (8 μ m) were fixed in 3.7% formaldehyde in PBS at room temperature (RT) for 10 minutes followed by permeabilization in PBS/Titon X100 (0.2%) for 10 minutes. Saturation of non-specific sites with 2% BSA and 10% of goat serum. Sections were incubated o/n at 4°C with primary antibodies diluted in saturation solution. The day after, sections were incubated with Cy3-coupled secondary antibodies (1:400, Jackson ImmunoResearch) or Alexa 488 coupled secondary antibodies (Invitrogen, 1:400) and Cy3 coupled anti rat (Jackson ImmunoResearch, 1:500) or Cy3 coupled anti rabbit (Confocal images were acquired on LEICA with identical gain and offset parameters for all samples.

Target Protein	Antibody Supplier. ref #	Dilution
NMRK2 (MIBP)	MBL International Corp. #K0099-3, mouse monoclonal 5B4.7 (immunofluorescence)	1:100
Vinculin (FITC coupled anti-hVIN-1)	Sigma mouse monoclonal, F7053	1:500
Integrin α 7	Dean Burkin's lab, rabbit polyclonal	1:500
Laminin	Sigma rabbit polyclonal, #L9393	1:100
Laminin α 2	Sigma rat monoclonal, clone 4H8-2, #L0663	1:200

NAD extraction and quantification

NAD levels were measured using a colorimetric approach. Weighted frozen heart tissue (20 to 30 mg) were crushed in 10 volumes ($\mu\text{l}/\text{mg}$) of buffered ethanol (BE) (75% Ethanol, 25% HEPES 10mM pH7.1) ($20\mu\text{l}/\text{mg}$ of tissue) as previously described [22] Extracts were cold on ice for 20 minutes and then centrifuged 10 minutes at 13000 g. To determine the NAD^+ and NADH levels in the buffered ethanol extraction of myocardial metabolites, 5 μl of extract were diluted 1:10 in 10 mM HCl (45 μl) and heated at 60°C for 30 minutes to selectively destroy NADH. In these conditions we validated that over 95% of pure commercial NAD^+ is resistant to this treatment whereas 100% of pure commercial NADH is destroyed. Extracts were neutralized by the addition of 1/5 of the volume (10 μl) of 1 M Tris-HCl buffer pH 8. Total NADt levels corresponded to the same amount of extract heated in the neutralized solution instead of the acid solution. For each sample, 25 μL of NADt and NAD^+ extracts were quantified in duplicates by the addition of 100 μL of reaction buffer (600 mM ethanol, 0.5 mM 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2 mM phenazineethosulfate (PES), 120 mM Bicine (pH 7.8), yeast alcohol dehydrogenase (SIGMA A3263 >300 u/mg) 0.05 mg/ml). Kinetics of the reaction (OD at 570 nm, every 30 seconds for 40 minutes) was followed on a TECAN INFINITE F500 microplate reader. NADt and NAD^+ were quantified by comparison to a range of standard NAD^+ concentration (linear regression curve equation method). In this recycling assay, both NAD^+ and NADH are indistinctly detected in the NADt fraction. Levels of NADH were obtained by the formula: $[\text{NADH}] = [\text{NADt}] - [\text{NAD}^+]$. Data are expressed in pmole of NAD / mg of tissue.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

For transmission electron microscopy, the cells were washed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 and fixed in 2% glutaraldehyde for 1 h at room temperature. The samples were first washed in 0.1 M phosphate buffer and then in bidistilled water and finally post-fixed in 1% osmium-bidistilled water for 1 h at room temperature. After washes in bidistilled water, the samples were dehydrated in increasing concentrations of ethanol, infiltrated in 1:1 ethanol:epon resin for 1 h and finally 100% epon resin for 48 h at 60°C for polymerization. Seventy-nm-thick sections were cut with an ultracut UCT microtome (LEICA) and picked up

on copper rhodium-coated grids. Grids were stained for 2 min in Uranylless (DELTA Microscopies) for 5 min in 0.2% lead citrate. Grids were analysed on an electron microscope (EM 912 OMEGA, ZEISS) at 80 kV, and images were captured with digital camera (Side-Mounted TEM CCD, Veleta 2kx2k). The software used is iTEM.

RESULTS

Nmrk2 is a striated muscle specific protein

To analyze the function of the *Nmrk2* gene in vivo, all the 7 exons of the gene were replaced by a cassette including a *LacZ* reporter gene sequence and a neomycin resistance gene via homologous recombination in ES cells (**Fig. 1A**). ES cells bearing one null *Nmrk2* allele were injected in the inner cell mass of wild-type blastocysts to produce chimeric founders. Heterozygous *Nmrk2* +/- mice were obtained among chimeric founders offspring and bred together. Breedings generated homozygous *Nmrk2* -/- (KO) mice at the expected 25% Mendelian ratio at birth. No mortality or major macroscopic phenotype was observed during postnatal development and both *Nmrk2*-KO males and females were viable and fertile. We took advantage of the position of the *LacZ* reporter gene immediately downstream of the 5'-untranslated region of the *Nmrk2* gene coding sequence to analyze the expression pattern of the lacZ reporter that is expressed in replacement of the *Nmrk2* mRNA. In 2 month-old *Nmrk2* +/- adult mice, β -galactosidase activity resulting from *lacZ* expression was detected exclusively in the heart and skeletal muscles (**Fig.1C, E, F, G**). No activity was detected in brain, lungs and liver (**Fig.1D and data not shown**). *LacZ* expression was not detected at the early stages of embryonic development from 9.5 to 12.5 days post-coitum (d.p.c.) and started in developing muscle masses only at the fetal stage (14.5 d.p.c.). *Nmrk2* mRNA was quantified by real-time quantitative (RTq) PCR analysis in different tissues. *Nmrk2* mRNA was detected exclusively in the heart and skeletal muscles as the *lacZ* reporter. This results show that murine *Nmrk2* is a striated muscle-specific gene as reported previously for the human *Nmrk2* gene under the name of *MIBP*^[16]. The level of *Nmrk2* mRNA was higher in the gastrocnemius and plantaris that are rich in rapid glycolytic fibers than in the soleus postural muscle, a slow oxidative muscle and cardiac muscle that is highly oxidative (**Fig.1H**). Strikingly, the level of NMRK2 protein was inversed compared to the mRNA level so that the protein was clearly detected in wild-type heart protein extract and was below detection limit in the liver as expected but also in the gastrocnemius muscle in the same blot(**Fig.1I**). Upon longer exposure, NMRK2 protein may be faintly detected in gastrocnemius though at the cost of non-specific band appearance in other

parts of the gel (not shown). This observation suggests that either the translation of the *Nmrk2* mRNA is repressed in skeletal muscles or that the protein is less stable in this tissue than in the heart. In the mouse *SRF-HKO* model of dilated cardiomyopathy, NMRK2 protein was robustly induced in the failing heart but not in the gastrocnemius. To determine the cellular and subcellular localization of the NMRK2 kinase in the myocardium, immunofluorescent staining was performed for NMRK2 and for vinculin, a cytoskeletal linker present at the inner face of the sarcolemma membrane at intercalated disks and costameres. A partial overlap of these two proteins at the sarcolemma and intercalated disks of cardiomyocytes was observed in control hearts (**Fig. 1J**). When NMRK2 was highly increased in the *SRF-HKO* failing heart, in which cardiomyocytes are deformed and intercalated disks stretched and sinuous^[14], the NMRK2 staining still overlapped with vinculin in these same regions though it also appeared to increase in the cytosol of the most affected cardiomyocytes (**Fig. 1J**, asterisk). Altogether, these observations suggested that the *Nmrk2* gene function is to be exerted mainly in the heart.

Cardiac dysfunction and altered NAD homeostasis in young adult mice lacking *Nmrk2* following two weeks of TAC

To assess cardiac functions in the *Nmrk2-KO* mice, we performed echocardiography in adult mice at 2 months of age. We observed no differences in left ventricle ejection fraction (LVEF) and cardiac chamber dimensions in systole or diastole (**Table 1A**) at this age. *Nmrk2* is also known under the name of MIBP, or *Itgb1p3*, as a binding protein of integrin $\beta 1$. Integrin $\beta 1$ or its partners such as melusin (*Itgb1bp2*) play an important role in the transduction of biomechanical stress in the heart, especially in the context of hemodynamic loading leading to pressure-overload hypertrophy^[23, 24]. To assess the role of NMRK2 kinase in this context, we performed transverse aortic constriction (TAC) in *Nmrk2-KO* mice and compared the response to control mice subjected to the same procedure and followed the mice by echocardiography over a period of 8 weeks (**Table 1A and 1B**). We performed this experiment at 2 month of age when the response to TAC is maximal. There was no difference in mortality between the two groups of mice until 6 weeks. ANOVA statistics indicated a significant genotype effect of TAC on left

ventricle ejection fraction (LVEF) and most cardiac remodeling parameters, notably the increase in LV mass index (LVMI) and LV posterior wall thickness (LVPWT) but not for the transient increase of the interventricular septum thickness (IVST) that occurred at 2 weeks after TAC in both groups. The general trend over the survey period was that the decrease in LVEF and the dilatation and thinning of LV chamber was more pronounced in *Nmrk2-KO* mice.

In order to compare the response of *Nmrk2-KO* and controls hearts to the TAC procedure at the cellular and molecular level, we selected the stage of 2 weeks post-TAC, when the controls develop concentric cardiac hypertrophy whereas the KO mice develop a more eccentric type of cardiac remodeling. Echocardiography analysis on this second series of mice reproduced the results obtained in the first series (**Table 2**). After sacrifice, the hearts were weighted and processed for histological examination as well as mRNA, protein and metabolites extraction. The heart weight/body weight ratio was increased in both groups subjected to TAC compared to controls and *Nmrk2-KO* mice subjected to sham surgery (**Fig. 2A**). Immunostaining with anti-laminin $\alpha 2$ antibody allowed delineating cardiac fibers contours to perform histomorphometric analyses (**Fig. 2B**). The mean cross-sectional area (CSA) and diameter of cardiomyocytes (LV endomyocardium) was increased in WT and *Nmrk2-KO* mice following TAC compared to baseline but did not differ between the two groups (**Fig. 2C, D**). Frequency plot of cardiomyocytes CSA showed the decreased frequency of small to intermediate size cardiomyocytes and increased frequency of large cardiomyocytes in control and *Nmrk2-KO* mice subjected to TAC (Chi2 p value = 5.13E-08 and 3.28E-05 for controls TAC versus baseline and *Nmrk2-KO* TAC versus baseline, respectively) but no difference between the two TAC groups (**Fig. 2E**). TAC procedure increased the expression of cardiac stress markers to a similar extent in control and *Nmrk2-KO* mice (**Fig. 2F**). TAC increased the level of *Nmrk2* mRNA in control mice but decreased the expression of *Nmrk1* (**Fig. 2G**). TAC repressed *Sirt1* expression level in both genotypes (**Fig. 2H**). Changes in *Nampt* and *Sirt3* expression were not significant (**Fig. 2G, H**). Despite the modulations in *Nmrk2* and *Nmrk1* expression, myocardial NAD levels were unchanged in TAC compared to SHAM groups. TAC has been reported to recruit integrin and MAPK signaling^[24] and *Nmrk2* level has been linked to paxillin phosphorylation status in C2C12 skeletal myotubes^[17]. TAC increased

ERK1/2 phosphorylation, a target of MAPK signaling and decreased paxillinphosphotylation to a similar extent in both genotypes although there was already a trend of *Nmrk2-KO* mice to display lower paxillin phosphorylation level and higher ERK1/2 without TAC (**Fig. 2J, K**). Angiotensin-II delivered chronically at a rate of 3.0 mg/kg/day for 14 days was shown to induce a cardiac hypertrophy associated with a loss myocardial NAD in the mouse ^[25]. We used the same protocol for Angiotensin-II administration to control and *Nmrk2-KO* mice to determine the contribution of NMRK2 to the effect of Angiotensin-II on NAD homeostasis, cardiac dysfunction and hypertrophy. Since we had seen no difference in cardiac function at baseline and after TAC at 2 months of age, we performed the experiment of angiotensin-II chronic delivery in slightly older 7 month-old mice give more time for a potential cardiac phenotype to develop in *Nmrk2-KO* mice. Echocardiography analysis showed that LV end-diastolic diameter (LVEDD) increased and LV thickness to radius (h/r) ratio decreased at baseline in 6 month-old *Nmrk2-KO* mice compared to age-matched controls, together with a reduced LVEF and fractional shortening (FS) (**Supplementary Fig. S1**). Angiotensin-II decreased LVEF and FS in control mice but had no further impact on *Nmrk2-KO* mice though it increased LVMI and h/r ratio in both group as expected for an agonist triggering cardiac hypertrophy. We found that angiotensin-II trend to increase *Nmrk2* expression level in control mice but decreased *Nampt* expression level in both groups (**Supplementary Fig. S2A**). Angiotensin-II also decreased *Sirt1* but not *Sirt3* levels in control hearts while *Sirt1* was already depressed in *Nmrk2-KO*. Surprisingly, we found that in our hands angiotensin-II increased rather than decrease myocardial NAD levels in control hearts (**Supplementary Fig. S2A**). This increase was slightly less pronounced in *Nmrk2-KO* mice though it was still significant. On the other hand, angiotensin-II increased the expression level of cardiac stress markers like the BNP and the CTGF associated with cardiac fibrosis and decreased the expression of the NMRK2 binding partner integrin $\alpha 7$ and integrin signaling protein melusin (**Supplementary Fig. S3A**). Finally angiotensin-II increased perivascular fibrosis in controls, which was already higher at baseline and not further increased by angiotensin-II in *Nmrk2-KO* hearts (**Supplementary Fig. S3B**).

Nmrk2 mutants develop dilated cardiomyopathy with ageing

The previous analyses suggested that young *adult Nmrk2-KO* mice (2 to 3 months-old) have a subclinical phenotype that mildly worsen cardiac functions but does not totally impairs the ability of the myocardium to respond to pressure overload while 7 month-old *Nmrk2-KO* mice present mild cardiac remodeling and dysfunction. To determine if the cardiac phenotype of *Nmrk2-KO* mice evolves during ageing, we assessed cardiac function in 12 *Nmrk2-KO* mice and 8 wild-type control mice by serial echocardiography at 5, 8, 12 and 24 months. In the mutant group, two death events occurred before 8 months and 2 animals out of the remaining 10 mice died between 12 and 24 months. In the control group, 4 out of the 8 mice died between 12 and 24 months. From 5 till 12 months, a progressive and significant decrease in left ventricle (LV) systolic functions was evidenced in mutant mice compared to controls (**Fig.3A, B**). LV chamber dilated (**Fig. 3C, D**) and interventricular septum became thinner during this period (**Fig. 3E, F**), resulting in a decreased LV thickness/radius (h/r) ratio indicative of a DCM phenotype (**Fig. 3G**). These results indicate that the lack of NMRK2 triggers a progressive remodeling of the cardiac chambers and compromises cardiac performance at intermediate stages in adulthood life. However, after the age of 12 months, the cardiac functions remained subnormal, yet above 50% for the rest of the survey period until 24 months (**Fig. 3A, B**). In parallel, the process of LV chamber dilatation slowed down (**Fig. 3C, D**). During this second period of adulthood the LV walls seemed to regain thickness (**Fig. 3E, F**) in a process of age-associated hypertrophic remodeling that was also observed in the control mice during this period (**Fig. 3H**), raising the h/r ratio in the *Nmrk2-KO* mice (**Fig. 2G**).

To summarize, adult *Nmrk2-KO* mice develop a moderate cardiac dysfunction associated with DCM phenotype during ageing though it does not evolve towards terminal heart failure in the absence of stress in sedentary conditions.

Dysregulated gene expression in *Nmrk2-KO* mice during ageing

We assessed the consequence of NMRK2 loss on the cardiac gene expression by quantitative RT-PCR at the ages of 6 and months in independent series of mice and in the ageing cohort sacrificed at 24 months after the last echocardiography (**Fig. 4**). The expression of genes involved in cardiac remodeling change with ageing in both. The main difference between the control and the *Nmrk2-KO* group was at the level of the β MHC mRNA encoding the cardiac, slow isoform of myosin heavy chain, which increased progressively in both controls and mutants during ageing, but was always higher in the mutant at all ages. The level of *Serca2a*, the gene encoding the sarcoplasmic reticulum calcium pump ATPase and SOD1, the superoxide dismutase decreased with age as expected. Genes involved in the regulation of energy metabolism like the PPAR γ cofactor 1 α (PGC1 α) and the transport of glucose Glut1 and Glut4 did not change significantly.

***Nmrk2* is required in aged mice to preserve cardiac NAD levels**

We observed a decrease in the expression of *Nmrk2* with age in control mice. Levels of the mRNAs of the genes encoding *Nmrk1* and *Nampt* were also reduced during aging and were moderately increased in the mutant at 12 and 24 months (**Fig. 5A**). The levels of Sirt1 and Sirt3 decreased similarly in both groups with age (**Fig. 5B**). To determine the contribution of *Nmrk2* in maintaining cardiac total NAD levels ($\text{NADt} = \text{NAD}^+ + \text{NADH}$), we measured the NAD concentration in metabolite extracts of control and *Nmrk2-KO* hearts at the ages of 4, 12 and 24 months. The results show there was close to 50% NADt loss in the heart of *Nmrk2-KO* mice compared to controls at 24 months (**Fig. 5C**). This loss in the global pool of NAD reflected a similar trend to lower NAD^+ and NADH levels at 24 months, though there was more individual variation in the respective percentage of oxidized and reduced NAD at this age compared to 4 month-old mice and we cannot conclude on the redox state of the coenzyme (NAD^+/NADH ratio).

To test whether NMRK2 could be required at younger age to boost NAD^+ synthesis in response to nicotinamide riboside (NR) administration, we provided NR in drinking water (2

mg/ml, i.e. 400 mg/kg/day for a 30 g mouse) during 40 days to control and *Nmrk2-KO* mice (6 to 9 months-old) and compared NAD levels in the liver expressing NMRK1 (NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamideriboside metabolism in mammalian cells^[26] and the heart expressing NMRK2. NR increased hepatic NAD⁺ and NADH levels, so total NADt level, by ~193% in the control group and ~174% in the mutants (**Supplementary Fig. S4**), confirming the efficiency of the NR-enriched diet. However, NR did not increase myocardial NAD levels in controls or *Nmrk2-KO* mice.

Laminin disorganization and cardiac fibrosis in *Nmrk2-KO* mice

Since the NMRK2 kinase is also known under the name of MIBP, which binds to the heterodimer integrin $\alpha7/\beta1$, a receptor for the laminin present in striated muscle cells basal lamina, we assessed the expression of these genes and the localization of the corresponding proteins in the myocardium. The expression level of the mRNAs encoding integrin $\alpha7$, integrin $\beta1$ and melusin, which like NMRK2 (MIBP) binds to the cytosolic part of integrin $\beta1$, and laminin $\alpha2$ decreased with age in both groups although there was a transient upregulation at 12 months (**Fig. 6A**). Change in NMRK2 (MIBP) levels were reported to alter laminin deposition in C2C12 myotubes and zebrafish^[18]. We examined, using immunostaining, the organization of laminin, on frozen heart sections from mutants and control mice. The anti-laminin antibody signal delineated a thin and sharply defined basal lamina surrounding the cardiomyocytes and capillaries in the control hearts (**Fig. 6B**, left). In the *Nmrk2-KO* mice, the laminin signal was diffused and spread in a wider intercellular space at 12 month (**Fig. 6B**, right). This defect was already apparent at 4 months in the *Nmrk2-KO* hearts (**supplementary data Fig. S5**). Integrin $\alpha7$ protein expression was maintained up to 12 month but then specifically decreased in the *Nmrk2-KO* hearts at 24 months (**Fig. 6C, D**). Integrin $\beta1$ protein could still be detected at this age in the *Nmrk2-KO* hearts though it was reduced compared to controls. Red Sirius staining of collagen fibers evidenced the development of cardiac fibrosis in the *Nmrk2-KO* hearts at 12 months compared to controls (**Fig. 7A, B**). Electron microscopy analysis of control and *Nmrk2-KO* heart sections showed that *Nmrk2-KO* cardiomyocytes present slightly thinner myofibrils than

controls (**Fig. 7C, D**). Subsarcolemal and intermyofibrillar mitochondria were smaller and less aligned than in controls (**Fig. 7C, D**). The extracellular space separating cardiomyocytes in the Nmrk2 KO hearts was strongly enlarged compared to control heart section (**Fig. 7E, F**) and quantification in the inset and we observed the presence of large collagen fibers in the extracellular space that were not observed in the controls (**Fig. 7G, H**).

DISCUSSION

This study was realized to understand the *in vivo* role of *Nmrk2* (or *Itgb1bp3* encoding MIBP protein), a striated muscle-specific gene with a potential dual role in NAD⁺ biosynthesis and integrin signaling that is strongly upregulated in the heart in various mouse models of DCM. The *in vivo* role of *Nmrk2* in the mouse had not been formally addressed previously addressed by reverse genetics. Here, we showed that that the *Nmrk2* gene is a striated muscle-specific gene whose protein product is predominantly found in cardiac tissue. *Nmrk2-KO* mice are viable but develop a slowly progressive cardiac dysfunction and DCM phenotype associated with alterations in laminin deposition in the extracellular matrix starting at 4 months and cardiac fibrosis starting at 9 months while the impacts of NMRK2 deficiency on the maintenance of NAD homeostasis is revealed in aged mice at 24 months.

Role of *Nmrk2* in NAD biosynthesis

NMRK kinases phosphorylate NR to generate NMN, an immediate precursor of NAD⁺ in the pathway. We found that the lack of NMRK2 does not affect the steady-state level of NAD⁺ or NADH in the myocardium at baseline in young adults and that NR supplementation does not increase significantly myocardial NAD level in controls expressing NMRK2. Similarly, there was no reduction at baseline in tissue NAD levels in the mice knocked out for the more ubiquitously expressed gene *Nmrk1*, as measured in the liver, brown adipose tissue (BAT), kidney and skeletal muscles^[26]. However, these authors showed that NR supplementation does increase NAD levels in these tissues as we found in our own experiment in the liver. The increase in NAD⁺ levels in these tissues following NR treatment is only partially blunted in absence of NMRK1^[26]. The lack or extremely low level of NMRK2 in these non-muscular tissues and conversely the very low level of NMRK1 in the heart seems to limit the possibility of compensation of one enzyme by the other. Another, non exclusive hypothesis is that a part of the NR that is administrated systematically is converted to alternative NAD⁺ precursors such as NAM by the purine nucleoside phosphorylase and NAM is efficiently transformed into NMN precursor by the NAMPT enzyme, a major rate-limiting enzyme in mammals^[27]. Moreover the

tryptophane-kynurenin pathway and the nicotinic acid pathway provide additional sources of NAD⁺ precursors^[28]. Hence it is clear that NMRK enzymes are not essential for NAD maintenance in young healthy adults. However, we found, that the expression of *Nmrk1*, *Nmrk2* and especially *Nampt* strongly decline with ageing in the heart at 24 months. This observation revealed the necessary contribution of NMRK2 kinase to the maintenance of NAD levels in the heart at 24 months that were reduced by 50%. This finding opens interesting perspectives for the future treatment of age-associated cardiac diseases as loss of NAD⁺-dependant sirtuin activity has been involved in aging and diseases^[29].

Role of NMRK2 in laminin deposition and integrin stabilization

Overexpression of MIBP in skeletal myoblasts^[17] and knock-out of *Nrk2b* gene in zebrafish embryo^[18] have both been shown to impact on laminin deposition in the basal membrane of muscle cells. In this study, we found that an aberrant pattern of laminin organization in the extracellular matrix of the myocardium is one of the earliest defects that we can observe in the mouse *Nmrk2-KO* model, suggesting a conserved function for this gene through evolution. The expression of laminin α 2 chain gene, which is the predominant isoform in the basal membrane of cardiomyocytes, is developmentally regulated in both human and rodents. Its relative level increases rapidly after birth to follow normal cardiomyocyte growth and then decreases progressively to adulthood. During the development of cardiac hypertrophy and failure, the imbalance between the increased size of myocyte and the steady state or decreased level of laminin- α 2 chain might contribute to the altered sarcolemma properties in the failing heart^[30]. A thickening of the laminin layer has been described in the rat heart in isoproterenol-induced cardiac failure, and during hypertrophy induced by myocardial infarction^[31]. We observed a similar defect in the laminin organization in the young *Nmrk2-KO* after TAC and during late postnatal maturation of the heart between 3 to 4 months when their heart start to dilate and systolic function decreases. Interestingly, mutations in the laminin- α 2 gene, which are essentially associated with a phenotype of muscular dystrophy^[32] can also be associated with DCM phenotype in some patients^[33, 34].

The nature of the molecular mechanism linking NMRK2 activity to laminin deposition remains elusive. In the case of the closely related MIBP protein, the selective impact of MIBP overexpression on laminin deposition but lack of effect on fibronectin was linked to its ability to bind to $\alpha 7\beta 1$ integrin, a known receptor for laminin, and not to $\alpha 5\beta 1$ integrin, a receptor for fibronectin^[17]. Interestingly muscular dystrophies similar to those observed in the case of laminin- $\alpha 2$ mutations also arise from mutations affecting the $\alpha 7\beta 1$ integrin further^[17]. This type of impact of an intracellular integrin binding protein on the organization of an extracellular protein may relate to the inside-out integrin activation signals, which, through conformational changes of the integrin transmembrane domains, increase their affinity for extracellular ligands^[35, 36].

The link between NMRK2 kinase activity leading to NR conversion into NMN and integrin to laminin interaction is less obvious. However, it is noticeable that treatments with niacin cocktails or NAD^+ reduce muscle degeneration in zebrafish mutants for integrin $\alpha 6$, $\alpha 7$ or dystroglycan receptors through a paxillin-dependent mechanism impacting on laminin deposition[18] Whether this beneficial impact of NR or NAD^+ was linked to a global increase of NAD^+ metabolism and signaling improving survival and adhesion of muscle cells or to a more direct NAD^+ -dependent posttranslational modification of membrane receptors that would be favored by presence of Nr2b protein remains unknown. Interestingly, the NAD^+ -dependant ADP-ribosylation of integrin $\alpha 7$ by the ART1 enzyme has been shown to increase its affinity to laminin^[4] (In the Nmrk2-KO mice, we show that paxillin phosphorylation levels are reduced at baseline in young mice and $\alpha 7$ integrin protein is decreased at a late stage in adulthood but interestingly at the same time than the decrease in NAD^+ levels. In conclusion, the link between NMRK2, $\alpha 7\beta 1$ integrin and laminin is now clearly established in different models but further research is required to elucidate the underlying molecular mechanisms. Close links between integrins signaling and cell metabolism has been observed in cancer and the molecular mechanisms that relate to AMPK signaling and integrin post-translational glycosylation can probably be extended to other cell types in the future^[3].

The characterization of therapeutic molecules capable of modulating the NAD biosynthetic pathway in a relation with integrin signaling offers new therapeutic perspectives for cardiac pathologies.

Funding

This research was supported by a grant from the Association Française contre les Myopathies, project MUSCLE-MINDS. C.T was supported by a joint PhD Fellowship from UPMC University and Collège des Ingénieurs.

Acknowledgement

We thank Chuanyue Wu (Alabama, USA) for the kind gift of MIBP monoclonal antibody for preliminary assays, which was then ordered to MBL International Corp. We thank the Imaging Facility of Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS) (FR3631) in Paris for help in confocal immunofluorescence. We thank the animal facilities of UPMC university Paris 6 including IBPS, ICAN PitiéSalpêtrière and Charles Foix Institut de la Longévité and CNRS-TAAM transgenic facility (Villejuif, France) for ES injections in blastocysts and reimplantation.

REFERENCES

1. Elliott, P., et al., Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*, 2008. **29**(2): p. 270-6.
2. Pinto, Y.M., et al., Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J*, 2016. **37**(23): p. 1850-8.
3. Merlo, M., et al., Clinical management of dilated cardiomyopathy: current knowledge and future perspectives. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2015. **14**(2): p. 137-40.
4. Haas, J., et al., Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 2015. **36**(18): p. 1123-35a.
5. Neubauer, S., The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med*, 2007. **356**(11): p. 1140-51.
6. Ventura-Clapier, R., et al., Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(7): p. 1360-72.
7. Louzao-Martinez, L., et al., Characteristic adaptations of the extracellular matrix in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*, 2016. **220**: p. 634-46.
8. Raghov, R., An 'Omics' Perspective on Cardiomyopathies and Heart Failure. *Trends Mol Med*, 2016. **22**(9): p. 813-27.
9. Burke, M.A., et al., Molecular profiling of dilated cardiomyopathy that progresses to heart failure. *JCI Insight*, 2016. **1**(6).
10. Muchir, A., et al., Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Clin Invest*, 2007. **117**(5): p. 1282-93.
11. Akbay, E.A., et al., D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH2 causes cardiomyopathy and neurodegeneration in mice. *Genes Dev*, 2014. **28**(5): p. 479-90.
12. Martin, O.J., et al., A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 in the control of mitochondrial dynamics during postnatal cardiac growth. *Circ Res*, 2014. **114**(4): p. 626-36.
13. Xu, W., et al., Lethal Cardiomyopathy in Mice Lacking Transferrin Receptor in the Heart. *Cell Rep*, 2015. **13**(3): p. 533-45.
14. Parlakian, A., et al., Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart. *Circulation*, 2005. **112**(19): p. 2930-9.
15. Liu, Y., et al., RNA-Seq identifies novel myocardial gene expression signatures of heart failure. *Genomics*, 2015. **105**(2): p. 83-9.
16. Li, J., R. Mayne, and C. Wu, A novel muscle-specific beta 1 integrin binding protein (MIBP) that modulates myogenic differentiation. *J Cell Biol*, 1999. **147**(7): p. 1391-8.
17. Li, J., et al., The muscle integrin binding protein (MIBP) interacts with alpha7beta1 integrin and regulates cell adhesion and laminin matrix deposition. *Dev Biol*, 2003. **261**(1): p. 209-19.
18. Goody, M.F., et al., Nr2b-mediated NAD⁺ production regulates cell adhesion and is required for muscle morphogenesis in vivo: Nr2b and NAD⁺ in muscle morphogenesis. *Dev Biol*, 2010. **344**(2): p. 809-26.
19. Bieganski, P. and C. Brenner, Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell*, 2004. **117**(4): p. 495-502.
20. Mericskay, M., Nicotinamide adenine dinucleotide homeostasis and signalling in heart disease: Pathophysiological implications and therapeutic potential. *Arch Cardiovasc Dis*, 2016. **109**(3): p. 207-15.

21. Franco, C.A., et al., Serum response factor is required for sprouting angiogenesis and vascular integrity. *Dev Cell*, 2008. **15**(3): p. 448-61.
22. Trammell, S.A. and C. Brenner, Targeted, LCMS-based Metabolomics for Quantitative Measurement of NAD(+) Metabolites. *Comput Struct Biotechnol J*, 2013. **4**: p. e201301012.
23. Shai, S.Y., et al., Cardiac myocyte-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure. *Circ Res*, 2002. **90**(4): p. 458-64.
24. Brancaccio, M., et al., Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nat Med*, 2003. **9**(1): p. 68-75.
25. Pillai, V.B., et al., Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway. *J Biol Chem*, 2010. **285**(5): p. 3133-44.
26. Ratajczak, J., et al., NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 13103.
27. Revollo, J.R., et al., Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab*, 2007. **6**(5): p. 363-75.
28. Bogan, K.L. and C. Brenner, Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: a molecular evaluation of NAD+ precursor vitamins in human nutrition. *Annu Rev Nutr*, 2008. **28**: p. 115-30.
29. Imai, S. and J. Yoshino, The importance of NAMPT/NAD/SIRT1 in the systemic regulation of metabolism and ageing. *Diabetes Obes Metab*, 2013. **15 Suppl 3**: p. 26-33.
30. Oliviero, P., et al., Expression of laminin alpha2 chain during normal and pathological growth of myocardium in rat and human. *Cardiovasc Res*, 2000. **46**(2): p. 346-55.
31. Grimm, D., et al., Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res*, 1998. **37**(1): p. 91-100.
32. Guicheney, P., et al., Genetics of laminin alpha 2 chain (or merosin) deficient congenital muscular dystrophy: from identification of mutations to prenatal diagnosis. *Neuromuscul Disord*, 1997. **7**(3): p. 180-6.
33. Nelson, I., et al., Laminin alpha2 Deficiency-Related Muscular Dystrophy Mimicking Emery-Dreifuss and Collagen VI related Diseases. *J Neuromuscul Dis*, 2015. **2**(3): p. 229-240.
34. Carboni, N., et al., Dilated cardiomyopathy with conduction defects in a patient with partial merosin deficiency due to mutations in the laminin-alpha2-chain gene: a chance association or a novel phenotype? *Muscle Nerve*, 2011. **44**(5): p. 826-8.
35. Hu, P. and B.H. Luo, Integrin bi-directional signaling across the plasma membrane. *J Cell Physiol*, 2013. **228**(2): p. 306-12.
36. Kim, C., F. Ye, and M.H. Ginsberg, Regulation of integrin activation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011. **27**: p. 321-45.

LEGENDS

Figure 1. Nmrk2 gene is expressed in striated muscles.(A)Definitive null allele was obtained by replacement of all exons and introns of the *Nmrk2* gene by an expression cassette including the lacZ reporter gene and a floxed neomycin resistance gene. The *lacZ* gene is under the control of *Nmrk2* regulatory sequences. The *lacZ* reporter gene was visualized by histochemical reaction of its product, the β -galactosidase in the embryo at 14.5 d.p.c. (B), the heart (C), the liver (negative) (D)and the skeletal muscles;plantaris(E), soleus(F) and gastrocnemius (G). (H)*Nmrk2* mRNA expression level in the heart and skeletal muscles of wild-type mice measured by qPCR and normalized on housekeeping genes expression level. Data are expressed as mean \pm SEM. (I) NMRK2 protein levels analyzed by western blot in the heart, liver and gastrocnemius. (J) Confocal microscopy of cardiac sections stained with anti-vinculin antibody and anti-NMRK2antibody in control mice and dilated heart from *SRF-HKO*mice.Bottom left white Bar = 10 μ m, arrowheads: intercalated disks (stretched in *SRF-HKO*), arrows: lateral sarcolemma, asterisks: cytosol filled with NMRK2.

Figure 2. Nmrk2-KO mice develop cardiac hypertrophy in response to transverse aortic constriction. Wild type (Wt) and *Nmrk2-KO*mice were subjected to transverse aortic constriction (TAC) or sham surgery (control) and sacrificed 15 days later for histological and molecular analyses. (A) Heart weight body weight (HW/BW) ratio, **<0.01. (B) Cardiac sections stained with anti-laminin α 2 antibody to demarcate cell boundaries, scale barrs = 20 μ M. (C) Mean value forcardiomyocyte cross-sectional area and for (D) cross-sectional area MinFerret diameter. (E) Fequency, (F) Markers of cardiac stress and (G) Genes involved in NAD biosynthesis and signaling. (H) Total NAD content in the myocardium of Wt and *Nmrk2-KO* mice at baseline and 15 days after TAC.Wt SHAM: n=5; Wt TAC: n=3; KO Sham: n=4, KO TAC: n=5. Data are expressed as mean \pm SEM. Student test was applied to calculate the *P* value. (I)Western blot analysis of phosphorylated Pax and total Pax shows a decrease in Pax phosphorylation following acute pressure overload.(J) Western blot analysis of phosphorylated ERK and total ERK shows an increase in ERK phosphorylation following acute

pressure overload. n=5 for WtSham, n=3 for WtTAC, n=4 for KO Sham and n=5 for KO TAC. Data are presented as means \pm SEM. Student test was applied to calculate p value. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Figure 3. Cardiac dysfunction and left ventricle dilatation takes place with ageing in the *Nmrk2*-KO mice. Longitudinal echocardiography analysis of Wt and *Nmrk2*-KO mice at 5, 8, 12 and 24 months. **(A)** Ejection fraction (EF), **(B)** fractional shortening (FS). **(C)** LV end-systolic diameter (LVESD) and **(D)** left ventricle end-diastolic diameter (LVEDD). **(E)** Left Ventricle Posterior Wall (diastole) and **(F)** septal thickness (diastole) (SIVd). **(G)** Left ventricular thickness/radius (h/r) and **(H)** left ventricle mass index (LVMI). **(I)** Cardiac output (CO) and **(J)** Heart rate (HR). Wt 5 months (N=8), KO 5 months (N=12); Wt 8 months (N=8), KO 8 months (N=10); Wt 12 months (N=8), KO 12 months (N=10); Wt 24 months (N=4), KO 24 months (N=8). Data are presented as means \pm SEM. Student test was applied to calculate p value * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Figure 4. Time course analysis of cardiac genes expression during ageing. Cardiac RNA was extracted at the age of 6, 12 and 24 months in control and mutant mice and analyzed by RT-qPCR. The ratio of RNA levels of controls and mutants hearts is normalized on housekeeping genes expression level. Genes involved in cardiac stress and heart failure: β MHC, Serca2a, BNP, ANF and SOD1. Genes involved in glucose transport: Glut 1 and Glut 4. Data are presented as means \pm SEM. Student test was applied to calculate p value * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Figure 5. Expression level of genes involved in NAD salvage pathway and quantification of NAD contents in the heart lysate of control and *Nmrk2* KO mice.

(A, B) RT-qPCR analysis of cardiac RNA from control and *Nmrk2*-KO mice at the age of 6, 12 and 24 months. **(A)** Genes involved in NAD salvage pathway **(B)** Genes involved in NAD signaling

(C) Myocardial NADt ($\text{NAD}^+ + \text{NADH}$) at indicated ages. **(D)** Liver and **(E)** myocardial NADt in wild type and *Nmrk2-KO* mice fed with control diet (CD) or nicotinamide riboside supplemented diet (NR). Data are presented as means \pm SEM. Student test was applied to calculate p value * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Figure 6. Membrane and extracellular matrix organization

(A) RT-qPCR analysis of integrins and melusin mRNAs from control and *Nmrk2-KO* mice at the age of 6, 12 and 24 months. **(B)** Frozen heart sections from 6 month-old control and mutant mice were incubated with an antibody directed against total laminin. Top panel, low magnification, bar = 50 μM . Bottom, high magnification, bar = 20 μM . Note how the laminin staining delineates a thin linear basal lamina in controls (arrowheads) whereas it spreads on a thicker disorganized area in the mutant (arrowheads). **(C)** Endomyocardium cross sections of 24 month-old control and *Nmrk2-KO* mice stained with anti-integrin $\alpha 7$ antibody. **(D)** LV posterior wall longitudinal sections of the same mice co-labelled with anti-integrin $\alpha 7$ and vinculin for intercalated disks. Note the thicker intercalated disks in the KO. Bar = 20 μm . **(E)** Western blot showing integrin $\alpha 7$ expression in the heart of control and *Nmrk2-KO* mice at 4, 12, and 24 months age. GAPDH was used as loading control.

Figure 7. Histological analysis and ultrastructural analysis of cardiac muscle

Frozen heart sections from controls **(A)** and mutant **(B)** were stained with Sirius red. Note the increase of collagen fibers in the region of the atrioventricular junction of the left ventricle in the mutant. Bar = 100 μm . **(C, D)** Sarcomere structure of cardiomyocytes. The control and mutant have well-aligned myofibrils at the z disks. Asterisks highlight the wide extracellular space separating cardiomyocytes in *Nmrk2-KO* heart sections. Arrows point to the thin basal lamina that run along the plasma membrane in controls **(E, G)** while the basal lamina is poorly defined in the *Nmrk2-KO* **(F, H)** and intermixed with amorphous extracellular matrix spreading away from the sarcolemma (brackets). Arrowhead in H points to large collagen bundles

observed in *Nmrk2-KO* sections but not in controls. Quantification of the space between cardiomyocytes through ImageJ © fit-ellipse analysis plugin. Data are presented as means \pm SEM. Student test was applied to calculate p value * $p \leq 0.05$.

SUPPLEMENTARY DATA

Figure S1. Echocardiographic analysis of Wt and *Nmrk2-KO* mice at the age of 7 months at baseline and 15 days after Angiotensin II treatment. (A) Ejection Fraction (EF), (B) Fractional shortening (FS), (C) Left ventricle end diastolic diameter (LVEDD), (D) Left ventricle wall thickness/radius (h/r) and (E) left ventricle mass index/body weight (LVMI/BW). Data are presented as means \pm SEM. Student test was applied to calculate p value versus controls at baseline * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

Figure S2. Regulation of genes related to NAD metabolism and signaling and NAD homeostasis in response to angiotensin-II treatment. (A) RT-qPCR analysis of cardiac genes. Data are normalized on housekeeping genes expression level. (B) Total NAD content in the myocardium of Wt and *Nmrk2-KO* mice at baseline and 15 days after AngII treatment. Data are presented as means \pm SEM. Student test was applied to calculate p value versus controls at baseline * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Figure S3. Regulation of genes related to fibrosis and integrin signaling in response to angiotensin-II treatment. (A) RT-qPCR analysis of cardiac genes. Data are normalized on housekeeping genes expression level. (B) Frozen heart sections were stained with Sirius Red. Perivascular fibrosis is observed in control mice treated with angiotensin-II and at baseline as well as after treatment in *Nmrk2-KO* mice. Data are presented as means \pm SEM. Student test was applied to calculate p value versus Wt at baseline * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Figure S4. NAD⁺ and NADH contents in the liver and heart lysates of control and *Nmrk2-KO* mice

Wild type and *Nmrk2-KO* mice were fed with control diet (CD) or nicotinamide riboside supplemented diet (NR) for 45 days. (A, B) NAD⁺ and NADH contents in the liver (C, D) NAD⁺ and NADH contents in the heart. Data are presented as means \pm SEM. Student test was applied to calculate p value * $p \leq 0.05$ between CD and NR treatment.

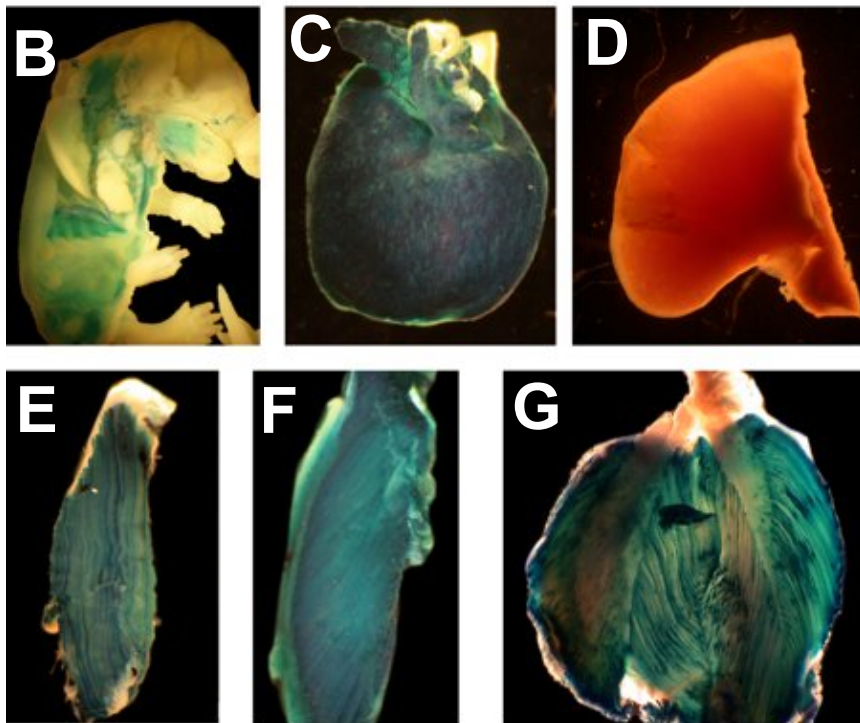
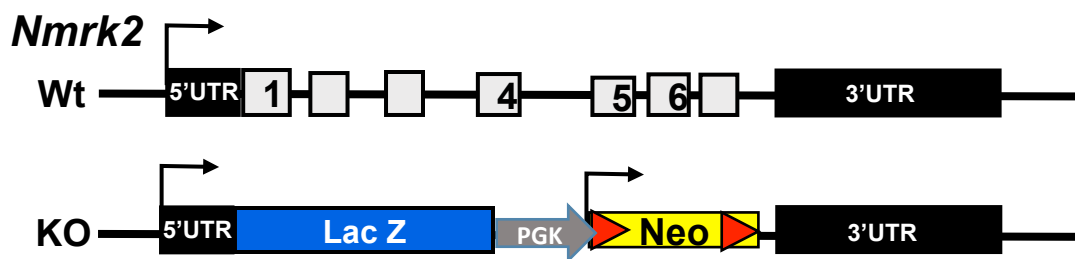
Figure S5. Laminin α 2 staining in the heart of 4 months old control and *Nmrk2-KO* mice

Frozen cross heart sections from 4 months-old control **(A)** and mutant **(B)** mice were incubated with an antibody directed against the α 2 isoform of laminin. Frozen longitudinal sections from 4 months-old control **(C)** and mutant **(D)** mice were incubated with an antibody directed against the α 2 isoform of laminin. Note that laminin α 2 staining is less sharp and spread on a thicker area in the mutant (arrowheads) than in the control heart where it delineates finely the basal lamina. Bottom right scale bar =40 μ m.

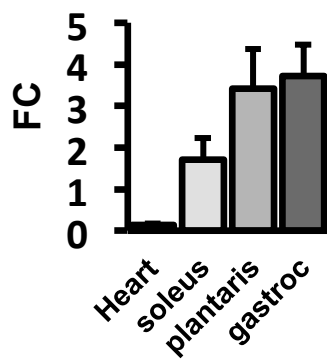
Figure S6. Integrin β 1 immunostaining

Endomyocardium cross sections of 24 month-old control and *Nmrk2-KO* mice stained with anti-integrin β 1 antibody (red staining) and vinculin for intercalated disks (in green). Scale bar = 50 μ M.

A



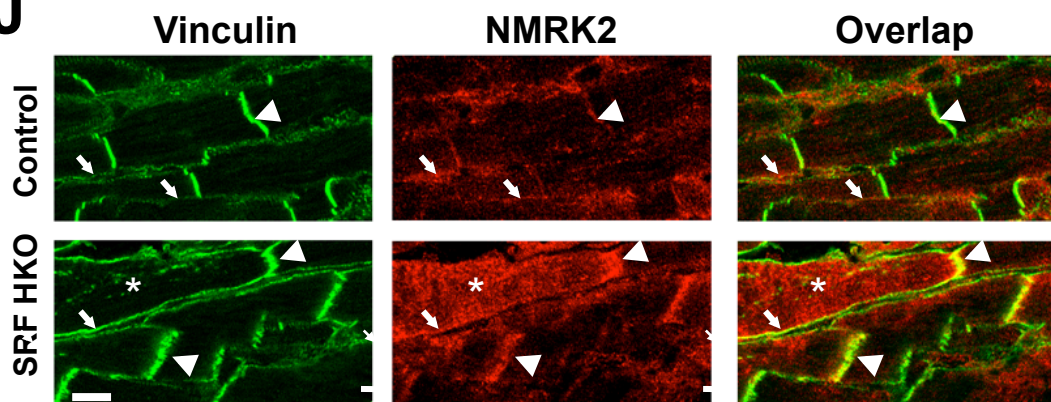
H

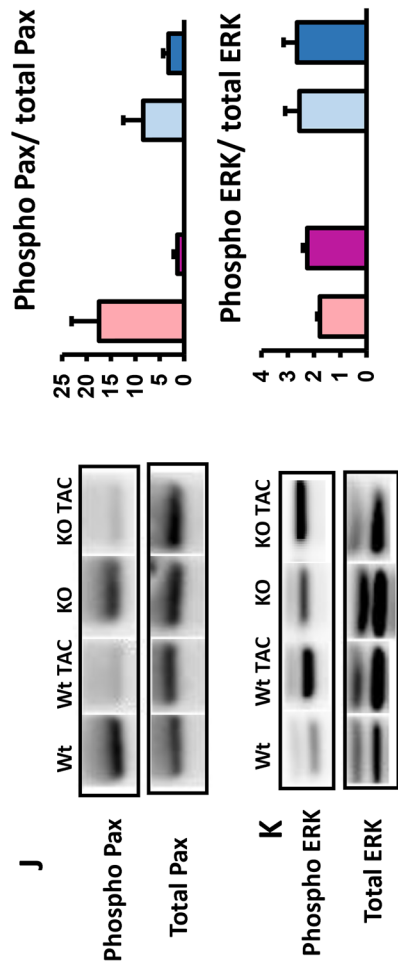
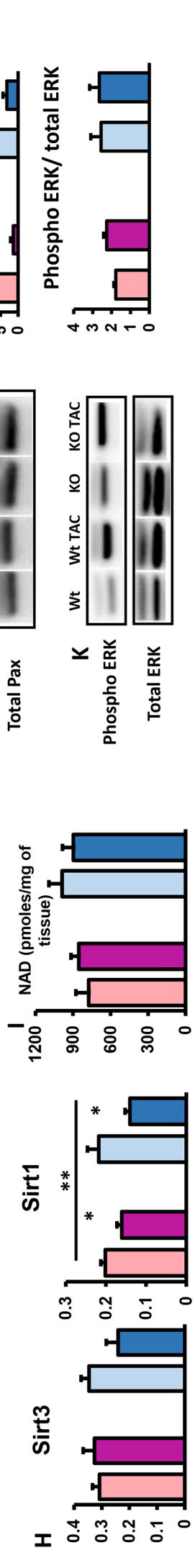
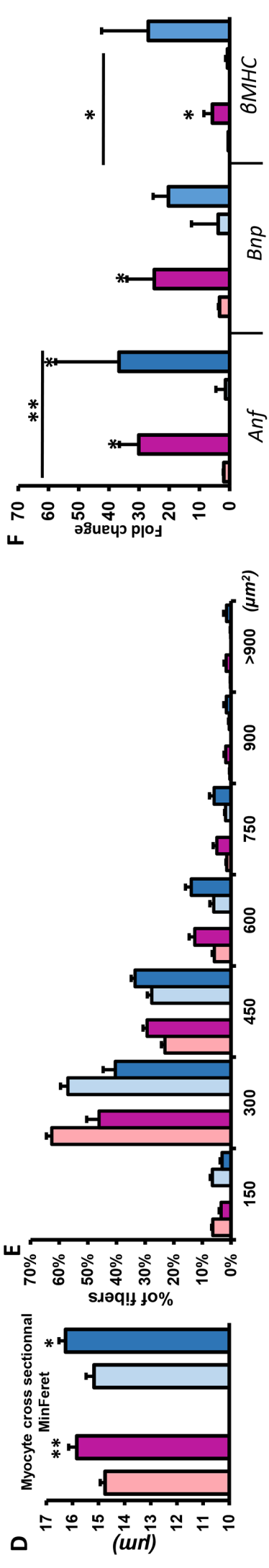
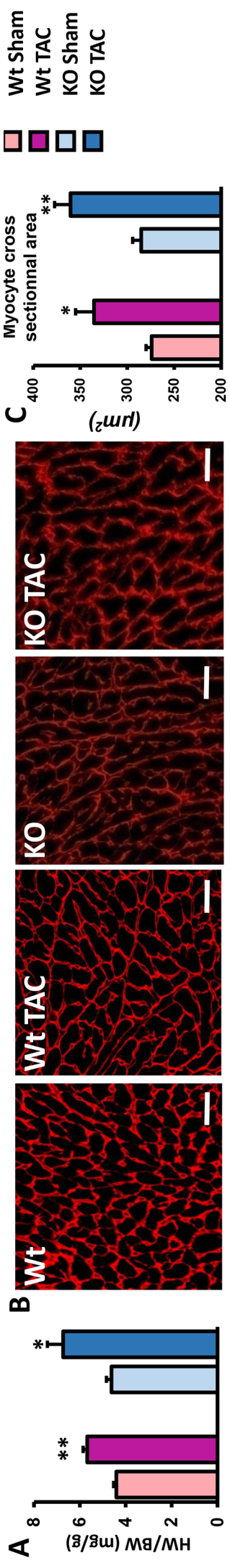
Nmrk2

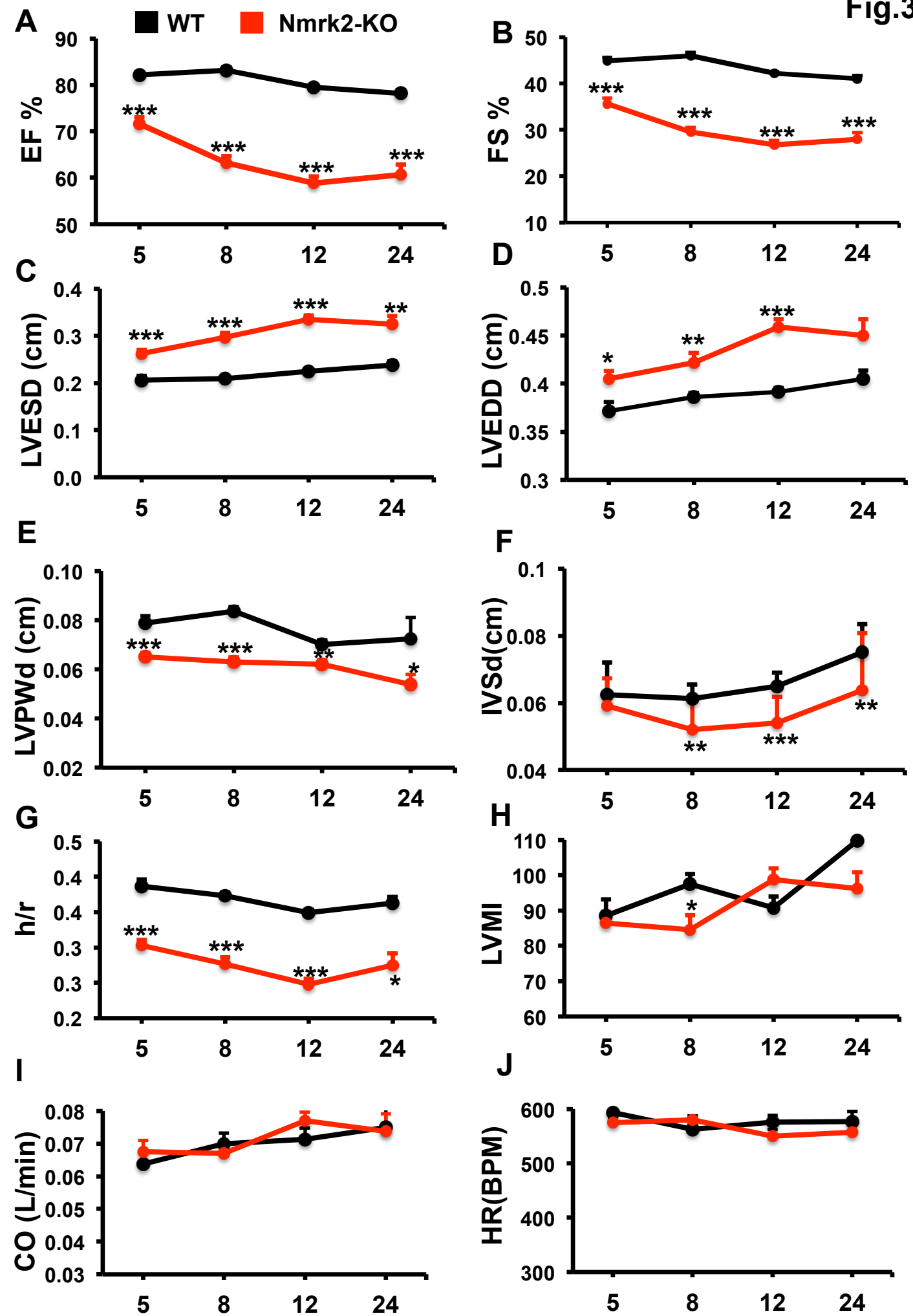
I

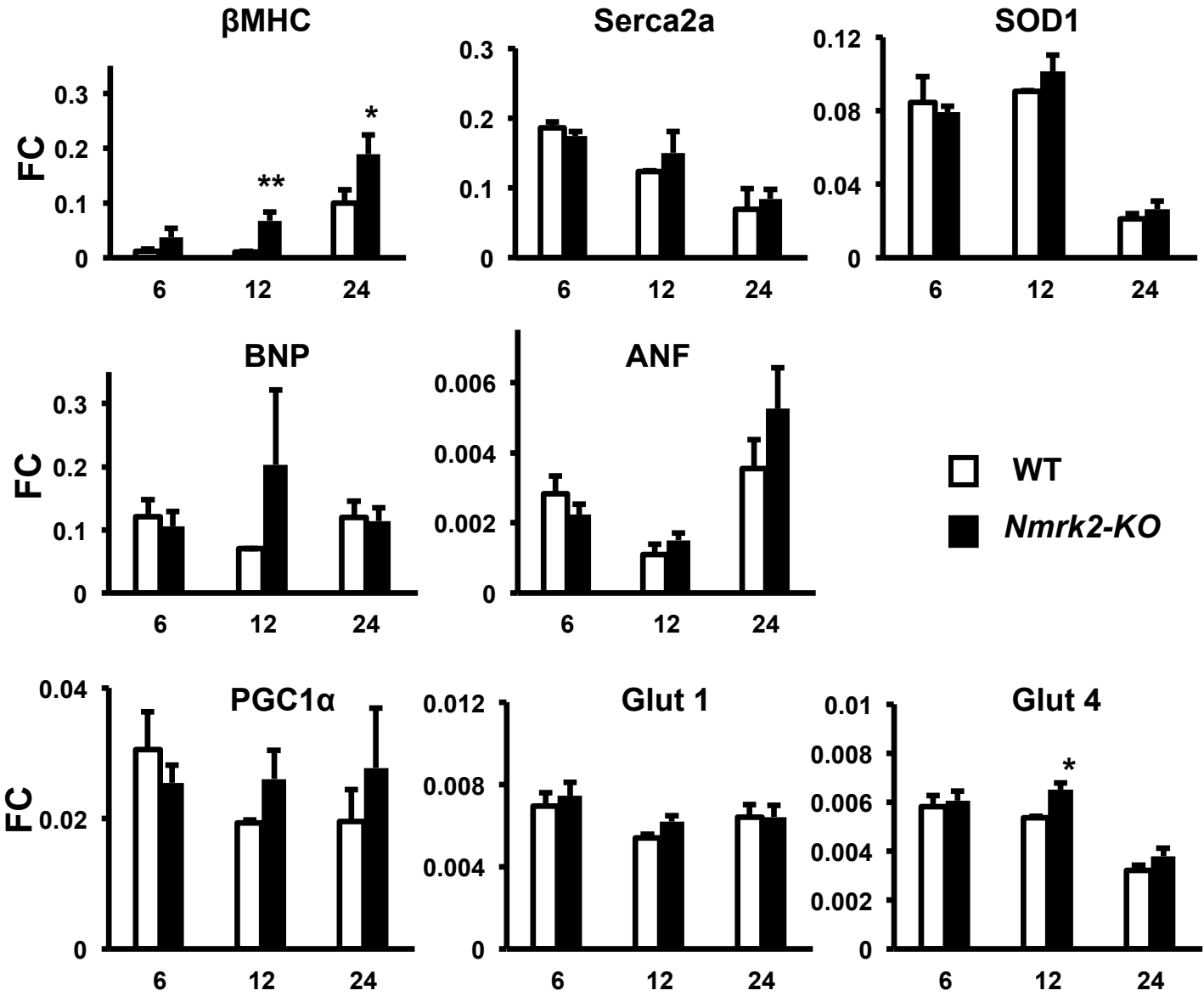


J

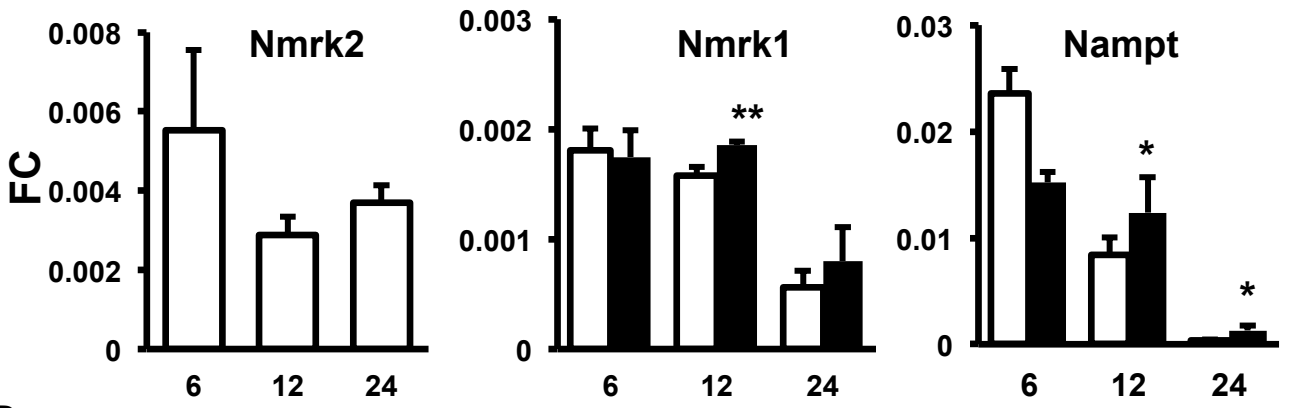




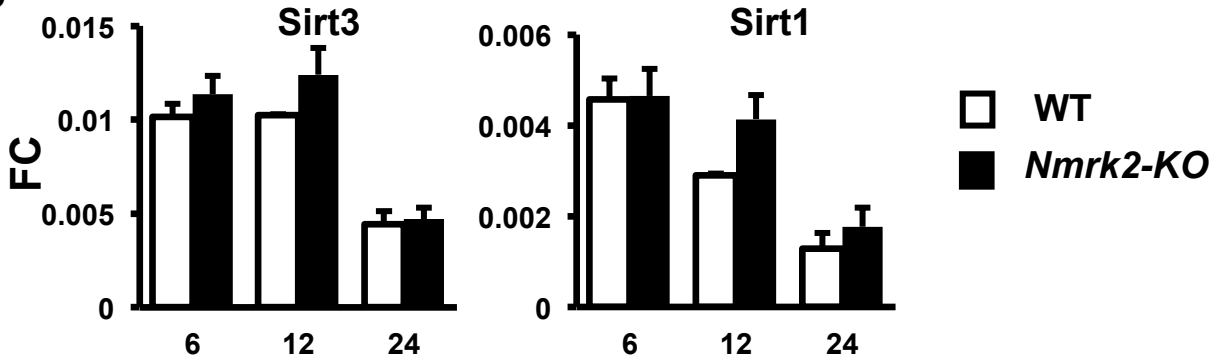




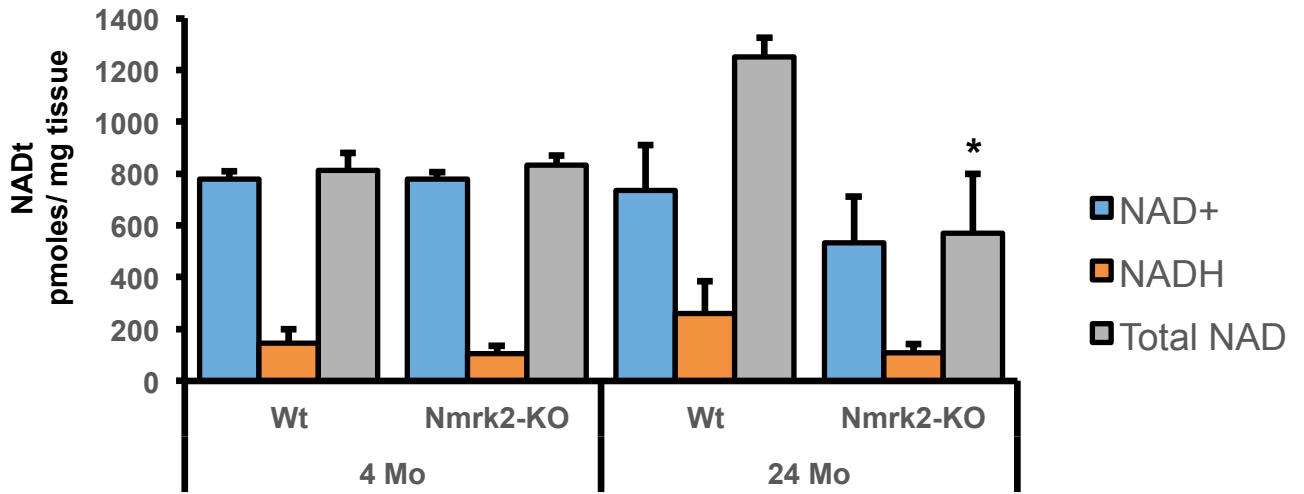
A



B



C



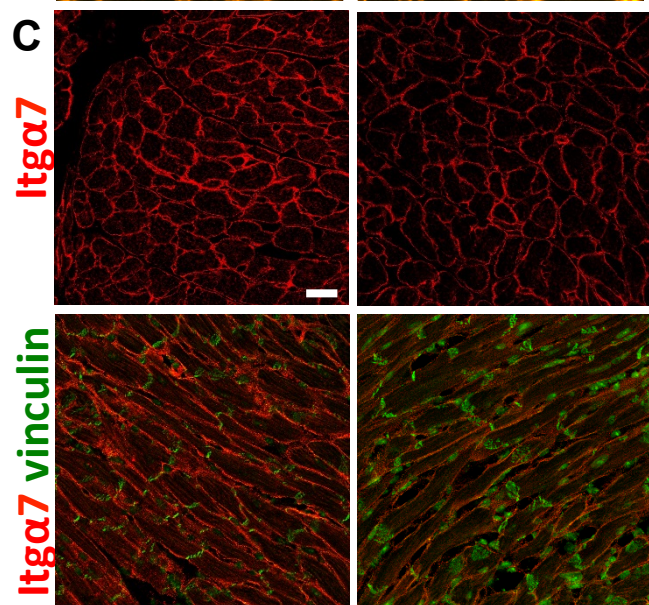
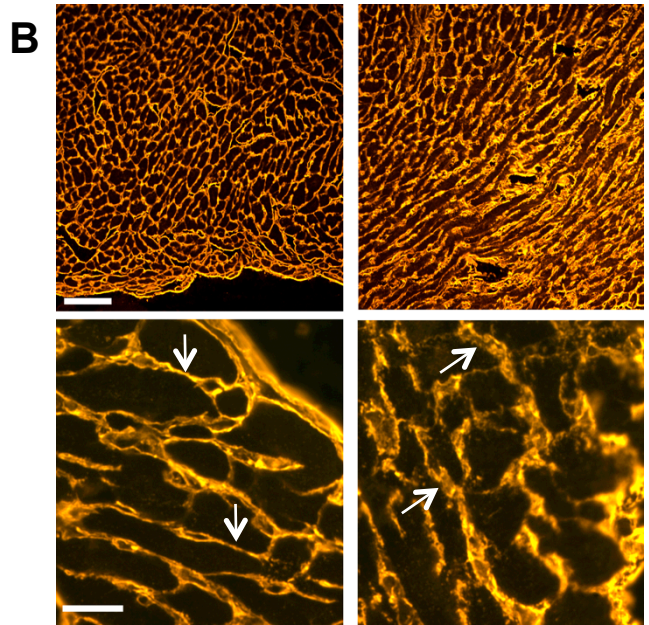
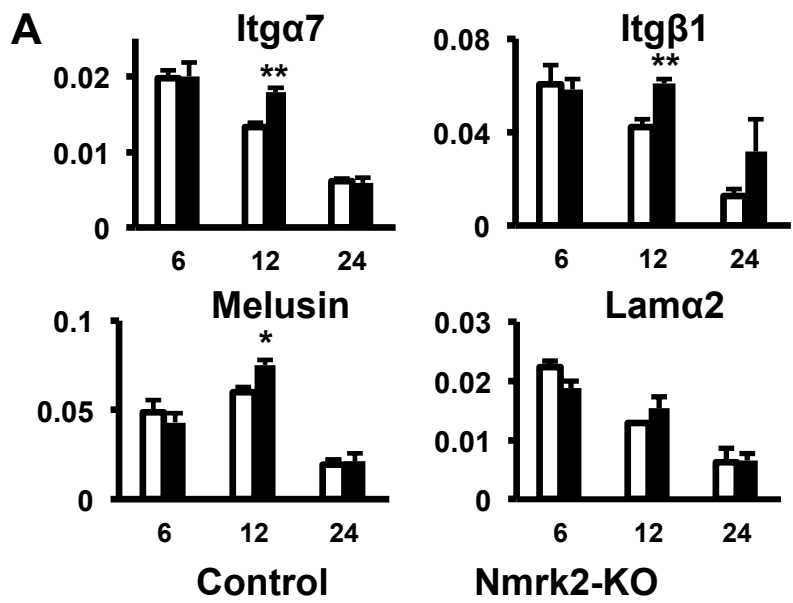
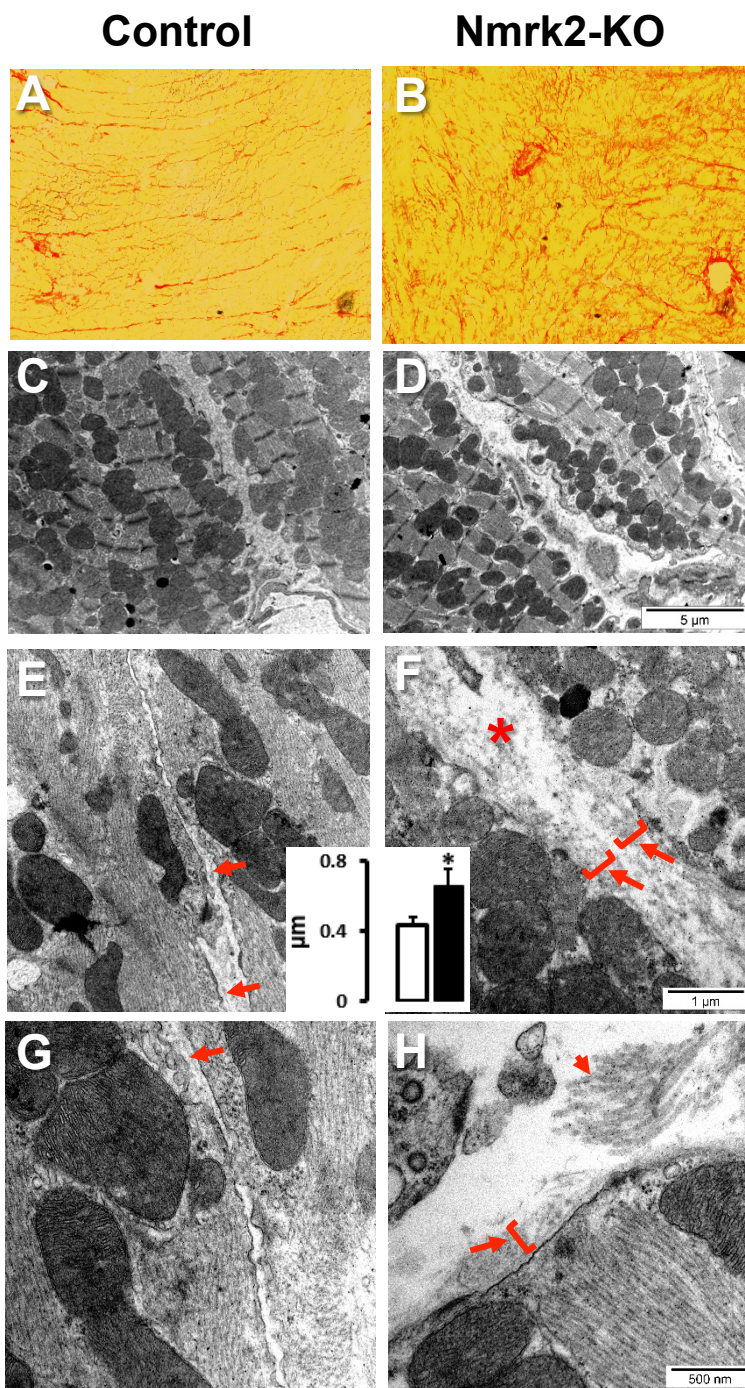
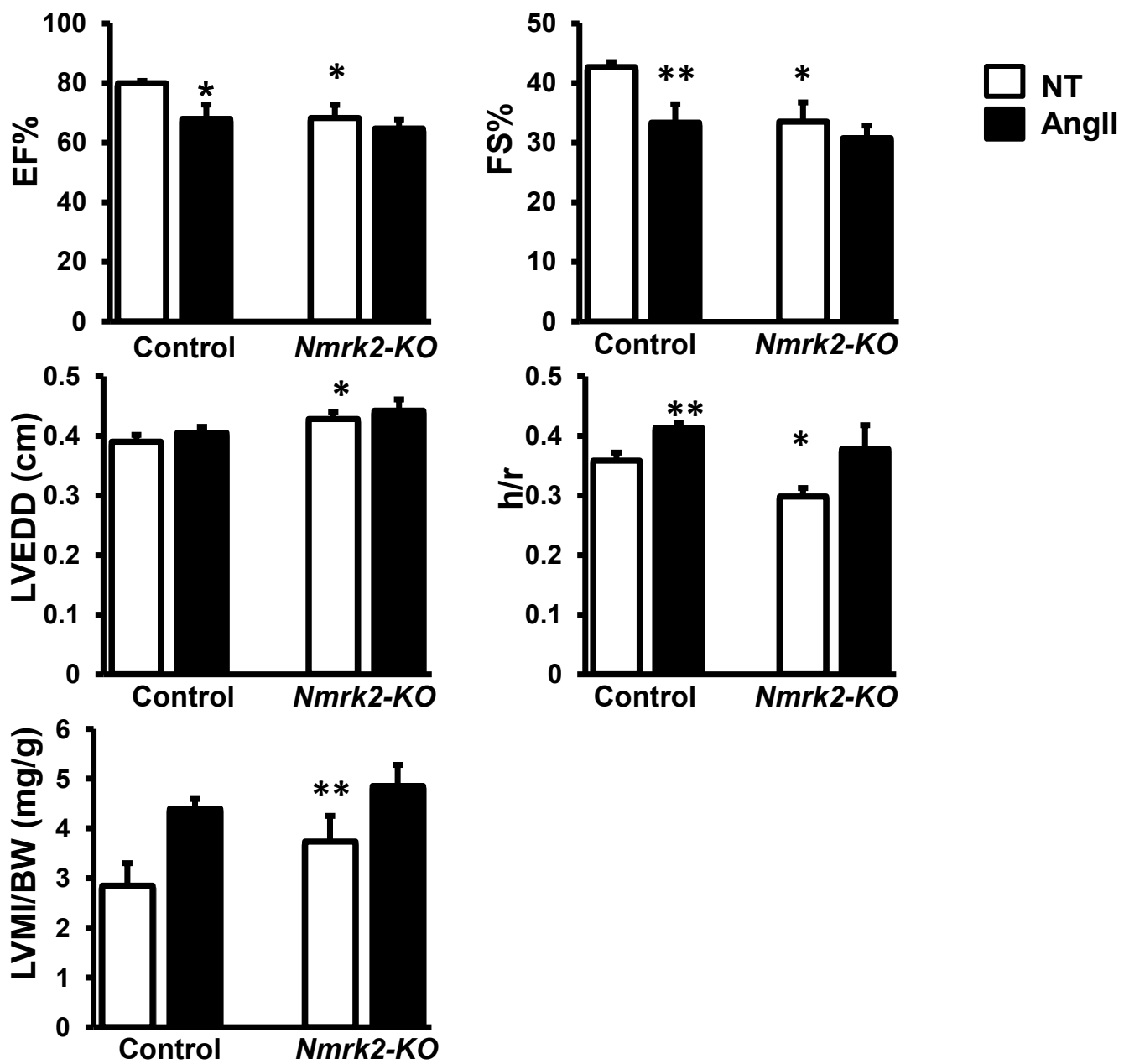
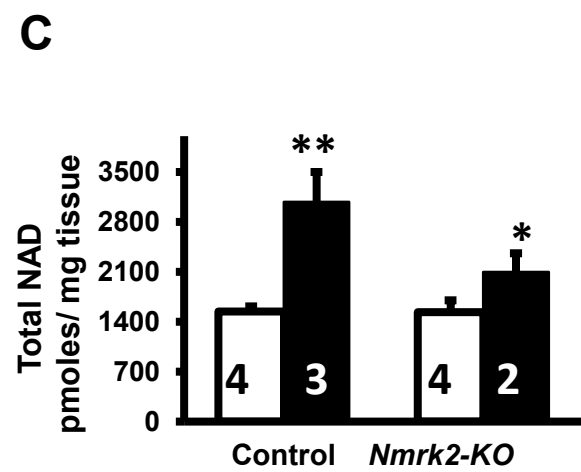
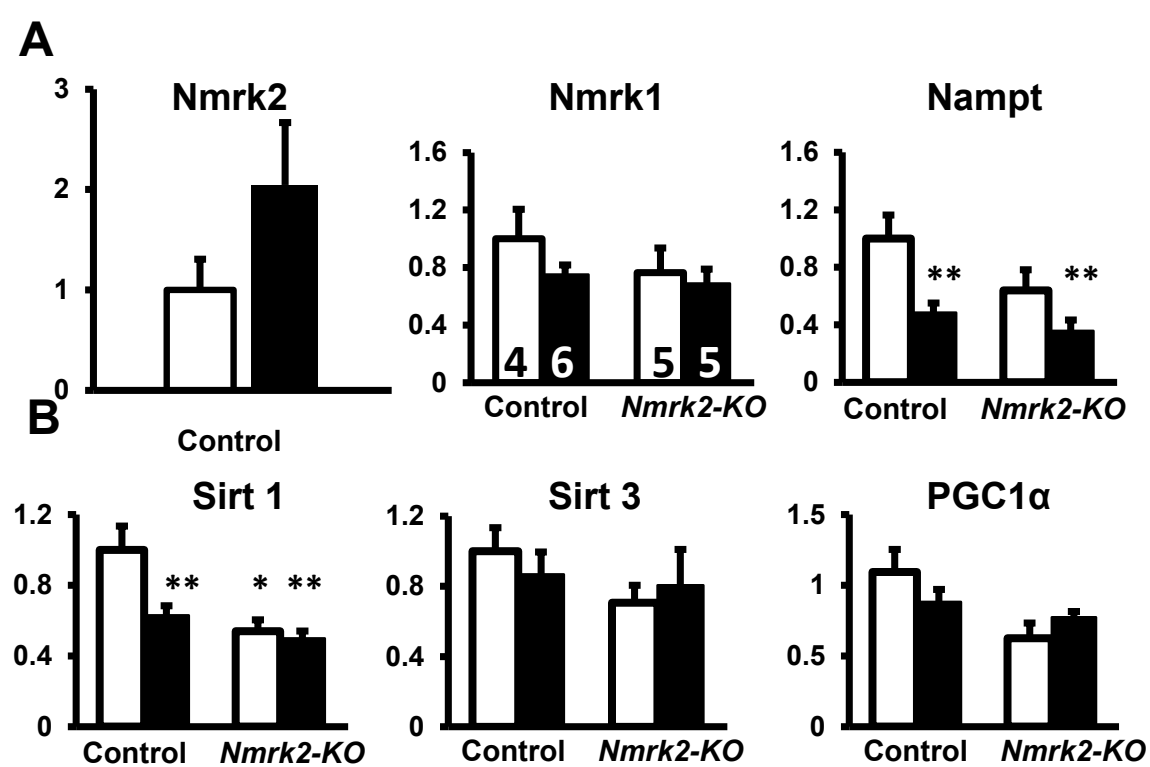


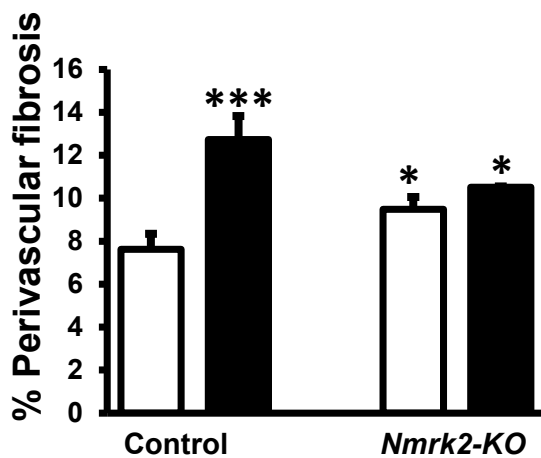
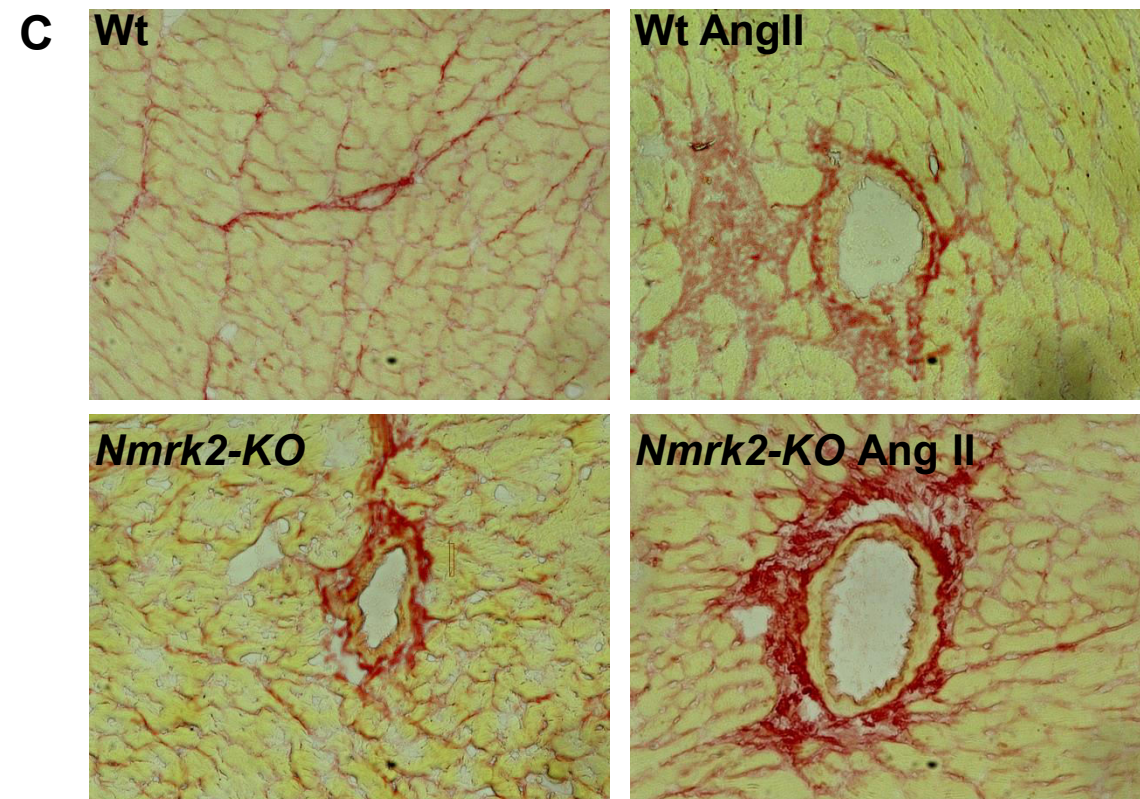
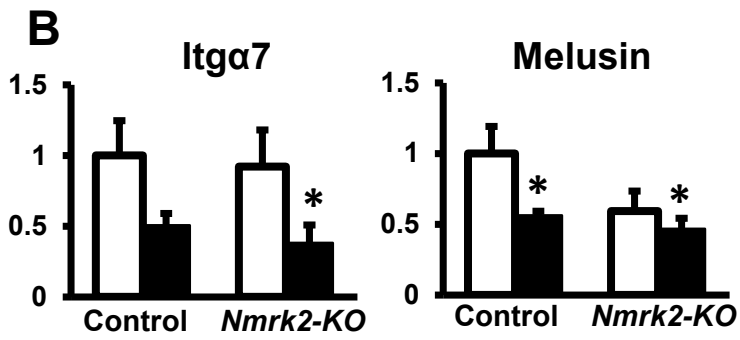
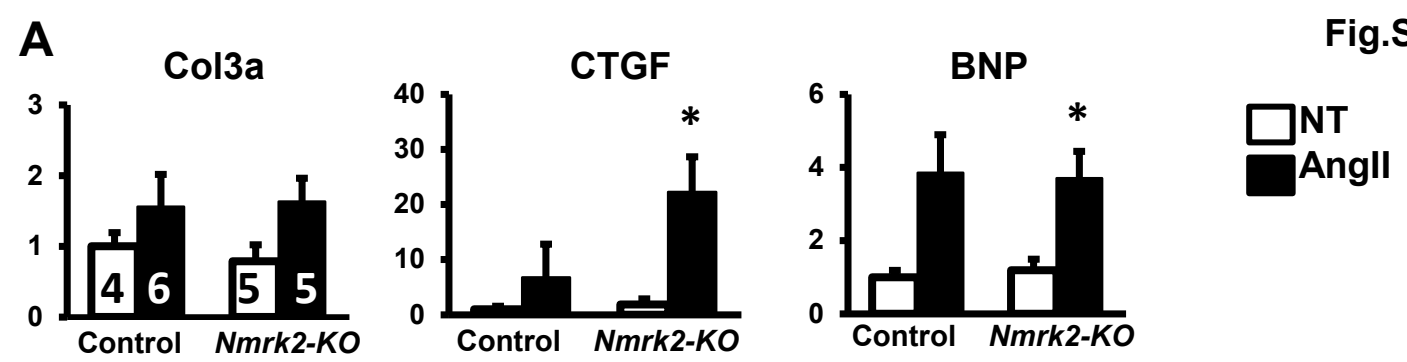
Fig.7

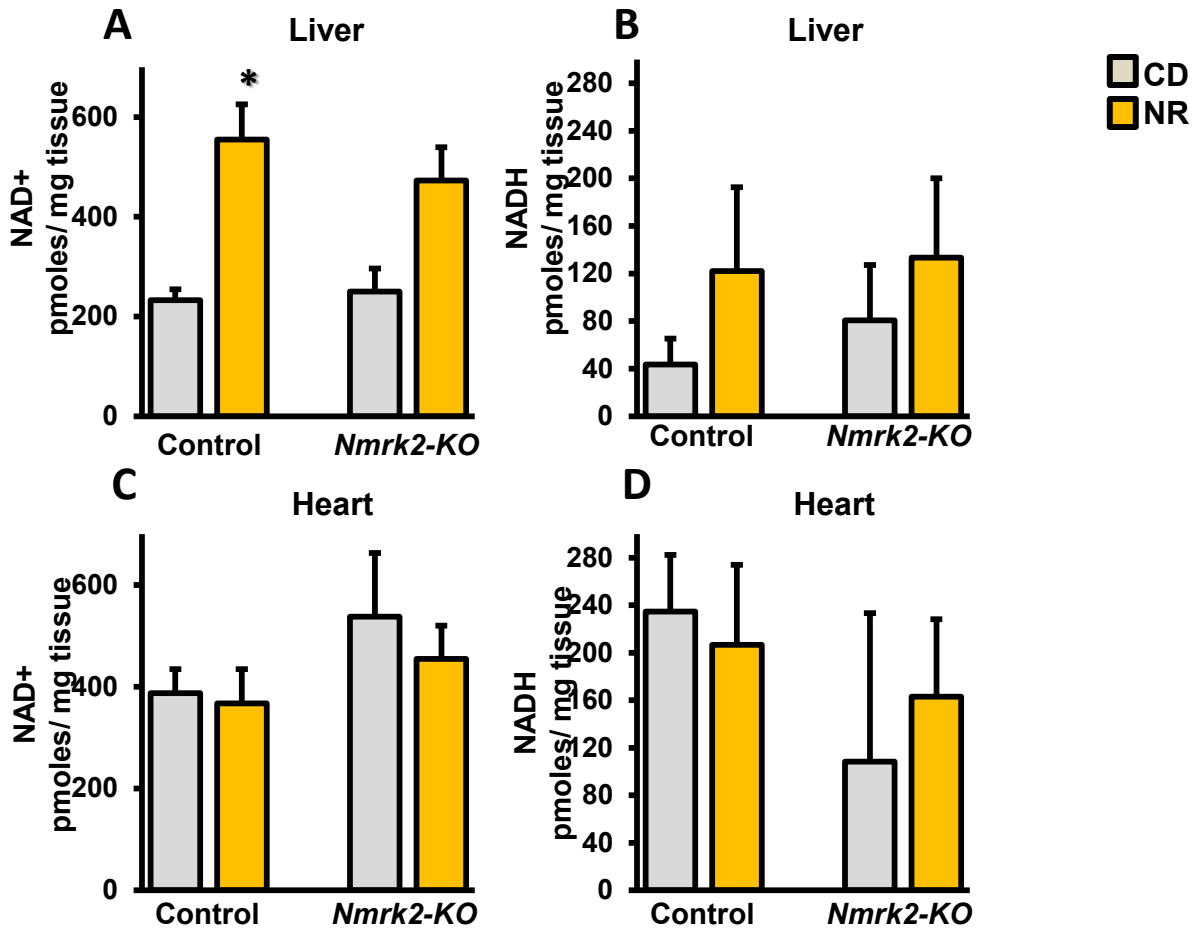


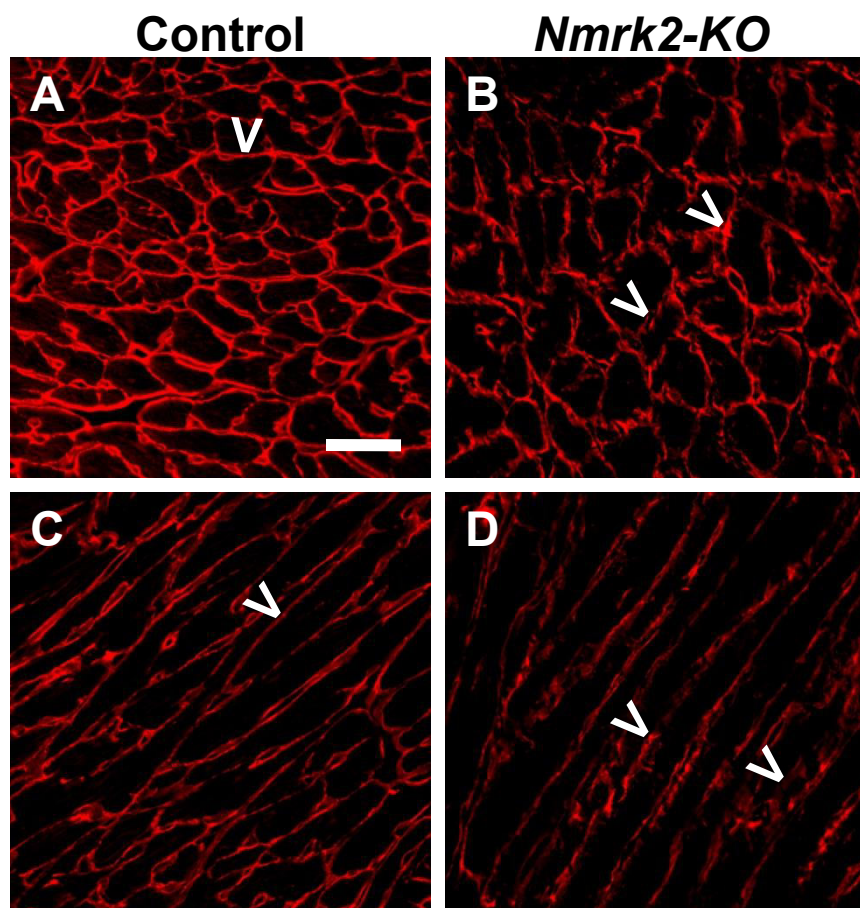


□ NT
 ■ AngII



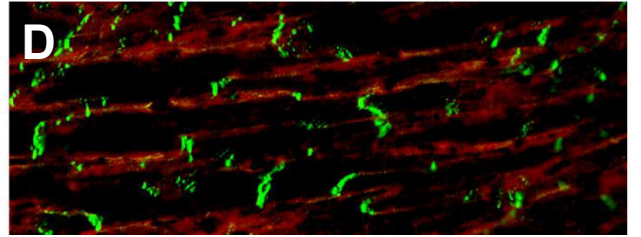
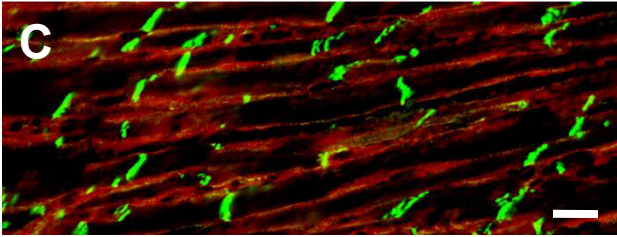
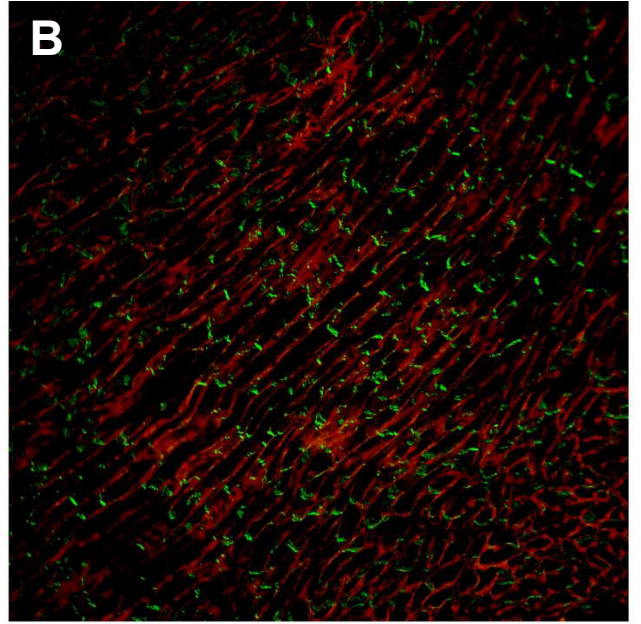
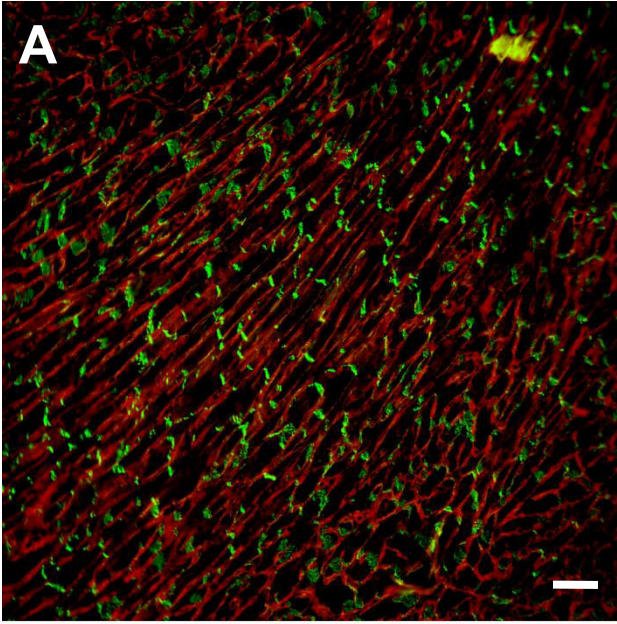






Control

Nmrk2-KO



Article 2

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

URL: <http://circ-submit.aha-journals.org>

Title:

Manuscript number: CIRCULATIONAHA/2016/026099

Author(s): Mathias Mericksay, INSERM UMR-S 1180

1 **Nicotinamide riboside preserves cardiac functions in a mouse model of**
2 **dilated cardiomyopathy**

3

4 Diguet et al. Short title: Nicotinamide riboside to treat heart failure

5

6 Nicolas Diguet¹, PhD, Samuel AJ Trammell², PhD, Cynthia Tannous^{1,3}, Jérôme Piquereau³,
7 PhD, Nathalie Mougenot⁴, Robin Deloux^{1,3}, Anne Gouge¹, Mélanie Gressette³, Jocelyne
8 Blanc¹, Marie Breton³, Jean-François Decaux¹, PhD, Gareth Lavery⁵, PhD, István Baczkó⁶,
9 MD, PhD, Joffrey Zoll, MD⁷, Anne Garnier³, PhD, Zhenlin Li¹, PhD, Charles Brenner², PhD,
10 Mathias Mericskay^{1,3,*}, PhD

11 ¹ Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Department of Biology of
12 Adaptation and Ageing, CNRS UMR8256, INSERM U1164, Institute of Biology Paris-Seine,
13 DHU FAST, 75005 Paris, France

14 ² Department of Biochemistry, Carver College of Medicine, University of Iowa, Iowa City, IA
15 52242, USA

16 ³ Université Paris-Saclay, Université Paris-Sud, Signalisation et Physiopathologie
17 Cardiovasculaire, Inserm UMR-S 1180 - LabEx LERMIT - DHU TORINO, Faculty of Pharmacy
18 , F-92296 Chatenay-Malabry, France

19 ⁴ Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Plateforme PECMV, UMS28,
20 75013 Paris, France

21 ⁵ Institute of Metabolism and Systems Research, 2nd Floor IBR Tower, University of
22 Birmingham, Birmingham, B15 2TT, UK.

23 ⁶ Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Szeged, Szeged,
24 Hungary

25 ⁷ Physiology Department, Faculty of Medicine and EA3072, Université de Strasbourg,
26 Strasbourg, France.

27

28 *Correspondence:

29 Mathias Mericskay

30 Signalisation et Physiopathologie Cardiovasculaire, Inserm UMR-S 1180

31 Faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Sud ,

32 5, rue Jean-Baptiste Clément

33 F-92296 Chatenay-Malabry, France

34 Phone: 33 1 46 83 53 25

35 Email: mathias.mericskay@inserm.fr

36

9899 WORDS

1 **Abstract**

2 **Background**— Myocardial metabolic impairment is a major feature in chronic heart failure
3 (HF). The major drugs used in the clinic to treat HF do not directly address this problem. As
4 a major coenzyme in fuel oxidation and oxidative phosphorylation metabolism and a co-
5 substrate molecule for enzymes signaling energy stress and oxidative stress response (e.g.
6 SIRT1, PARP1), NAD⁺ is emerging as a metabolic target in a number of diseases including
7 HF. However, little is known on mechanisms regulating homeostasis of NAD⁺ in the failing
8 heart and the interest of stimulating NAD⁺ biosynthetic pathways for HF therapy.

9 **Methods**— To explore possible alterations of NAD⁺ homeostasis in the failing heart, we
10 quantified the myocardial levels of NAD⁺ and the expression of NAD⁺ signaling and
11 biosynthetic enzymes in the heart of a mouse model of dilated cardiomyopathy and in
12 human failing heart and studied the impact of NAD⁺ precursor supplementation on cardiac
13 functions.

14 **Results**— We observed a 30% loss in levels of NAD⁺ in the murine failing heart that was
15 accompanied by a shift in the expression level of enzymes involved in NAD⁺ synthesis. The
16 expression of the NAMPT enzyme that recycles the nicotinamide (NAM) precursor is
17 depressed whereas the NMRK2 kinase that phosphorylates the nicotinamide riboside (NR)
18 precursor is strongly increased. This shift was also observed in human failing heart biopsies
19 compared to non-failing controls. We show that the *Nmrk2* gene is an AMPK and PPARalpha
20 responsive gene that is activated by energy stress and NAD⁺ depletion and that NR
21 efficiently contributes to NAD⁺ synthesis in isolated neonate and adult rat cardiomyocytes.
22 Accordingly, NR supplementation in food stabilizes myocardial NAD⁺ levels in the murine
23 failing heart while raising the levels of methyl-NAM and N1-Methyl-4-pyridone-5-
24 carboxamide, which are terminal products of NAD⁺ metabolism inducing NRF2 antioxidant
25 responses. NR supplementation also preserves citrate synthase activity and raises the
26 acetylation level of FoxO1 transcription factor.

27 **Conclusions**— The data show that nicotinamide riboside could be useful for treatment of
28 HF notably in the context of dilated cardiomyopathy, a disease with few therapeutic
29 options.

1 INTRODUCTION

2 Advanced congestive heart failure (HF) is a leading cause of death worldwide. Despite
3 progress in therapeutic advances in HF, mortality remains high, creating a need for new
4 evidence-based and cost-effective treatments. Failure of cardiomyocytes bioenergetics is a
5 key issue in HF that is still poorly addressed in current clinical therapeutics despite
6 intensive research in this field ¹⁻³. We decided to focus our attention on the pathways that
7 regulate the nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) homeostasis in the failing heart
8 which emerges as a new avenue for the development of metabolic therapy of HF ⁴⁻⁷. NAD⁺ is
9 the major hydride transfer coenzyme in fuel oxidation and mitochondrial ATP generation
10 and the precursor for NADPH, which is required for anabolic pathways and ROS
11 detoxification ^{6, 8, 9}. In addition, NAD⁺ is an essential substrate of enzymes including sirtuins
12 and poly(ADPribose) polymerases (PARPs), which are important in responding to stresses
13 and altered nutritional status ⁹⁻¹⁰. Sirtuins perform NAD⁺-dependent deacylation of protein
14 Lys residues modified by Ac-coA derived acyl groups ¹¹. Sirtuins regulate nuclear gene
15 expression as well as mitochondrial enzymes activities and can play a protective role in the
16 heart ¹², though chronic over-activation may be deleterious ^{13, 14}. PARP1 is activated in
17 response to ROS-induced DNA lesions, and was reported to deplete myocardial NAD⁺ stores
18 in HF ¹⁵. In situations of physiological equilibrium, biosynthetic pathways relying on dietary
19 sources of tryptophan (TRP) and NAD⁺ precursor vitamins counterbalance the consumption
20 of NAD⁺ by the Sirtuins and PARPs enzymes. However, dietary precursors may become
21 insufficient to maintain the NAD⁺ metabolome in pathological conditions, thereby
22 necessitating supplementation at levels of precursors ^{8, 16, 17}.

23 The homeostasis of NAD⁺ and regulation of NAD⁺ biosynthetic enzymes have not been
24 studied in dilated cardiomyopathy (DCM), which leads to severe forms of HF and represents
25 the leading cause of heart transplant ¹⁸. We previously generated a powerful model of non-
26 ischemic DCM in mice triggered by cardiac-specific inducible inactivation of Serum
27 Response Factor (*SRF^{HKO}* model) ¹⁹⁻²¹. SRF is a major transcriptional regulator of genes and
28 microRNAs involved in contractility as well as in energy flux and calcium handling ^{20, 21}. SRF
29 pathway is altered in human failing heart ²²⁻²⁶ and in animal models of DCM ^{27, 28}. The heart
30 of *SRF^{HKO}* mutant mice display an early down-regulation of myofibrillar CK activity, which is

1 followed by repression of enzymes of the fatty acid β -oxidation (FAO) and loss of ATP, thus
2 recapitulating the transitional steps toward energy failure and cardiac structural
3 remodeling in HF ²⁹.

4 Here we show that NAD⁺ homeostasis is altered at an early stage in the heart of SRF^{HKO} mice
5 with striking induction of the nicotinamide riboside kinase 2 pathway for NAD⁺ synthesis.
6 *Nmrk2* gene is one of two mammalian paralogs of the yeast *NRK1* gene that was discovered
7 as an eukaryotic route to NAD⁺ from nicotinamide riboside (NR) ³⁰. Given the activity of NR
8 in promoting sirtuin activity and replicative lifespan in invertebrate systems ^{31, 32} and
9 restoring metabolic balance in a variety of vertebrate disease models ^{17, 33-37}, we aimed to
10 test whether NR might treat HF in SRF^{HKO} mice. Here we show that NR greatly protects
11 cardiac functions by virtue of improved citrate and Ac-coA metabolism and antioxidant
12 gene expression. Because NR is orally available in people³⁸, our data suggest clinical testing
13 of NR in human HF.

14

15 RESULTS

16 ***The nicotinamide riboside kinase 2 pathway is activated in the failing heart of SRF^{HKO}*** 17 ***mice***

18 To assess whether pathways related to NAD metabolism were altered in the SRF^{HKO} hearts,
19 we analyzed transcriptomic data generated from cardiac mRNA at day 8 (D8, early
20 asymptomatic stage) and D25 (onset of DCM) after SRF inactivation, or after administration
21 of phenylephrin (PE), an alpha-adrenergic agonist triggering cardiac hypertrophy as
22 described previously ²⁰. Transcriptome analyses revealed that the *Nmrk2* gene was induced
23 at an early stage in the SRF^{HKO} heart and rose continuously during the establishment of HF
24 up to 57-fold in PE-treated SRF^{HKO} hearts (**Figure 1A and supp. Table S1**). The transcript
25 for the ectoenzyme NT5E (CD73) that hydrolyzes extracellular NAD⁺ and nicotinamide
26 mononucleotide (NMN) to NR, the substrate of NMRK2 kinase ³⁹ also increased in SRF^{HKO}
27 hearts (**Supp. Table S1**). At the opposite, the transcripts encoding NAMPT the enzyme
28 converting NAM to NMN, and PNP, which converts NR to NAM ^{31, 40}, were depressed upon
29 PE treatment in SRF^{HKO} hearts (**Supp. Table S1**). Expression of other genes involved in the

1 Tryptophan and nicotinic acid (niacin) pathways for NAD⁺ synthesis were not altered
2 (**Figure 1A and supp. Table S1**).

3 Modulation of *Nmrk2* and *Nampt* gene expression were corroborated by RT-qPCR analysis
4 in a different series of mice (**Figure 1B, C**). Western blot analysis confirmed the robust
5 induction of NMRK2 protein in the *SRF^{HKO}* hearts and repression of NAMPT (**Figure 1D,**
6 **right**). We analyzed NMRK2 and NAMPT protein levels in left ventricles from human
7 controls and HF patients. We observed a similar shift in the failing hearts toward decreased
8 NAMPT expression and increased NMRK2 compared to controls (**Figure 1D**).
9 Immunofluorescent analysis of NMRK2 protein localization on mouse heart sections
10 showed a low signal in the cytoplasm and at proximity of cardiomyocytes sarcolemma in
11 controls that was strongly enhanced in *SRF^{HKO}* cardiomyocytes at D45 (**Figure 1E**).

12 Because NMRK2 is involved in NAD⁺ biosynthesis, we examined the possibility that *Nmrk2*
13 gene induction in the *SRF^{HKO}* heart may be a signature of altered NAD⁺ homeostasis. There
14 was a 30% loss of NAD representing the sum of free NAD⁺ and NADH extracted in buffered
15 ethanol solution and quantified by a colorimetric NAD⁺ cycling assay (**Figure 1F**, see
16 supplementary material and method section for details). The gene expression pattern (*Nt5e*
17 and *Nmrk2* up with *Pnp* and *Nampt* down) suggested that cardiac tissue is attempting to
18 mobilize and utilize NR as an NAD⁺ precursor while not increasing NAM availability or
19 usage. We tested this hypothesis by intraperitoneal administration of NR and NAM to
20 *SRF^{HKO}* mice from D8 to D15. Consistent with this hypothesis, myocardial NAD (NAD⁺ +
21 NADH) levels were preserved by NR but not by NAM (**Figure 1F**). *Srf* and *Nmrk2* expression
22 levels were not changed by these treatments (**Figure 1G, H**). Because NR is orally available
23 ^{34, 38}, we performed a second experiment in which we fed mice an NR-supplemented diet
24 for 2 weeks. We confirmed in this independent series that NAD levels are reduced in the
25 *SRF^{HKO}* hearts compared to controls and are rescued by NR administration (**Figure 1I**).

26

27 **NR preserves cardiac functions in the *SRF^{HKO}* heart**

28 Because NR protects myocardial NAD, we hypothesized that NR supplementation in food
29 might be beneficial for cardiac functions in the context of DCM-associated HF. We fed

1 control and mutant *SRF^{HKO}* mice with standard chow diet (CD) or NR-enriched diet (0.22%)
2 to reach a dose of 400 mg of NR/Kg of body weight/day. The protocol was maintained from
3 day 5 to 50 after the induction of the disease, a period in which untreated *SRF^{HKO}* mice
4 develop DCM and HF ^{19, 29}. NR enriched-diet induced a modest 4 to 5% increase in body
5 weight in controls and *SRF^{HKO}* mice (**Figure 2A**). Cardiac parameters were analyzed by
6 echocardiography between D45 and D47 when *SRF^{HKO}* mice develop HF (**Figure 2B-O**). NR
7 did not induce any change in heart rate and LV mass index (**Figure 2B,C**). *SRF^{HKO}* mutant
8 mice fed the standard diet displayed a severe decrease in LV ejection fraction (LVEF) and
9 fractional shortening (FS) (**Figure 2D,E**). The NR diet clearly protected against the decline
10 of LVEF in *SRF^{HKO}* mutant mice. LVEF was maintained at 64.8% ± 8.2 (S.D) versus 48.1 % ±
11 7.4 in the non-treated *SRF^{HKO}* mice ($p = 4.3 \times 10^{-5}$) though it was still below the LVEF value
12 of 73.5% ± 7.5 in control mice ($p=3.8 \times 10^{-2}$). The NR enriched-diet fully protected *SRF^{HKO}*
13 mice against the dilatation the LV in systole and diastole (**Figure 2F-I**). NR also protected
14 against the thinning of the LV posterior wall while having little impact on interventricular
15 septum thickness (**Figure 2J-M**). These positive effects of NR enriched-diet on LV
16 remodeling were manifest by the preservation of the H/R ratio that normally declines in
17 *SRF^{HKO}* mice with the development of the DCM (**Figure 2N**). Changes in stroke volume
18 (**Figure 2O**) or cardiac output (not shown) were not significant.

19

20 **NR-enriched diet protects the cardiac NAD⁺ metabolome in HF**

21 The impact of an NR-enriched diet on the cardiac NAD⁺ metabolome including salvageable
22 precursors and catabolites of NAD⁺ consuming pathways is not known (**Figure 3A**). Mice
23 fed with or without NR were sacrificed 3 days after the echocardiography at D50.
24 Myocardial NAD (NAD⁺ + NADH) was decreased in the *SRF^{HKO}* mice at D50 (**Figure 3B**) as at
25 earlier stages (**Figure 1F, I**). The NR-supplemented diet protected against the drop in NAD
26 in *SRF^{HKO}* hearts. Myocardial NAD⁺ and NADH varied in the same direction in all conditions
27 leaving the NAD⁺/NADH ratio unchanged (**Supp. Figure S1**). Liquid chromatography
28 coupled to mass spectrometry (LCMS) allowed us to provide the levels of nearly the full set
29 of NAD⁺ metabolites on a common scale with NAD⁺ ^{17, 41} (**Figure 3C-L**). Strikingly, with
30 lower levels of NAD⁺ (**Figure 3C**), the *SRF^{HKO}* mice heart did not have higher levels of ADPR

1 or NAM (**Figure 3D, E**), which would have indicated higher levels of PARP or other NAD⁺
2 consuming activities. Levels of NADP⁺ and NMN showed a similar pattern as NAD⁺ (**Figure**
3 **3F, G**). Changes in unrelated metabolites such as inosine and IMP were not significant
4 (**Figure 3K, L**).

5 The NR diet increased the cardiac levels of nicotinic acid adenine dinucleotide
6 (NAAD)(**Figure 3H**), a highly sensitive biomarker of increased NAD⁺ metabolism³⁸. NR also
7 increased Methyl-NAM (MeNAM) derived from NAM methylation by the NNMT enzyme
8 (**Figure 3I, J**). MeNAM oxidation by AOX1 generates N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide
9 (Me4PY) and releases hydrogen peroxide (H₂O₂) (**Figure 3A**). In the nematode, this life-
10 protective pathway has been linked to activation of the cytoprotective NRF2 transcription
11 factor that upregulates expression of antioxidant enzymes⁴². The NR diet increased the
12 expression level of the *Nfe2l2* gene encoding NRF2 as well as its target genes *metallothionein*
13 *2 (Mt2)* and *NADPH oxidase 4 (Nox4)* in the heart of *SRF^{HKO}* mice (**Figure 3M-O**). The
14 expression level of the glucose-6-phosphate dehydrogenase *G6pdx* initiating the pentose
15 phosphate pathway, which is critical for NADPH production, was increased at baseline and
16 after NR-enriched diet in *SRF^{HKO}* mice (**Figure 3P**). These results show that the NAD⁺
17 metabolome is depressed in the heart of *SRF^{HKO}* mice and that, consistent with
18 transcriptional induction of *Nmrk2*, this defect can be corrected by NR, which also activates
19 transcriptional pathways linked to oxidative stress signaling.

20

21 **NR enriched diet does not result in global cardiac protein deacetylation**

22 The absolute levels of NAM and ADPR in this HF model are low and show little changes with
23 NR supplementation (**Figure 3D, E**), suggesting that the NR-driven boost in NAD⁺ synthesis
24 is not necessarily translated into a higher level of NAD⁺ consumption by sirtuins and PARPs.
25 We performed anti-AcLys (acetylated Lysine residue) and anti-PAR (poly-ADP-ribose)
26 western blot analyses on cardiac proteins from control and *SRF^{HKO}* mice fed with the CD or
27 NR-enriched diet. Just as levels of ADPR were not modulated by *SRF^{HKO}* or NR, neither were
28 levels of PAR (**Supp. Figure S2A**). There was a mild increase in the acetylation level of some
29 cardiac proteins in the NR-fed *SRF^{HKO}* hearts (**Supp. Figure S2B**). The acetylation state of
30 nucleocytosolic proteins is controlled by a balance of acetylation, which always requires Ac-

1 coA, and deacetylation, which requires NAD⁺ when catalyzed by sirtuins. Using an antibody
2 specific to the acetylated form of FOXO1⁴³, we observed an increase in the acetylation level
3 of this protein in the heart in response to NR in controls as in *SR^{FHKO}* mice (**Figure 3Q, R**).
4 These data suggest that the bioenergetic improvement in NR-supplemented hearts may
5 result in greater production of cytosolic Ac-coA and consequent increased nucleocytosolic
6 proteins acetylation.

7

8 **NR improves metabolism of citrate in HF**

9 NR has been shown to enhance mitochondrial oxidative metabolism in liver and skeletal
10 muscle tissues in response to high fat diet³⁴. HF might plausibly depress total
11 mitochondrial biogenesis, thereby reducing production of phosphocreatine, ATP and ROS-
12 detoxifying metabolites. Second, the electron transfer chain (ETC) might be damaged in HF,
13 degrading production of high-energy phosphates. Third, expression and/or activity of
14 particular enzymes might be depressed by HF and restored by NR.

15 We found that several regulators involved in mitochondrial biogenesis and oxidative
16 metabolism such as *Ppargc1a*, *Ppargc1b* and *Tfam* were repressed in *SR^{FHKO}* hearts (**Supp.**
17 **Figure S3A**). Genes involved in lipid metabolism were also repressed in the *SR^{FHKO}* hearts
18 (**Supp. Figure S3B**). Simultaneously, the expression of the glucose transporter *Glut1* was
19 increased and expression of the inhibitory pyruvate dehydrogenase kinase *Pdk2* was
20 decreased (**Supp. Figure S3C**). These changes, which suggest a switch from fatty acid to
21 glucose driven energetic metabolism, were not altered by the NR-enriched diet. There was a
22 trend toward a reduced ratio of mitochondrial to genomic DNA in the *SR^{FHKO}* LV, which was
23 not changed by NR (**Figure 3S**).

24 The NADH-dependent Complex I activity and Cox activity was not changed by the NR diet
25 (**Figure 3T,U**). We measured maximal O₂ consumption rate in LV permeabilized fibers. The
26 NADH-dependent complex I (malate/pyruvate + glutamate) and FADH₂-dependent complex
27 II (succinate) maximal respiration rates showed no alteration at this stage (Day 50) in the
28 *SR^{FHKO}* hearts and no change after NR administration (**Supp. Figure S3D**). Apparent *K_m* for
29 ADP, mitochondrial creatine kinase coupling and ADP acceptor control ratio were not

1 changed (**Supp. Figure S3E-G**). These data indicate that HF does not disable production of
2 reduced cofactors or function of the mitochondrial ETC in permeabilized cardiac fiber
3 preparations.

4 We noted that NR-treatment resulted in a net increase in acetylation of FOXO1 (**Figure 3Q,**
5 **R**). We therefore hypothesized that HF might alter the availability of cytosolic Ac-coA via
6 depression of mitochondrial citrate synthase and/or conversion of citrate to Ac-coA via the
7 cytosolic enzyme, ATP-citrate lyase. Strikingly, citrate synthase activity was reduced to 65%
8 of control levels in the *SRF^{HKO}* left ventricular myocardium at D50 (**Figure 3V**). Strikingly,
9 NR administration protected against the decline of citrate synthase activity in the failing
10 heart.

11
12 ***Nmrk2 is induced by inhibition of alternative NAD⁺ biosynthetic pathways in cultured***
13 ***cardiomyocytes***

14 Little is known on the contribution of NMRK2 to NAD⁺ homeostasis in cardiomyocytes. To
15 assess the impact of NMRK2 on NAD⁺ biosynthesis relative to the other pathways, we used
16 chemical inhibitors to target the alternative pathways in neonate rat cardiomyocytes (NRC).
17 The glutamine analog azaserin (AZA) inhibits glutamine-dependent NAD synthase
18 NADSYN1 ^{44, 45}, which catalyzes the last step of NAD⁺ synthesis from TRP and NA (**Figure**
19 **1A**). FK866 is a specific inhibitor of Nampt ⁴⁶.

20 AZA had a slowly repressive effect on NAD⁺ and NADH pools that resulted in a 50%
21 reduction with respect to non-treated cells at 72 h with unchanged NAD⁺/NADH ratio
22 (**Figure 4A-C**). AZA triggered a progressive increase in *Nmrk2* expression reaching a
23 plateau of ~10-fold induction at 48-72 h (**Figure 4D**). FK866 treatment led to a rapid and
24 severe loss of intracellular NAD⁺ but not NADH (**Figure 4A-C**). Despite this severe loss of
25 NAD⁺, NRC could be maintained up to 72h in continuous layer. *Nmrk2* expression started to
26 increase at 48 h and strongly rose to 70-fold at 72 h (**Figure 4D**). Combined AZA and FK866
27 treatment did not accelerate the loss of NAD⁺ nor increased *Nmrk2* expression with respect
28 to FK866 alone (**Figure 4A-D**). We observed no changes in *Nmrk1* expression levels in
29 these conditions (not shown).

1 To test whether NR could preserve NAD⁺ levels in the presence of FK866, we added 1 mM
 2 NR or 250 μM NAD⁺ at the same time as 10 μM FK866. NR slightly increased the baseline
 3 level of intracellular NAD⁺ in non-treated NRC while exogenous NAD⁺ had no impact
 4 (**Figure 4E**). Both compound trend to increase NAD⁺/NADH ratio (**Figure 4F-G**). Exogenous
 5 NR fully protected NAD⁺ levels in NRC following NAMPT inhibition by FK866 while the
 6 protection by exogenous NAD⁺ was partial (**Figure 4E**), though both treatments blocked
 7 transcriptional induction of *Nmrk2* (**Figure 4E**). At least 100 μM of NR was required to
 8 rescue the NAD⁺ loss induced by 10 μM FK866 (**Figure 4I**). Finally, to assess the
 9 functionality of NMRK2 in cardiomyocytes in absence of a stress like the FK866 treatment,
 10 we infected NRC with a recombinant adenovirus expressing a HA-tagged *Nmrk2* cDNA
 11 (**Figure 4J**). Overexpression of NMRK2 did not modulate the NAD⁺ levels in NRC unless NR
 12 was added to the DMEM medium, which contains only NAM precursor. In presence of NR,
 13 *Nmrk2* overexpression robustly increased the NAD⁺ level by a factor of 6 in NRC. NR alone
 14 slightly increased the NAD⁺ level in control NRC infected with *Ad-GFP* (**Figure 4J**) as in
 15 previous experiments (panel E), showing that the NMRK1 and/or NMRK2 pathway is active
 16 at baseline in NRC. Interestingly, in isolated primary cultures of adult rat cardiomyocytes
 17 (ARC), we found that NR increased intracellular NAD close to 3 fold showing that the NMRK
 18 pathway is even more active in ARC than in NRC (**Figure 4K**). FK866 treatment reduced
 19 NAD levels by a factor 2 in ARC while AZA had no impact (**Figure 4K**). These results show
 20 that the NMRK2 pathway is induced when the other NAD⁺ biosynthetic pathways are
 21 inhibited *in vitro* and is efficient to increase NAD⁺ synthesis in cardiomyocytes.

22

23 ***SRF is not a repressor of Nmrk2***

24 Because *Nmrk2* expression is activated *in vivo* upon *Srf* gene inactivation, we addressed the
 25 role of the SRF transcription factor in FK866-mediated induction of *Nmrk2*. We identified
 26 an SRF binding site with 9/10 bp match to the consensus CC(A/T)₆GG (CArG) sequence in a
 27 conserved 600 bp region between the murine and human genes (**Figure 5A**). We cloned the
 28 upstream region and 5'UTR of the murine *Nmrk2* gene (-581/+61) into a luciferase reporter
 29 vector and introduced mutations to transform the CArG-like sequence to a motif matching
 30 the consensus sequence (5'-CC) or a motif unable to bind SRF (5'-GG) (**Figure 5A**). FK866

1 increased the expression of the WT construct 8-fold while a consensus CArG reduced the
2 extent of activation (**Figure 5B**). The 5'-GG mutation reduced baseline expression by 75%
3 and abolished the response to FK866. Extending the length of the upstream region to the
4 full intergenic sequence upstream of *Nmrk2*, conferred a much higher level of luciferase
5 expression, especially in response to FK866 (**Figure 5C**). SiRNA-mediated inhibition of *Srf*
6 reduced, but did not abolish, the induction of endogenous *Nmrk2* by FK866 in NRCs (**Figure**
7 **5D-E**). These data show that SRF is a component of *Nmrk2* expression but not a simple
8 repressor.

9

10 ***The Nmrk2 gene is induced by the AMPK-PPAR α axis***

11 In terms of the requirement for ATP, PRPP and other energy inputs, the NR to NAD⁺
12 pathway is the least expensive way for a cell to make NAD⁺ ⁴⁷. We hypothesized that *Nmrk2*
13 might be activated by pathways related to energy failure, a key step in the pathogenesis of
14 HF. In agreement with this hypothesis, the level of phosphorylated AMPK α , the energy
15 stress sensing AMP-activated kinase, and its target Ac-CoA Carboxylase (ACC) was
16 increased at an early stage when *Nmrk2* induction begins in the heart of SRF^{HK0} mice
17 (**Figure 6A-B**). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) treatment
18 stimulated AMPK phosphorylation in NRC and increased NMRK2 protein level in NRC
19 (**Figure 6C**). The energetic stress induced by glucose-deprivation for 24 h also increased
20 the NMRK2 protein.

21 AICAR treatment did not modulate NAD⁺/NADH but robustly induced *Nmrk2* expression
22 (**Figure 6D-G**). To assess whether the effect of AICAR took place at the level of the *Nmrk2*
23 promoter, we transfected *Nmrk2*-luciferase constructs into NRC and treated the cells with
24 AICAR. The full-length p3009-Luc reporter was highly responsive to AICAR treatment
25 (**Figure 6H-I**). Co-transfection of a plasmid overexpressing a dominant negative (DN)
26 isoform of AMPK ⁴⁸ efficiently blunted the induction of the p3009-Luc construct by AICAR
27 (**Figure 6I**).

28 Analysis of the 5' regulatory sequences of *Nmrk2* revealed enrichment in putative
29 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) binding sites (**Figure 6J**). Promoter

1 deletion analysis showed that luciferase activity was maximal with the 3009 bp-long
2 fragment (**Figure 6J**). Deletion of 500 bp at 5' reduced the activity by 60%. Deleting the
3 region from -2552 to -1028 had no impact but sequential deletions from -1028 to -228
4 further reduced luciferase activity. By comparison, the activity of the *Nmrk2* promoter was
5 very low in cardiac fibroblasts (**Figure 6K**). To assess the role of PPAR factors in *Nmrk2*
6 gene regulation, we co-transfected NRC with the p3009-Luc reporter and expression
7 vectors for the various PPAR factors and the retinoid X receptor. Among the three PPAR
8 factors, only PPAR α increased the activity of the *Nmrk2* promoter in presence of its agonist
9 GW7647 (**Figure 6L**). The PPAR α antagonist G6471 repressed the *Nmrk2* promoter (**Figure**
10 **6L**) and blunted the activating effect of AICAR (**Figure 6M**). Neither the PPAR β antagonist
11 GSK3787 nor the PPAR γ antagonist G9662 had any effect on *Nmrk2* promoter induction by
12 AICAR. These results establish that *Nmrk2* is an AMPK-PPAR α responsive gene that is
13 induced by energy stress in cardiac cells.

14

15 **DISCUSSION**

16 We report that depressed NAD⁺ homeostasis and activation of Nmrk2 kinase are early and
17 persistent events in a mouse model of DCM leading to heart failure and that administration
18 of NR, the substrate of Nmrk2 and most energetically favorable NAD⁺ precursor, prevents
19 deterioration of cardiac functions and adverse remodeling.

20 Altered NAD⁺ homeostasis and dysregulation of NAD⁺ biosynthetic and NAD⁺ consuming
21 enzymes has been reported in several models of HF including pressure overload,
22 myocardial infarction and angiotensin 2 infusion in recent years ^{7, 13, 49}. In this context,
23 much attention has focused on the NAMPT enzyme that is repressed in several models of
24 cardiac injuries ⁴⁹. On the other hand, we found a robust upregulation of *Nmrk2* expression
25 in the heart of SRF^{HKO} mice. Interestingly, we observed a similar shift in human failing heart
26 with repressed NAMPT and increase NMRK2 protein levels compared to control hearts. In
27 SRF^{HKO} heart, transcriptomic analysis showed that the *Nmrk2* upregulation was paralleled
28 by an increase in the expression of NT5E that would promote conversion of extracellular
29 NAD⁺ and NMN to NR, and a decline in the expression of PNP, which would convert NR into
30 NAM ^{31, 39, 40}. This suggests that the myocardium attempts to shift completely to an NR-

1 driven pathway for NAD⁺ synthesis in the context of DCM. Interrogation of the Gene
2 Expression Omnibus (GEO) database reveals that *Nmrk2* is induced in several models of
3 cardiomyopathy related to lamin-A mutation (GEO dataset GDS2746) ⁵⁰, isocitrate
4 dehydrogenase 2 mutations (GDS4893) ⁵¹, cardiac-specific PPAR coactivator 1-alpha
5 (PGC1 α) deletion (GDS4776) ⁵² or transferrin receptor Tfr1 deficiency (GDS4776) ⁵³.
6 Considering the relative heterogeneity of molecular functions encoded by all these genes
7 including *Srf*, we propose that the activation of the NMRK2 pathway represents a common
8 adaptive mechanism in the failing heart to sustain NAD⁺ synthesis. *Nmrk1* is expressed at
9 low level in the heart and was not modulated in any of these models. Our data show that
10 *Nmrk2* gene can be activated in response to NAMPT inhibition and activation of the energy
11 stress sensor AMPK and PPAR α pathways. AMPK was activated early in HF. In addition to
12 its well-known roles in stimulating fuel oxidation to restore ATP levels ⁵⁴, AMPK
13 stimulation induces *Nmrk2* expression. We note that NMN synthesis from NR by NMRK
14 enzymes requires a single ATP while synthesis from NAM by NAMPT requires more than 4
15 ATP equivalents: one for the autophosphorylation of the enzyme, and three (plus a
16 carbohydrate) in formation of PRPP. Hence, the shift from NAMPT to NMRK2 for NAD⁺
17 synthesis is an energy-sparing mechanism that may be favored in HF.

18 Although the NMRK2 pathway is activated in the failing heart of SRF^{HKO} mice, the
19 myocardial NAD⁺ level is depressed, which suggests that circulating and tissue levels of
20 NAD⁺, NAM, NMN and NR are insufficient to sustain cardiac NAD⁺ synthesis in mice on a
21 regular rodent chow diet, stimulating an interest in NR supplementation to correct this
22 defect. A few studies have shown that short-term NAD⁺ supplementation via osmotic pump
23 delivery (14 days) ⁷ or NMN supplementation ^{55, 56} can normalize alterations in
24 NAD⁺/NADH ratio in the failing heart. Notably, cells do not take up NMN intact and, instead,
25 NMN is extracellularly dephosphorylated to NR, such that its cellular conversion to NAD⁺
26 depends on the NR kinase pathway ⁵⁷.

27 In a recent study, NR was administrated to mouse neonates deficient for the transferrin
28 receptor, prolonging their survival from D10 to D15 ⁵³. Other studies reported a beneficial
29 impact of long-term NR supplementation in mouse models of mitochondrial myopathies,
30 skeletal muscle aging, high-fat diet induced obesity and diabetes ^{17, 34-37, 58, 59}.

1 We discovered a strongly beneficial effect of NR in the *SRF^{HKO}* model of HF in preservation
2 of cardiac functions and limitation of cardiac remodeling that was associated with
3 maintenance of NAD⁺ levels in the heart. Experiments were conducted to probe the
4 molecular nature of cardiomyocyte dysfunction in HF that is corrected by NR and to probe
5 the basis for *Nmrk2* induction in this model. The most striking NR-reversible deficit we
6 found in HF was depression of citrate synthase activity. *Nmrk2* induction was shown to
7 correlate with NAD⁺ decline and depend on the AMPK-PPAR α axis.

8 Increasing the steady state level of NAD⁺ can be expected to increase activity of sirtuins <sup>31-
9 33,35</sup>. In addition, in the overfed mouse liver, the sum of NADP⁺ and NADPH was depressed
10 and was brought back to normal by NR supplementation, suggesting that restoration of
11 defense against ROS may mediate some of the protective effects of NR in obesity and type 2
12 diabetes ¹⁷. Here we used NAD⁺ metabolomics and expression analysis to discover the
13 reason for depressed NAD⁺ levels in HF. There was no evidence for increased levels of PAR,
14 ADPR, Nam or PARylated proteins, which would indicate a storm of NAD⁺ consuming
15 activities in HF. Instead, a progressive loss of *Nampt* expression, coupled with the known
16 depression of ATP and high-energy phosphates, is postulated to make it challenging for
17 damaged hearts to maintain NAD⁺ homeostasis.

18 Many regulatory processes from gene expression to enzyme activity are controlled by
19 reversible protein Lys acetylation. In the nucleus as in the mitochondria, though there are a
20 variety of acetylases and deacetylases that are NAD⁺-dependent and NAD⁺-independent,
21 production of citrate in mitochondria and its conversion to cytosolic Ac-coA is required to
22 drive changes in substrate fuel selection ² and protein acetylation level ^{11, 60}. NR robustly
23 increased the acetylation level of FOXO1 in *SRF^{HKO}* hearts as well as in control hearts,
24 suggesting a tight link between NR-derived NAD⁺ synthesis and Ac-coA availability for post-
25 translational acetylation of cellular proteins. This apparently overrides the ability of SIRT1
26 to deacetylate the FOXO1 nuclear factor. Though SIRT1 is often perceived as a protective
27 pathway in the organism throughout lifespan, chronic activation of SIRT1 has been shown
28 to be detrimental to cardiac functions in the context of HF ¹⁴. Noticeably SIRT1-mediated
29 deacetylation of FOXO1 increases the autophagic process in the heart in condition of
30 starvation ⁴³. Strong enhancement of autophagy may not be favorable in chronic HF such as

1 in the SRF^{HKO} model where SRF depletion already leads to low synthesis of sarcomeric
2 proteins. FOXO1 inactivation protects against the development of chronic HF such as
3 diabetic cardiomyopathy ⁶¹. Acetylation of FOXO1 is considered as an OFF signal for FOXO1,
4 diminishing its binding affinity to DNA. Hence, it is conceivable that NR-induced
5 hyperacetylation of FOXO1 contributes to the beneficial effects of NR in the context of
6 chronic HF.

7 Finally, we observed that NR led to heightened production of Me4PY, a terminal NAM
8 metabolite associated with local production of H₂O₂. This pathway was shown to promote
9 life extension in the *C. elegans* through a hormetic response to a moderate rise in ROS,
10 which activates the cytoprotective NRF-2 transcription factor involved in oxidative stress
11 response ⁴². In the SRF^{HKO} heart, NR was shown to result in Me4PY simultaneous with
12 induction of NRF-2 and cytoprotective target genes.

13 In conclusion, our work shows that oral NR supplementation is a powerful approach to
14 preserve cardiac functions and limit remodeling in DCM, a devastating disease currently
15 lacking effective therapies. Further work will be required to determine the
16 pharmacokinetics and pharmacodynamics of therapeutic NR administration in animal
17 models and people suffering HF to enable safe and effective human translation.

18

19

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for internal review purposes only, and not to be distributed outside the organization.

1 **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

2 **Patients.**

3 Left ventricular myocardium was obtained from terminally failing human hearts of 4
4 patients (mean age 54 years \pm 7, S.D.) at the time of transplantation at the “Hôpitaux
5 Universitaires de Strasbourg” (HUS) as previously published with approval of HUS ethics
6 committee ⁶². Patients’ characteristics are detailed in Table S2. Human cardiac tissue
7 control samples (LV, mean age 51 years \pm 4.5, S.D) were obtained from general organ
8 donors whose non-diseased hearts were explanted to obtain pulmonary and aortic valves.
9 The investigations conformed to the principles of the Declaration of Helsinki. Experimental
10 protocols and were approved by the Ethical Review Board of the Medical Center of the
11 University of Szeged and by the Scientific and Research Ethical Committee of the Medical
12 Scientific Board at the Hungarian Ministry of Health (ETT-TUKEB; No. 51-57/1997 OEj and
13 4991-0/2010-1018EKU).

14 **Transgenic mice.** All experiments with animals conformed to the Directive 2010/63/EU of
15 the European Parliament and were approved by the ethics committee Charles Darwin #5
16 (agreement 00369.01). *SRF^{FKO}* mice bear the tamoxifen-inducible α -MHC-MerCreMer
17 transgene and the *Srf* floxed allele (*Sf/Sf*) as described previously ¹⁹. Tamoxifen (Sigma
18 T5648) was administrated by i.p. injection at a dose of 0.7 mg diluted in 100 μ l peanut oil at
19 D0, D1 and D2 to *SRF^{FKO}* mice and *Sf/Sf* littermates used as controls.

20 **Phenylephrine administration.**

21 The series of mice treated with PE, 80 mg/kg/day for 15 days with Alzet osmotic
22 micropumps and the impact of the treatment on cardiac parameters have been published
23 previously ²⁰.

24 **NAM and NR i.p. administration.** Mice were injected daily at a dose of 1 μ mole/ g body
25 weight with 300 mM NAM or NR solution in saline.

26 **NR supplementation in diet**

27 *SRF^{FKO}* and control (*Sf/Sf*) mice were administered either A04 rodent maintenance diet
28 (Scientific Animal Food Engineering, Paris, France) supplemented with NR chloride

1 provided by Chromadex (Irvine CA. USA). The soft pellets were prepared every 5 days by
2 mixing 1.65 g of NR into 500 g of powdered SAFE A04 diet and 235 ml of water to reach
3 2.24 mg of NR / g (wet weight). Control diet was prepared in the same way omitting NR.
4 Mice had *ad libitum* access to food and water. Mice (average body weight 31.3 ± 0.82 g, no
5 difference between groups) consumed an average of 6 g of soft food per day, reaching a
6 minimal daily intake of 450 mg NR/kg. No difference in food intake was observed between
7 *SRF^{FHKO}* and control mice.

8

9 **SUPPLEMENTAL INFORMATION**

10 Supplemental Information includes Supplemental Methods, 3 supplemental figures, and
11 two supplemental tables.

12

13 **ACKNOWLEDGMENTS**

14 We thank V. Veksler and R. Ventura-Clapier (Inserm UMR-S 1180) for expert advises on
15 respiration assays and fruitful discussions. We thank Luc Bertrand (UCL, Belgium) for
16 expert advises on AMPK detection and fruitful discussions. We thank A. Angelini (UMR
17 8256) for technical help in these assays and A. Grosfeld (UMR 8256) for preliminary set-up
18 experiments for *Nmrk2* cloning. We thank Florence Lefebvre for ARC isolation.

19 **SOURCES OF FUNDING**

20 This study was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), the
21 Agence Nationale de la Recherche (ANR) and fundings from Institut National pour la Santé
22 Et la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS),
23 UPMC University Paris 6 and University Paris Sud. N.D, C.T., R.D. were supported by a PhD
24 fellowship of French Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. N.D. was
25 further supported by a one year PhD fellowship from AFM. C.B is supported by the Roy J.
26 Carver Trust.

27 **DISCLOSURES**

28 N.D., Z.L. and M.M. declare an intellectual property interest in uses of NR for the treatment
29 of cardiomyopathies. C.B. discloses an intellectual property interest in uses of NR. He serves
30 on the Scientific Advisory Board of ChromaDex, which distributes NR and is cofounder and

1 Chief Scientific Advisor of Prohealthspan, which sells NR supplements. The other authors
2 declare no competing financial interest

3 REFERENCES

- 4 1. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the failing heart.
5 *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1813:1360-1372
- 6 2. Des Rosiers C, Labarthe F, Lloyd SG, Chatham JC. Cardiac anaplerosis in health and
7 disease: food for thought. *Cardiovasc Res*. 2011;90:210-9
- 8 3. Fukushima A, Milner K, Gupta A, Lopaschuk GD. Myocardial Energy Substrate
9 Metabolism in Heart Failure : from Pathways to Therapeutic Targets. *Curr Pharm Des*.
10 2015;21(25):3654-64.
- 11 4. Mericskay M. Nicotinamide adenine dinucleotide homeostasis and signalling in heart
12 disease: Pathophysiological implications and therapeutic potential. *Arch Cardiovasc Dis*.
13 2016;109:207-215
- 14 5. Lee CF, Tian R. Mitochondrion as a target for heart failure therapy- role of protein
15 lysine acetylation. *Circ J*. 2015;79:1863-1870
- 16 6. Nakamura M, Bhatnagar A, Sadoshima J. Overview of pyridine nucleotides review
17 series. *Circ Res*. 2012;111:604-610
- 18 7. Pillai VB, Sundaresan NR, Kim G, Gupta M, Rajamohan SB, Pillai JB, Samant S, Ravindra
19 PV, Isbatan A, Gupta MP. Exogenous nad blocks cardiac hypertrophic response via
20 activation of the sirt3-lkb1-amp-activated kinase pathway. *J Biol Chem*. 2010;285:3133-
21 3144
- 22 8. Belenky P, Bogan KL, Brenner C. Nad(+) metabolism in health and disease. *Trends*
23 *Biochem Sci*. 2007;32:12-19
- 24 9. Canto C, Menzies KJ, Auwerx J. Nad(+) metabolism and the control of energy
25 homeostasis: A balancing act between mitochondria and the nucleus. *Cell Metab*.
26 2015;22:31-53
- 27 10. Fouquerel E, Sobol RW. ARTD1 (PARP1) activation and NAD(+) in DNA repair and cell
28 death. *DNA Repair (Amst)*. 2014;23:27-32.
- 29 11. Ghanta S, Grossmann RE, Brenner C. Mitochondrial protein acetylation as a cell-
30 intrinsic, evolutionary driver of fat storage: Chemical and metabolic logic of acetyl-
31 lysine modifications. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013;48:561-574
- 32 12. Bindu S, Pillai VB, Gupta MP. Role of Sirtuins in Regulating Pathophysiology of the
33 Heart. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27:563-73.
- 34 13. Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, Tian B, Wagner T, Vatner SF,
35 Sadoshima J. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ*
36 *Res*. 2007;100:1512-1521

- 1 14. Oka S, Alcendor R, Zhai P, Park JY, Shao D, Cho J, Yamamoto T, Tian B, Sadoshima J.
2 Pparalpha-sirt1 complex mediates cardiac hypertrophy and failure through
3 suppression of the err transcriptional pathway. *Cell Metab.* 2011;14:598-611
- 4 15. Pillai JB, Isbatan A, Imai S, Gupta MP. Poly(adp-ribose) polymerase-1-dependent cardiac
5 myocyte cell death during heart failure is mediated by nad⁺ depletion and reduced
6 sir2alpha deacetylase activity. *J Biol Chem.* 2005;280:43121-43130
- 7 16. Bogan KL, Brenner C. Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: A
8 molecular evaluation of nad⁺ precursor vitamins in human nutrition. *Annu Rev Nutr.*
9 2008;28:115-130
- 10 17. Trammell SA, Weidemann BJ, Chadda A, Yorek MS, Holmes A, Coppey LJ, Obrosof A,
11 Kardon RH, Yorek MA, Brenner C. Nicotinamide riboside opposes type 2 diabetes and
12 neuropathy in mice. *Sci Rep.* 2016;6:26933
- 13 18. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Goldfarb S, Levvey BJ,
14 Meiser B, Rossano JW, Yusef RD, Stehlik J. The registry of the international society for
15 heart and lung transplantation: Thirty-second official adult heart transplantation
16 report--2015; focus theme: Early graft failure. *J Heart Lung Transplant.* 2015;34:1244-
17 1254
- 18 19. Parlakian A, Charvet C, Escoubet B, Mericskay M, Molkentin JD, Gary-Bobo G, De Windt
19 LJ, Ludosky MA, Paulin D, Daegelen D, Tuil D, Li Z. Temporally controlled onset of
20 dilated cardiomyopathy through disruption of the srf gene in adult heart. *Circulation.*
21 2005;112:2930-2939
- 22 20. Tritsch E, Mallat Y, Lefebvre F, Diguët N, Escoubet B, Blanc J, De Windt LJ, Catalucci D,
23 Vandecasteele G, Li Z, Mericskay M. An srf/mir-1 axis regulates ncx1 and annexin a5
24 protein levels in the normal and failing heart. *Cardiovasc Res.* 2013;98:372-380
- 25 21. Touvron M, Escoubet B, Mericskay M, Angelini A, Lamotte L, Santini MP, Rosenthal N,
26 Daegelen D, Tuil D, Decaux JF. Locally expressed igf1 propeptide improves mouse heart
27 function in induced dilated cardiomyopathy by blocking myocardial fibrosis and srf-
28 dependent ctgf induction. *Dis Model Mech.* 2012;5:481-491
- 29 22. Olson EN, Nordheim A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular
30 motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:353-365
- 31 23. Kuwahara K, Nakao K. New molecular mechanisms for cardiovascular
32 disease: Transcriptional pathways and novel therapeutic targets in heart failure. *J*
33 *Pharmacol Sci.* 2011;116:337-342
- 34 24. Chang J, Wei L, Otani T, Youker KA, Entman ML, Schwartz RJ. Inhibitory cardiac
35 transcription factor, srf-n, is generated by caspase 3 cleavage in human heart failure
36 and attenuated by ventricular unloading. *Circulation.* 2003;108:407-413
- 37 25. Davis FJ, Gupta M, Pogwizd SM, Bacha E, Jeevanandam V, Gupta MP. Increased
38 expression of alternatively spliced dominant-negative isoform of srf in human failing
39 hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H1521-1533

- 1 26. Kuwahara K, Teg Pipes GC, McAnally J, Richardson JA, Hill JA, Bassel-Duby R, Olson EN.
2 Modulation of adverse cardiac remodeling by stars, a mediator of mef2 signaling and srf
3 activity. *J Clin Invest.* 2007;117:1324-1334
- 4 27. Frank D, Rangrez AY, Poyanmehr R, Seeger TS, Kuhn C, Eden M, Stiebeling K, Bernt A,
5 Grund C, Franke WW, Frey N. Mice with cardiac-restricted overexpression of myozap
6 are sensitized to biomechanical stress and develop a protein-aggregate-associated
7 cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;72:196-207
- 8 28. Ho CY, Jaalouk DE, Vartiainen MK, Lammerding J. Lamin a/c and emerin regulate mkl1-
9 srf activity by modulating actin dynamics. *Nature.* 2013;497:507-511
- 10 29. Diguet N, Mallat Y, Ladouce R, Clodic G, Prola A, Tritsch E, Blanc J, Larcher JC, Delcayre
11 C, Samuel JL, Friguet B, Bolbach G, Li Z, Mericskay M. Muscle creatine kinase deficiency
12 triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced
13 glycation end products in dilated cardiomyopathy. *J Biol Chem.* 2011;286:35007-35019
- 14 30. Bieganowski P, Brenner C. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and
15 conserved nrk genes establish a preiss-handler independent route to nad+ in fungi and
16 humans. *Cell.* 2004;117:495-502
- 17 31. Belenky P, Racette FG, Bogan KL, McClure JM, Smith JS, Brenner C. Nicotinamide
18 riboside promotes sir2 silencing and extends lifespan via nrk and urh1/pnp1/meu1
19 pathways to nad+. *Cell.* 2007;129:473-484
- 20 32. Mouchiroud L, Houtkooper RH, Moullan N, Katsyuba E, Ryu D, Canto C, Mottis A, Jo YS,
21 Viswanathan M, Schoonjans K, Guarente L, Auwerx J. The nad(+)/sirtuin pathway
22 modulates longevity through activation of mitochondrial upr and foxo signaling. *Cell.*
23 2013;154:430-441
- 24 33. Brown KD, Maqsood S, Huang J-Y, Pan Y, Harkcom W, Li W, Sauve A, Verdin E, Jaffrey
25 SR. Activation of sirt3 by the nad+ precursor nicotinamide riboside protects from noise-
26 induced hearing loss. *Cell Metab.* 2014;20:1059-1068
- 27 34. Canto C, Houtkooper RH, Pirinen E, Youn DY, Oosterveer MH, Cen Y, Fernandez-Marcos
28 PJ, Yamamoto H, Andreux PA, Cettour-Rose P, Gademann K, Rinsch C, Schoonjans K,
29 Sauve AA, Auwerx J. The nad(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative
30 metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab.*
31 2012;15:838-847
- 32 35. Cerutti R, Pirinen E, Lamperti C, Marchet S, Sauve AA, Li W, Leoni V, Schon EA, Dantzer
33 F, Auwerx J, Viscomi C, Zeviani M. Nad(+)-dependent activation of sirt1 corrects the
34 phenotype in a mouse model of mitochondrial disease. *Cell Metab.* 2014;19:1042-1049
- 35 36. Khan NA, Auranen M, Paetau I, Pirinen E, Euro L, Forsstrom S, Pasila L, Velagapudi V,
36 Carroll CJ, Auwerx J, Suomalainen A. Effective treatment of mitochondrial myopathy by
37 nicotinamide riboside, a vitamin b3. *EMBO Mol Med.* 2014;6:721-731
- 38 37. Zhang H, Ryu D, Wu Y, Gariani K, Wang X, Luan P, D'Amico D, Ropelle ER, Lutolf MP,
39 Aebersold R, Schoonjans K, Menzies KJ, Auwerx J. Nad+ repletion improves
40 mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science.*
41 2016;352:1436-1443

- 1 38. Trammell SA, Schmidt MS, Weidemann BJ, Redpath P, Jaksch F, Dellinger RW, Li Z, Abel
2 ED, Migaud ME, Brenner C. Nicotinamide riboside is uniquely and orally bioavailable in
3 mice and humans. 2016; Oct 10; 7:12948. doi: 10.1038/ncomms12948. PMID:
4 27721479
- 5 39. Grozio A, Sociali G, Sturla L, Caffa I, Soncini D, Salis A, Raffaelli N, De Flora A, Nencioni A,
6 Bruzzone S. Cd73 protein as a source of extracellular precursors for sustained nad+
7 biosynthesis in fk866-treated tumor cells. *J Biol Chem.* 2013;288:25938-25949
- 8 40. Belenky P, Christensen KC, Gazzaniga FS, Pletnev A, Brenner C. Nicotinamide riboside
9 and nicotinic acid riboside salvage in fungi and mammals: Quantitative basis for urh1
10 and purine nucleoside phosphorylase function in nad+ metabolism. *J Biol Chem.*
11 2009;284:158-164
- 12 41. Trammell SA, Brenner C. Targeted, lcms-based metabolomics for quantitative
13 measurement of nad+ metabolites. *Comput Struct Biotechnol J.* 2013;4:e201301012
- 14 42. Schmeisser K, Mansfeld J, Kuhlow D, Weimer S, Priebe S, Heiland I, Birringer M, Groth
15 M, Segref A, Kanfi Y, Price NL, Schmeisser S, Schuster S, Pfeiffer AF, Guthke R, Platzer M,
16 Hoppe T, Cohen HY, Zarse K, Sinclair DA, Ristow M. Role of sirtuins in lifespan
17 regulation is linked to methylation of nicotinamide. *Nat Chem Biol.* 2013;9:693-700
- 18 43. Hariharan N, Maejima Y, Nakae J, Paik J, Depinho RA, Sadoshima J. Deacetylation of foxo
19 by sirt1 plays an essential role in mediating starvation-induced autophagy in cardiac
20 myocytes. *Circ Res.* 2010;107:1470-1482
- 21 44. Bieganowski P, Pace HC, Brenner C. Eukaryotic nad+ synthetase qns1 contains an
22 essential, obligate intramolecular thiol glutamine amidotransferase domain related to
23 nitrilase. *J Biol Chem.* 2003;278:33049-33055
- 24 45. Preiss J, Handler P. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. Ii. Enzymatic aspects.
25 *J Biol Chem.* 1958;233:493-500
- 26 46. Galli U, Travelli C, Massarotti A, Fakhfour G, Rahimian R, Tron GC, Genazzani AA.
27 Medicinal chemistry of nicotinamide phosphoribosyltransferase (nampt) inhibitors. *J*
28 *Med Chem.* 2013;56:6279-6296
- 29 47. de Figueiredo LF, Gossmann TI, Ziegler M, Schuster S. Pathway analysis of nad+
30 metabolism. *Biochem J.* 2011;439:341-348
- 31 48. Woods A, Azzout-Marniche D, Foretz M, Stein SC, Lemarchand P, Ferre P, Foufelle F,
32 Carling D. Characterization of the role of amp-activated protein kinase in the regulation
33 of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative
34 forms of the kinase. *Mol Cell Biol.* 2000;20:6704-6711
- 35 49. Hsu CP, Yamamoto T, Oka S, Sadoshima J. The function of nicotinamide
36 phosphoribosyltransferase in the heart. *DNA Repair (Amst).* 2014;23:64-68
- 37 50. Muchir A, Pavlidis P, Decostre V, Herron AJ, Arimura T, Bonne G, Worman HJ. Activation
38 of mapk pathways links lmna mutations to cardiomyopathy in emery-dreifuss muscular
39 dystrophy. *J Clin Invest.* 2007;117:1282-1293

- 1 51. Akbay EA, Moslehi J, Christensen CL, Saha S, Tchaicha JH, Ramkissoon SH, Stewart KM,
2 Carretero J, Kikuchi E, Zhang H, Cohoon TJ, Murray S, Liu W, Uno K, Fisch S, Jones K,
3 Gurumurthy S, Gliser C, Choe S, Keenan M, Son J, Stanley I, Losman JA, Padera R,
4 Bronson RT, Asara JM, Abdel-Wahab O, Amrein PC, Fathi AT, Danial NN, Kimmelman
5 AC, Kung AL, Ligon KL, Yen KE, Kaelin WG, Jr., Bardeesy N, Wong KK. D-2-
6 hydroxyglutarate produced by mutant *idh2* causes cardiomyopathy and
7 neurodegeneration in mice. *Genes Dev.* 2014;28:479-490
- 8 52. Martin OJ, Lai L, Soundarapandian MM, Leone TC, Zorzano A, Keller MP, Attie AD, Muoio
9 DM, Kelly DP. A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-
10 1 in the control of mitochondrial dynamics during postnatal cardiac growth. *Circ Res.*
11 2014;114:626-636
- 12 53. Xu W, Barrientos T, Mao L, Rockman HA, Sauve AA, Andrews NC. Lethal
13 cardiomyopathy in mice lacking transferrin receptor in the heart. *Cell Rep.*
14 2015;13:533-545
- 15 54. Kim TT, Dyck JR. Is ampk the savior of the failing heart? *Trends Endocrinol Metab.*
16 2015;26:40-48
- 17 55. Yamamoto T, Byun J, Zhai P, Ikeda Y, Oka S, Sadoshima J. Nicotinamide mononucleotide,
18 an intermediate of Nad⁺ synthesis, protects the heart from ischemia and reperfusion.
19 *PLoS One.* 2014;9:e98972
- 20 56. Lee CF, Chavez JD, Garcia-Menendez L, Choi Y, Roe ND, Chiao YA, Edgar JS, Goo YA,
21 Goodlett DR, Bruce JE, Tian R. Normalization of nad⁺ redox balance as a therapy for
22 heart failure. *Circulation.* 2016;134:883-894
- 23 57. Ratajczak J, Joffraud M, Trammell SA, Ras R, Canela N, Boutant M, Kulkarni SS,
24 Rodrigues M, Redpath P, Migaud ME, Auwerx J, Yanes O, Brenner C, Cantó C. NRK1
25 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in
26 mammalian cells. *Nat Commun.* 2016 Oct 11;7:13103. doi: 10.1038/ncomms13103.
27 PMID: 27725675
- 28 58. Frederick DW, Loro E, Liu L, Davila A, Jr., Chellappa K, Silverman IM, Quinn WJ, 3rd,
29 Gosai SJ, Tichy ED, Davis JG, Mourkioti F, Gregory BD, Dellinger RW, Redpath P, Migaud
30 ME, Nakamaru-Ogiso E, Rabinowitz JD, Khurana TS, Baur JA. Loss of nad homeostasis
31 leads to progressive and reversible degeneration of skeletal muscle. *Cell Metab.*
32 2016;24:269-282
- 33 59. Gomes AP, Price NL, Ling AJ, Moslehi JJ, Montgomery MK, Rajman L, White JP, Teodoro
34 JS, Wrann CD, Hubbard BP, Mercken EM, Palmeira CM, de Cabo R, Rolo AP, Turner N,
35 Bell EL, Sinclair DA. Declining nad(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-
36 mitochondrial communication during aging. *Cell.* 2013;155:1624-1638
- 37 60. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. Atp-citrate
38 lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science.* 2009;324:1076-1080
- 39 61. Battiprolu PK, Hojaye B, Jiang N, Wang ZV, Luo X, Iglewski M, Shelton JM, Gerard RD,
40 Rothermel BA, Gillette TG, Lavandero S, Hill JA. Metabolic stress-induced activation of
41 *foxo1* triggers diabetic cardiomyopathy in mice. *J Clin Invest.* 2012;122:1109-1118

1 62. Garnier A, Zoll J, Fortin D, N'Guessan B, Lefebvre F, Geny B, Mettauer B, Veksler V,
2 Ventura-Clapier R. Control by circulating factors of mitochondrial function and
3 transcription cascade in heart failure: A role for endothelin-1 and angiotensin ii. *Circ*
4 *Heart Fail.* 2009;2:342-350

5

6 LEGENDS

7

8 **Figure 1. Activation of the Nmrk2 enzyme in dilated cardiomyopathy**

9 **(A)** Biosynthetic NAD⁺ pathways in mammalian cells. NA (Nicotinic acid), NAM, NR and Trp
10 enter cells through specialized transport systems. Extracellular NAD⁺ and NMN are
11 hydrolyzed to NR by the ectonucleotidase CD73. In the *de novo* pathway, Trp is converted to
12 kynurenin (KYN) by IDO and TDO enzymes, and then into quinolic acid (QA) in 4 steps (not
13 detailed). QA, NA and NAM are phosphoribosylated by QPRT, NAPRT1, and NAMPT
14 enzymes, respectively, to form mononucleotides NAMN and NMN. NR is phosphorylated by
15 NMRK enzymes to form NMN. NR can be converted to NAM by PNP. NAMN and NMN
16 adenylated by the NMNAT enzymes to form the dinucleotides NAAD⁺ and NAD⁺. NAAD⁺ is
17 amidated by NADSYN1. Genes increased in SRF^{HKO} heart are highlighted in green and those
18 repressed in red (see accompanying Table S1). Inhibitors are shown in blue.

19 **(B, C)** RT qPCR analysis of *Nmrk2* and *Nampt* mRNA fold change (FC) in SRF^{HKO} hearts at
20 different days (D) after SRF inactivation.

21 **(D)** Western blot analysis of NMRK2 and NAMPT protein in control and failing human
22 hearts and control and SRF^{HKO} mouse hearts at D45. GAPDH is used as loading control. All
23 human and mouse samples were analyzed on single blot but 2 lanes separating that
24 showed signs of protein degradation and aberrant migration pattern were cut out of the
25 picture

26 **(E)** Control and SRF^{HKO} mutant heart sections stained for NMRK2 (red) and vinculin (green)
27 at D45. White bar in upper left panel = 20 μm.

28 **(F-H)** NAM or NR (30 μmole) were injected i.p. from D8 to 15 (400 mg/kg/day) to control
29 and SRF^{HKO} mice. Vehicle: saline solution. **(F)** Myocardial NAD⁺ levels. **(G, H)** RT qPCR
30 analysis of *Nmrk2* and *Nampt* mRNA levels.

31 **(I)** Myocardial NAD levels in control and SRF^{HKO} mice fed regular chow diet (CD) or NR
32 enriched diet (0.22%. 400-450 mg/kg/day) from D5 to 20.

33 Throughout the figure, except for F and I, data are expressed as mean FC ± SEM over control
34 group. Asterisks indicate statistical significant difference versus the control group: *, p ≤
35 0.05 ; **, p ≤ 0.01 ; ***, p ≤ 0.001.

36

37 **Figure 2. NR supplementation in diet prevents the onset of heart failure and** 38 **dilatation.**

39 **(A)** CD or NR supplemented diet (0.22 %) was given *ad libitum* to control and SRF^{HKO} mice
40 from D5 after SRF inactivation to the end of the experiment. Body weight was monitored

1 throughout the period. Data are expressed as mean % weight variation \pm SEM, compared to
2 weight at D5. #, ##, $p \leq 0.05$ and 0.01 , respectively, versus groups of the same genotype fed
3 the CD.

4 **(B-O)** Cardiac parameters of control and *SRF^{HKO}* mutant were analyzed in M-Mode
5 echocardiography between D45 to D47. **(B)** Heart rate; **(C)** Left ventricle (LV) mass index;
6 **(D)** LV ejection fraction; **(E)** Fractional shortening; **(F, G)** LV end-systolic diameter (D) and
7 volume (G); **(H, I)** LV end-diastolic diameter (H) and volume (I); **(J, K)**; LV posterior wall
8 thickness in systole (J) and diastole (K); **(L, M)** Interventricular septum thickness in systole
9 (L) and diastole (M); **(N)** H/R: LV thickness (H) to radius (R) ratio; **(O)** Stroke volume.
10 Dimensions were normalized by the body weight. *, **, ***: $p \leq 0.05$, 0.01 and 0.001 ,
11 respectively vs control CD group. #: $p \leq 0.05$; ###, $p \leq 0.001$, in comparisons between NR
12 versus CD groups of the same genotype.

13

14 **Figure 3. Impact of NR treatment on cardiac NAD⁺ metabolome**

15 **(A)** NR to NAD⁺ pathway and NAD⁺ catabolism are depicted. NAD⁺ is cleaved into NAM and
16 ADP-ribose by NAD⁺ consuming enzymes and NAM is either recycled by NAMPT or
17 methylated and oxidized giving rise to degradation products Me-NAM and Me-4PY.

18 **(B)** Myocardial NAD was quantified by colorimetric NAD⁺ cycling assay at day 50 in controls
19 (N=6), Controls + NR (N=5), *SRF^{HKO}* (N=6), *SRF^{HKO}* + NR (N=6). Data are expressed as means
20 \pm SEM. 2-way independent ANOVA statistics: ¶¶, $p \leq 0.01$ for the genotype effect, §§, $p \leq 0.01$
21 for the NR effect, no interaction.

22 **(C-L)** Myocardial metabolites were analyzed by LCMS-based metabolomics. See
23 abbreviations in the text. Controls (N=4), Controls + NR (N=5), *SRF^{HKO}* (N=6), *SRF^{HKO}* + NR
24 (N=5, except for NAM, MeNAM and Me-4PY, N=4, no peak was identified in one sample).
25 Data are expressed as means \pm SEM. Statistics : ¶¶, significant Kruskal Wallis test at $p \leq 0.01$
26 was followed by a post-hoc Dunn's test for groups with unequal size. #: $p \leq 0.05$ in
27 comparisons between NR versus CD groups of the same genotype.

28 **(M-P)** Expression of genes related to oxidative stress signaling. N=5 in each group.

29 **(Q)** Representative western blot analysis of FOXO1 and acetyl-FOXO1 of 3 independent
30 experiments realized in different duplicates for each group. GAPDH is used as a loading
31 control.

32 **(R)** Quantification of total and acetyl-FOXO1 levels in N=5 to 6 animals per group.

33 **(S-V)** LV cardiac tissue was isolated at 50 days after tamoxifen injection in control and
34 *SRF^{HKO}* mice fed CD or NR-enriched diet. DNA and proteins were extracted from parallel
35 samples to quantify mitochondrial to genomic DNA ratio **(S)** and enzymatic activities: **(T)**
36 Complex I activity, **(U)** Cytochrome oxidase activity **(V)** Citrate synthase activity. See
37 associated supplementary figure S3D-G.

38 In (M-P) and (R-V), data are expressed as mean FC \pm SEM over control group (black) fed CD
39 (white). *, **, ***: $p \leq 0.05$, ≤ 0.01 and ≤ 0.001 , respectively, versus control CD group. #, ##: $p \leq$
40 0.05 and ≤ 0.01 , respectively, in comparisons between NR versus CD groups of the same
41 genotype.

1

2 **Figure 4. *Nmrk2* expression is activated by repression of alternative NAD⁺**
3 **biosynthetic pathways**

4 **(A-C)** Intracellular levels of NAD⁺ (A), NADH (B) and NAD⁺/NADH ratio (C) in NRC after 10
5 μM FK866 and/or 20 μM Azaserin treatment or no treatment (NT) for 24 h to 72 h as
6 indicated.

7 **(D)** *Nmrk2* mRNA level in NRC treated as in (A-C)

8 **(E-G)** Same as in (A-C) in NRC treated for 72h with 10 μM FK866 or not treated (NT) in
9 normal culture medium (-) or in presence of 250 μM NAD⁺ or 1 mM NR.

10 **(H)** *Nmrk2* mRNA level in NRC treated as in (E-G)

11 **(I)** NAD⁺ levels in NRCs treated with 10 μM FK866 for 72 h, or not treated (NT) in the
12 presence of increasing concentration of NR in culture medium.

13 **(J)** NAD⁺ content in non treated (NT) or following 24 h NR treatment (1mM) in NRC
14 infected with Ad-GFP or HA-*Nmrk2*. Bottom: western blot detection of HA-*Nmrk2* with anti-
15 HA antibody.

16 **(K)** NAD level in adult rat cardiomyocytes. ARC were treated with 10 μM FK866, 20 μM
17 azaserin or 1 mM NR for 65 h. NAD (NAD⁺ + NADH) was extracted by the boiling buffered
18 ethanol method. Data are given as μM concentration in cells using an average 30 pl cellular
19 volume.

20 Throughout the figure the data are expressed as mean FC ± SEM over the control group,
21 except for NAD⁺/NADH ratio (C, G) and NAD levels in ARC (K). *, **, ***: p ≤ 0.05, ≤0.01 and
22 ≤0.001, respectively, versus control group.

23 **Figure 5. SRF is a component of *Nmrk2* gene transcription**

24 **(A)** CArG-like binding site for SRF in the conserved region between the murine (M.m)
25 *Nmrk2* promoter and human (H.s) *NMRK2* intron 1. The CArG-like motif was mutated to a
26 CArG consensus sequence (cons) and a CArG mutant (mut) site unable to bind SRF.

27 **(B)** Activity of p586-Firefly Luciferase construct bearing wild-type (WT), consensus (CONS)
28 or mutated (Mut) CArG motif **(H)** or longer fragments **(I)**, without (NT) or with FK866
29 treatment (10 μM). SV40-renilla luciferase was co-transfected with the *Nmrk2*-Firefly Luc
30 constructs for normalization of transfection efficiency.

31 **(C)** Various lengths of the murine *Nmrk2* regulatory region were inserted into pGL4 vector
32 and transfected in non-treated or FK866 treated cells.

33 **(D, E)** *Srf* and *Nmrk2* mRNA levels in NRC transfected with control scrambled siRNA (siScr)
34 or *Srf* si-RNA, without (NT) or with FK866 treatment.

35 Throughout the figure, data are expressed as mean fold change (FC) ± SEM over control
36 group, except for panel C, fold change over promoterless pGL4 plasmid. Asterisks indicate
37 statistical significant difference versus control group at *, p ≤ 0.05 ; **, p ≤ 0.01 ; ***, p ≤
38 0.001. N=4 for each group. Data are representative of at least 2 independent experiments.

39

1 **Figure 6. *Nmrk2* expression is increased by AMPK and PPAR α pathways**

2 **(A)** Representative western blot analysis of cardiac proteins in control and SRF^{HK0} mice at
3 D9 using antibodies directed against ACC, phospho-ACC (Ser79), AMPK α and phospho-
4 AMPK α (Thr172). Phosphorylated and total proteins were analyzed on 2 separate gels (gel
5 1 and 2) and GAPDH antibody was used for loading control.

6 **(B)** Quantification of total and phospho-protein signal from western blot analyses. Data are
7 normalized on GAPDH signal. The Phos/Total ratio is calculated from GAPDH normalized
8 levels for each individual. N= 6 for each group. Data are expressed as mean FC \pm SEM over
9 control group.

10 **(C)** NRC were treated with FK866 (10 μ M, 72h), AICAR (500 μ M, 48h) or grown in absence
11 of glucose in the medium (Glc 0) for 48h and proteins were extracted for western blot
12 analyses. *Left*: Representative western blot. *Right*: Quantification on n=3 samples for each
13 condition. Data are expressed as mean FC \pm SEM over NT group.

14 **(D-F)** Intracellular NAD⁺ content (D), NADH (E) and NAD⁺/NADH ratio (F) in NRC after 24h
15 of treatment with AICAR [500 μ M].

16 **(G)** RT qPCR analysis of *Nmrk2* mRNA level in NRC treated as in (D-F).

17 **(H, I)** NRC were cotransfected with *Nmrk2*-luciferase constructs containing 586 or 3009
18 base pairs of upstream *Nmrk2* regulatory region and a dominant negative (DN) AMPK
19 expression vector. NRC were transfected at D3 after plating, followed by AICAR treatment
20 (500 μ M) at D4. Luciferase levels were analyzed at D5. Normalized Firefly1/Renilla values
21 are expressed as in Figure 5B as FC \pm SEM over the promoterless pGL4 vector.

22 **(J)** *Nmrk2* promoter deletion analysis by luciferase assay. Rectangular boxes show the
23 position of the putative PPAR binding sites. Data are expressed as in (H, I). *, p \leq 0.05 ; ***,
24 p \leq 0.001, ns: not significant, vs the immediately shorter construct. Data are expressed as
25 mean FC \pm SEM over the promoterless pGL4 plasmid

26 **(K)** Neonatal rat cardiac fibroblasts and cardiomyocyte-enriched fractions were separated
27 on a discontinuous percoll gradient. Cardiac fibroblasts were transfected with the p-228, p-
28 581 and p-3009-FLuc constructs. Cardiomyocytes were transfected with the p-3009-FLuc.
29 SV40-RLuc construct was cotransfected for normalization. Data are expressed as mean FC \pm
30 SEM over the mean p228-FLuc activity in cardiac fibroblasts.

31 **(L)** NRC were co-transfected with the p3009-FLuc construct and the RXR expression vector
32 and with either PPAR α , PPAR β/δ or PPAR γ expression vectors. NRC were treated 24h later
33 with the agonists GW7647 [0.6 μ M], GW501516 [0.6 μ M], and G1929 [0.6 μ M], for PPAR α ,
34 PPAR β/δ and PPAR γ , respectively, or with their respective antagonists, GW6471 [10 μ M],
35 GSK3787 [2 μ M] or GW9662 [2 μ M]. Data are expressed as mean FC \pm SEM over normalized
36 luciferase levels of NRC transfected with the p3009-FLuc construct alone (dashed line) in
37 the same experiment. *, p \leq 0.05 vs NT cells. ##, p \leq 0.01 for agonist vs antagonist.

38 **(M)** NRC were transfected with the p3009-FLuc construct. Transfected NRC were treated
39 24h later with the antagonists G6471, GSK3787, or G9662, 30 minutes before adding AICAR
40 for a further 24 h period. All concentrations were as in L. Data are expressed as mean FC \pm

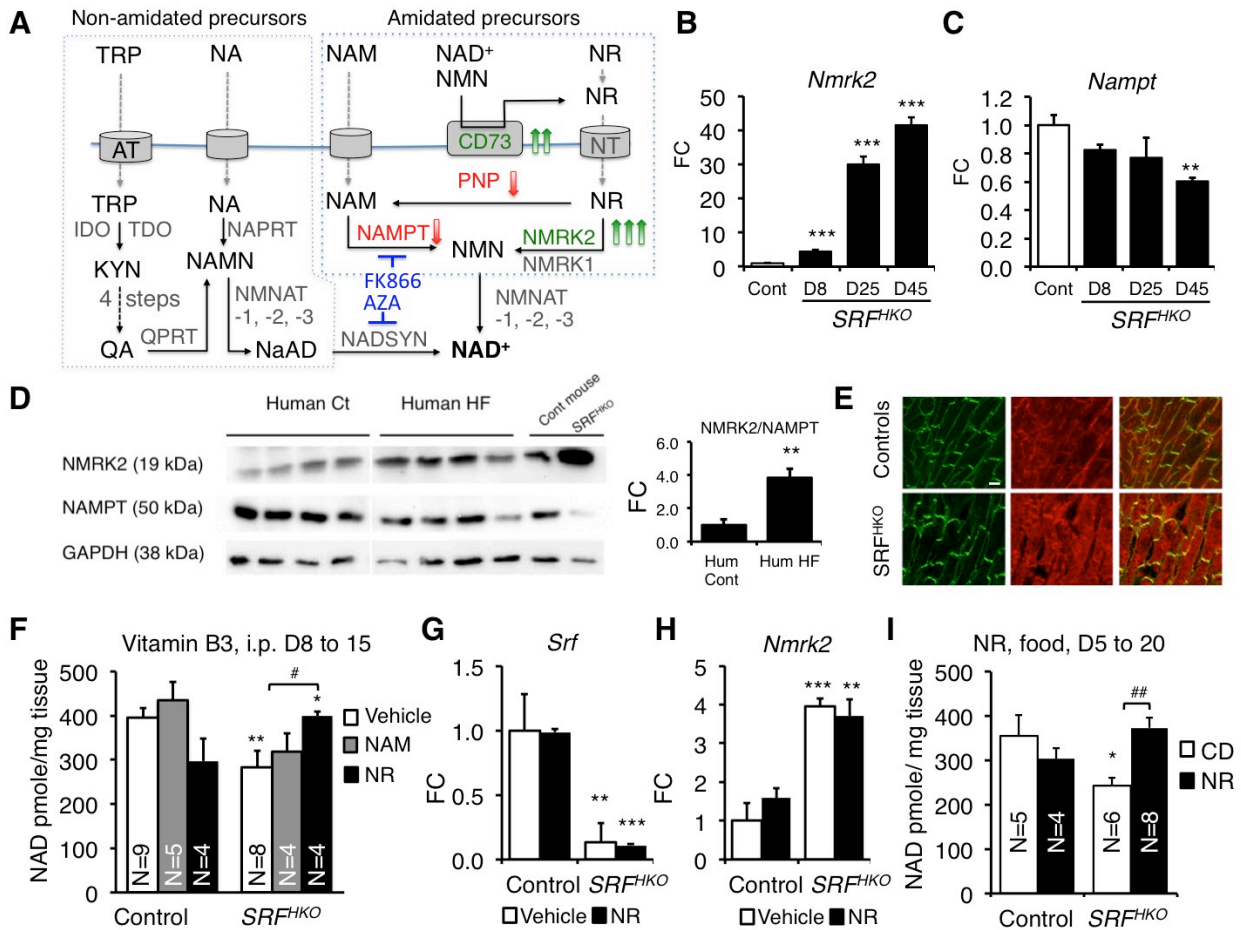
1 SEM over the p3009-luc construct treated with AICAR alone. *, $p \leq 0.05$ vs AICAR treated
2 cells.

3 Student test statistics: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$ vs reference control group. ##, $p \leq$
4 0.01 between 2 groups as indicated by brackets

5

Disclaimer: The manuscript and its contents are
confidential, intended for journal review purposes
only, and not to be further disclosed.

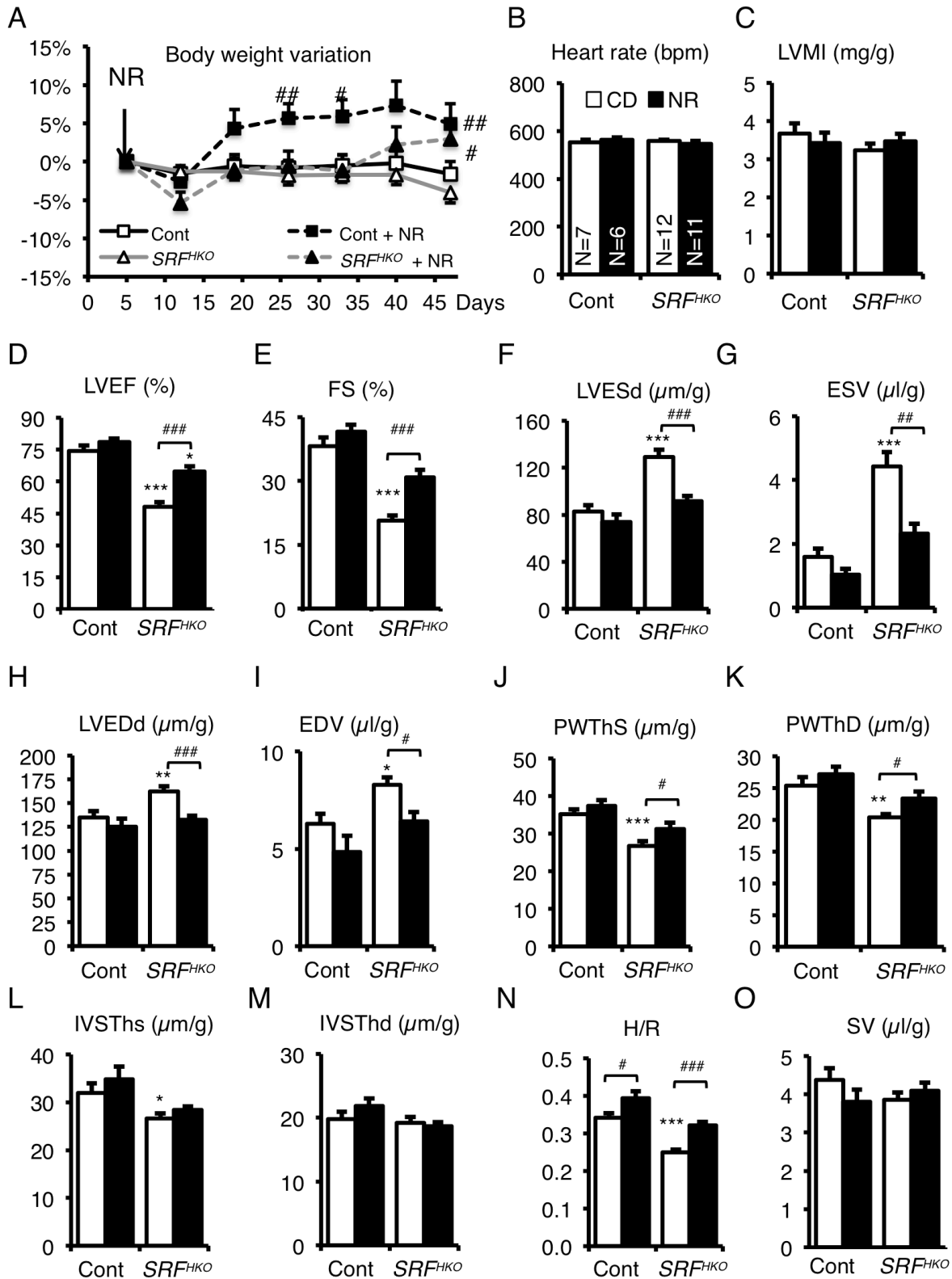
1 **Figure 1**
2



3
4

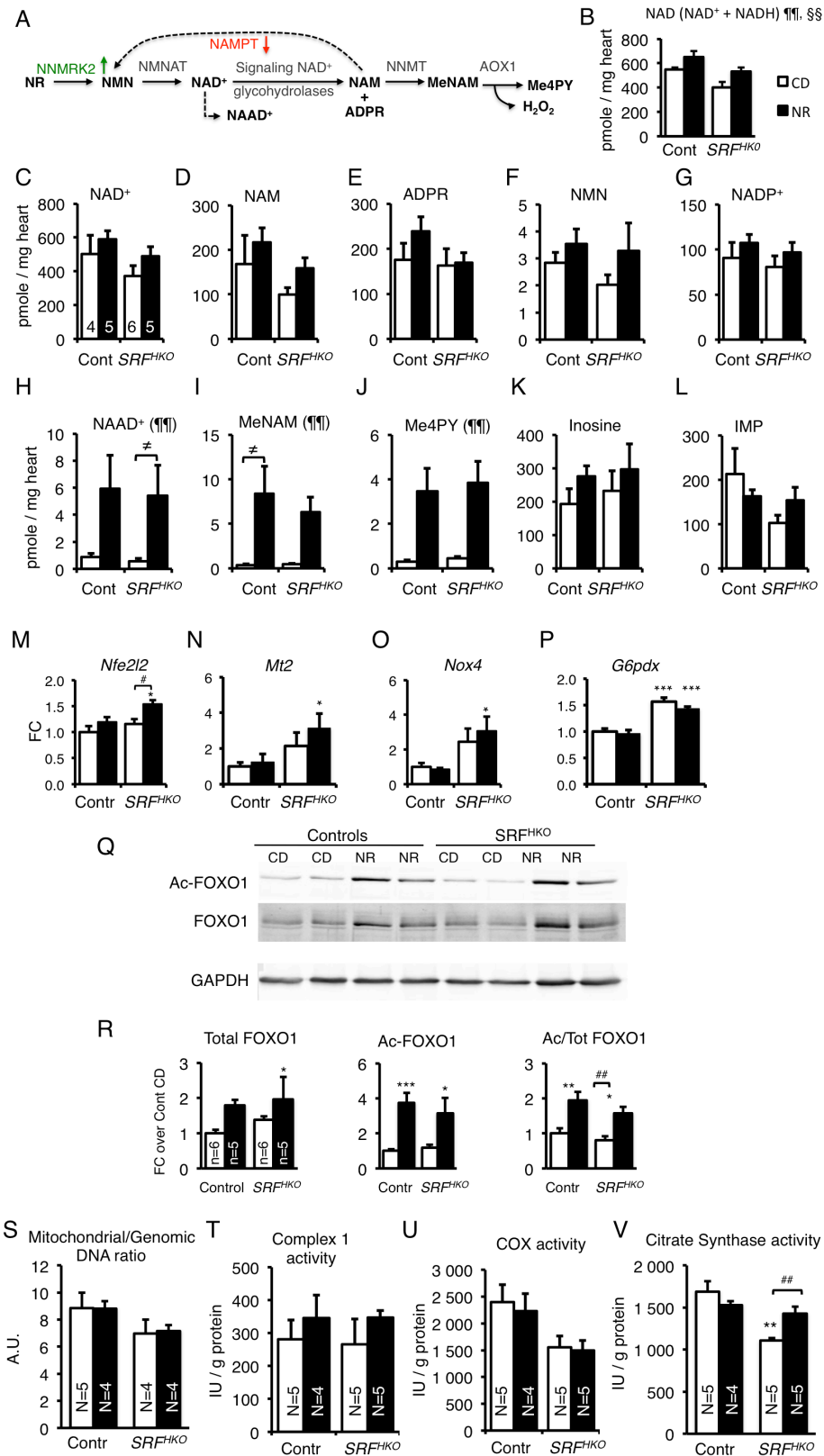
Disclaimer: The content of this document is confidential, intended for internal use only, and not for distribution.

1 **Figure 2**
2



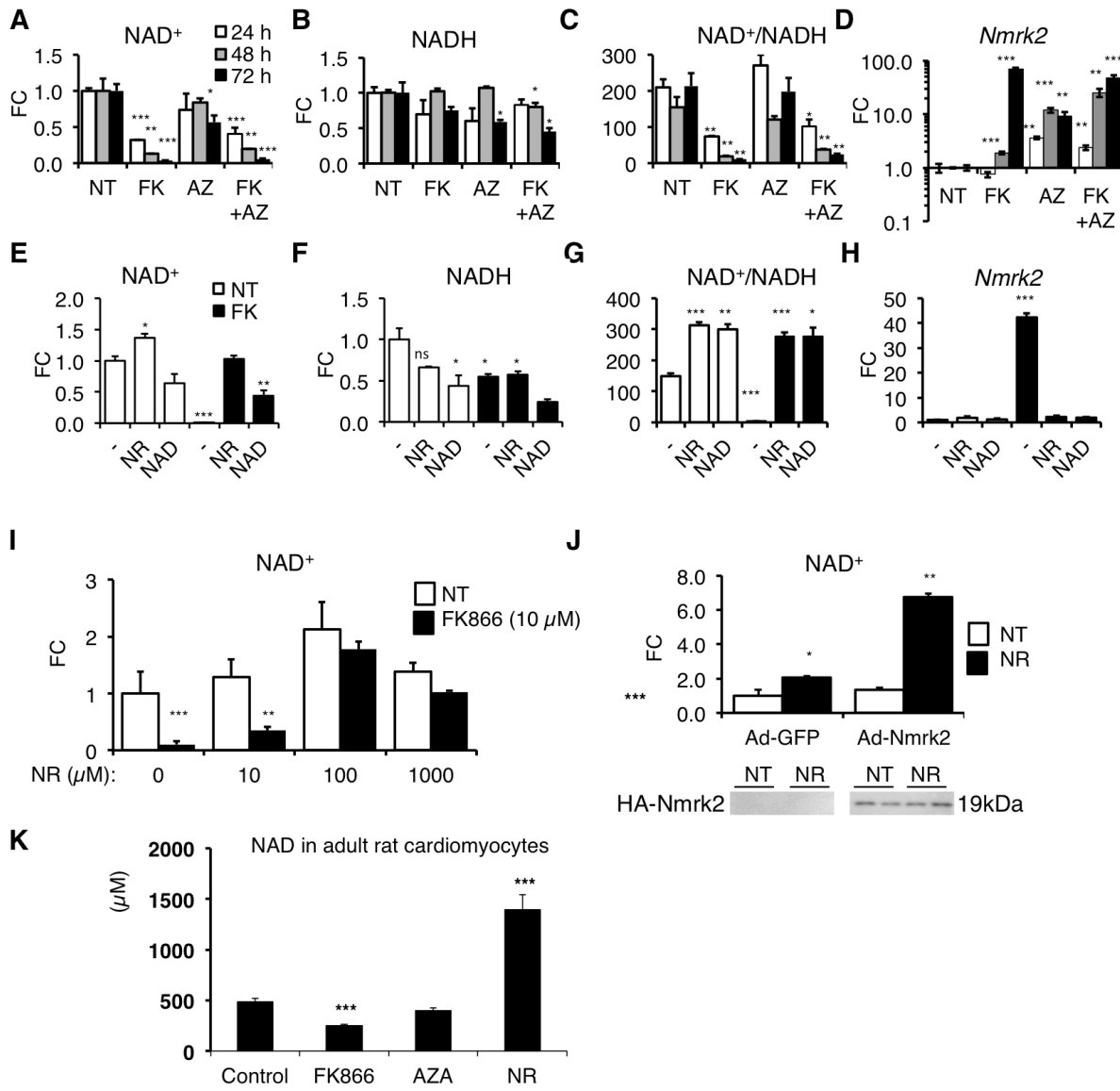
3
4

1 **Figure 3**
2



3

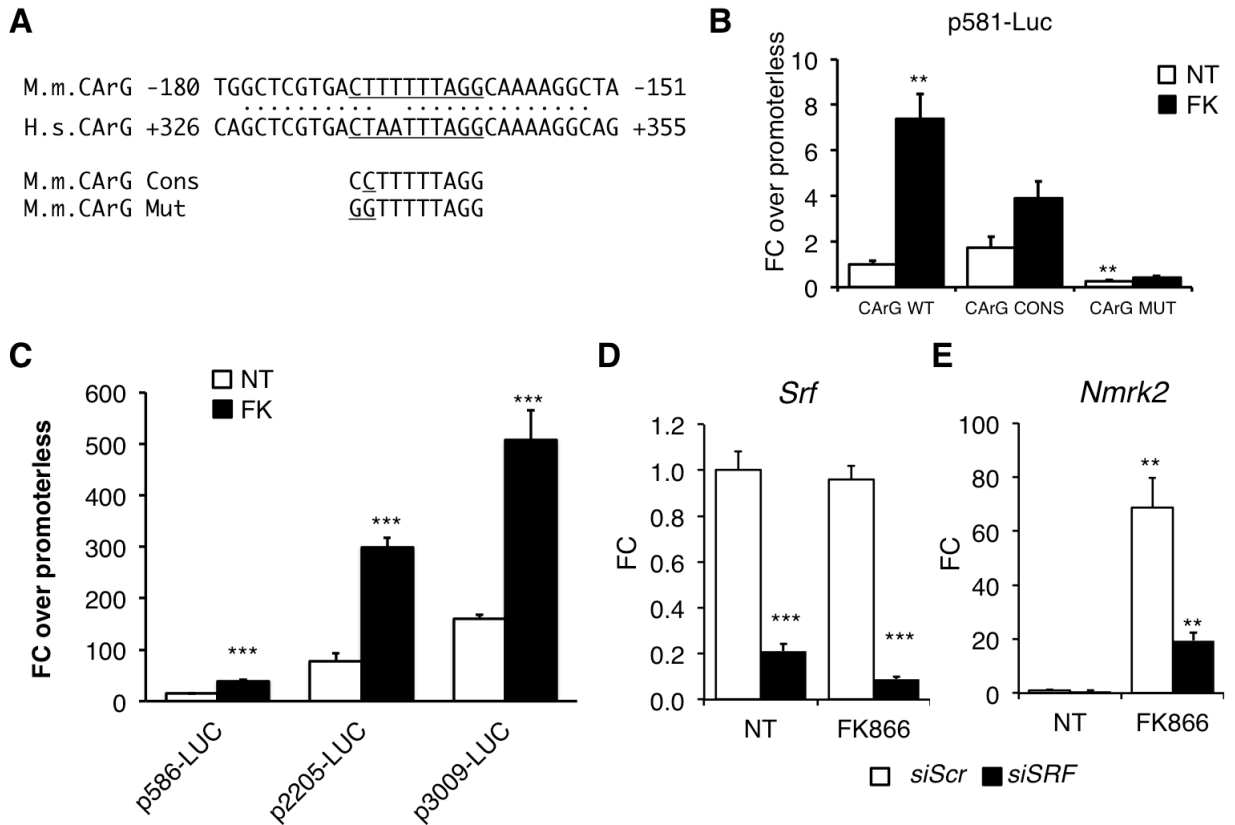
1 **Figure 4**
2



3
4

Disc. confide. onl.

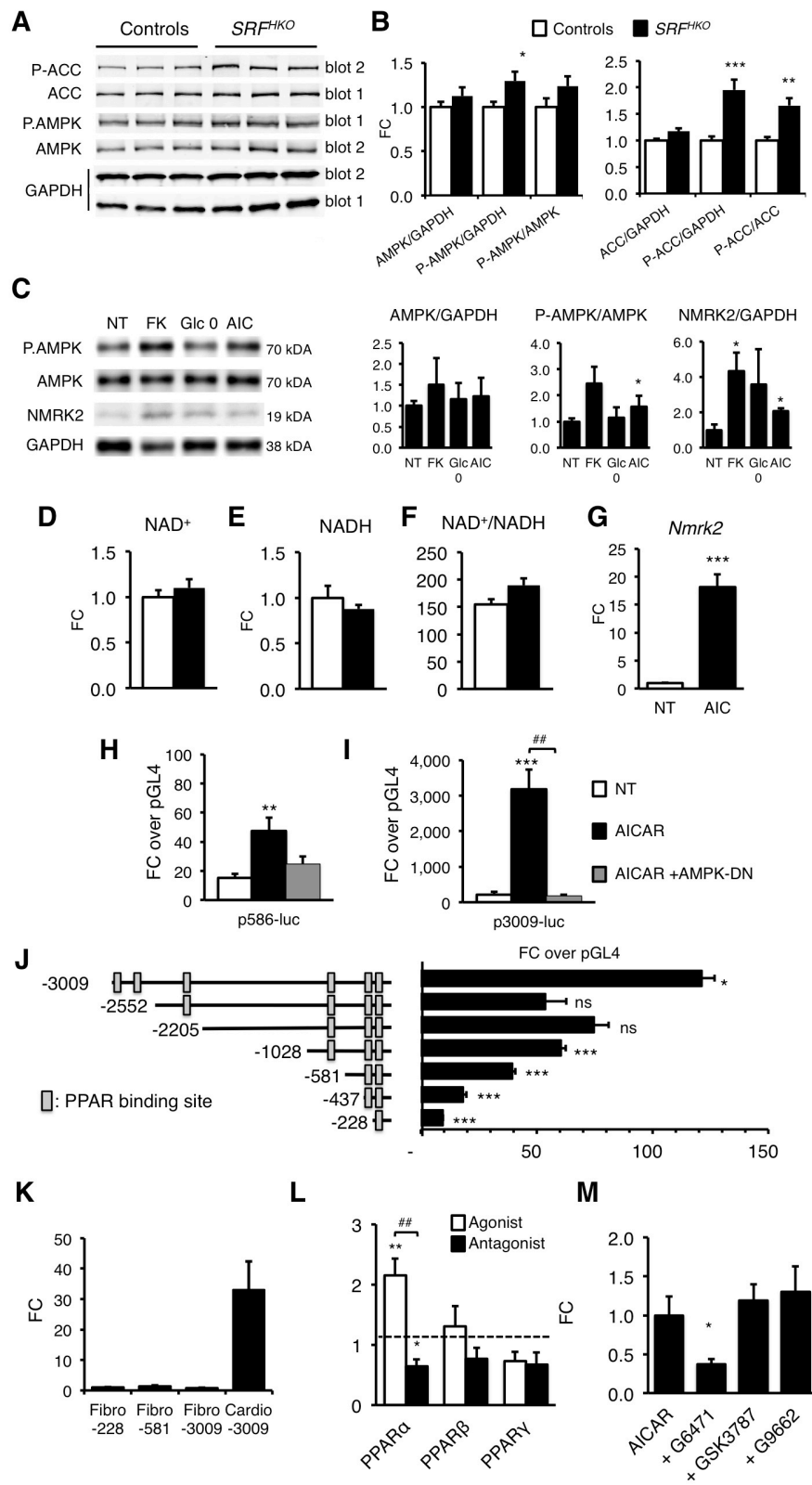
1 **Figure 5**
2



3
4

Disclaimer: The main text of this document is confidential, intended for internal use only, and not to be

1 **Figure 6**
2



3

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental Methods

Microarray and RT-PCR analysis

To evaluate the effects of SRF deletion on gene expression, total RNA was purified from SRF^{HKO} and control *Sr^{fl/fl}* hearts with the RNeasy fibrous tissue kit (Qiagen). We examined the effects of SRF inactivation on gene expression at 8 days after TAM injection, an early stage when SRF is already strongly diminished but cardiac functions are not altered and at 25 days after TAM injection, an intermediate stage when the LVEF starts to decrease and LV chamber begins to dilate ¹. In addition, we compared the effect of phenylephrine (PE), an alpha-adrenergic agonist known to trigger cardiac hypertrophy, administered at 80 mg/kg/day with Alzet osmotic minipumps from day 5 to 15 after TAM injection to SRF^{HKO} and control *Sr^{fl/fl}* as previously described ². Microarray analysis for each genotype was performed with four samples, each being hybridized to one Affymetrix GeneChip MOE 430 2.0 array (Affymetrix, Santa Clara, CA) with a coverage of 45,000 transcripts, corresponding to over 30,000 mouse genes. All technical microarray procedures were carried out by PartnerChip (Evry, France) under Affymetrix guidelines. Briefly, 2 µg of total RNA sample was used to synthesize double stranded cDNA with the SuperScript II double-stranded cDNA synthesis kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Labeled cRNA was synthesized using the Affymetrix IVT amplification and labeling kit. 20 µg of purified, fragmented labeled cRNA were hybridized with an array at 45°C for 16 h in an Affymetrix 640 hybridization oven. The posthybridization process was performed in an Affymetrix Fluidics Station 450 according to the manufacturer's instructions. All gene chips were scanned on an Affymetrix GeneChip 3000 scanner, and data were extracted from scanned images using AFX GCOS 1.4 software. Background intensities were adjusted and normalized using GC-RMA method implemented in R (version 2.4.1).

RT-qPCR

cDNAs were reverse transcribed from RNA (1.5 µg) extracted in TRIzol (ThermoFisher) from cell cultures and tissues using the Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies). Quantitative PCR was carried out on a Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) using Fast Start SYBR Green Master (Roche Diagnostics). Quantification of gene expression was calculated as $R = 2^{\Delta C_t(\text{Ref Cp} - \text{target Cp})}$, with *Hprt* used as a reference. Primers were designed using the NCBI Primer-BLAST software. Primer sequences are available on request.

Western Blot Analysis

Proteins were homogenized in a lysis buffer (Tris-HCl pH7.5 50 mM, NP40 Igepal 1%, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, Glycerol 10%) in the presence of proteases. phosphatases and deacetylases inhibitors (PMSF 0.5 mM, NaF 50 mM, PPINa 5 mM, Roche protease cocktail inhibitor 1/100, Santa Cruz deacetylase cocktail inhibitor 1/100). Equal amounts of proteins (10 to 20 µg) were separated on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Proteins were detected by overnight incubation at 4°C with primary antibodies, followed by IRDye 700 or IRDye800 fluorescent antibodies (Li-Cor Biosciences. 1/2500) and scanned on an Odyssey CLx Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences).

Antibody list

Target protein	Antibody Supplier. ref #	Dilution
Acetyl-CoA Carboxylase (ACC)	Thermoscientific. # MA5-15025	1/1000
ACC Phospho-Ser79	Thermoscientific. # PA5-17725	1/1000
AMPK α	Cell Signaling #2532	1/1000
AMPK α (Phospho-Thr172)	Cell Signaling #2535	1/1000
FKHR (H-128)(FoxO1)	Santa Cruz BT.. # sc-11350	1/1000
Ac-FKHR (D-19):	Santa Cruz BT..# sc-49437	1/200
GAPDH	Sigma #G9545	1/3000
Acetyl-Lysine	Cell Signaling #9441	1/1000
HA epitope	Sigma #H6908	1/500
NMRK2	Generated by BioGenes (see below)	1/500
PARP	Cell Signaling #9532	1/1000
PAR (Anti-Poly (ADP-Ribose)	Pharmingen #551813	1/500
p53 (acetyl K386)	Abcam #ab52172	1/500

Generation of rabbit polyclonal antibody against NMRK2 protein

Polyclonal antibody was generated in rabbits immunised with a peptide sequence specific to the NMRK2 protein, verified and affinity purified and tested by BioGenes GmbH (Berlin, Germany). SDS-PAGE analysis using the NMRK2 antibody on cardiac muscle lysates was performed on membranes blocked with 5% milk using a 1/500 dilution, with a rabbit HRP secondary that was used at a 1/25,000 dilution and developed using a chemiluminescence.

Immunofluorescent staining

Hearts were harvested after cervical dislocation and washed in cold PBS. Frozen hearts section (10 µm) were fixed in 3.7% formaldehyde in PBS at room temperature (RT) for 10 minutes followed by permeabilization in PBS/Triton X100 (0.2%) for 10 minutes. Endogenous mouse immunoglobulins were blocked by 1h. RT. incubation with monovalent anti-mouse IgG Fab fragments (Jackson ImmunoResearch) followed by saturation of non-specific binding sites with 2% BSA and 10% goat serum. Sections were incubated o/n at 4°C with mouse monoclonal [clone 5B4.7] (IgG1) to human MIBP (=NMRK2) at 1/100 dilution in saturation solution (LSBio, Seattle, USA and kind gift from Dr Chuanyue Wu, University of Pittsburgh, USA). The day after, sections were incubated with FITC-coupled anti-hVIN-1vinculin antibody (Sigma. 1/100) and Cy3-coupled anti-mouse IgG1 (Jackson ImmunoResearch. 1/400). Confocal images were acquired on a Leica SP5 microscope with identical gain and offset parameters for all samples.

Echocardiography

Echocardiography was performed on lightly anesthetized mice given isoflurane (induction with 1% isoflurane 100% O₂. and maintained with 0.2 to 0.25% isoflurane 100% O₂) to maintain high cardiac frequency. Non-invasive measurements of left ventricular dimensions were evaluated using Doppler echocardiography (Vivid 7 Dimension/Vivid7 PRO; GE Medical Systems) with a probe ultrasound frequency range of 9–14 MHz. The two-dimensionally guided time-motion recording mode (parasternal long-axis view) of the left ventricle (LV) provided the following measurements: diastolic and systolic septal (IVS) and posterior wall thicknesses (LVPW); internal end-diastolic (LVEDD) and end-systolic diameters (LVESD); and heart rate. Each set of measurements was obtained from the same cardiac cycle. At least 3 sets of measurements were obtained from 3 different cardiac cycles. LV fractional shortening (FS) was calculated using the formula: $(LVEDD - LVESD)/LVEDD \times 100$. LV myocardial volume (LVV), LV end-diastolic volume (EDV), and end-systolic volume (ESV) were calculated using a half-ellipsoid model of the LV. From these volumes, LV ejection fraction (EF) was calculated using the formula: $(EDV - ESV) / EDV \times 100$. H/R ratio was calculated by the formula $(PWThd + IVSThd) / LVEDd$. A “blinded” echocardiographer, unaware of the genotype and the treatment, performed the examinations.

NAD extraction and quantification

Tissue frozen powder was resuspended in 75% ethanol, 25% HEPES 10 mM pH7.1, buffer (20 µl/mg of tissue). Extracts were warmed 5 min at 80°C, then directly cold on ice and

centrifuge 5 min at 16 000 g. Tissues extracts were normalized on the weight of tissue used for extraction. NAD was extremely stable in this buffer and resistant to heat degradation over 60 minutes. Using spiking concentrations of known amounts of NAD⁺ and NADH (Sigma-Aldrich) in pure buffered ethanol solution followed by dilutions in acid (HCl 0.1M) or basic (NaOH 0.1M) buffer, heating at 60°C for 30 minutes and neutralization with TRIS buffer pH7.1, we found that NAD⁺ was extremely stable after heating in acid condition (>99% recovery) while NADH was completely destroyed (<1% recovery). Heating in NaOH buffer led to some destruction of both NAD⁺ and NADH and this protocol was discontinued. Hence, we selected the protocol of selective acid-heating destruction of NADH in the cardiac samples for the determination of free NAD⁺ versus free NADH concentrations in these extracts, the buffered ethanol extracts were diluted 1/10 in HCl 0.1M and heated 30 minutes at 60°C to destroy NADH and then neutralized with Tris buffer at pH 7.1 before measuring NAD⁺. After adjustment of dilution factors, NADH levels were calculated by subtracting the NAD⁺ concentration to the non-heated ethanolic extract values : NADH = NAD_t (non heated) - NAD⁺(heated). Kinetics of the reaction (OD at 550nm, every 30 seconds for 40 minutes) was followed on a TECAN Infinite F500 microplate reader. NAD was quantified in duplicates for each sample by comparison to a range of standard NAD⁺ concentration using linear regression curve equation method between NAD⁺ standard concentrations and the slope of the reaction in OD units/sec.

For cell cultures, the wells were washed twice with PBS and scraped on ice in buffered ethanol (100µl/well in 12-well plates or 50µl/well in 24-well plates). Extracts were diluted in water to a final volume of 25 µl to reach a concentration that within the titration curve. We added 100 µL of reaction buffer (600 mM ethanol, 0.5 mM 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2 mM phenazine ethosulfate (PES), 120 mM Bicine (pH7.8), yeast alcohol dehydrogenase (SIGMA A3263 > 300 u/mg) 0.05 mg/ml. Kinetics of the reaction (OD at 550nm, every 30 seconds for 40 minutes) was followed on a TECAN Infinite F500 microplate reader. NAD was quantified in duplicates for each sample by comparison to a range of standard NAD⁺ concentration using linear regression curve equation method between NAD⁺ standard concentrations and the slope of the reaction in OD units/sec. NAD⁺/NADH was obtained by the formula $([NAD_t] - [NADH]) / [NADH]$. Proteins could not be reliably quantified after extraction by boiling buffered ethanol method but cells layers were confluent in all conditions. Hence, in neonatal rat cardiomyocytes where the number of cells have changes over the culture period, data are given as fold change over mean control values (untreated group) at the time of extraction. In adult rat cardiomyocytes that do not proliferate, 20,000 cells were seeded per well in 24-well plates and an average cylinder volume of 20 µm diameter and 100 µm length was used to estimate the cellular volume and calculate the concentration.

Isolation and treatments of neonatal and adult rat cardiomyocytes (NRC, ARC)

NRC were isolated as described previously³. 1-day-old rat pups were killed by decapitation and the cardiac ventricles were harvested and minced into 1 to 2-mm wide cubes with scissors. After washing with Tyrode solution, heart fragments were subjected up to 10 rounds of digestion with 0.05 mg/ml of Liberase Blendzyme 4 (Roche Applied Science) in 10 ml oxygenated Tyrode solution under agitation at 37°C for 10 minutes. The supernatant of the first digestion was discarded and the following digestions were centrifuged and the cell pellet dissociated in 2 ml of DMEM, 10% FCS. The different fractions were pooled and centrifuged on a discontinuous Percoll gradient (bottom 58.5%, top 40.5%, 30 min, 3000 rpm) to enrich in cardiomyocytes at the interface between the 2 Percoll solutions. Non cardiac cells containing mainly fibroblasts were at the top of the tubes. Neonatal cardiomyocytes were seeded at a density 5×10^5 cells/well in 6-well plates coated with 10 µg/ml of laminin (BD Biosciences) in DMEM without pyruvate, with glucose 4.5g/l, 10% horse serum, 5% FCS and cultured at 37 °C in 1% CO₂ atmosphere. To assay the impact on NAD⁺ and Nmrk2 expression, Azaserin and FK866 drugs were added in the culture medium at day 5 and renewed everyday when the treatment was prolonged over several days. The same was done for NAD⁺, NR and AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside). AICAR was administrated for 24h only. Doses are indicated in the legends. For treatment of transfected cells (see next section), AICAR, FK866 and PPAR agonists and antagonist were administrated 1 day after transfection. PPAR agonists: GW7647 for PPAR α , GW501516 for PPAR β/δ and GW1929 for PPAR γ ; PPAR antagonists: GW6471 PPAR α , GSK3787 for PPAR β/δ and GW9662 for PPAR γ were ordered from SIGMA ALDRICH CHIMIE, Saint Quentin Fallavier, France. Adult rat cardiomyocytes (ARC) were isolated as previously described². ARC were seeded at 20,000 cells/well in 24-well plates and treated 2 hours after Ca²⁺ introduction and plating with 10 µM FK866, 20 µM Azaserin or 1 mM NR for 65h before NAD extraction. In all conditions, they were still more than 60% of rod-shaped cardiomyocytes after 65 h cultures. The treatment did not induced changes in cell shape or cell numbers.

Cloning of mouse Nmrk2 promoter in luciferase reporter plasmid and transfection procedure

The transcription initiation site of mouse Nmrk2 promoter was determined by 5'RACE and was conform to the reported site in the Genebank ([NM_027120.2](#)). The promoter of the mouse Nmrk2 gene was cloned from C57Bl6/N genomic DNA by PCR with forward primer CCTATGAGGTGAGAGGATCTCTG (-3009/-2987) and reverse primer CTTGGGGACTGGAGGTGACTGGTC (+61/+38), and inserted into a pGL4.10[luc2] luciferase reporter plasmid (Promega prod no E6651). Subsequent deletions were performed by enzymatic digestion or primer mediated subcloning of the original fragment. 2.5×10^5 cardiomyocytes in 12-well plates were co-transfected at day 2 of culture with 1 µg of Nmrk2 pGL4.10[luc2] constructs and 100 ng of pGL4.73[hRluc/SV40] Vector (Promega prod no E6911) as an internal control of transfection efficiency using Lipofectamine 2000

(Lifetechnology) as indicated by the supplier. In the case of AICAR treatment, Luciferase activity was analyzed 48h later with the Dual-Luciferase Assay System (Promega).

AMPK, PPAR, RXR Vectors

The pcDNA3 vectors harboring dominant negative AMPK, PPAR α , PPAR β and PPAR γ as well as RXR genes were kindly provided by Pr. Michel Raymondjean ⁴⁻⁶. These vectors were cotransfected at a dose of 100 ng / well in 24-well plates with 500ng of Nmrk2 luciferase constructs.

Cloning of mouse Nmrk2 cDNA into recombinant adenovirus

The cDNA of Nmrk2 was cloned by PCR amplification from reversed transcribed cardiac mRNA into pcDNA3HA vector, introducing a MYPYDVPDYALMAMEARIR sequence (HA tag is underlined) at the N-terminus of Nmrk2 open reading frame that replaced the first methionine. The HA tagged Nmrk2 cDNA was then subcloned into the pShuttle2 vector before to be inserted in the Adeno-X viral DNA (Clontech lab. Adeno-X Expression System 1). Pac1 Linearized recombinant adenoviral DNA was transfected in HEK 293 cells followed by rounds of infection to collect the adenoviral particles. Adenoviral titer was determined by the cytopathic effect method. NRCs were infected at day 3 of culture with 100 particles/cell.

Mitochondrial (mtDNA) and nuclear (nDNA) DNA content

Total DNA was extracted from left ventricle. Briefly, tissue were minced in 500 μ l of buffer 1 (TrisHCl 10 mM, NaCl 10 mM, EDTA 25 mM, SDS 1%, proteinase K 0.4mg/ml, pH 7.5) with cleaned scissors and incubated overnight at 37°C. After addition of 50 μ l of saturated NaCl solution, the homogenates were centrifuged at 500 g for 15 minutes. Isopropanol (500 μ l) was added to supernatants which were then incubated 45 minutes at -20°C. After a centrifugation at 16000 g for 20 minutes, the pellets were kept, washed with ethanol 70%, resuspended in buffer 2 and finally warmed at 70°C. mtDNA content was measured by real-time qPCR using specific primers for a mitochondrial gene (Dloop, forward primer ATAGCCGTCAAGGCATGAAA, reverse primer GATTGGGTTTTGCGGACTAA) and a nuclear gene (B2M (beta-2-microglobulin), forward primer TGGTAAAGCAAAGAGGCCTAA, reverse primer AGAAGTAGCCACAGGGTTGG). The difference between the threshold cycle (C_t) of nuclear gene and mtDNA gene (ΔC_t) was used to assess the mtDNA/nDNA ratio, which was calculated using the following formula: $2(2^{\Delta C_t})$. For details see; ⁶.

Measure of O₂ consumption rate in permeabilized cardiac fibers

Mitochondrial respiration was studied in situ in saponin-permeabilized cardiac muscle fibres using a Clarke electrode as previously described ⁸. Oxygen consumption was measured after successive addition of pyruvate-malate (1-4 mM), ADP (0.1 mM), creatine (12 mM), ADP (2 mM), glutamate (10 mM), succinate (15 mM), and amytal (an inhibitor of

complex I, 1 mM) to respiration solution (in mM: 2.77 CaK₂EGTA, 7.23 K₂EGTA [100 nM free Ca²⁺], 6.56 MgCl₂ [1 mM free Mg²⁺], 20 taurine, 0.5 DTT, 50 K-methane sulfonate [160 mM ionic strength], 20 imidazole, pH 7.1) at 23 °C. From this protocol, sensitivity of mitochondrial respiration to external ADP and creatine were determined (K_m ADP and K_m creatine) and acceptor control ratio (ACR) was calculated from basal mitochondrial respiration rate (in the presence of pyruvate/malate 1/4 mM, without ADP) and oxygen consumption after addition of 2mM ADP. Rates of respiration are given in nmoles O₂/min/mg dry weight.

Biochemical studies

Frozen tissue samples were weighed, homogenized (Bertin Precellys 24) in ice-cold buffer (50 mg/ml) containing HEPES 5 mM (pH 8.7), EGTA 1 mM, DTT 1mM and 0.1% Triton X-100. Citrate synthase (CS), complex I and cytochrome oxidase (COX), activities were determined in homogenized ventricles as previously described ⁸. Activities of enzymes were determined by standard spectrophotometric assays. Briefly, for citrate synthase (CS), approximately 0.5µg of protein were added in 1 ml of Buffer M (Trizma 100 mM (pH 8), 5,5'-dithiobis-(2-Nitrobenzoic acid) 0.1mM, Acetyl-CoA 0.3mM, oxaloacetic acid 0.5mM) and the absorbance at 412nm was measured during 3 min. Cytochrome oxidase (COX) activity was determined by the addition of approximately 0.25µg of protein in 1 ml of phosphate buffer (K₂HPO₄ 50mM (pH 7.4)) containing 50µM Cytochrome c (cytochrome c were previously reduced at 90% using sodium dithionite). Loss of reduced cytochrome c were followed by measuring the absorbance at 550nm during 3 min using fully oxidized cytochrome c (by addition of potassium ferricyanure in excess) as a reference. For the determination of complex I activity, 25µg of protein and 100µM NADH were added to 1 ml of C1 Buffer (41.1 mM KH₂PO₄, K₂HPO₄ 8.8 mM, Decyl-ubiquinone 100µM, BSA 3.75mg/ml, pH 7.4). Measurements of the absorbance at 340nm during 3 min in the presence and in the absence of 5mM rotenone were used to calculate activity of this complex. CS, COX and complex I activities were respectively calculated using an extinction coefficient of 13600 M⁻¹.cm⁻¹, 18500 M⁻¹.cm⁻¹ and 6220 M⁻¹.cm⁻¹ and rates are given in UI/g prot.

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LCMS) analyses of NAD metabolome.

NAD-related metabolites were quantified as previously described with a Waters Acquity LC interfaced with a Waters TQD MS operated in positive ion multiple reaction monitoring mode ⁹. Metabolites were extracted as follows: pieces of myocardial tissue (≈10 mg) were snap frozen and pulverized in liquid nitrogen. Metabolites were extracted in 10 volumes (µl / mg of tissue powder) of buffered ethanol (75% ethanol/25% 10 mM HEPES, pH 7.1, v/v) preheated to 80 °C. Samples were shaken at 1000 rpm in an 80 °C block for three minutes. Soluble metabolites were separated from particulate by refrigerated microcentrifugation (10 min, 16kg). Extracts were dried via speed vacuum for three hours before to be processed for the LCMS analysis. This method does not effectively preserve reduced co-factors. Hence NADH and NADPH levels were not reported in this assay.

Statistical Analyses

For in vivo experiments, animals were unbiasedly assigned into different treatment groups. To assess significance, we performed Student's t test for independent samples unless otherwise specified in the legend. Values are expressed as mean \pm SEM.

Supplemental References

1. Parlakian A, Charvet C, Escoubet B, Mericskay M, Molkentin JD, Gary-Bobo G, De Windt LJ, Ludosky MA, Paulin D, Daegelen D, Tuil D, Li Z. Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the *srf* gene in adult heart. *Circulation*. 2005;112:2930-2939
2. Tritsch E, Mallat Y, Lefebvre F, Diguët N, Escoubet B, Blanc J, De Windt LJ, Catalucci D, Vandecasteele G, Li Z, Mericskay M. An *srf*/mir-1 axis regulates *ncx1* and *annexin a5* protein levels in the normal and failing heart. *Cardiovasc Res*. 2013;98:372-380
3. Diguët N, Mallat Y, Ladouce R, Clodic G, Prola A, Tritsch E, Blanc J, Larcher JC, Delcayre C, Samuel JL, Friguët B, Bolbach G, Li Z, Mericskay M. Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end products in dilated cardiomyopathy. *J Biol Chem*. 2011;286:35007-35019
4. El Hadri K, Denoyelle C, Ravaux L, Viollet B, Foretz M, Friguët B, Rouis M, Raymondjean M. Ampk signaling involvement for the repression of the il-1beta-induced group iia secretory phospholipase a2 expression in vsmcs. *PLoS One*. 2015;10:e0132498
5. Ravaux L, Denoyelle C, Monne C, Limon I, Raymondjean M, El Hadri K. Inhibition of interleukin-1beta-induced group iia secretory phospholipase a2 expression by peroxisome proliferator-activated receptors (ppars) in rat vascular smooth muscle cells: Cooperation between *pparbeta* and the proto-oncogene *bcl-6*. *Mol Cell Biol*. 2007;27:8374-8387
6. Woods A, Azzout-Marniche D, Foretz M, Stein SC, Lemarchand P, Ferre P, Foufelle F, Carling D. Characterization of the role of amp-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol*. 2000;20:6704-6711
7. Dimmock D, Tang LY, Schmitt ES, Wong LJ. Quantitative evaluation of the mitochondrial DNA depletion syndrome. *Clin Chem*. 2010;56:1119-1127
8. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature protocols*. 2008;3:965-976
9. Trammell S, Brenner C. Targeted, lcms-based metabolomics for quantitative measurement of nad⁺ metabolites. *Comput Struct Biotechnol J*. 2013;4:e201301012

Supplemental Table S1. Expression level of genes involved in NAD homeostasis

Probe Set ID	Gene Symbol	Gene Title	Mut D8	Mut D25	Mut D25 +PE	Cont D25 +PE
1452944_at	Afmid /// Syngr2	arylformamidase /// synaptogyrin 2	1.19	0.78	0.92	0.65
1447638_at	Afmid /// Syngr2	arylformamidase /// synaptogyrin 2	0.99	0.90	0.88	0.92
1428885_at	Afmid /// Syngr2	arylformamidase /// synaptogyrin 2	1.31	0.97	1.08	0.97
1431722_a_at	Afmid	arylformamidase	0.97	1.01	0.96	0.99
1432492_a_at	Hao	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	0.99	0.99	0.98	1.00
1420437_at	Ido1	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase 1	0.83	1.09	0.99	1.01
1425778_at	Ido2	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase 2	0.99	0.96	0.95	0.97
1418998_at	Kmo	kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)	0.99	0.98	0.97	1.00
1430570_at	Kynu	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	1.00	0.94	0.93	0.96
1451903_at	Kynu	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	1.00	0.99	0.97	1.00
1430359_a_at	Nadsyn1	NAD synthetase 1	1.00	0.89	0.85	0.92
1417190_at	Nampt	nicotinamide phosphoribosyl transferase	1.02	1.10	0.87	↑ 1.35
1448607_at	Nampt	nicotinamide phosphoribosyl transferase	1.33	1.41	0.99	1.14
1454748_at	Naprt1	nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1	0.64	0.86	0.86	1.06
1425773_s_at	Nmnat1	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 1	0.85	0.92	0.89	1.00
1429819_at	Nmnat1	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 1	0.96	1.05	1.05	1.05
1436155_at	Nmnat2	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2	0.78	1.00	0.95	0.98
1424899_at	Nmnat3	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3	1.11	0.79	0.67	0.73
1432342_at	Nmnat3	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3	1.00	0.97	0.97	0.98
1443149_at	Nmnat3	Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3 (Nmnat3). mRNA	0.99	0.98	0.97	1.00
1459128_at	Nmnat3	Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3 (Nmnat3). mRNA	0.99	0.92	0.90	0.96
1432342_at	Nmnat3	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3	1.00	0.97	0.97	0.98
1443149_at	Nmnat3	Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3 (Nmnat3). mRNA	0.99	0.98	0.97	1.00
1459128_at	Nmnat3	Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3 (Nmnat3). mRNA	0.99	0.92	0.90	0.96
1425646_at	Nmrk1	nicotinamide riboside kinase 1	0.98	0.90	0.91	1.01
1447503_at	Nmrk1	nicotinamide riboside kinase 1	1.00	0.99	0.92	0.98
1453898_at	Nmrk2	nicotinamide riboside kinase 2	8.87	30.6	57.4	↑ 4.15
1422974_at	Nt5e	5' nucleotidase, ecto (CD73)	1.48	2.80	4.22	↑ 1.21
1428547_at	Nt5e	5' nucleotidase, ecto (CD73)	1.06	1.63	2.42	0.94
1416530_a_at	Pnp	purine-nucleoside phosphorylase	0.76	0.83	0.74	0.92

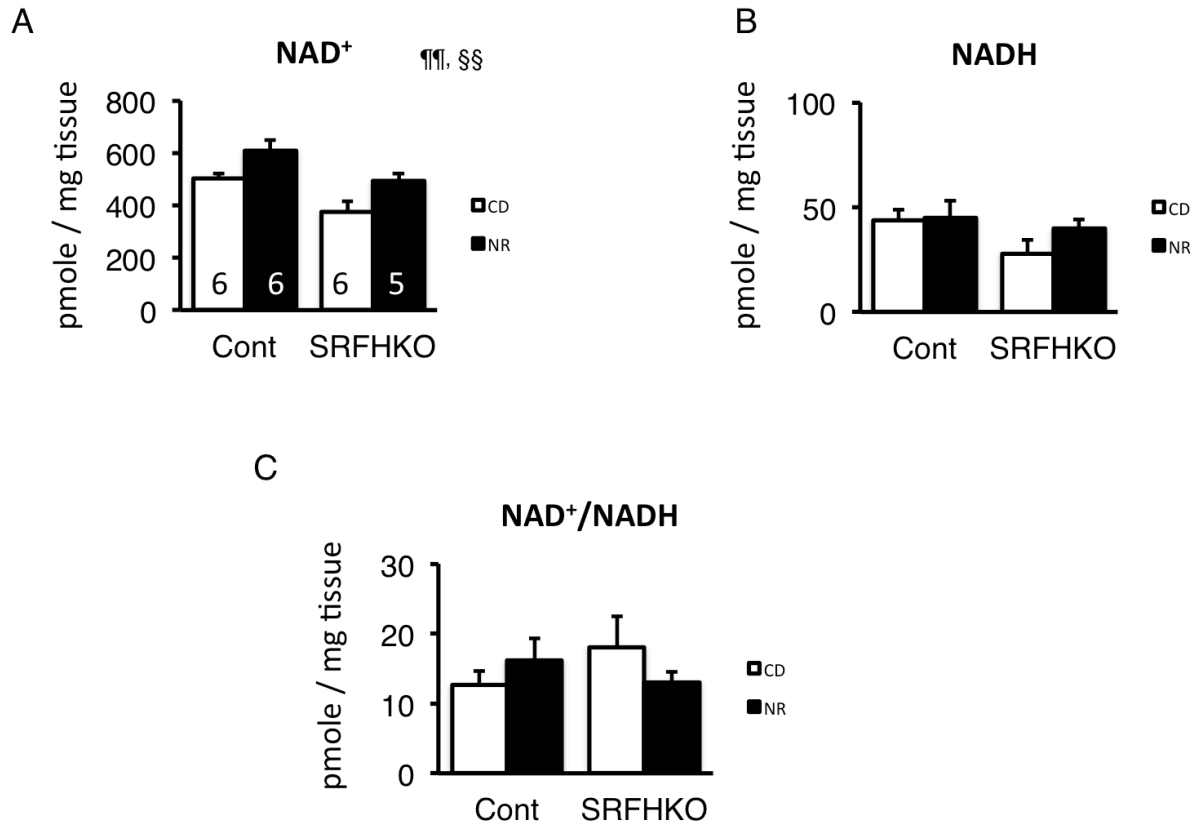
1453299_a_at	Pnp	Similar to purine-nucleoside phosphorylase / LOC545044	0.96	0.84	0.68	0.88
1418836_at	Qprt	quinolinate phosphoribosyltransferase	1.00	0.99	0.99	1.00
1418837_at	Qprt	quinolinate phosphoribosyltransferase	1.00	0.99	0.98	1.00
1419093_at	Tdo2	tryptophan 2,3-dioxygenase	0.99	0.99	0.98	1.00
1449337_at	Tdo2	tryptophan 2,3-dioxygenase	0.99	0.99	0.98	1.00
1455770_at	Tdo2	Tryptophan 2,3-dioxygenase. mRNA (cDNA clone MGC:25811 IMAGE:4159877)	0.99	0.99	0.98	1.00

Control (Cont) and *SRF^{HKO}* mutant (Mut) mice were sacrificed at day (D) 8 or 25 after first day of tamoxifen injection. A group of control and a group of mutant mice were treated with phenylephrine (PE) from D10 to 25 before sacrifice. RNA was extracted and processed for Affymetrix Mouse 430.2 Expression array. Genes with a fold change expression $<$ or $>$ to 1.3 and a p value $<$ 0.05 compared to non treated time-matched control are highlighted in bold font, green for upregulated genes, red for downregulated genes. †, genes differentially regulated between Mutant D25+PE and Control D25+PE.

Supplemental Table S2. Patients characteristics.

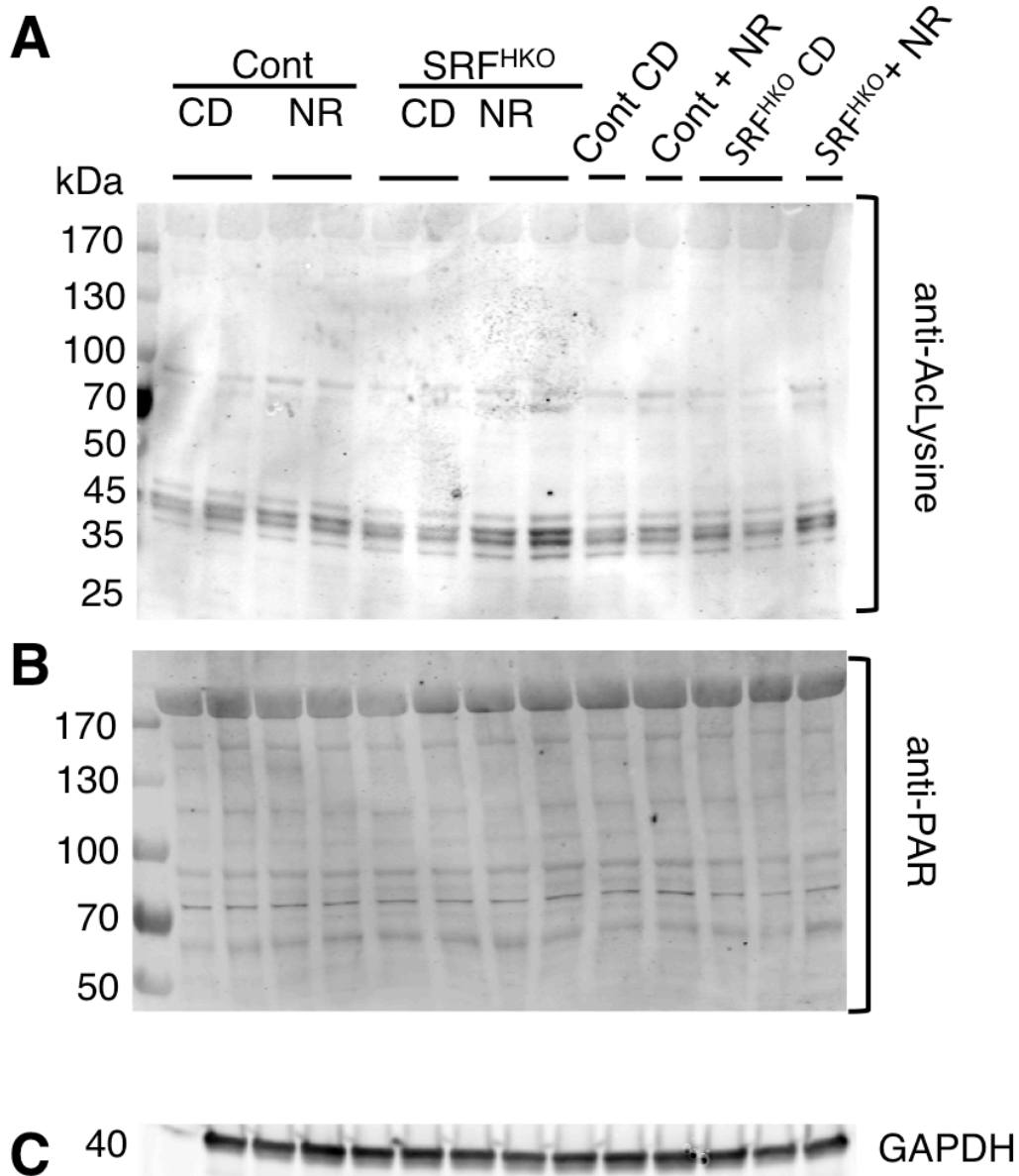
Patients	Pathology	Age	Sex	NYHA class	CHF duration	LVEF	BNP pg/ml	Treatments
1	Cad	49	M	4	90 Mo	15 %	320	Ramipril
2	Cad	63	M	3	4 Mo	30 %	157.8	Enalapril
3	Nocm	56	M	3	28 Mo	35 %	500	Ramipril, Carvedilol
4	Hdcm	48	F	4	29 Mo	23 %	1249	Perindopril, Carvedilol

Cad: coronary artery disease, Nocm: non obstructive cardiomyopathy, Hdcm: hypertrophic dilated cardiomyopathy. LVEF: left ventricular ejection fraction



Supplemental Figure S1. Cardiac NAD⁺ and NADH quantification in control and SRFHKO mice at day 50 following 45 days of NR enriched diet.

Cardiac metabolites were extracted by the boiling method in buffered ethanol. The extracts containing the sum of free NAD⁺ and NADH (total free NAD) or NAD⁺ only after selective heat degradation of NADH in acid conditions were quantified by the colorimetric alcohol dehydrogenase NAD recycling assay. NADH levels were calculated by the subtraction of quantified NAD⁺ levels from total NAD. **(A)** NAD⁺ values in pmole/ mg of heart tissue; control CD n=6, control NR n=6, SRFHKO CD n=6, SRFHKO NR n=5 **(B)** NADH values in pmole/ mg of heart tissue, control CD n=5, control NR n=6, SRFHKO CD n=5, SRFHKO NR n=4 **(C)** NAD⁺/NADH, **(D)** NAD total (NAD⁺ + NADH). *, **, ***: p ≤ 0.05, ≤0.01 and ≤0.001, respectively, versus control CD group. #, ##: p ≤ 0.05 in comparisons between NR versus CD groups of the same genotype.



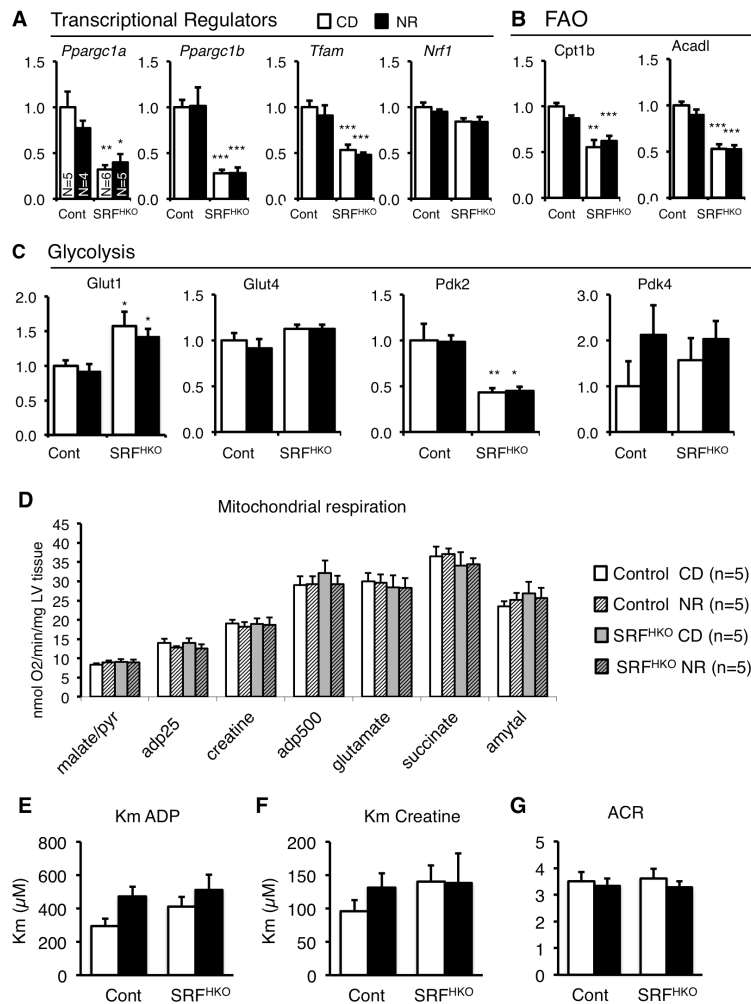
Supplemental Figure S2. Acetylation and parylation level of cardiac proteins

Equal quantities of cardiac proteins from control and SRFHKO mice fed with regular diet (CD or NR enriched diet were extracted at D45 and analyzed by SDS-PAGE.

(A) Western blot analysis using an anti-acetyl-Lysine antibody

(B) Western blot analysis using an anti-PAR antibody

(C) Western blot for GAPDH is shown as a loading control.



Supplemental Figure S3. Impact of NR on genes involved in energy metabolism.

LV tissue were harvested in control and SRF^{HKO} mice fed with regular chow diet (CD) or NR from D5 to day 45 and split for RTqPCR analysis or isolation of cardiac fibers for respiration studies (Figure 3 and S3).

(A-C) RT qPCR analysis of transcriptional regulators of energy metabolism **(A)**, genes involved fatty acid beta-oxidation **(B)** and glycolysis **(C)**.

Student test: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$ vs control group fed with regular chow diet (CD).

(D-G) Cardiac fibers were isolated from adults LV 45 days after tamoxifen injection in control and SRF^{HKO} mice fed with regular chow diet (CD) or NR enriched diet (NR) in the same series of mice than shown in Figure 3R-U. **(D)** Rate of mitochondrial oxygen consumption in permeabilized cardiac fibers using a Clarke electrodes after successive addition of indicated substrates. Individual samples were analyzed in triplicates (n=5 individuals for each group). **(E)** Km ADP. **(F)** Km Creatine. **(G)** Acceptor control ratio for ADP (ACR).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objet de ce travail de thèse était de comprendre le rôle de Nmrk2 dans les processus de remodelage cardiaque. Les études préalablement réalisées au laboratoire ont montré une forte induction de cette kinase chez le mutant SRF développant une CMD. La kinase NMRK2 étant impliquée dans la biosynthèse du NMN, précurseur du NAD, l'hypothèse de travail actuelle de l'équipe est que cette augmentation pourrait être due à une réponse du gène Nmrk2 au stress énergétique et/ou à la chute du taux de NAD dans le tissu cardiaque observés dans ce modèle. Cette étude du laboratoire est à mettre en parallèle avec les observations d'autres équipes ayant observé des altérations dans l'homéostasie du NAD dans différents modèles de RC incluant la surcharge en pression, l'administration d'AngII ou l'ischémie-réperfusion (Hsu et al. 2010; Hsu et al. 2014). Les causes de cette chute du taux de NAD dans le cœur insuffisant sont encore mal connues mais on peut faire l'hypothèse qu'elle résulte soit d'une surconsommation du NAD⁺ par les voies de signalisation de type PARP, Sirtuines ou CD38, ou une baisse de la synthèse du NAD⁺ à partir des vitamines B3, soit l'acide nicotinique (NA), le nicotinamide (NAM) et le nicotinamide riboside (NR) ou de la synthèse de novo à partir du tryptophane (TRP).

Les recherches effectuées par l'équipe dans la banque de données Gene Expression Omnibus (GEO) recensant l'ensemble des données transcriptomiques publiques, ont montré une forte augmentation du niveau d'expression de Nmrk2 dans d'autres modèles de CMD liée à la mutation de lamine-A (Muchir et al. 2007), de l'isocitrate déshydrogénase 2 (Akabay et al. 2014), la déficience cardiaque en PGC1 α ou le récepteur de transferrine (Belenky 2007, grozio 2013).

Dans ces modèles ainsi que dans notre étude effectuée chez le mutant SRF, l'enzyme NAMPT permettant le recyclage du NAM issu de l'activité d'hydrolyse du NAD⁺ par les sirtuines et les PARP, ou le NAM issu de l'alimentation voit son expression chuter. L'enzyme NAMPT est considérée comme la voie majeure de production du NMN, précurseur du NAD⁺ notamment dans le cœur de souris alors que les précurseurs non amidés comme le NA et le TRP contribuent à moins de 1% de la synthèse du NAD⁺ dans ce tissu (Mori et al. 2014).

Nos observations suggèrent que dans le contexte de la CMD, le muscle cardiaque tend à changer de voie parmi les 2 précurseurs amidés que sont le NAM et le NR en favorisant la voie qui est conduite par Nmrk2. Il est intéressant de rappeler que la synthèse de NMN à partir du NR via les kinases NRK, requiert une seule molécule d'ATP alors que la synthèse de NMN via la NAMPT à partir du NAM, en requiert deux, une pour l'auto-phosphorylation de l'enzyme qui est requise pour son activité catalytique et l'autre pour la synthèse du phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP). Par conséquent, le « shift » de la voie NAMPT vers la voie de NMRK2 est en accord avec l'idée que les mécanismes permettant d'économiser l'énergie sont favorisés dans le cœur insuffisant. En accord

également avec cette hypothèse, l'observation que l'AICAR, un activateur de l'AMPK kinase ou la privation en glucose, augmente fortement l'expression du gène *Nmrk2*. Malgré cette forte induction de *Nmrk2* chez le mutant *SRF-HKO* dans le cœur insuffisant, le niveau total de NAD myocardique reste en dessous de la normale, suggérant que les apports en NR provenant de la nourriture utilisée pour l'élevage des souris sont insuffisants pour compenser la perte du NAD. Nous avons donc vu l'intérêt de traiter les souris avec un régime enrichi en NR afin de corriger ce défaut. Plusieurs études ont mis en évidence que l'administration de court-terme de NAD⁺ exogène via des pompes osmotiques (14 jours) (Pillai et al. 2010), ou bien du NMN par injection i.p (3 jours) (Karamanlidis et al. 2013), pouvait rétablir la déficience en NAD⁺ au niveau du cœur. Toutefois il a été montré récemment que le NAD⁺ comme le NMN ne pénètrent pas directement dans la cellule et sont en fait convertis via une ectonucléotidase membranaire appelée CD73 ou Nt5e en NR (Ratajczak et al. 2016).

Récemment le NR a été montré comme le précurseur de NAD⁺ le plus biodisponible chez l'homme et chez la souris mais aussi comme celui qui stimule le plus le turnover du NAD⁺, donc sont utilisation par les enzymes de signalisation de type Sirtuines ou PARP (Trammell et al. 2016). Ceci suggère qu'il existe une compartimentation subcellulaire des pools de NAD selon les précurseurs et voies de synthèse.

Les résultats du laboratoire montrent qu'un traitement de court terme avec du NR (en injection i.p ou bien nourriture enrichie), est capable de maintenir les niveaux de NAD myocardiques chez le mutant *SRF* alors que le NAM n'est pas efficace. Le traitement sur le long terme (45-50) jours maintien les taux de NAD⁺ tout en préservant la fonction cardiaque et en limitant la dilatation (article en annexe). De manière intéressante, l'équipe de Gisèle Bonne a, suite à notre suggestion, traité des souris porteuses d'une mutation lamine A H222P développant une CMD avec du NR et obtenu comme pour le mutant *SRF-HKO* une amélioration du phénotype cardiaque (collaboration A. Muchir/ N. Vignier, M.Mericskay, publication en préparation).

Les recherches de l'équipe de M. Mericskay se poursuivent dans ce domaine en cherchant d'une part à comprendre le mécanisme d'action du NR sur le cœur qui semble plus complexe qu'anticipé car les cibles nucléaires de Sirt1 comme Foxo1 (article en annexe) et p53 se trouvent être hyperacétylées plutôt que désacétylées suite au traitement de long terme au NR. Il s'agit maintenant de rechercher si les protéines mitochondriales pourraient être différenciellement acétylées/désacétylées en réponse au NR par rapport aux protéines nucléaires ou si d'autres voies liées à la réponse au stress oxydant pourraient être activées par le NR comme montré dans le vers *c. elegans*. L'autre axe consiste à rechercher si le NR peut agir sur mode thérapeutique plutôt que préventif et si il peut agir sur d'autres modèles d'insuffisance cardiaque.

L'ensemble de ces données nous a conduits à poser la question du rôle de Nmrk2 dans le RC et plus particulièrement dans le maintien de l'homéostasie du NAD en utilisant un modèle KO de Nmrk2 chez la souris. Nous avons noté que la kinase Nmrk2 s'est révélée être identique à un gène précédemment cloné comme étant une protéine MIBP spécifique du muscle se liant à l'hétérodimère intégrine $\beta 1/\alpha 7$ et qui se trouve impliquée dans le dépôt de la laminine dans la matrice extracellulaire (Li et al. 1999; Goody et al. 2010). Ces observations nous ont conduits à nous déterminer l'impact de la déficience de Nmrk2 sur l'expression et l'organisation de la laminine dans le cœur.

Rôle de Nmrk2 dans la biosynthèse du NAD

Les kinases NMRK phosphorylent le NR pour donner du NMN, le précurseur direct de NAD⁺. Nos résultats montrent que l'absence de NMRK2 n'a pas d'effet sur le pool total de NAD dans le cœur à l'état basal et à un âge jeune. La supplémentation en NR ne fait pas augmenter les niveaux de base de NAD dans le cœur des souris contrôles exprimant NMRK2.

Des niveaux augmentés de NAD⁺ ont été reportés en réponse au traitement avec NR chez la levure (Bieganowski and Brenner 2004; Belenky et al. 2007), et dans les cellules humaines en culture (Yang et al 2007). Canto et al (cell metabolism 2012) ont montré que le NR augmente la disponibilité de NAD⁺ dans les tissus de mammifères. NMRK1 est essentielle pour que le NR puisse induire la synthèse de NAD⁺ dans cellules hépatiques (in vitro) et le muscle squelettique (in vivo). L'augmentation de l'activité des NRK1 et 2 dans les cellules NIH/3T3 par une surexpression, est suffisante pour induire la synthèse de NAD⁺ par le NR, ce qui suggère un rôle important de NMRK1/2 dans l'utilisation du NR (Ratajczak et al. 2016). Toutefois chez le KO Nmrk1, la réponse au NR n'est pas totalement abolie dans le foie, or ce tissu n'exprime pas la NMRK2. On peut donc émettre l'hypothèse que le NR administré par voie systémique est converti en précurseurs de NAD⁺ alternatifs comme le NAM par la purine nucléoside phosphorylase et le NAM est transformé en NMN par la NAMPT (Revollo et al. 2007).

Le faible niveau d'expression de base de NMRK2 que nous avons observé dans le cœur et nos résultats montrant que le myocarde ne présente pas de différences de niveaux de NAD chez la souris adulte jusqu'à 12 mois et en réponse au traitement avec le NR, confortent l'idée qu'à l'état physiologique la source majeure de NAD⁺ reste le NAM métabolisé par la NAMPT.

De manière intéressante, l'étude de Diguët et al à laquelle j'ai participé montre que dans un modèle murin de CMD dans lequel il y a une forte induction de l'expression de Nmrk2, l'enrichissement du régime en NR améliore la fonction cardiaque et assure le maintien du NAD myocardique. Il semble donc que le rôle de NMRK2 dans le maintien des niveaux de NAD ne se révèle qu'en conditions

pathologiques lorsque la production de NAD via la voie NAMPT, plus coûteuse sur le plan énergétique se met à chuter.

Par ailleurs nous avons observé que le niveau d'expression des gènes *Nmrk1*, *Nmrk2*, *Nampt*, déclinent avec l'âge chez la souris. Ceci nous a permis de mettre en évidence l'importance de la contribution de NMRK2 dans le maintien des niveaux de NAD dans le cœur à 24 mois, qui sont réduits de 50% chez le mutant à ce stade. Ce résultat pourrait inciter à réfléchir à de nouvelles options thérapeutiques concernant les maladies liées au vieillissement cardiaque, sachant qu'il a été montré que la perte de l'activité de sirtuines déacétylases qui sont justement dépendante du NAD, est associée à de nombreuses maladies liées au vieillissement (Imai and Guarente 2014). Cette perspective est toutefois à contrebalancer avec notre observation que FoxO1 une cible de Sirt1 se retrouve hyperacétylé plutôt que déacétylé chez l'adulte en CMD. Il faudra tester le traitement au NR sur des souris âgées mais sans pathologie cardiaque pour vérifier son impact sur la fonction cardiaque et les taux de NAD.

Test d'endurance et échocardiographies :

L'étude des mutant *Nmrk2* *-/-* nous a permis de montrer que ce gène spécifique des muscles striés n'est pas indispensable au développement cardiaque et musculaire. Cependant nous avons observé que les mutants sont 7 fois moins endurants que les souris contrôles et que cette incapacité à l'effort correspond à une dysfonction cardiaque se manifestant par une diminution de la fraction d'éjection et le développement d'une CMD. Cette dysfonction se maintient néanmoins à un niveau d'IC modérée car elle semble se stabiliser avec l'âge et 25 n'affecte pas la survie des mutants à l'état basal. L'expression de certains gènes cardiaques est modifiée chez le mutant *Nmrk2* à l'état basal. L'expression du gène *SOD1* codant une enzyme importante pour réduire le stress oxydatif dans l'IC est diminuée chez ce mutant. Le mutant *Nrk2* présente également une induction de la β MHC Dans le cœur défaillant des rongeurs, un changement de l'isoforme α rapide, fortement consommateur d'ATP a lieu en faveur d'une ré-expression de l'isoforme lent β MHC qui est caractéristique du cœur embryonnaire chez la souris mais qui pourrait être énergétiquement favorable lorsque la fonction cardiaque est déprimée (Parlakian et al. 2005). Par contre le mutant *Nmrk2* ne présente pas les signes d'un stress cardiaque aigu (BNP, ANF).

Matrice extracellulaire et fibrose

Au niveau histologique, Le marquage de la laminine chez le mutant *Nmrk2* montre que la laminine de la lame basale ne semble pas correctement déposée, en accord avec l'étude faite chez le

poisson zèbre qui montre que le gène de Nr2b est nécessaire pour le dépôt correct de la laminine au niveau de la jonction myotendineuse.

Il est intéressant de noter que de nombreuses CMD sont associées à des défauts moléculaires qui mettent en évidence le lien entre les cardiomyocytes et la matrice extracellulaire (MEC). In vivo, le remodelage cardiaque, y compris la réorganisation du cytosquelette au niveau cellulaire, résulte d'une combinaison des effets de facteurs mécaniques et hormonaux en interaction étroite avec les protéines de la MEC, les intégrines (comme l'intégrine $\alpha 7$) et les protéines sécrétées localement comme les métalloprotéinases. Il est donc important de comprendre comment les signaux mécaniques sont convertis en signaux chimiques et comment les protéines de la MEC comme la laminine, régulent la progression de la pathologie dans le cardiomyocyte, sachant que la laminine de la membrane basale, est impliquée dans la formation des jonctions de type « gap », responsables de la régulation du couplage électrique entre les cardiomyocyte (Yang et al. 2014).

Le marquage au rouge Sirius des fibres de collagène montre la présence d'une fibrose cardiaque chez le mutant. La MET montre un élargissement de l'espace inter-cardiomyocytes chez le mutant pouvant affecter les flux entre les cardiomyocytes et aboutir à des arythmies. L'espace inter-cardiomyocytaire est aussi occupé par des dépôts de collagène confirmant la fibrose observée avec le marquage Rouge Sirius. La fibrose cardiaque constitue une cible thérapeutique pour la gestion des arythmies cardiaques fatales. L'absence de mortalité chez le mutant Nmrk2 jusqu'à l'âge de 24 mois ne plaide pas pour la présence d'arythmies graves mais il serait néanmoins intéressant de procéder à des analyses d'ECG pour déterminer les paramètres de conduction chez ce mutant, notamment chez des souris plus âgées encore pour tester cette hypothèse.

Réponse du mutant Nmrk2 à la surcharge de pression

NMRK2 se lie à l'hétérodimère intégrine $\alpha 7/\beta 1$ (Li et al. 2003). Les molécules de signalisation intégrines sont modulées suite à une surcharge de pression du VG. Les intégrines sont responsables de la transduction des signaux biomécaniques par l'intermédiaire de kinases cytoplasmiques. Nous avons soumis des souris contrôles et Nmrk2-KO à une surcharge en pression (TAC) de long terme afin de suivre l'évolution des paramètres fonctionnels cardiaques et d'étudier la survie des deux groupes face à cette surcharge de pression chronique. Les souris contrôles développent une réponse hypertrophique compensatoire. Par contre, les souris Nmrk2-KO développent une dilatation du VG, qui commence deux semaines suivant la TAC. Ceci n'a pas été associé à un taux de mortalité plus élevé avant 8 semaines. La mortalité s'est révélée par la suite légèrement supérieure dans le groupe

mutant soumis à la TAC par rapport aux contrôles mais le n relativement petit de l'étude ne permet pas de conclure sur la significativité.

L'altération du remodelage du VG chez les souris Nmrk2-KO en réponse à cette surcharge mécanique, constitue le profil typique de l'hypertrophie cardiaque excentrique, caractérisée par un élargissement du diamètre du VG et un épaississement moindre des parois par rapport aux contrôles. Ceci est considéré comme une adaptation géométrique maladaptative vis-à-vis des conditions hypertensives qui accélère l'évolution vers l'IC (Norton et al. 2002).

Deux semaines après la TAC, le stade où nous avons observé le début du remodelage excentrique, nous avons effectué un marquage laminine $\alpha 2$ qui montre une altération du pattern chez le mutant par rapport aux contrôles.

Le niveau d'expression de la laminine $\alpha 2$ est régulé au cours du développement chez l'homme et les rongeurs. Son niveau d'expression augmente rapidement après la naissance pour suivre la croissance normale des cardiomyocytes puis diminue progressivement jusqu'à l'âge adulte.

Dans l'hypertrophie cardiaque et l'IC, le déséquilibre entre la taille augmentée des CM et l'expression diminuée de la laminine $\alpha 2$, pourrait contribuer à des propriétés altérées du sarcolemme (Oliviero et al. 2000). De même, un épaississement de la laminine dans la MEC a été observé dans le cœur de rats en IC induite par l'isoproténolol, et dans l'hypertrophie cardiaque induite par l'infarctus du myocarde (Grimm et al. 1998).

Nous avons observé un défaut similaire au niveau de l'organisation de la laminine chez des souris Nmrk2-KO au cours de la maturation post-natale tardive du cœur entre 3 et 4 mois. Au même moment leur cœur commence à se dilater et la fonction systolique diminue. De même, des mutations de laminine $\alpha 2$ qui sont surtout associées au phénotype de dystrophie musculaire (Guicheney et al. 1997), pourraient être associées avec la CMD chez certains patients (Carboni et al. 2011; Nelson et al. 2015).

Nous avons observé une augmentation similaire de la surface des CM et du ratio de la masse du cœur sur la masse du corps chez les deux groupes de souris, ainsi que du niveau d'expression des gènes de stress cardiaque (ANF et BNP). Le niveau d'expression de la β MHC est cependant systématiquement plus élevé chez le mutant à l'état basal. Le niveau d'expression de l'intégrine $\alpha 7$ diminue significativement chez le mutant uniquement après TAC, sachant que l'augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha 7$ produite par des réponses compensatoires ou induites par l'exercice, a un effet protecteur pour le muscle squelettique et les CM (Liu et al. 2012). De même la surexpression de l'hétérodimère intégrine $\alpha 7\beta 1D$ in vivo, protège le myocarde de l'ischémie/réperfusion (Okada et al. 2013).

La surcharge hémodynamique du VG résulte en une modulation du niveau de phosphorylation de FAK et de ERK et une augmentation du niveau d'expression des sous-unités $\alpha 7$ et $\beta 1D$, qui sont exprimées de façon dominante dans le muscle squelettique strié et auquel se lie NMRK2.

Par conséquent, nous avons évalué les changements des niveaux de phosphorylation de différentes molécules qui sont connues pour transmettre de signaux à par tir des intégrines. Nous avons analysé le niveau de phosphorylation de la paxilline car elle a été décrite comme une cible intracellulaire régulée par NMRK2 (MIBP) (Li et al. 2003). ERK1/2 est impliqué dans l'hypertrophie cardiaque (Haq et al. 2000). La phosphorylation de ERK1/2 et de la paxilline augmentent de façon similaire dans les deux groupes de souris. En revanche, le niveau d'expression de la paxilline totale est plus faible chez le mutant à l'état basal. A ce stade il est donc difficile de conclure sur le rôle exact de NMRK2 dans les cascades de phosphorylation en aval de la signalisation intégrine et il faudrait tester d'autres cibles comme la FAK et l'ILK.

En conclusion, à ce stade de l'étude, nos résultats montrent que Nmrk2 est requise pour préserver la fonction et la structure cardiaque. A l'état basal, le rôle de Nmrk2 semble essentiellement lié à la structuration de l'espace intercellulaire, ce qui pourrait être lié à son rôle dans la signalisation intégrine, et Nmrk2 ne semble pas nécessaire au maintien d'un taux normal de NAD dans le myocarde, tel que mesuré par nos méthode de quantification basées sur l'extraction en éthanol 70% /Hepes mais peut maintenir le taux de NAD en situation pathologique suite à un traitement au NR (mutants SRF-HKO ou lamine A H222P).

La caractérisation de molécules thérapeutiques pouvant moduler la biosynthèse du NAD en lien avec la signalisation intégrine, pourrait offrir des perspectives thérapeutiques intéressantes pour les pathologies cardiaques mais une recherche plus approfondie est nécessaire pour rechercher et comprendre la nature de cet éventuel couplage.

Etude de la réponse du mutant à l'angiotensine II

L'AngII est un acteur majeur du remodelage cardiaque et une étude du groupe de Gupta suggérait qu'elle diminuait le taux de NAD⁺ myocardial (Pillai et al. 2006). Les échocardiographies des souris contrôles traitées à l'Ang II pour une durée de 15 jours, montrent comme attendu une diminution de la FE et une hypertrophie. Les mutants Nmrk2 qui ont une FE réduite à la base par rapport aux contrôles ne développent pas de chute supplémentaire suite à l'administration d'AngII, par contre ils semblent capables de développer au moins partiellement un remodelage concentrique. Nous devons toutefois quantifier l'augmentation de surface des cardiomyocytes pour confirmer ce dernier point. Alors que les 2 autres enzymes potentiellement impliquées dans la synthèse du NMN (Nmrk1, Nampt) sont réprimées par l'AngII, Nmrk2 est maintenue, voire légèrement induite chez le

contrôle. La quantification du NAD que nous avons réalisé montre une augmentation de la concentration en NAD total du myocarde chez les souris contrôles traitées à l'AngII à l'inverse de ce qui a été montré par le groupe de Gupta. Dans les deux études, la méthode de quantification a été la même, une mesure de l'absorbance à 570 nm du sel de tétrazolium MTT qui est réduit en formazan en présence de la phenazine ethosulfate par le NADH issu de la conversion de l'alcool en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase. Cependant nous avons utilisé des méthodes d'extraction différentes. Le groupe de Gupta a effectué les extractions de métabolites avec de l'acide perchlorique qui extrait préférentiellement le NAD⁺ mais pas le NADH et qui doit être neutralisé avec du KClO₄ pour stabiliser les métabolites. En revanche notre extraction de métabolites est effectuée avec un tampon éthanol 70% / HEPES 10mM pH 7 qui permet de stabiliser immédiatement les métabolites. D'après une étude en chromatographie couplée à la spectrométrie de masse réalisée par l'équipe de Charles Brenner sur certains de nos échantillons, nos extraits contiennent 70% de NAD⁺ et 30 % de NADH. Nous avons confirmé ces données par une approche de destruction sélective du NADH par chauffage en milieu acide. Les résultats des deux études ne sont donc pas directement comparables et nous proposons des méthodes alternatives pour résoudre cette question (voir perspectives et suite du travail ci-après).

Indépendamment de ces considérations, l'augmentation du taux de NAD induite par l'AngII dans nos conditions de mesure tend à être moins importante chez les mutants que chez les contrôles, suggérant que Nmrk2 pourrait être important pour stimuler la synthèse du NAD dans le myocarde dans ce contexte. Il faudra toutefois augmenter le nombre d'animaux étudiés par groupe pour vérifier si la tendance devient significative sur le plan statistique. Nmrk2 ne serait donc pas requis pour le maintien du NAD dans le myocarde à l'état basal mais seulement en situation de stress comme chez le mutant SRF-HKO ou suite à l'administration chronique d'angiotensine II.

Il est connu que l'une des caractéristiques de l'IC est une déficience énergétique du cœur. Sirt1 est une déacétylase régulatrice jouant multiples rôles dans le développement, le vieillissement et la régulation métabolique. La perte de l'activité de Sirt1 contribue au développement d'une CMD avec une réduction de la taille du cardiomyocyte et des anomalies de fonctions mitochondriales, suggérant que la Sirt1 est essentielle pour le maintien de l'intégrité mitochondriale cardiaque (Planavila et al. 2012). Son expression est diminuée chez le mutant à l'état basal à un niveau comparable à l'effet du traitement AngII chez les contrôles. Il faudra confirmer que cette chute d'expression de Sirt1 détectée au niveau de l'ARNm est également observable au niveau protéique par western blot. Si la chute de Sirt1 est confirmée, on pourrait faire l'hypothèse que les mutants présentent des altérations au niveau de la fonction mitochondriale. Cette hypothèse devra être vérifiée par la mesure des capacités respiratoire (oxymètre) et la quantification des ROS

mitochondriale (système amplifié de détection du H₂O₂ d'origine mitochondriale) sur des fibres cardiaques isolées et perméabilisées (collaboration avec J. Piquereau et A. Garnier, Châtenay Malabry).

En conclusion, mon travail de thèse a permis de mettre en évidence le rôle d'une kinase spécifique du cœur encore très peu étudiée chez la souris et chez l'homme. Cette kinase semble jouer le rôle de «senseur» du stress énergétique dans différents modèles de remodelage cardiaque, où son niveau d'expression augmente significativement. NMRK2 est requise pour une fonction cardiaque normale et une structure correcte au cours du vieillissement et devient indispensable pour l'homéostasie du NAD au stade âgé. La caractérisation de molécules impliquées dans sa voie, pourraient offrir de potentielles options thérapeutiques dans le contexte des maladies cardiaques.

BIBLIOGRAPHIE

- Abel, E. D., H. C. Kaulbach, et al. (1999). "Cardiac hypertrophy with preserved contractile function after selective deletion of GLUT4 from the heart." *J Clin Invest* **104**(12): 1703-14.
- Agarwal, A. K., P. Venugopalan, et al. (2001). "Prevalence and aetiology of heart failure in an Arab population." *Eur J Heart Fail* **3**(3): 301-5.
- Akbay, E. A., J. Moslehi, et al. (2014). "D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH2 causes cardiomyopathy and neurodegeneration in mice." *Genes Dev* **28**(5): 479-90.
- Alaynick, W. A., R. P. Kondo, et al. (2007). "ERRgamma directs and maintains the transition to oxidative metabolism in the postnatal heart." *Cell Metab* **6**(1): 13-24.
- Alcendor, R. R., S. Gao, et al. (2007). "Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart." *Circ Res* **100**(10): 1512-21.
- Alford, P. W., A. P. Nesmith, et al. (2011). "Vascular smooth muscle contractility depends on cell shape." *Integr Biol (Camb)* **3**(11): 1063-70.
- Angelini, A., Z. Li, et al. (2015). "Regulation of Connective Tissue Growth Factor and Cardiac Fibrosis by an SRF/MicroRNA-133a Axis." *PLoS One* **10**(10): e0139858.
- Arany, Z., H. He, et al. (2005). "Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle." *Cell Metab* **1**(4): 259-71.
- Babbitt, C. J., S. Y. Shai, et al. (2002). "Modulation of integrins and integrin signaling molecules in the pressure-loaded murine ventricle." *Histochem Cell Biol* **118**(6): 431-9.
- Bak, M. I. and J. S. Ingwall (1998). "Regulation of cardiac AMP-specific 5'-nucleotidase during ischemia mediates ATP resynthesis on reflow." *Am J Physiol* **274**(4 Pt 1): C992-1001.
- Beer, M., T. Seyfarth, et al. (2002). "Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with (31)P-SLOOP magnetic resonance spectroscopy." *J Am Coll Cardiol* **40**(7): 1267-74.
- Belenky, P., K. C. Christensen, et al. (2009). "Nicotinamide riboside and nicotinic acid riboside salvage in fungi and mammals. Quantitative basis for Urh1 and purine nucleoside phosphorylase function in NAD⁺ metabolism." *J Biol Chem* **284**(1): 158-64.
- Belenky, P., F. G. Racette, et al. (2007). "Nicotinamide riboside promotes Sir2 silencing and extends lifespan via Nrk and Urh1/Pnp1/Meu1 pathways to NAD⁺." *Cell* **129**(3): 473-84.
- Bernardi, S., A. Michelli, et al. (2016). "Update on RAAS Modulation for the Treatment of Diabetic Cardiovascular Disease." *J Diabetes Res* **2016**: 8917578.
- Bhatia, R. S., J. V. Tu, et al. (2006). "Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study." *N Engl J Med* **355**(3): 260-9.
- Bieganowski, P. and C. Brenner (2004). "Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans." *Cell* **117**(4): 495-502.
- Bishop, J. E. (1998). "Regulation of cardiovascular collagen deposition by mechanical forces." *Mol Med Today* **4**(2): 69-75.
- Bleumink, G. S., A. M. Knetsch, et al. (2004). "Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study." *Eur Heart J* **25**(18): 1614-9.

- Bogan, K. L. and C. Brenner (2008). "Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: a molecular evaluation of NAD⁺ precursor vitamins in human nutrition." *Annu Rev Nutr* **28**: 115-30.
- Borra, M. T., M. R. Langer, et al. (2004). "Substrate specificity and kinetic mechanism of the Sir2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases." *Biochemistry* **43**(30): 9877-87.
- Brancaccio, M., E. Hirsch, et al. (2006). "Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy." *Cardiovasc Res* **70**(3): 422-33.
- Bray, M. A., S. P. Sheehy, et al. (2008). "Sarcomere alignment is regulated by myocyte shape." *Cell Motil Cytoskeleton* **65**(8): 641-51.
- Brown, K. D., S. Maqsood, et al. (2014). "Activation of SIRT3 by the NAD(+) precursor nicotinamide riboside protects from noise-induced hearing loss." *Cell Metab* **20**(6): 1059-68.
- Butler, A. J. and C. P. Ordahl (1999). "Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription." *Mol Cell Biol* **19**(1): 296-306.
- Cadre, B. M., M. Qi, et al. (1998). "Cyclic stretch down-regulates calcium transporter gene expression in neonatal rat ventricular myocytes." *J Mol Cell Cardiol* **30**(11): 2247-59.
- Canto, C., Z. Gerhart-Hines, et al. (2009). "AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity." *Nature* **458**(7241): 1056-60.
- Canto, C., R. H. Houtkooper, et al. (2012). "The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity." *Cell Metab* **15**(6): 838-47.
- Carboni, N., G. Marrosu, et al. (2011). "Dilated cardiomyopathy with conduction defects in a patient with partial merosin deficiency due to mutations in the laminin-alpha2-chain gene: a chance association or a novel phenotype?" *Muscle Nerve* **44**(5): 826-8.
- Carey, R. M. and H. M. Siragy (2003). "The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy." *Trends Endocrinol Metab* **14**(6): 274-81.
- Ceia, F., C. Fonseca, et al. (2002). "Prevalence of chronic heart failure in Southwestern Europe: the EPICA study." *Eur J Heart Fail* **4**(4): 531-9.
- Cencioni, C., F. Spallotta, et al. (2015). "Sirtuin function in aging heart and vessels." *J Mol Cell Cardiol* **83**: 55-61.
- Chang, J., L. Wei, et al. (2003). "Inhibitory cardiac transcription factor, SRF-N, is generated by caspase 3 cleavage in human heart failure and attenuated by ventricular unloading." *Circulation* **108**(4): 407-13.
- Chen, S., M. F. Blank, et al. (2016). "SIRT7-dependent deacetylation of the U3-55k protein controls pre-rRNA processing." *Nat Commun* **7**: 10734.
- Clark, E. A. and J. S. Brugge (1995). "Integrins and signal transduction pathways: the road taken." *Science* **268**(5208): 233-9.
- Clegg, A. J., D. A. Scott, et al. (2007). "Clinical and cost-effectiveness of left ventricular assist devices as destination therapy for people with end-stage heart failure: a systematic review and economic evaluation." *Int J Technol Assess Health Care* **23**(2): 261-8.
- Cleland, J. G., K. Swedberg, et al. (2003). "The EuroHeart Failure survey programme-- a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis." *Eur Heart J* **24**(5): 442-63.

- Cohn, J. N., R. Ferrari, et al. (2000). "Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling." *J Am Coll Cardiol* **35**(3): 569-82.
- Collins, P. B. and S. Chaykin (1972). "The management of nicotinamide and nicotinic acid in the mouse." *J Biol Chem* **247**(3): 778-83.
- Conforti, L., L. Janeckova, et al. (2011). "Reducing expression of NAD⁺ synthesizing enzyme NMNAT1 does not affect the rate of Wallerian degeneration." *Febs J* **278**(15): 2666-79.
- Cook, C., G. Cole, et al. (2014). "The annual global economic burden of heart failure." *Int J Cardiol* **171**(3): 368-76.
- Coppolino, M. G., M. J. Woodside, et al. (1997). "Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion." *Nature* **386**(6627): 843-7.
- D'Armiento, J. (2002). "Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction." *Trends Cardiovasc Med* **12**(3): 97-101.
- Daniels, A., M. van Bilsen, et al. (2009). "Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis." *Acta Physiol (Oxf)* **195**(3): 321-38.
- de Gasparo, M., K. J. Catt, et al. (2000). "International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors." *Pharmacol Rev* **52**(3): 415-72.
- De Ingeniis, J., M. D. Kazanov, et al. (2012). "Glutamine versus ammonia utilization in the NAD synthetase family." *PLoS One* **7**(6): e39115.
- De Sousa, E., V. Veksler, et al. (1999). "Subcellular creatine kinase alterations. Implications in heart failure." *Circ Res* **85**(1): 68-76.
- Deschamps, A. M. and F. G. Spinale (2005). "Matrix modulation and heart failure: new concepts question old beliefs." *Curr Opin Cardiol* **20**(3): 211-6.
- Diguet, N., Y. Mallat, et al. (2011). "Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end products in dilated cardiomyopathy." *J Biol Chem* **286**(40): 35007-19.
- Doenst, T., G. Pytel, et al. (2010). "Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload." *Cardiovasc Res* **86**(3): 461-70.
- Dolder, M., B. Walzel, et al. (2003). "Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation." *J Biol Chem* **278**(20): 17760-6.
- Dorner, A. and H. P. Schultheiss (2000). "The myocardial expression of the adenine nucleotide translocator isoforms is specifically altered in dilated cardiomyopathy." *Herz* **25**(3): 176-80.
- Dostal, D. E. and K. M. Baker (1999). "The Cardiac Renin-Angiotensin System." *Conceptual, or a Regulator of Cardiac Function?* **85**(7): 643-650.
- Duan, Y., Z. Liu, et al. (2011). "Hybrid gel composed of native heart matrix and collagen induces cardiac differentiation of human embryonic stem cells without supplemental growth factors." *J Cardiovasc Transl Res* **4**(5): 605-15.
- Dzau, V. J., W. S. Colucci, et al. (1981). "Relation of the renin-angiotensin-aldosterone system to clinical state in congestive heart failure." *Circulation* **63**(3): 645-51.
- Dzeja, P. P., D. Pucar, et al. (1999). "Reduced activity of enzymes coupling ATP-generating with ATP-consuming processes in the failing myocardium." *Mol Cell Biochem* **201**(1-2): 33-40.

- Eckle, T., K. Hartmann, et al. (2012). "Adora2b-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch crucial for myocardial adaptation to ischemia." Nat Med **18**(5): 774-82.
- Engler, A. J., C. Carag-Krieger, et al. (2008). "Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating." J Cell Sci **121**(Pt 22): 3794-802.
- Evans, C., K. L. Bogan, et al. (2010). "NAD⁺ metabolite levels as a function of vitamins and calorie restriction: evidence for different mechanisms of longevity." BMC Chem Biol **10**: 2.
- Fassler, R., J. Rohwedel, et al. (1996). "Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin." J Cell Sci **109 (Pt 13)**: 2989-99.
- Finck, B. N. and D. P. Kelly (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease." Circulation **115**(19): 2540-8.
- Fonarow, G. C., N. M. Albert, et al. (2010). "Improving evidence-based care for heart failure in outpatient cardiology practices: primary results of the Registry to Improve the Use of Evidence-Based Heart Failure Therapies in the Outpatient Setting (IMPROVE HF)." Circulation **122**(6): 585-96.
- Foretz, M., N. Ancellin, et al. (2005). "Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver." Diabetes **54**(5): 1331-9.
- Foretz, M., D. Carling, et al. (1998). "AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes." J Biol Chem **273**(24): 14767-71.
- Formentini, L., F. Moroni, et al. (2009). "Detection and pharmacological modulation of nicotinamide mononucleotide (NMN) in vitro and in vivo." Biochem Pharmacol **77**(10): 1612-20.
- Frank, D., C. Kuhn, et al. (2008). "Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program." Hypertension **51**(2): 309-18.
- Garnier, A., D. Fortin, et al. (2003). "Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles." J Physiol **551**(Pt 2): 491-501.
- Geng, B., Y. Cai, et al. (2013). "PARP-2 knockdown protects cardiomyocytes from hypertrophy via activation of SIRT1." Biochem Biophys Res Commun **430**(3): 944-50.
- Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1999). "Integrin signaling." Science **285**(5430): 1028-32.
- Gilley, J., R. Adalbert, et al. (2013). "Rescue of peripheral and CNS axon defects in mice lacking NMNAT2." J Neurosci **33**(33): 13410-24.
- Goldberger, J. (1914). "Public Health Weekly Reports for OCTOBER 23, 1914." Public Health Rep **29**(43): 2821-2881.
- Gomes, P., T. F. Outeiro, et al. (2015). "Emerging Role of Sirtuin 2 in the Regulation of Mammalian Metabolism." Trends Pharmacol Sci **36**(11): 756-68.
- Gong, G., J. Liu, et al. (2003). "Oxidative capacity in failing hearts." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(2): H541-8.
- Goody, M. F., M. W. Kelly, et al. (2010). "Nr2b-mediated NAD⁺ production regulates cell adhesion and is required for muscle morphogenesis in vivo: Nr2b and NAD⁺ in muscle morphogenesis." Dev Biol **344**(2): 809-26.

- Gopalan, S. M., C. Flaim, et al. (2003). "Anisotropic stretch-induced hypertrophy in neonatal ventricular myocytes micropatterned on deformable elastomers." Biotechnol Bioeng **81**(5): 578-87.
- Goto, M., S. Terada, et al. (2000). "cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats." Biochem Biophys Res Commun **274**(2): 350-4.
- Greco, S., P. Fasanaro, et al. (2012). "MicroRNA dysregulation in diabetic ischemic heart failure patients." Diabetes **61**(6): 1633-41.
- Grimm, D., D. Elsner, et al. (1998). "Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system." Cardiovasc Res **37**(1): 91-100.
- Grossman, W. and W. J. Paulus (2013). "Myocardial stress and hypertrophy: a complex interface between biophysics and cardiac remodeling." J Clin Invest **123**(9): 3701-3.
- Grozio, A., G. Sociali, et al. (2013). "CD73 protein as a source of extracellular precursors for sustained NAD⁺ biosynthesis in FK866-treated tumor cells." J Biol Chem **288**(36): 25938-49.
- Guicheney, P., N. Vignier, et al. (1997). "Genetics of laminin alpha 2 chain (or merosin) deficient congenital muscular dystrophy: from identification of mutations to prenatal diagnosis." Neuromuscul Disord **7**(3): 180-6.
- Gurd, B. J. (2011). "Deacetylation of PGC-1alpha by SIRT1: importance for skeletal muscle function and exercise-induced mitochondrial biogenesis." Appl Physiol Nutr Metab **36**(5): 589-97.
- Hanks, S. K., M. B. Calalb, et al. (1992). "Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(18): 8487-91.
- Haq, S., G. Choukroun, et al. (2000). "Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy." J Cell Biol **151**(1): 117-30.
- Hartupée, J. and D. L. Mann (2016). "Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction." Nat Rev Cardiol **14**(1): 30-38.
- Hazeltine, L. B., C. S. Simmons, et al. (2012). "Effects of substrate mechanics on contractility of cardiomyocytes generated from human pluripotent stem cells." Int J Cell Biol **2012**: 508294.
- Heidenreich, P. A., J. G. Trogdon, et al. (2013). "Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association." Circulation **123**(8): 933-44.
- Heineke, J. and J. D. Molkentin (2006). "Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(8): 589-600.
- Hellermann, J. P., S. J. Jacobsen, et al. (2003). "Heart failure after myocardial infarction: prevalence of preserved left ventricular systolic function in the community." Am Heart J **145**(4): 742-8.
- Heydarkhan-Hagvall, S., J. M. Gluck, et al. (2012). "The effect of vitronectin on the differentiation of embryonic stem cells in a 3D culture system." Biomaterials **33**(7): 2032-40.
- Ho, C. Y., D. E. Jaalouk, et al. (2013). "Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics." Nature **497**(7450): 507-11.
- Hsu, C.-P., P. Zhai, et al. (2010). "Sirt1 Protects the Heart from Ischemia/Reperfusion." Circulation **122**(21): 2170-2182.

- Hsu, C. P., S. Oka, et al. (2009). "Nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates cell survival through NAD⁺ synthesis in cardiac myocytes." *Circ Res* **105**(5): 481-91.
- Hsu, C. P., T. Yamamoto, et al. (2014). "The function of nicotinamide phosphoribosyltransferase in the heart." *DNA Repair (Amst)* **23**: 64-8.
- Huang, J. Y., M. D. Hirsche, et al. (2010). "Mitochondrial sirtuins." *Biochim Biophys Acta* **1804**(8): 1645-51.
- Huss, J. M., R. P. Kopp, et al. (2002). "Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha." *J Biol Chem* **277**(43): 40265-74.
- Huss, J. M., I. P. Torra, et al. (2004). "Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle." *Mol Cell Biol* **24**(20): 9079-91.
- Hynes, R. O. (1987). "Integrins: a family of cell surface receptors." *Cell* **48**(4): 549-54.
- Imai, S. (2009). "Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt): a link between NAD biology, metabolism, and diseases." *Curr Pharm Des* **15**(1): 20-8.
- Imai, S. and L. Guarente (2014). "NAD⁺ and sirtuins in aging and disease." *Trends Cell Biol* **24**(8): 464-71.
- Inoue, T., M. Hiratsuka, et al. (2007). "SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress." *Oncogene* **26**(7): 945-57.
- Investigators, T. S. (1992). "Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. The SOLVD Investigattors." *N Engl J Med* **327**(10): 685-91.
- Israeli-Rosenberg, S., A. M. Manso, et al. (2014). "Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte." *Circ Res* **114**(3): 572-86.
- Jacot, J. G., J. C. Martin, et al. (2010). "Mechanobiology of cardiomyocyte development." *J Biomech* **43**(1): 93-8.
- Jacot, J. G., A. D. McCulloch, et al. (2008). "Substrate stiffness affects the functional maturation of neonatal rat ventricular myocytes." *Biophys J* **95**(7): 3479-87.
- Jagtap, P. and C. Szabo (2005). "Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors." *Nat Rev Drug Discov* **4**(5): 421-40.
- Jang, M., L. Cai, et al. (1997). "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes." *Science* **275**(5297): 218-20.
- Johannsson, E., P. K. Lunde, et al. (2001). "Upregulation of the cardiac monocarboxylate transporter MCT1 in a rat model of congestive heart failure." *Circulation* **104**(6): 729-34.
- Jones, K. J., G. Morgan, et al. (2001). "The expanding phenotype of laminin alpha2 chain (merosin) abnormalities: case series and review." *J Med Genet* **38**(10): 649-57.
- Kalsi, K. K., R. T. Smolenski, et al. (1999). "Energetics and function of the failing human heart with dilated or hypertrophic cardiomyopathy." *Eur J Clin Invest* **29**(6): 469-77.
- Karamanlidis, G., C. F. Lee, et al. (2013). "Mitochondrial Complex I Deficiency Increases Protein Acetylation and Accelerates Heart Failure." *Cell metabolism* **18**(2): 239-250.
- Katz, E. B., A. E. Stenbit, et al. (1995). "Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4." *Nature* **377**(6545): 151-5.
- Kelder, J. C., M. J. Cramer, et al. (2011). "The diagnostic value of physical examination and additional testing in primary care patients with suspected heart failure." *Circulation* **124**(25): 2865-73.

- Khan, N. A., M. Auranen, et al. (2014). "Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3." *EMBO Mol Med* **6**(6): 721-31.
- Kobayashi, K. and J. R. Neely (1979). "Control of maximum rates of glycolysis in rat cardiac muscle." *Circ Res* **44**(2): 166-75.
- Kolwicz, S. C., Jr. and R. Tian (2011). "Glucose metabolism and cardiac hypertrophy." *Cardiovasc Res* **90**(2): 194-201.
- Kumphune, S., S. Chattipakorn, et al. (2012). "Role of p38 inhibition in cardiac ischemia/reperfusion injury." *Eur J Clin Pharmacol* **68**(5): 513-24.
- Kuwahara, K., G. C. Teg Pipes, et al. (2007). "Modulation of adverse cardiac remodeling by STARS, a mediator of MEF2 signaling and SRF activity." *J Clin Invest* **117**(5): 1324-34.
- Lai, L., T. C. Leone, et al. (2008). "Transcriptional coactivators PGC-1alpha and PGC-1beta control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart." *Genes Dev* **22**(14): 1948-61.
- Lapidos, K. A., R. Kakkar, et al. (2004). "The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma." *Circ Res* **94**(8): 1023-31.
- Laurent, G. J. (1987). "Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass." *Am J Physiol* **252**(1 Pt 1): C1-9.
- Lee, C. F., J. D. Chavez, et al. (2016). "Normalization of NAD+ Redox Balance as a Therapy for Heart Failure." *Circulation* **134**(12): 883-94.
- Legate, K. R. and R. Fassler (2009). "Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails." *J Cell Sci* **122**(Pt 2): 187-98.
- Lehman, J. J., P. M. Barger, et al. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis." *J Clin Invest* **106**(7): 847-56.
- Lehman, J. J., S. Boudina, et al. (2008). "The transcriptional coactivator PGC-1alpha is essential for maximal and efficient cardiac mitochondrial fatty acid oxidation and lipid homeostasis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**(1): H185-96.
- Lemieux, H., S. Semsroth, et al. (2011). "Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart." *Int J Biochem Cell Biol* **43**(12): 1729-38.
- Leone, T. C., J. J. Lehman, et al. (2005). "PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis." *PLoS Biol* **3**(4): e101.
- Levy, B. I. (2005). "How to explain the differences between renin angiotensin system modulators." *Am J Hypertens* **18**(9 Pt 2): 134S-141S.
- Li, J., R. Mayne, et al. (1999). "A novel muscle-specific beta 1 integrin binding protein (MIBP) that modulates myogenic differentiation." *J Cell Biol* **147**(7): 1391-8.
- Li, J., H. Rao, et al. (2003). "The muscle integrin binding protein (MIBP) interacts with alpha7beta1 integrin and regulates cell adhesion and laminin matrix deposition." *Dev Biol* **261**(1): 209-19.
- Li, L., C. Muhlfeld, et al. (2011). "Mitochondrial biogenesis and PGC-1alpha deacetylation by chronic treadmill exercise: differential response in cardiac and skeletal muscle." *Basic Res Cardiol* **106**(6): 1221-34.
- Liao, R., M. Jain, et al. (2002). "Cardiac-specific overexpression of GLUT1 prevents the development of heart failure attributable to pressure overload in mice." *Circulation* **106**(16): 2125-31.

- Liao, R., L. Nascimben, et al. (1996). "Decreased energy reserve in an animal model of dilated cardiomyopathy. Relationship to contractile performance." *Circ Res* **78**(5): 893-902.
- Lin, J., P. Puigserver, et al. (2002). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor." *J Biol Chem* **277**(3): 1645-8.
- Lin, J., P. H. Wu, et al. (2004). "Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice." *Cell* **119**(1): 121-35.
- Lin, T. H., Q. Chen, et al. (1997). "Cell anchorage permits efficient signal transduction between ras and its downstream kinases." *J Biol Chem* **272**(14): 8849-52.
- Lindsay, M. M. and F. G. Dunn (2007). "Biochemical evidence of myocardial fibrosis in veteran endurance athletes." *Br J Sports Med* **41**(7): 447-52.
- Liu, J., D. J. Milner, et al. (2012). "beta1D chain increases alpha7beta1 integrin and laminin and protects against sarcolemmal damage in mdx mice." *Hum Mol Genet* **21**(7): 1592-603.
- Liu, J., C. Wang, et al. (2001). "Mitochondrial ATPase and high-energy phosphates in failing hearts." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(3): H1319-26.
- Lopaschuk, G. D. and J. R. Ussher (2016). "Evolving Concepts of Myocardial Energy Metabolism: More Than Just Fats and Carbohydrates." *Circ Res* **119**(11): 1173-1176.
- Magni, G., A. Amici, et al. (2004). "Structure and function of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase." *Curr Med Chem* **11**(7): 873-85.
- Maillet, M., J. H. van Berlo, et al. (2013). "Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(1): 38-48.
- Mailleux, F., R. Gelinias, et al. (2016). "O-GlcNAcylation, enemy or ally during cardiac hypertrophy development?" *Biochim Biophys Acta* **1862**(12): 2232-2243.
- Mallat, Y., E. Tritsch, et al. (2014). "Proteome modulation in H9c2 cardiac cells by microRNAs miR-378 and miR-378." *Mol Cell Proteomics* **13**(1): 18-29.
- Mann, D. L. (2015). "Innate immunity and the failing heart: the cytokine hypothesis revisited." *Circ Res* **116**(7): 1254-68.
- Marin-Garcia, J., M. J. Goldenthal, et al. (2001). "Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure." *Cardiovasc Res* **52**(1): 103-10.
- Martin, O. J., L. Lai, et al. (2014). "A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 in the control of mitochondrial dynamics during postnatal cardiac growth." *Circ Res* **114**(4): 626-36.
- McCutcheon, L. J., C. R. Cory, et al. (1992). "Respiratory chain defect of myocardial mitochondria in idiopathic dilated cardiomyopathy of Doberman pinscher dogs." *Can J Physiol Pharmacol* **70**(11): 1529-33.
- Meighan, C. M. and J. E. Schwarzbauer (2008). "Temporal and spatial regulation of integrins during development." *Curr Opin Cell Biol* **20**(5): 520-4.
- Mericskay, M. (2016). "Nicotinamide adenine dinucleotide homeostasis and signalling in heart disease: Pathophysiological implications and therapeutic potential." *Arch Cardiovasc Dis* **109**(3): 207-15.
- Micheli, V., H. A. Simmonds, et al. (1990). "Importance of nicotinamide as an NAD precursor in the human erythrocyte." *Arch Biochem Biophys* **283**(1): 40-5.
- Mittal, A., M. Pulina, et al. (2013). "Fibronectin and integrin alpha 5 play requisite roles in cardiac morphogenesis." *Dev Biol* **381**(1): 73-82.

- Miyamoto, S., S. K. Akiyama, et al. (1995). "Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function." *Science* **267**(5199): 883-5.
- Moe, G. W., J. Marin-Garcia, et al. (2004). "In vivo TNF-alpha inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**(4): H1813-20.
- Mootha, V. K., A. E. Arai, et al. (1997). "Maximum oxidative phosphorylation capacity of the mammalian heart." *Am J Physiol* **272**(2 Pt 2): H769-75.
- Mori, V., A. Amici, et al. (2014). "Metabolic profiling of alternative NAD biosynthetic routes in mouse tissues." *PLoS One* **9**(11): e113939.
- Mosterd, A. and A. W. Hoes (2007). "Clinical epidemiology of heart failure." *Heart* **93**(9): 1137-46.
- Muchir, A., P. Pavlidis, et al. (2007). "Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy." *J Clin Invest* **117**(5): 1282-93.
- Nelson, I., T. Stojkovic, et al. (2015). "Laminin alpha2 Deficiency-Related Muscular Dystrophy Mimicking Emery-Dreifuss and Collagen VI related Diseases." *J Neuromuscul Dis* **2**(3): 229-240.
- Neubauer, S., M. Horn, et al. (1997). "Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy." *Circulation* **96**(7): 2190-6.
- Ning, X. H., J. Zhang, et al. (2000). "Signaling and expression for mitochondrial membrane proteins during left ventricular remodeling and contractile failure after myocardial infarction." *J Am Coll Cardiol* **36**(1): 282-7.
- North, B. J. and E. Verdin (2004). "Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases." *Genome Biol* **5**(5): 224.
- Norton, G. R., A. J. Woodiwiss, et al. (2002). "Heart failure in pressure overload hypertrophy. The relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction." *J Am Coll Cardiol* **39**(4): 664-71.
- Ntelios, D., G. Tzimogiorgis, et al. (2015). "Mechanical aberrations in hypertrophic cardiomyopathy: emerging concepts." *Front Physiol* **6**: 232.
- Okada, H., N. C. Lai, et al. (2013). "Integrins protect cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury." *J Clin Invest* **123**(10): 4294-308.
- Oliviero, P., C. Chassagne, et al. (2000). "Expression of laminin alpha2 chain during normal and pathological growth of myocardium in rat and human." *Cardiovasc Res* **46**(2): 346-55.
- Orsomando, G., L. Cialabrini, et al. (2012). "Simultaneous single-sample determination of NMNAT isozyme activities in mouse tissues." *PLoS One* **7**(12): e53271.
- Ouzounian, M., D. S. Lee, et al. (2008). "Diastolic heart failure: mechanisms and controversies." *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **5**(7): 375-86.
- Parlakian, A., C. Charvet, et al. (2005). "Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart." *Circulation* **112**(19): 2930-9.
- Paulus, W. J., C. Tschope, et al. (2007). "How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology." *Eur Heart J* **28**(20): 2539-50.

- Pham, C. G., A. E. Harpf, et al. (2000). "Striated muscle-specific beta(1D)-integrin and FAK are involved in cardiac myocyte hypertrophic response pathway." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(6): H2916-26.
- Pillai, J. B., M. Gupta, et al. (2006). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice are protected from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(4): H1545-53.
- Pillai, J. B., A. Isbatan, et al. (2005). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD⁺ depletion and reduced Sir2alpha deacetylase activity." J Biol Chem **280**(52): 43121-30.
- Pillai, V. B., N. R. Sundaresan, et al. (2010). "Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway." J Biol Chem **285**(5): 3133-44.
- Planavila, A., E. Dominguez, et al. (2012). "Dilated cardiomyopathy and mitochondrial dysfunction in Sirt1-deficient mice: a role for Sirt1-Mef2 in adult heart." J Mol Cell Cardiol **53**(4): 521-31.
- Pong, T., W. J. Adams, et al. (2011). "Hierarchical architecture influences calcium dynamics in engineered cardiac muscle." Exp Biol Med (Maywood) **236**(3): 366-73.
- Price, N. L., A. P. Gomes, et al. (2012). "SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function." Cell Metab **15**(5): 675-90.
- Puigserver, P., Z. Wu, et al. (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." Cell **92**(6): 829-39.
- Ratajczak, J., M. Joffraud, et al. (2016). "NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells." Nat Commun **7**: 13103.
- Razeghi, P., M. E. Young, et al. (2001). "Metabolic gene expression in fetal and failing human heart." Circulation **104**(24): 2923-31.
- Razeghi, P., M. E. Young, et al. (2002). "Downregulation of metabolic gene expression in failing human heart before and after mechanical unloading." Cardiology **97**(4): 203-9.
- Revollo, J. R., A. Korner, et al. (2007). "Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme." Cell Metab **6**(5): 363-75.
- Reyes, L. A., J. Boslett, et al. (2015). "Depletion of NADP(H) due to CD38 activation triggers endothelial dysfunction in the postischemic heart." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(37): 11648-53.
- Roger, V. L. (2013). "Epidemiology of heart failure." Circ Res **113**(6): 646-59.
- Roger, V. L., A. S. Go, et al. (2011). "Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association." Circulation **123**(4): e18-e209.
- Rohwedel, J., K. Guan, et al. (1998). "Loss of beta1 integrin function results in a retardation of myogenic, but an acceleration of neuronal, differentiation of embryonic stem cells in vitro." Dev Biol **201**(2): 167-84.
- Rosca, M. G. and C. L. Hoppel (2009). "New aspects of impaired mitochondrial function in heart failure." J Bioenerg Biomembr **41**(2): 107-12.
- Ross, R. S. and T. K. Borg (2001). "Integrins and the myocardium." Circ Res **88**(11): 1112-9.
- Rouleau, J. L., L. A. Moye, et al. (1991). "Activation of neurohumoral systems following acute myocardial infarction." Am J Cardiol **68**(14): 80D-86D.
- Russell, L. K., C. M. Mansfield, et al. (2004). "Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner." Circ Res **94**(4): 525-33.

- Russell, R. R., 3rd, R. Bergeron, et al. (1999). "Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR." *Am J Physiol* **277**(2 Pt 2): H643-9.
- Russell, R. R., 3rd, J. Li, et al. (2004). "AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury." *J Clin Invest* **114**(4): 495-503.
- Saavedra, W. F., N. Paolocci, et al. (2002). "Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart." *Circ Res* **90**(3): 297-304.
- Sabbah, H. N., V. Sharov, et al. (1992). "Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure." *J Mol Cell Cardiol* **24**(11): 1333-47.
- Sack, M. N., T. A. Rader, et al. (1996). "Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart." *Circulation* **94**(11): 2837-42.
- Salameh, A., A. Wustmann, et al. (2010). "Cyclic mechanical stretch induces cardiomyocyte orientation and polarization of the gap junction protein connexin43." *Circ Res* **106**(10): 1592-602.
- Samarel, A. M. (2005). "Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**(6): H2291-301.
- Sambandam, N. and G. D. Lopaschuk (2003). "AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart." *Prog Lipid Res* **42**(3): 238-56.
- Sanbe, A., K. Tanonaka, et al. (1993). "Regional energy metabolism of failing hearts following myocardial infarction." *J Mol Cell Cardiol* **25**(9): 995-1013.
- Sanbe, A., K. Tanonaka, et al. (1995). "Effects of long-term therapy with ACE inhibitors, captopril, enalapril andtrandolapril, on myocardial energy metabolism in rats with heart failure following myocardial infarction." *J Mol Cell Cardiol* **27**(10): 2209-22.
- Schaller, M. D., C. A. Borgman, et al. (1992). "pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11): 5192-6.
- Schaller, M. D., C. A. Otey, et al. (1995). "Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains." *J Cell Biol* **130**(5): 1181-7.
- Schaller, M. D. and J. T. Parsons (1994). "Focal adhesion kinase and associated proteins." *Curr Opin Cell Biol* **6**(5): 705-10.
- Schaper, J., R. Froede, et al. (1991). "Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy." *Circulation* **83**(2): 504-14.
- Schaub, M. C., M. A. Hefti, et al. (2006). "Integration of calcium with the signaling network in cardiac myocytes." *J Mol Cell Cardiol* **41**(2): 183-214.
- Schilling, J. and D. P. Kelly (2011). "The PGC-1 cascade as a therapeutic target for heart failure." *J Mol Cell Cardiol* **51**(4): 578-83.
- Schipke, J. D. (1994). "Cardiac efficiency." *Basic Res Cardiol* **89**(3): 207-40.
- Schultheiss, H. P. (1992). "Dysfunction of the ADP/ATP carrier as a causative factor for the disturbance of the myocardial energy metabolism in dilated cardiomyopathy." *Basic Res Cardiol* **87 Suppl 1**: 311-20.
- Schultheiss, H. P. and H. D. Bolte (1985). "Immunological analysis of auto-antibodies against the adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy." *J Mol Cell Cardiol* **17**(6): 603-17.

- Schwartz, M. A. (2010). "Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(12): a005066.
- Schwinger, R. H., H. Bundgaard, et al. (2003). "The Na, K-ATPase in the failing human heart." Cardiovasc Res **57**(4): 913-20.
- Seferovic, P. M. and W. J. Paulus (2015). "Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes." Eur Heart J **36**(27): 1718-27, 1727a-1727c.
- Segura, A. M., O. H. Frazier, et al. (2014). "Fibrosis and heart failure." Heart Fail Rev **19**(2): 173-85.
- Shai, S. Y., A. E. Harpf, et al. (2002). "Cardiac myocyte-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure." Circ Res **90**(4): 458-64.
- Shanker, A. J., K. Yamada, et al. (2005). "Matrix-protein-specific regulation of Cx43 expression in cardiac myocytes subjected to mechanical load." Circ Res **96**(5): 558-66.
- Sharov, V. G., A. Goussev, et al. (1998). "Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure." J Mol Cell Cardiol **30**(9): 1757-62.
- Sharov, V. G., A. V. Todor, et al. (2000). "Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium." J Mol Cell Cardiol **32**(12): 2361-7.
- Sheehy, S. P., A. Grosberg, et al. (2012). "The contribution of cellular mechanotransduction to cardiomyocyte form and function." Biomech Model Mechanobiol **11**(8): 1227-39.
- Shibata, R., K. Sato, et al. (2005). "Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms." Nat Med **11**(10): 1096-103.
- Shirwany, A. and K. T. Weber (2006). "Extracellular matrix remodeling in hypertensive heart disease." J Am Coll Cardiol **48**(1): 97-8.
- Sin, T. K., A. P. Yu, et al. (2014). "Modulating effect of SIRT1 activation induced by resveratrol on Foxo1-associated apoptotic signalling in senescent heart." J Physiol **592**(12): 2535-48.
- Sorci, L., F. Cimadamore, et al. (2007). "Initial-rate kinetics of human NMN-adenyltransferases: substrate and metal ion specificity, inhibition by products and multisubstrate analogues, and isozyme contributions to NAD⁺ biosynthesis." Biochemistry **46**(16): 4912-22.
- Sorge, M. and M. Brancaccio (2016). "Melusin Promotes a Protective Signal Transduction Cascade in Stressed Hearts." Front Mol Biosci **3**: 53.
- Spinale, F. G. (2007). "Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function." Physiol Rev **87**(4): 1285-342.
- St-Pierre, J., S. Drori, et al. (2006). "Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators." Cell **127**(2): 397-408.
- Stavrum, A. K., I. Heiland, et al. (2013). "Model of tryptophan metabolism, readily scalable using tissue-specific gene expression data." J Biol Chem **288**(48): 34555-66.
- Stephens, L. E., A. E. Sutherland, et al. (1995). "Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality." Genes Dev **9**(15): 1883-95.
- Stewart, S., K. MacIntyre, et al. (2001). "More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure." Eur J Heart Fail **3**(3): 315-22.
- Sylvén, C., L. Lin, et al. (1993). "Ventricular adenine nucleotide translocator mRNA is upregulated in dilated cardiomyopathy." Cardiovasc Res **27**(7): 1295-9.
- Taber, L. A. (2001). "Biomechanics of cardiovascular development." Annu Rev Biomed Eng **3**: 1-25.

- Taegtmeyer, H. (2000). "Genetics of energetics: transcriptional responses in cardiac metabolism." *Ann Biomed Eng* **28**(8): 871-6.
- Taha, M. and G. D. Lopaschuk (2007). "Alterations in energy metabolism in cardiomyopathies." *Ann Med* **39**(8): 594-607.
- Tatari, S., L. Soubra, et al. (2015). "The economic impact of patients with heart failure on the Lebanese healthcare system." *ESC Heart Failure* **2**(3): 178-183.
- Taubman, M. B. (2003). "Angiotensin II." *A Vasoactive Hormone With Ever-Increasing Biological Roles* **92**(1): 9-11.
- Thorsteinsdottir, S., B. A. Roelen, et al. (1999). "Expression of the alpha 6A integrin splice variant in developing mouse embryonic stem cell aggregates and correlation with cardiac muscle differentiation." *Differentiation* **64**(3): 173-84.
- Traister, A., S. Aafaqi, et al. (2012). "ILK induces cardiomyogenesis in the human heart." *PLoS One* **7**(5): e37802.
- Trammell, S. A., M. S. Schmidt, et al. (2016). "Nicotinamide riboside is uniquely and orally bioavailable in mice and humans." *Nat Commun* **7**: 12948.
- Trammell, S. A., L. Yu, et al. (2016). "Nicotinamide Riboside Is a Major NAD+ Precursor Vitamin in Cow Milk." *J Nutr* **146**(5): 957-63.
- Trepats, X., L. Deng, et al. (2007). "Universal physical responses to stretch in the living cell." *Nature* **447**(7144): 592-5.
- Tritsch, E., Y. Mallat, et al. (2013). "An SRF/miR-1 axis regulates NCX1 and annexin A5 protein levels in the normal and failing heart." *Cardiovasc Res* **98**(3): 372-80.
- Unverferth, D. V., S. W. Lee, et al. (1988). "Human myocardial adenosine triphosphatase activities in health and heart failure." *Am Heart J* **115**(1 Pt 1): 139-46.
- Vakhrusheva, O., C. Smolka, et al. (2008). "Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice." *Circ Res* **102**(6): 703-10.
- van Hateren, K. J., G. W. Landman, et al. (2015). "Effectiveness of angiotensin II receptor antagonists in a cohort of Dutch patients with type 2 diabetes mellitus (ZODIAC-14)." *Can J Diabetes* **39**(2): 157-61.
- van Laake, L. W., E. G. van Donselaar, et al. (2010). "Extracellular matrix formation after transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes." *Cell Mol Life Sci* **67**(2): 277-90.
- van Riet, E. E., A. W. Hoes, et al. (2014). "Prevalence of unrecognized heart failure in older persons with shortness of breath on exertion." *Eur J Heart Fail* **16**(7): 772-7.
- Veksler, V. and R. Ventura-Clapier (1994). "In situ study of myofibrils, mitochondria and bound creatine kinases in experimental cardiomyopathies." *Mol Cell Biochem* **133-134**: 287-98.
- Ventura-Clapier, R., A. Garnier, et al. (2004). "Energy metabolism in heart failure." *J Physiol* **555**(Pt 1): 1-13.
- Ventura-Clapier, R., A. Garnier, et al. (2011). "Bioenergetics of the failing heart." *Biochim Biophys Acta* **1813**(7): 1360-72.
- Vickers, C., P. Hales, et al. (2002). "Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase." *J Biol Chem* **277**(17): 14838-43.
- Villard, E., C. Perret, et al. (2011). "A genome-wide association study identifies two loci associated with heart failure due to dilated cardiomyopathy." *Eur Heart J* **32**(9): 1065-76.

- Voigt, J. U., G. Pedrizzetti, et al. (2015). "Definitions for a common standard for 2D speckle tracking echocardiography: consensus document of the EACVI/ASE/Industry Task Force to standardize deformation imaging." *J Am Soc Echocardiogr* **28**(2): 183-93.
- Volpe, M., B. Musumeci, et al. (2003). "Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease?" *J Hypertens* **21**(8): 1429-43.
- von Lueder, T. G. and H. Krum (2015). "New medical therapies for heart failure." *Nat Rev Cardiol* **12**(12): 730-40.
- Wahbi, K., W. Bougouin, et al. (2015). "Long-term cardiac prognosis and risk stratification in 260 adults presenting with mitochondrial diseases." *Eur Heart J* **36**(42): 2886-93.
- Walsh, K. B. and G. E. Parks (2002). "Changes in cardiac myocyte morphology alter the properties of voltage-gated ion channels." *Cardiovasc Res* **55**(1): 64-75.
- Wang, N., J. D. Tytell, et al. (2009). "Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(1): 75-82.
- Wang, T. J., J. C. Evans, et al. (2003). "Natural history of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction in the community." *Circulation* **108**(8): 977-82.
- Weber, K. T. and C. G. Brilla (1991). "Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system." *Circulation* **83**(6): 1849-65.
- Weeks, K. L. and J. R. McMullen (2011). "The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes?" *Physiology (Bethesda)* **26**(2): 97-105.
- Weiss, R. G., G. Gerstenblith, et al. (2005). "ATP flux through creatine kinase in the normal, stressed, and failing human heart." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3): 808-13.
- Wheeler-Jones, C. P. (2005). "Cell signalling in the cardiovascular system: an overview." *Heart* **91**(10): 1366-74.
- Wilding, J. R., F. Joubert, et al. (2006). "Altered energy transfer from mitochondria to sarcoplasmic reticulum after cytoarchitectural perturbations in mice hearts." *J Physiol* **575**(Pt 1): 191-200.
- Wong, J., J. Zhang, et al. (2012). "Cleavage of serum response factor mediated by enteroviral protease 2A contributes to impaired cardiac function." *Cell Res* **22**(2): 360-71.
- Wyss, M., J. Smeitink, et al. (1992). "Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism." *Biochim Biophys Acta* **1102**(2): 119-66.
- Xing, Y., N. Musi, et al. (2003). "Glucose metabolism and energy homeostasis in mouse hearts overexpressing dominant negative alpha2 subunit of AMP-activated protein kinase." *J Biol Chem* **278**(31): 28372-7.
- Yamada, K., K. G. Green, et al. (2005). "Distinct pathways regulate expression of cardiac electrical and mechanical junction proteins in response to stretch." *Circ Res* **97**(4): 346-53.
- Yang, H., T. K. Borg, et al. (2014). "Role of the basement membrane in regulation of cardiac electrical properties." *Ann Biomed Eng* **42**(6): 1148-57.
- Yang, J. T., H. Rayburn, et al. (1995). "Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development." *Development* **121**(2): 549-60.
- Yin, L., H. Bien, et al. (2004). "Scaffold topography alters intracellular calcium dynamics in cultured cardiomyocyte networks." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**(3): H1276-85.
- Yoshino, J., K. F. Mills, et al. (2011). "Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice." *Cell Metab* **14**(4): 528-36.

- Young, J. L., K. Kretchmer, et al. (2014). "Mechanosensitive kinases regulate stiffness-induced cardiomyocyte maturation." Sci Rep **4**: 6425.
- Zannad, F. and B. Pitt (2009). "Biomarkers of extracellular matrix turnover." Heart Fail Clin **5**(4): 589-99.
- Zarrinpashneh, E., C. Beauloye, et al. (2008). "AMPKalpha2 counteracts the development of cardiac hypertrophy induced by isoproterenol." Biochem Biophys Res Commun **376**(4): 677-81.
- Zeng, D., D. B. Ou, et al. (2013). "Collagen/beta(1) integrin interaction is required for embryoid body formation during cardiogenesis from murine induced pluripotent stem cells." BMC Cell Biol **14**: 5.
- Zhai, R. G., M. Rizzi, et al. (2009). "Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase, new insights into an ancient enzyme." Cell Mol Life Sci **66**(17): 2805-18.
- Zhang, Y., B. Wang, et al. (2016). "Exogenous NAD(+) administration significantly protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in rat model." Am J Transl Res **8**(8): 3342-50.

Rôle de la nicotinamide riboside kinase 2 dans le remodelage cardiaque pathologique

La cardiomyopathie dilatée (CMD) est une maladie cardiaque sévère caractérisée par une fonction systolique altérée, une désorganisation de la matrice extracellulaire et des défauts métaboliques. Dans différents modèles de CMD, nous avons trouvé une forte augmentation du niveau d'expression de la nicotinamide riboside kinase 2 (*Nmrk2*) impliquée dans la synthèse du NAD, un coenzyme majeur du métabolisme énergétique et une molécule de signalisation utilisée par les sirtuines et les poly-ADP ribosylpolyérasés (PARPs). La protéine NMRK2 est similaire à la «Muscle Integrin Binding Protein» (MIBP) qui se lie à l'hétérodimère intégrine $\beta 1/\alpha 7$. Le rôle du gène *Nmrk2* dans le cœur n'est pas connu. Nous avons généré des souris *Nmrk2-KO* qui sont viables et fertiles. Les souris *Nmrk2-KO* jeunes sont capables de développer une réponse hypertrophique concentrique normale en réponse au traitement avec l'angiotensine II et la constriction aortique (TAC) mais les échocardiographies progressives jusque 8 semaines post-TAC et au cours du vieillissement à l'état basal, montrent une diminution plus sévère de la FE et le développement d'une CMD. Les analyses en RT-QPR montrent une augmentation du niveau d'expression de l'isoforme lente β de la chaîne lourde de myosine. NMRK2 n'est pas requise pour maintenir le taux global de NAD dans le cœur en réponse aux traitements pro-hypertrophiques et à un âge jeune. Au cours du vieillissement, les niveaux d'expression de *Nmrk1* et *Nampt* sont diminués et à l'âge de 24 mois, les souris *Nmrk2-KO* montrent une réduction de 50% du niveau myocardique en NAD. A ce stade, le complexe intégrine $\alpha 7\beta 1$ est aussi réduit. Les analyses en immunofluorescence et la microscopie électronique de transmission (MET) mettent en évidence un défaut du dépôt de la laminine au niveau de la lame basale, la présence d'une fibrose cardiaque et un élargissement de l'espace intercellulaire chez le mutant *Nmrk2-KO*. En conclusion, NMRK2 est requis pour préserver la fonction et la structure cardiaque au cours du vieillissement et se révèle indispensable pour maintenir l'homéostasie du NAD à un âge avancé. La caractérisation de composants moléculaires pouvant moduler cette voie pourrait être une option thérapeutique dans le futur.

Mots clés: cardiomyopathie dilatée, NMRK2, NAD, intégrine, fibrose.

Role of the nicotinamide riboside kinase 2 in pathological cardiac remodeling

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a severe heart disease characterized by reduced ejection fraction (EF), extracellular matrix disorganization and metabolic defects. In different mice models of DCM, we found a strong increase in the expression of the nicotinamide riboside kinase 2 (*Nmrk2*) implicated in the synthesis of NAD, a major coenzyme in energy metabolism and a signaling molecule used by sirtuins and poly-ADP ribosylpolymerases (PARPs). NMRK2 protein is similar to the muscle integrin binding protein (MIBP) that binds to the integrin $\alpha 7\beta 1$ heterodimer. The role of *Nmrk2* in the heart is unknown. We generated *Nmrk2-KO* mice that were viable. Young *Nmrk2-KO* mice were able to develop a normal cardiac hypertrophic response to angiotensin-II exposure and transverse aorta constriction (TAC) but follow-up echocardiography until 8 weeks post-TAC and during aging from 5 to 24 months revealed a more severe decrease in the EF and the development of a DCM phenotype. RT-qPCR analysis of cardiac mRNAs showed an increase in the slow, cardiac, β myosin heavy chain isoform starting at 12 months. NMRK2 was not essential to maintain myocardial NAD levels in response to pro-hypertrophic treatments and in young adults. However *Nmrk1* and *Nampt* expression level declined strongly with aging and *Nmrk2-KO* mice displayed a 50% reduction in myocardial NAD levels at 24 months. The $\alpha 7\beta 1$ integrin complex was repressed at this age. Immunofluorescent analyses and electron microscopy revealed a defect in laminin deposition in the basal lamina, the presence of cardiac fibrosis and enlarged intercellular space in the *Nmrk2-KO* heart. The *Nmrk2* gene is required to preserve cardiac function and structure during aging and becomes a major component of the NAD biosynthetic pathways at late age. Molecular characterization of compounds modulating this pathway could give future therapeutic prospect.

Keywords: Dilated cardiomyopathy, NMRK2, NAD, Integrin signaling, fibrosis.