



HAL
open science

Rôle de la sirtuine 1 dans la modulation des réponses apoptotique et autophagique du coeur au stress du réticulum endoplasmique

Julie Pires da Silva

► To cite this version:

Julie Pires da Silva. Rôle de la sirtuine 1 dans la modulation des réponses apoptotique et autophagique du coeur au stress du réticulum endoplasmique. Biologie moléculaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS211 . tel-01894468

HAL Id: tel-01894468

<https://theses.hal.science/tel-01894468>

Submitted on 12 Oct 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.

Rôle de la sirtuine 1 dans la modulation des réponses apoptotique et autophagique du cœur au stress du réticulum endoplasmique

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'Université Paris-Sud

Ecole doctorale n°569
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : physiopathologie cellulaire et moléculaire

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 31 mai 2018 par

Julie PIRES DA SILVA

Composition du Jury :

Christian Poüs Professeur des Universités, Université Paris-Sud (UMR-S 1193)	Président
Luc Bertrand Professeur des Universités, Maître de recherche FNRS, Université catholique de Louvain (CARD)	Rapporteur
Frank Lezoualc'h Directeur de recherche, Université de Toulouse (INSERM U1048)	Rapporteur
Jane-Lise Samuel Directeur de recherche, Université Denis Diderot (UMR-S 942)	Examineur
Christophe Lemaire Maître de Conférences des Universités, Université de Versailles/SQY (UMR-S 1180)	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury, en commençant par Christian Poüs : merci d'avoir accepté de présider ce jury, ainsi que pour votre gentillesse et votre bonne humeur. Vos conseils distribués au cours des réunions de l'école doctorale et des JED m'ont beaucoup apporté et je vous promets de continuer à me battre pour mon futur. Un grand merci également à Luc Bertrand et Frank Lezoualc'h, rapporteurs de ma thèse, et à Jane-Lise Samuel, examinatrice de mon travail. Je vous suis très reconnaissante d'avoir pris le temps de vous intéresser à mon étude.

Je remercie Rodolphe Fischmeister de m'avoir accueillie au sein de l'U769 en tant que doctorante. La qualité de travail et la bonne ambiance qui caractérisent cette unité sont uniques : c'est une chance énorme de commencer sa vie de chercheur dans cette unité. Merci pour ton soutien, tes conseils, ta bonne humeur et ton savoir scientifique et général. Je suis devenue une grande fan de Paris-Saclay grâce à toi ! Un grand merci également à Ana-Maria Gomez, actuelle directrice de l'unité (maintenant U1180), pour ta capacité à rendre ce lieu de travail aussi convivial que plaisant. Merci pour ton soutien et ton écoute. Je sais que l'unité est entre de bonnes mains.

Un grand merci à Renée Ventura-Clapier et Vladimir Veksler (Vovo), les grands sages de l'équipe au sein de laquelle j'ai mené mes travaux. Merci à toi Renée pour ta gentillesse et ton soutien durant ces années. Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la mitochondrie et du sex/gender. Pour mon Vovo, je commencerai par te dire « Coucou » et ensuite te remercier pour ton expertise, ta bonne humeur et toute l'attention dont tu as fait preuve envers moi. Merci à vous de m'avoir permis de bénéficier de votre expertise.

Je suis reconnaissante à Mathias Mericskay et Jérôme Piquereau, mes experts du métabolisme. J'ai beaucoup apprécié les nombreuses discussions que nous avons pu avoir sur le NR, sur la respi et les mitochondries. Ne t'inquiète pas Mathias en cas de besoin je reste joignable même si je quitte le laboratoire. Merci Jéré pour toute l'aide que tu m'as apportée durant ma thèse ainsi que pour ta bonne humeur, ton soutien et tes blagues. Je te souhaite à toi et ta famille plein de bonheur pour le futur.

Même si j'ai été obligée de quitter le domicile parental pour poursuivre ma thèse, j'ai trouvé une maman de secours au laboratoire. Un énorme merci à Anne Garnier, notre directrice d'équipe, pour ton aide, ta gentillesse, ta bonne humeur, tes bonbons, tes mcdos et pour nous laisser la liberté d'avoir nos vendredis après-midis chocolat et film ... heu biblio. Vos visites avec Renée et Lucile durant mes vacances forcées m'ont permis de garder la tête hors de l'eau. Vous étiez mes bouffées d'air frais durant ces mois d'inaction. Merci d'avoir continué

à prendre soin de moi à mon retour. Je n'ai pas toujours écouté mais j'ai toujours été reconnaissante de t'avoir. Et sache que je serai toujours partante pour un vendredi gras !

Je remercie bien évidemment et très sincèrement Christophe Lemaire (Chef) qui a assuré l'encadrement de ma thèse. Merci de m'avoir guidée pendant ces quatre années avec disponibilité et compétence. Tu m'as appris énormément et je veux que tu saches que je suis consciente de la chance que j'ai eue de bénéficier d'une si bonne formation, je t'en suis très reconnaissante et t'en remercie chaleureusement. En plus de m'avoir permis de me développer en tant que chercheur, tu m'as aussi appris à reconnaître mes forces, tu as réussi à me montrer et à me faire accepter mes forces et mes capacités. Tu m'as permis de développer ma confiance en moi. Nous n'avons pas atteint les 100% mais on est bien loin des 0% du début. Je voulais aussi te remercier pour ton honnêteté, ton soutien et tes conseils autant sur ma vie professionnelle et personnelle que tu m'as prodigués tout au long de ces années. Tu as su t'adapter aux changements qui nous sont tombés dessus et je te remercie d'avoir toujours gardé confiance en moi. Merci Chef ! Et promis je remplirai la boîte à mouchoirs avant de partir !

Mon arrivée au laboratoire et mon intégration ont été facilitées grâce à Alexandre Prola et Arnaud Guilbert, mes deux « sous-chef » adorés. C'est grâce à vous deux que je détiens tout ce savoir technique. Merci pour tous vos conseils, votre disponibilité, votre gentillesse et votre enthousiasme. Je n'aurai pas pu y arriver sans votre aide les garçons !

Tout au long de ma thèse j'ai passé beaucoup de temps à l'animalerie. Je souhaite donc remercier l'ensemble du personnel de l'animalerie et plus particulièrement Valérie Domergue et Pauline Robert dont la disponibilité, l'aide et la rigueur ont été une aide précieuse. Merci également à Florence Lefebvre pour les dissociations de cardiomyocytes et nos discussions de « cassée à cassée » qui m'ont permis de toujours voir le bon côté des choses. Un grand merci à mes trois fées : Mélanie Gressette, Audrey Varin et Pascale Gerbaud. Votre aide et vos conseils m'ont été indispensables et vous allez enfin pouvoir souffler les filles. Je remercie également mon réparateur préféré, Patrick Lechène. Je sais que grâce à moi tu n'étais jamais à court de travail et ce fût un plaisir de t'aider à occuper tes journées. J'essayerai de ne rien casser avant de partir mais bon faut bien que je te laisse un petit souvenir quand même. Rendez-vous à mon ordinateur le 31 mai !

Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance de pouvoir participer à l'encadrement de plusieurs étudiants. Cet aspect de mon travail s'est révélé très enrichissant et je tiens pour cela à remercier nos collaboratrices tunisiennes devenues de vraies amies pour moi : Inthidar et Manel. A partir de ma 2^{ème} année de thèse j'ai eu la chance de participer à des enseignements au sein de l'équipe BBCM. Pour cette merveilleuse expérience et vos nombreux conseils, je remercie chaleureusement Najet, Elisabeth, Antoine, Arnaud et Juliette. Je tiens aussi à remercier tous mes amis de l'ADIT pour tous ces bons moments passés

ensemble à préparer les JEDs et en particulier Hélène, Chloé et Rami pour le réconfort et l'espoir que nos discussions m'ont rapportés.

Je tiens à remercier tous les membres de l'U769/U1180 du 2ème, 3ème et 5ème étage. Vous avez été d'un très grand soutien durant ma thèse. Votre bonne humeur, vos attentions, votre gentillesse m'ont permis de supporter les pires moments. Merci Jean-Pierre pour tes blagues et tes conseils. Merci Guillaume pour nos repas pringles/saucisson/coca, pour tes conseils et ton écoute. Malheureusement je dois t'avouer que tu n'es pas aussi méchant que tu le penses. Merci Delphine pour ton aide, ta gentillesse et ton grain de folie. Merci Marion, Robin, Audrey, Antoine pour votre joie de vivre et votre soutien. Et merci à ma Sarah pour l'aide précieuse et pour toutes nos conversations entre folles qu'on a partagées.

Merci à mes amis Lucile Grimbert, Kevin Monceaux et Maxance Ribeiro car sans vous ma thèse aurait été bien différente. Je vous remercie pour tous ces moments passés ensemble, pour nos restaurants, nos bêtises et nos conversations scientifiques ou pas. Grâce à vous je ne travaillerai jamais sur AMPK et EPAC ! Vous avez été d'un soutien incroyable durant ces années, votre bonne humeur, vos conseils, votre humour, vos chansons m'ont permis d'arriver au bout de cette aventure. Aventure que je n'aurais voulu vivre avec personne d'autre. Je vous souhaite le meilleur pour la suite que ce soit professionnellement ou personnellement. Sachez que je ne vous oublierai jamais et que vous n'avez pas intérêt à m'oublier d'ailleurs !!!!!

Enfin, je remercie mes parents, mes grand-parents, ma sœur et mon frère, qui ont toujours cru en moi. Merci pour votre aide, votre soutien et vos encouragements. J'ai beaucoup de chance de vous avoir.

Ma dernière pensée sera pour toi Bou, pour ton amour, ton soutien, ta présence et pour l'immense bonheur que tu m'apportes chaque jour. Tu es ma bouée de sauvetage et sans toi je me serai noyée. Après tout ce qu'on a traversé et tout ce qu'on risque de traverser à nouveau, je veux que tu saches que je n'ai pas peur car je sais que tu seras toujours à mes côtés. Merci.

Liste des publications

1. Prola A, Nichtova Z, **Pires Da Silva J**, Piquereau P, Monceaux K, Guilbert A, Gressette M, Ventura-Clapier R, Garnier A, Zahradnik I, Novotova M and Lemaire C.

ER stress induces cardiac dysfunction through cardiomyocytes architectural modifications and alteration of mitochondrial function

En révision dans Cardiovascular Research

2. Prola A, **Pires Da Silva J**, Guilbert A, Ribeiro M, Lecru L, Piquereau P, Mateo P, Gressette M, Fortin D, Boursier C, Gallerne C, Caillard A, Samuel JL, François H, Sinclair DA, Eid P, Ventura-Clapier R, Garnier A and Lemaire C.

SIRT1 protects the heart from ER stress-induced cell death through eIF2 α deacetylation

Cell death and differentiation (2017) doi:10.1038/cdd.2017.138

3. **Pires Da Silva J**, Monceaux K, Guilbert A, Piquereau J, Gressette M, Novotova M, Ventura-Clapier R, Garnier A and Lemaire C.

SIRT1 protects the heart from ER stress-induced injury by promoting eEF2K/eEF2-dependent mitophagy

En préparation

4. Ben Salem I, Boussabbeh M, **Pires Da Silva J**, Guilbert A, Bacha H, Abid-Essefi S, Lemaire C.

SIRT1 protects cardiac cells against apoptosis induced by zearalenone or its metabolites α - and β -zearalenol through an autophagy-dependent pathway

Toxicology and Applied Pharmacology 314 (2017) 82–90 doi: 10.1016/j.taap.2016.11.012

5. Salah A, Bouaziz C, Prola A, **Pires Da Silva J**, Bacha H, Abid-Essefi S, Lemaire C.

Citrinin induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells through endoplasmic reticulum stress

J Toxicol Environ Health A. (2017) ;80(23-24):1230-1241. doi: 10.1080/15287394.2017

6. Zurlo G, Piquereau J, Moulin M, **Pires Da Silva J**, Gressette M, Ranchoux B, Garnier A, Ventura-Clapier R, Fadel E, Humbert M, Lemaire C, Perros F, Veksler V.

Sirtuin 1 regulates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation: role in pulmonary arterial hypertension

J Hypertens. 2018 Jan 24. doi: 10.1097/HJH.0000000000001676

Table des matières

Remerciements.....	1
Liste des publications.....	5
Liste des abréviations	11
Liste des figures.....	13
Liste des tableaux.....	14
Avant-propos.....	15
Introduction	17
Partie 1 : Généralités sur le cœur.....	19
I . Le cœur.....	19
A . Anatomie et fonction cardiaque.....	19
B . La contraction cardiaque.....	20
II . Les pathologies cardiaques.....	30
A . L'insuffisance cardiaque.....	30
B . Les traitements de l'insuffisance cardiaque.....	32
Partie 2 : Le processus autophagique	35
I . Les différents types d'autophagie	35
II . La machinerie moléculaire de l'autophagie.....	38
A . Induction de l'autophagie	38
B . Elongation de l'autophagosome	41
C . Maturation et fusion autophagosome-lysosome	42
III . L'autophagie dans le cœur	43
Partie 3 : Mort cellulaire et apoptose dans le coeur.....	45
I . Les caspases	45
II . La famille Bcl-2.....	47
III . La voie mitochondriale de l'apoptose.....	48
IV . Interconnexion entre autophagie et apoptose	49
Partie 4 : Le Réticulum Endoplasmique.....	51
I . Réticulum endoplasmique vs réticulum sarcoplasmique.....	51
II . Les fonctions physiologiques du RE	52
A . La synthèse des protéines	52
B . Le repliement des protéines dans le RE.....	55
III . Le stress du réticulum endoplasmique	57
A . La réponse UPR	57
IV . Stress RE, réponse UPR et autophagie	61

A . Branche ATF6 et autophagie	61
B . Branche IRE1 et autophagie	62
C . Branche PERK et autophagie	63
D . Calcium et autophagie	64
V . Stress RE, réponse UPR et apoptose	64
VI . Le stress RE dans les pathologies cardiaques	66
A . Stress RE bénéfique et pathologies cardiaques	68
B . Modulation du stress RE et pathologies cardiaques	69
Ginseng américain	71
Partie 5 : Généralités sur les sirtuines	73
A . Historique.....	73
B . Les différentes isoformes de la famille des sirtuines.....	73
C . Activité de la sirtuine 1	75
II . Régulation de l'expression et de l'activité de la sirtuine 1	75
A . Régulation de l'expression de SIRT1	76
B . Régulation de l'activité de SIRT1	79
III . Les processus biologiques régulés par SIRT1.....	82
A . SIRT1 et le métabolisme énergétique	82
B . SIRT1 et la réponse au stress cellulaire	82
C . SIRT1, autophagie et apoptose.....	82
IV . Rôles de SIRT1 dans le cœur.....	83
Matériel et Méthodes.....	85
I . Matériel	87
A . Lignée cellulaire, cardiomyocytes et animaux	87
II . Méthodes d'études cellulaires	87
A . Culture et transfection cellulaire	87
B . Cytométrie en flux	89
C . Microscopie	90
D . Dosage colorimétrique de protéines.....	90
E . Gel SDS-PAGE et immunodétection par Western Blot.....	91
F . Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative.....	93
G . Immunoprécipitation	95
H . Spectrométrie de masse	96
III . Modèle d'étude in vivo : les souris invalidées pour SIRT1	97
A . Description des souris.....	97
B . Génotypage des souris invalidées pour SIRT1.....	97
C . Traitement des souris invalidées pour SIRT1.....	98

D . Etude de la fonction cardiaque par échocardiographie.....	98
E . Mesure de l'apoptose des cardiomyocytes par la méthode TUNEL.....	98
F . Mesure des capacités oxydatives des mitochondries	99
G . Analyse du calcium mitochondrial <i>in situ</i>	101
H . Microscopie électronique à transmission.....	102
I . Préparation de mitochondries isolées	103
J . Mesure des activités enzymatiques mitochondriales et cytoplasmiques	103
K . Western Blot	105
IV. Etudes statistiques.....	106
Résultats.....	107
Article 1.....	109
Article 2.....	113
Article 3.....	117
Article 4.....	121
Discussion	125
I . Stress RE, architecture du cardiomyocyte et énergétique mitochondriale	128
II . Rôle de la sirtuine 1 dans la régulation de l'apoptose induite par le stress RE130	
III . Rôle de la sirtuine 1 dans la régulation de l'autophagie/mitophagie induite par le	
stress RE.....	132
Perspectives	137
Bibliographie	141
Annexes.....	179
Article 5.....	181
Article 6.....	183

Liste des abréviations

AMBRA1	Activating Molecule in 1 Regulating Autophagy
ATF6	Activating Transcription Factor 6
ATG	Autophagy related genes
Bcl-2	B cell lymphoma-2
BH	Bcl-2 Homology
CHOP/GADD153	C/EBP Homologous Protein/Growth Arrest and DNA Damage inducible 153
Drp1	Dynamin related protein 1
eIF2 α	eukaryotic initiation Factor 2 α
eEF2	eukaryotic Elongation Factor 2
eEF2K	eukaryotic Elongation Factor 2 kinase
ERAD	ER-Associated Degradation
ERSE	ER Stress Response Element
BiP/Grp78	Glucose Related Protein 78/Binding immunoglobulin Protein
IRE1	Inositol-Requiring Enzyme 1
ISO	Isoproterenol
JNK	c-Jun N-terminal protein Kinase
LAMP-2A	Lysosome-Associated Membrane Protein type 2A
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
MAM	Mitochondria Associated Membranes
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NAM	Nicotinamide
NR	Nicotinamide Riboside
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PE	Phosphatidyléthanolamine

PERK	PKR-like ER protein Kinase
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
PTP	Pore de Transition de Permabilité
RE	Réticulum Endoplasmique
RS	Réticulum Sarcoplasmique
SERCA	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ ATPase
Sir2	Silent information regulator 2
SQSTM1	Sequestosome 1
TG	Thapsigargine
TN	Tunicamycine
TRAF2	TNF Receptor-Associated Factor 2
UPR	Unfolded Protein Response
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
XBP1	X-box Binding Protein 1

Liste des figures

Figure 1 : Schématisation de la circulation sanguine.....	20
Figure 2 : Mécanisme du couplage excitation-contraction.....	22
Figure 3 : Ultrastructure du sarcomère et des myofilaments.....	23
Figure 4 : Les différentes étapes du raccourcissement des sarcomères	24
Figure 5 : Représentation schématique d'une mitochondrie	25
Figure 6 : Dynamique mitochondriale : mécanismes de fusion et de fission (d'après (Chiong et al., 2011)).....	27
Figure 7 : Représentation schématique de la biogenèse mitochondriale (d'après (Zamora and Villena, 2014)).....	29
Figure 8 : Les différents types d'autophagie	36
Figure 9 : Régulation de la mitophagie (Kubli and Gustafsson, 2012)	38
Figure 10 : Mécanisme moléculaire de l'autophagie.....	40
Figure 11 : Structure des caspases impliquées dans l'apoptose	46
Figure 12 : Classification des membres de la famille Bcl-2.....	47
Figure 13 : Les deux voies principales d'activation de l'apoptose.....	49
Figure 14 : Colocalisation partielle du réticulum endoplasmique et sarcoplasmique (d'après (Kaisto and Metsikkö, 2003)	51
Figure 15 : Initiation de la traduction	53
Figure 16 : Elongation de la chaîne polypeptidique	54
Figure 17 : Terminaison de la traduction : hydrolyse de la liaison ARNt-acide aminé.....	55
Figure 18 : Repliement des protéines naissantes dans le RE : fixation des chaperonnes	56
Figure 19 : Activation de la voie UPR en réponse au stress RE (Vanacker et al., 2017)	58
Figure 20 : Régulation de l'autophagie en réponse au stress RE (Song et al., 2017a)	62
Figure 21 : Rôle de la voie de signalisation PERK/eIF2 α /ATF4 dans l'activation transcriptionnelle des gènes autophagiques en réponse au stress RE. Adapté d'après (B'chir et al., 2013).	63
Figure 22 : Stress RE, réponse UPR et apoptose	66
Figure 23 : Représentation schématique d'une réaction de désacétylation catalysée par SIRT1.....	75
Figure 24 : Régulation de SIRT1 par les miRs (Yamakuchi, 2012).....	78

Figure 25 : Représentation schématique de la régulation de l'activité de SIRT1 par la disponibilité en NAD⁺79

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composés naturels induisant une autophagie cardioprotectrice. Adapté d'après (Wang et al., 2016b)	44
Tableau 2 : Molécules dont les effets cardioprotecteurs sont liés à une diminution du stress RE.....	71
Tableau 3 : Localisations, activités enzymatiques, principales cibles et fonctions des différentes sirtuines	74
Tableau 4 : Protéines modulant positivement ou négativement la transcription de SIRT1	77
Tableau 5 : Liste des kinases phosphorylant et régulant l'activité enzymatique de SIRT1	80
Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés.....	93
Tableau 7 : Séquence des amorces PCR utilisées.....	94
Tableau 8 : Liste des molécules activatrices de SIRT1 dont l'effet cardioprotecteur en réponse au stress RE sera testé.	140

Avant-propos

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 17,5 millions de décès dus aux maladies cardiovasculaires ont été enregistrés en 2012, soit 31% de la mortalité mondiale totale, faisant des maladies cardiovasculaires la première cause de mortalité dans le monde. A ce jour, malgré les moyens thérapeutiques mis en place, la mortalité liée aux pathologies cardiaques reste importante et les coûts socio-économiques élevés. De nombreuses études sont donc menées avec pour objectif de mieux comprendre le développement des pathologies cardiaques et d'identifier de nouvelles voies de signalisations associées. Le développement de médicaments cardioprotecteurs efficaces représente donc un domaine majeur d'investigation. Récemment, plusieurs équipes ont montré qu'un stress du réticulum endoplasmique (stress RE) contribue au développement de la majorité des pathologies cardiaques incluant l'infarctus, l'insuffisance cardiaque, la cardiomyopathie dilatée et la cardiotoxicité (Groenendyk et al., 2013; Hong et al., 2017; Minamino and Kitakaze, 2010). L'étude du stress RE apparaît donc depuis quelques années comme une thématique de recherche prometteuse dans le domaine cardiovasculaire afin d'identifier de nouvelles voies de régulation permettant de limiter le développement des pathologies cardiaques.

Le stress RE regroupe l'ensemble des perturbations empêchant un fonctionnement correct du RE. En réponse au stress RE, un mécanisme compensatoire adaptatif appelé UPR pour Unfolded Protein Response est activé afin de restaurer l'homéostasie du RE et de permettre la survie de la cellule. Dans le cas d'un stress RE sévère ou prolongé, les altérations ne pouvant plus être compensées, la cellule est éliminée par activation de la voie mitochondriale de l'apoptose, ce qui contribue au développement des pathologies. Alors que le stress RE est associé depuis plus de 20 ans aux pathologies telles que le diabète, l'obésité ou les maladies neurodégénératives (Xu et al., 2005), son étude dans le domaine des maladies cardiovasculaires est relativement récente, les premiers travaux ayant été publiés en 2004 (Okada et al., 2004). Depuis, différentes études ont montré que le stress RE sévère ou chronique et l'hyperactivation de la réponse UPR associée contribuent au développement de la majorité des pathologies cardiaques (Minamino and Kitakaze, 2010). Le but des recherches actuelles sur le stress RE en physiopathologie cardiaque n'est pas d'inhiber la réponse au stress RE mais plutôt de la moduler de manière à conserver les réponses adaptatives bénéfiques initiales tout en limitant l'apoptose délétère. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes de la réponse UPR et d'identifier de nouveaux acteurs de la régulation du stress RE dans le cardiomyocyte.

L'objectif de mon projet de recherche était de déterminer les effets du stress RE sur les cardiomyocytes et d'étudier les mécanismes de régulation par la désacétylase sirtuine 1

(SIRT1) de la réponse au stress RE dans le cœur. Les sirtuines constituent une famille de protéines qui comporte sept isoformes (SIRT1-7) chez les mammifères (Haigis and Sinclair, 2010; Michan and Sinclair, 2007). Le membre fondateur de cette famille, SIRT1 est une désacétylase de type III (activité dépendante du NAD⁺), localisée dans le noyau et le cytoplasme et connue pour ses propriétés cardioprotectrices contre le stress oxydatif, l'hypertrophie, le vieillissement et l'ischémie (Alcendor et al., 2007).

Dans ce contexte, mon projet de recherche visait à comprendre :

- les modifications architecturales et métaboliques associées au stress RE dans le cœur, afin de mieux comprendre le rôle du stress RE dans le développement des pathologies cardiaques.
- le rôle de SIRT1 dans la régulation de l'autophagie et de l'apoptose induite en réponse au stress RE délétère dans les cardiomyocytes.

Introduction

Partie 1 : Généralités sur le cœur

I. Le cœur

A. Anatomie et fonction cardiaque

Le cœur est un muscle strié creux appelé myocarde, qui est entouré du péricarde et tapissé à l'intérieur par une fine membrane, l'endocarde. Le cœur comprend quatre cavités: deux cavités droites, formées par l'oreillette et le ventricule droit et deux cavités gauches, formées par l'oreillette et le ventricule gauche. La principale fonction du cœur est d'assurer la circulation sanguine dans le système vasculaire. La circulation se fait à sens unique grâce à quatre valves. Deux d'entre elles siègent entre les oreillettes et les ventricules (les valves mitrales pour le cœur gauche et tricuspide pour le cœur droit), les deux autres valves appelées valves sigmoïdes sont situées entre les ventricules et l'artère correspondante (valve aortique et valve pulmonaire). Cette organisation permet la circulation du sang des oreillettes vers les ventricules puis des ventricules vers les artères. Les cavités droite et gauche du cœur sont séparées par le septum inter-ventriculaire. Ces cavités sont impliquées dans deux circulations différentes et complémentaires (figure 1) :

- La circulation systémique (ou grande circulation) qui comprend la partie gauche du cœur (ventricule et oreillette) ainsi que l'aorte et qui distribue oxygène et nutriments à tout l'organisme.

- La circulation pulmonaire (ou petite circulation) qui comprend la partie droite du cœur (ventricule et oreillette), les poumons, les artères ainsi que les veines pulmonaires et va recharger le sang en oxygène.

La fonction cardiaque consiste donc à assurer un approvisionnement constant en sang oxygéné et en nutriments à l'ensemble de l'organisme, et à permettre l'élimination du CO₂ et des déchets après utilisation au niveau systémique. Afin d'assurer sa fonction le cœur subit un phénomène appelé révolution cardiaque qui correspond à des variations de pression et de volume sanguin à l'intérieur du cœur. La révolution cardiaque se découpe en deux étapes : la diastole et la systole. La diastole permet le remplissage des cavités cardiaques et la systole permet l'éjection du sang vers la circulation. Au cours de la diastole, la pression dans les ventricules, vides de sang, s'abaisse pour devenir inférieure à celle des oreillettes permettant l'ouverture des valves auriculo-ventriculaires et le remplissage des ventricules. Au cours de la systole, les valves auriculo-ventriculaires se ferment et les valves sigmoïdes s'ouvrent permettant l'éjection du sang vers l'appareil circulatoire.

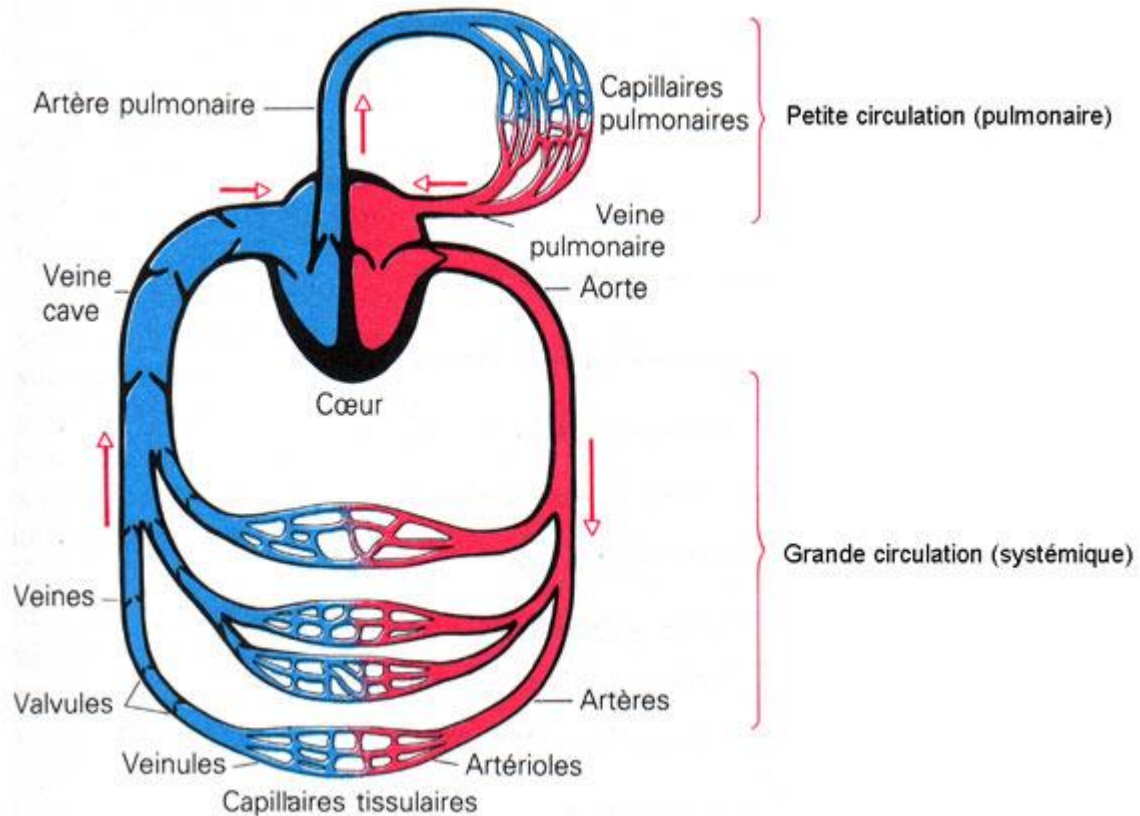


Figure 1 : Schématisation de la circulation sanguine

Le cœur est divisé en deux parties : le cœur gauche impliqué dans la circulation systémique et le cœur droit impliqué dans la circulation pulmonaire (Arms and Camp, 1989).

B. La contraction cardiaque

Chez l'Homme, le tissu cardiaque est composé de 72% de fibroblastes, de cellules nerveuses et vasculaires, et de 28% de cardiomyocytes. Ces cellules musculaires particulières et très spécialisées représentent 80% du volume cardiaque (Vliegen et al., 1991). Par leur activité mécanique, elles permettent la contraction du coeur.

1. Le cardiomyocyte

Le cardiomyocyte est une cellule musculaire striée qui présente des caractéristiques très particulières et qui se différencie des cellules musculaires squelettiques en de nombreux points. La cellule musculaire cardiaque de base est une cellule cylindrique d'environ 15 μm de diamètre et 60 μm de longueur (Braunwald, 1971) présentant des ramifications et contenant généralement, dans sa partie centrale, un seul noyau qui est légèrement allongé. Cependant, chez les rongeurs, il est fréquent de rencontrer des cardiomyocytes binucléés (Leu et al., 2001). Les différentes cellules musculaires constituant le myocarde sont reliées entre-elles en série au niveau de disques intercalaires (Forbes and Sperelakis, 1985), visibles en microscopie électronique sous forme de barreaux d'échelles, et communiquent les unes avec

les autres par l'intermédiaire de jonctions communicantes (Alcoléa et al., 1999; Delorme et al., 1997). Cette organisation spécifique permet ainsi une synchronisation de l'ensemble des cellules qui agit alors comme un syncytium fonctionnel. Les cardiomyocytes présentent également de très nombreuses invaginations de leur membrane plasmique, le sarcolemme, appelées tubules T qui jouent un rôle important dans le déclenchement de la contraction. Enfin, le réseau mitochondrial, situé à proximité des protéines contractiles, est très développé et représente environ 30% du volume d'un cardiomyocyte (Schaper et al., 1985).

2. La contraction du cardiomyocyte

a. Déclenchement de la contraction du cardiomyocyte

La contraction du cardiomyocyte est engendrée par des inversions transitoires de la polarisation membranaire. Ces phénomènes électrophysiologiques prennent leur origine au niveau du nœud sinusal, centre de l'automatisme cardiaque (Chen et al., 2010). Le nœud sinusal ou sino-auriculaire, situé dans l'oreillette droite à la jonction du crista terminalis auriculaire et du tissu veineux, est responsable de l'émission périodique de potentiels d'action. Ces potentiels d'action spontanés sont ensuite véhiculés tout le long du tissu nodal et se propagent à l'ensemble des cardiomyocytes du cœur. Au niveau des cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires, la propagation du signal électrique depuis le nœud sinusal conduit à un influx sodique qui entraîne une dépolarisation importante et rapide de la membrane cellulaire. Cette dépolarisation membranaire induit l'ouverture des canaux calciques de type L (appelés DHPR pour récepteurs à la Dihydropyridine) qui permet alors l'entrée d'ions calciques dans le cytosol. La fixation de ce calcium sur les récepteurs à la ryanodine (RyR) du réticulum sarcoplasmique (RS), qui constitue la réserve de calcium des cellules cardiaques, conduit à la libération rapide et massive de calcium contenu dans ce dernier (figure 2). Ce phénomène appelé «Calcium-induced, calcium release» (CICR) permet d'augmenter de façon importante la concentration intracellulaire de calcium qui est à l'origine de la mise en action de la machinerie contractile du cardiomyocyte (Bers, 2002). Il est à noter que la structure très particulière de la cellule musculaire cardiaque est la base de l'efficacité du CICR. Le sarcolemme du cardiomyocyte regorge de tubules T qui conduisent la dépolarisation en profondeur. L'activation des RyR par le flux calcique transarcolemmal (via DHPR) s'effectue au niveau de domaines jonctionnels spécialisés des tubules T et du RS appelés diades.

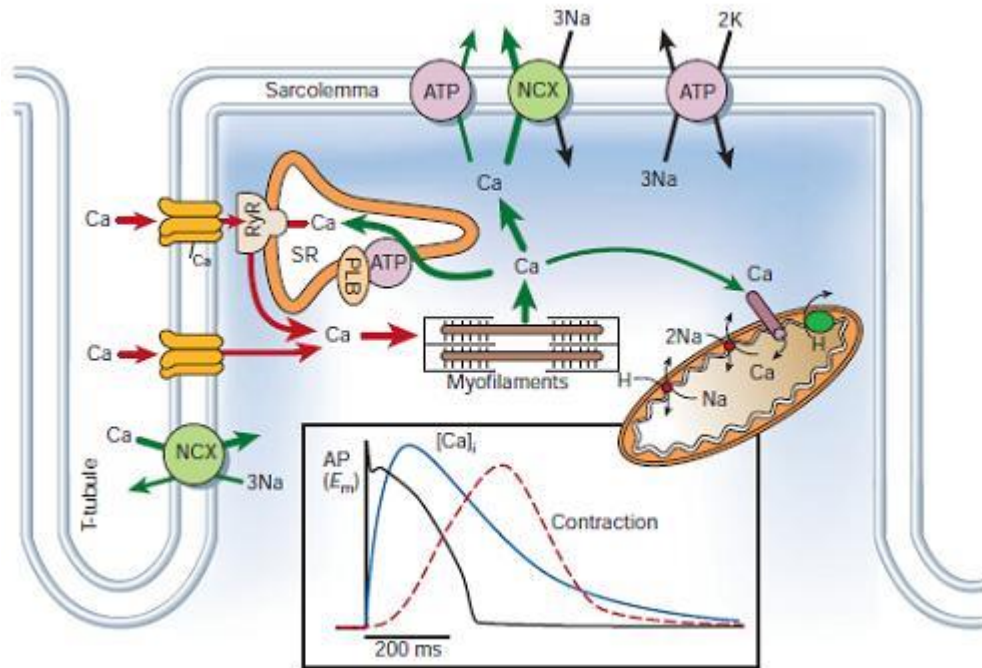


Figure 2 : Mécanisme du couplage excitation-contraction

La propagation du potentiel d'action depuis le nœud sinusal induit un influx sodique qui dépolarise la membrane plasmique. Cette dépolarisation conduit à l'ouverture des canaux calciques de type L (DHPR) qui stimule les récepteurs à la ryanodine (RyR) permettant une importante libération de calcium dans le cytosol et la mise en action de la machinerie contractile. L'ensemble des acteurs permettant la diminution de la concentration intracellulaire de calcium assurent enfin la relaxation (Bers, 2002).

b. Les sarcomères

La fonction contractile de la cellule musculaire cardiaque est assurée par un large panel de protéines qui représente 60% du volume cellulaire. Ce panel se compose de nombreuses myofibrilles, structures tubulaires allongées d'un diamètre de 1 à 2 μm , constituées de myofilaments. La base de l'organisation des myofibrilles est le sarcomère (figure 3). Le sarcomère est composé de myofilaments fins constitués d'actine associés à de la tropomyosine et de la troponine et de myofilaments épais constitués de myosine et de diverses protéines liées à la myosine. Chaque molécule de myosine est composée d'une chaîne lourde (MHC pour Myosin Heavy Chain), constituée d'une queue C-terminale et d'une tête globulaire N-terminale reliées par un domaine cervical déformable, et de deux chaînes légères (MLC pour Myosin Light Chain) combinées à la tête globulaire. Les têtes globulaires possèdent un site de fixation aux myofilaments fins et sont pourvues d'une activité ATPasique, l'hydrolyse de l'ATP entraînant un mouvement de la tête de myosine. Le raccourcissement du sarcomère, et par conséquent du cardiomyocyte, est caractérisé par le glissement des myofilaments épais par rapport aux myofilaments fins au sein de l'unité contractile (Huxley, 1957).

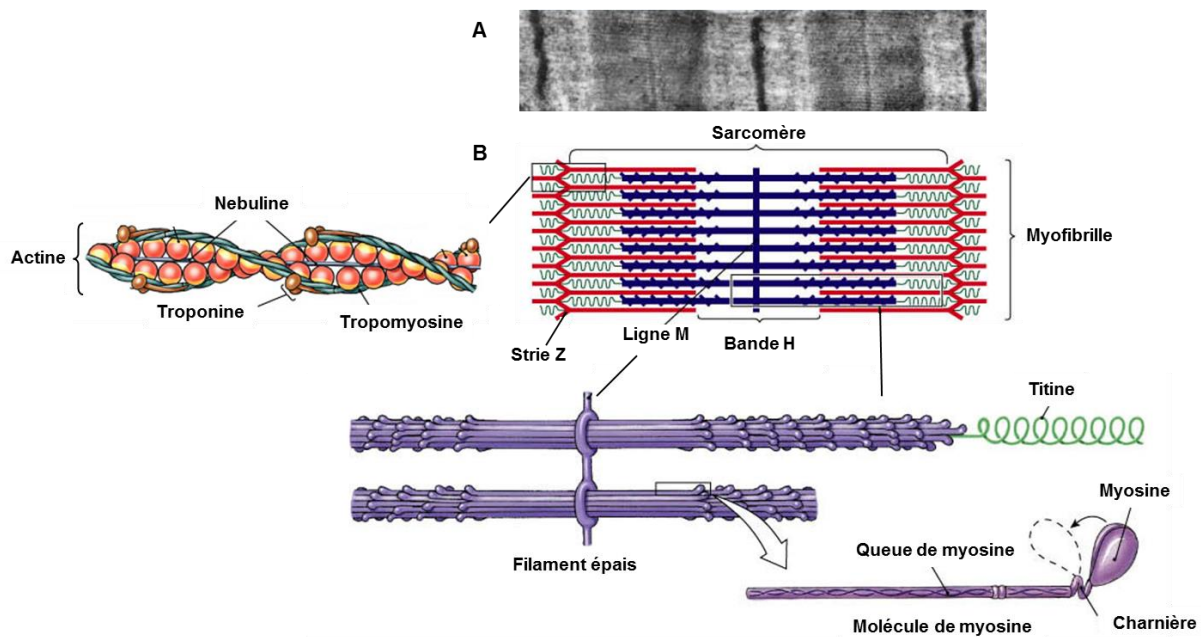


Figure 3 : Ultrastructure du sarcomère et des myofilaments

(A) Ultrastructure d'un sarcomère vue en microscopie électronique (<http://planet-vie.ens.fr>) (B) Représentation schématique de la composition des sarcomères. Adapté d'après Modesto Junior College (<http://droualb.faculty.mjc.edu>).

c. Le couplage excitation-contraction

Le glissement des myofilaments les uns par rapport aux autres nécessite l'attachement des têtes globulaires de myosine à l'actine (Mannherz and Goody, 1976). Le calcium relargué par le RS lors du phénomène de CICR va lier la troponine C et inhiber la troponine I induisant un changement de conformation du complexe troponine-tropomyosine permettant l'exposition du site de fixation de l'actine avec la myosine. Ce changement de conformation est permis par l'hydrolyse de l'ATP en ADP au niveau de la tête de myosine conduisant à sa fixation sur l'actine (figure 4). L'interaction entre la tête de myosine et l'actine provoque le glissement du filament d'actine et par conséquent le raccourcissement des sarcomères, synonyme de contraction cardiaque (systole). La phase de contraction est très brève et est immédiatement suivie d'une phase de relaxation (diastole) qui est la conséquence directe de la diminution de la concentration de calcium cytosolique. La transformation de l'énergie chimique (ATP) en énergie mécanique, constitue la principale source de consommation énergétique du cardiomyocyte. En effet, la fonction myocardique nécessite environ 1 mM d'ATP par seconde dans les conditions normales de contraction. Par conséquent, l'équipement de synthèse d'ATP du cardiomyocyte doit être important car la cellule musculaire cardiaque ne dispose que de très faibles concentration stock en ATP (8 mM d'ATP (Sztark et al., 1999)). La synthèse

énergétique pour maintenir une concentration suffisante d'ATP est donc très importante afin de garantir une contraction efficace du muscle myocardique.

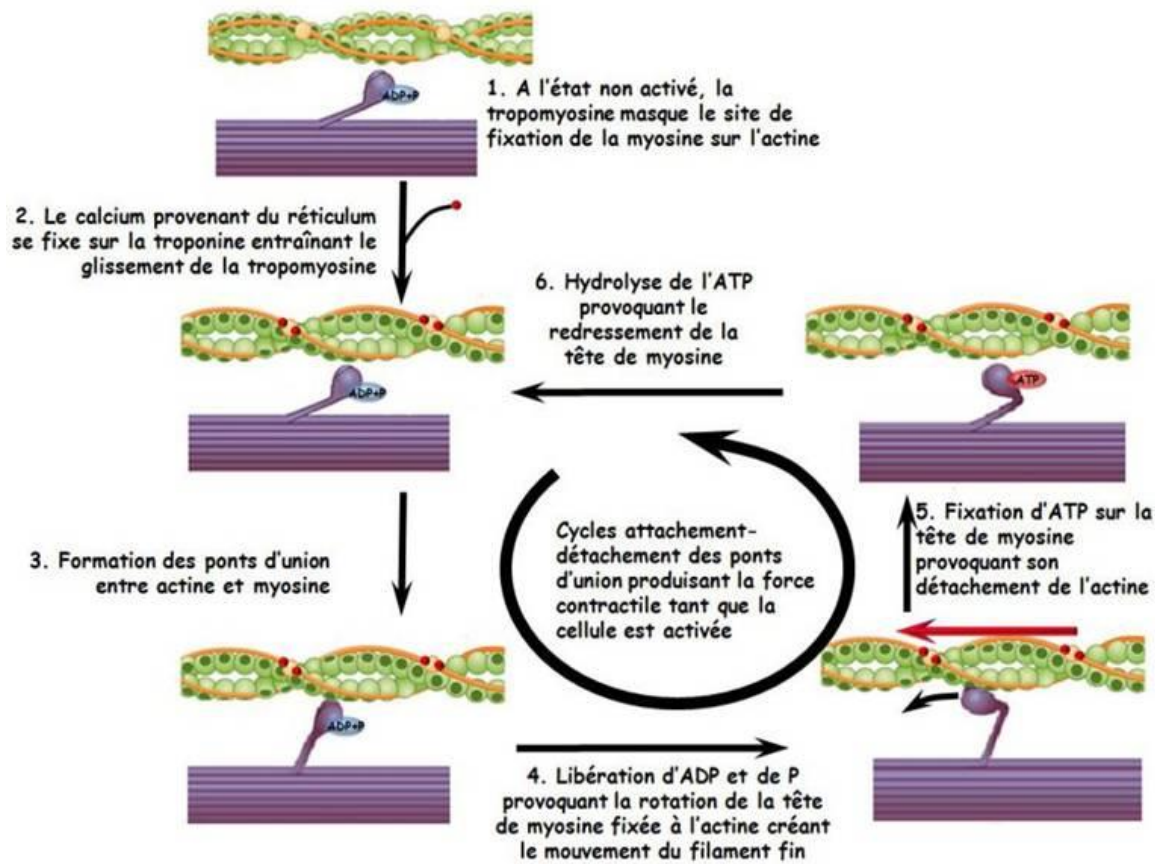


Figure 4 : Les différentes étapes du raccourcissement des sarcomères

<http://ressources.unisciel.fr>

La pompe cardiaque est qualifiée d'organe hautement oxydatif. Sa production d'énergie dépend, en effet pour l'essentiel (95%), du métabolisme oxydatif. C'est-à-dire que la production énergétique est couplée à la consommation d'oxygène, ce qui rend l'activité cardiaque très dépendante de l'apport en oxygène. C'est pourquoi le cœur est responsable de 11% de la consommation totale d'oxygène de l'organisme quand il ne représente que 0,4% de la masse corporelle (Ventura-Clapier et al., 2011). Bien qu'il y ait une production d'ATP dans le cytosol, notamment lors de la glycolyse anaérobie permettant la transformation du glucose en pyruvate (2 molécules d'ATP produites pour une molécule de glucose consommée), l'essentiel de la production énergétique a lieu dans la mitochondrie (36 molécules d'ATP produites pour une molécule de glucose consommée).

3. La mitochondrie

a. Origine et structure des mitochondries

Selon la théorie de l'endosymbiose établie par Lynn Margulis en 1960, les mitochondries proviendraient de cellules eucaryotes qui auraient intégré un endosymbiote procaryote apparenté aux alpha-protéobactéries (Gray et al., 2001). La mitochondrie possède son propre matériel génétique codant un ensemble limité d'ARN et de protéines essentiels pour sa formation et son fonctionnement. En effet, l'ADN mitochondrial contrôle la synthèse de 37 protéines dont 13 protéines impliquées dans les complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire, 22 ARN de transfert (ARNt) et 2 ARN ribosomiaux (ARNr) nécessaires pour la traduction de ces entités (Scarpulla, 2006). Pour autant, la mitochondrie n'est pas autonome ; la biogénèse mitochondriale ainsi que le maintien de la structure de l'organite nécessitent l'intervention du génome nucléaire qui porte l'information de très nombreuses protéines mitochondriales (>1000). Ces protéines codées par le noyau sont importées dans la mitochondrie par des complexes de translocation situés dans la membrane externe (TOM, Translocase of Outer Membrane) et la membrane interne (TIM, Translocase of Inner Membrane) (Schatz, 1996). Dans le cardiomyocyte de mammifère mature, les mitochondries occupent environ 30% du volume cellulaire où elles se répartissent autour du noyau, entre les myofilaments et au niveau subsarcolemmal (Barth et al., 1992; Schaper et al., 1985). Structuellement, les mitochondries sont des organites filiformes, elliptiques, d'une taille de l'ordre du micromètre pouvant aller de 1 à 10 μm de long et de 0.5 à 1 μm de large. Elles sont composées d'une membrane externe et d'une membrane interne, délimitant deux compartiments, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale (figure 5).

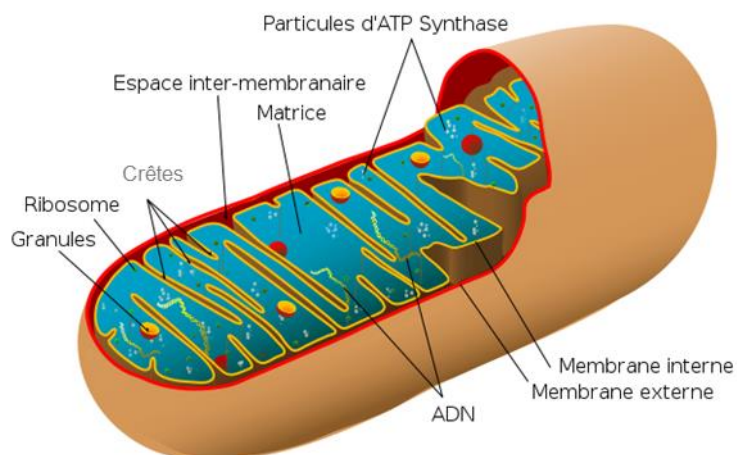


Figure 5 : Représentation schématique d'une mitochondrie

La membrane interne possède une surface bien plus importante que la membrane externe créant des replis membranaires appelés crêtes. Les complexes de la chaîne respiratoire vont être retrouvés au niveau de ces crêtes. Dans certaines régions, les deux membranes ne sont pas complètement dissociées, ce qui permet la mise en place de structures telles que les complexes TIM/TOM ou CPTI/CPTII (Carnitine palmitoyltransferase I/II). Elles sont également le lieu de formation du pore de transition de perméabilité (PTP), un complexe multi-protéique dont l'ouverture prolongée induit le gonflement puis la rupture de la membrane externe mitochondriale. Cette rupture entraîne la libération dans le cytoplasme de facteurs pro-apoptotiques tels qu'AIF (Apoptosis Inducing Factor) et du cytochrome c déclenchant l'apoptose mitochondriale (Javadov and Karmazyn, 2007). Au cours de la vie de l'organite, la morphologie mitochondriale change fréquemment sous l'action de deux événements opposés : la fusion et la fission, constituant collectivement la dynamique mitochondriale. La présence de plusieurs mitochondries isolées ou d'un réseau réticulaire de mitochondries fusionnées est dépendante des conditions physiologiques de la cellule (Westermann, 2010).

b. La dynamique mitochondriale

Les effets antagonistes des mécanismes de fusion et de fission entraînent une dynamique dans le comportement des mitochondries permettant à la cellule de répondre à différentes conditions physiologiques ou pathologiques. Une balance en faveur de la fusion favorise la génération de mitochondries interconnectées, tandis qu'une balance en faveur de la fission produira de nombreux fragments mitochondriaux. Les grands réseaux mitochondriaux générés par la fusion sont bénéfiques dans les cellules métaboliquement actives permettant la propagation de l'énergie. En revanche, dans les cellules quiescentes, les mitochondries sont souvent présentes sous forme de nombreuses petites sphères morphologiquement et fonctionnellement distinctes (Westermann, 2010). Les principales protéines impliquées dans la fusion/fission mitochondriale sont des enzymes mécano-chimiques de remodelage membranaire, qui appartiennent à la grande famille des GTPases appelée dynamines (figure 6). Parmi les dynamines mitochondriales on trouve DRP1 (dynamamin-related/-like protein 1), les mitofusines (MFNs) et OPA1 (optic atrophy 1). DRP1 régule la fission mitochondriale alors que les MFNs et OPA1 régulent respectivement la fusion de la membrane externe et interne des mitochondries (Lee and Yoon, 2016). La protéine DRP1 est recrutée au niveau des sites de scission sur des protéines telles que Fis-1 ou mff (mitochondrial fission factor) ; elle forme alors un anneau autour de la mitochondrie exerçant une constriction de la membrane jusqu'à la fission de la mitochondrie (Yoon et al., 2001). La mitofusine présente deux isoformes MFN1 et MFN2. Les mitofusines d'une mitochondrie se dimérisent avec les mitofusines d'une autre mitochondrie provoquant alors le rapprochement

des deux membranes externes (Chan, 2006). Les deux isoformes sont partiellement redondantes dans leur fonction au niveau de la fusion mitochondriale (Chen and Chan, 2005). Cependant, la MFN2 a été impliquée dans d'autres fonctions physiologiques telles que la régulation de la mitophagie ou l'interaction réticulum endoplasmique-mitochondrie (Vásquez-Trincado et al., 2016). OPA1 régule la fusion de la membrane interne de manière similaire aux mitofusines permettant le rapprochement des membranes internes. OPA1 a aussi été impliquée dans d'autres mécanismes tels que le fonctionnement du PTP (Piquereau et al., 2012) ou la mitophagie (Liao et al., 2017).

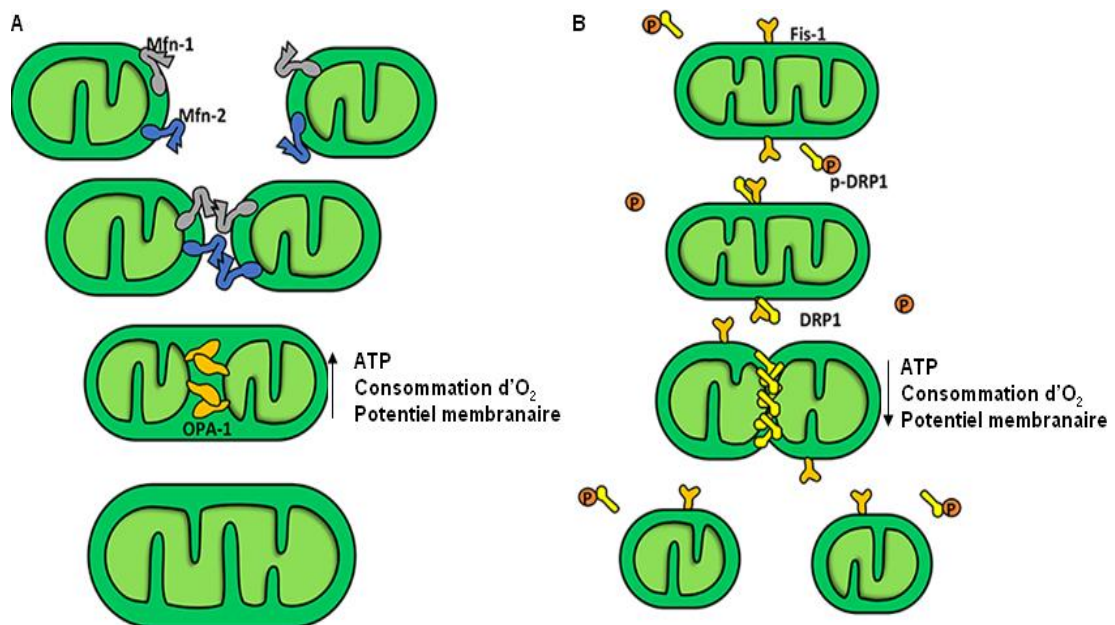


Figure 6 : Dynamique mitochondriale : mécanismes de fusion et de fission (d'après (Chiong et al., 2011))

(A) La dimérisation des mitofusines de deux mitochondries distinctes induit un rapprochement des deux membranes externes et la dimérisation des OPA1 induit un rapprochement des deux membranes internes conduisant à leur fusion. **(B)** La fission mitochondriale est régie par les molécules DRP1 et Fis1 (ou mff) conduisant à la formation d'un anneau qui sépare la mitochondrie mère en deux mitochondries filles.

La dynamique mitochondriale serait également impliquée dans l'induction de l'apoptose (Suen et al., 2008; Westermann, 2010), les phénomènes de prolifération des cellules de muscle lisse vasculaire (Marsboom et al., 2012), et de biogénèse mitochondriale (Ventura-Clapier et al., 2008). Il est à noter que dans les cardiomyocytes adultes les événements de fusion/fission semblent être plus lents que ceux des cardiomyocytes néonataux (Piquereau et al., 2013).

c. La biogénèse mitochondriale

La biogénèse mitochondriale peut être définie comme la croissance et la division de mitochondries préexistantes. Une biogénèse mitochondriale correcte repose sur la coordination spatio-temporelle de la synthèse et de l'importation d'environ 1000 protéines codées par le génome nucléaire. La réplication de l'ADN mitochondrial et les mécanismes de fusion/fission mitochondriaux doivent également être coordonnés. La biogénèse mitochondriale qui est déclenchée en réponse à un stress environnemental tel que l'effort physique, le stress oxydatif ou la restriction calorique (Jornayvaz and Shulman, 2010), s'accompagne d'une variation de la taille, du nombre et de la masse des mitochondries.

La transcription de l'ADN mitochondrial est régulée par des facteurs nucléaires tels que NRF1, NRF2 (Nuclear respiratory factor) et NFE2L2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) qui jouent un rôle clé dans la biogénèse mitochondriale (figure 7). Ces facteurs vont se lier à des promoteurs du génome nucléaire et ainsi activer la transcription de gènes codant des protéines impliquées dans la chaîne respiratoire (COX4, cytochrome c), la machinerie d'importation des protéines (TOMM34) et la transcription de l'ADN mitochondrial (Tfam) (Ploumi et al., 2016). Cependant, ces facteurs nucléaires ne semblent pas réguler l'expression de tous les gènes de la biogénèse mitochondriale. En effet, l'expression des protéines impliquées dans le transport des acides gras ou celle des enzymes d'oxydation est régulée par PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha PPAR α) (Finck and Kelly, 2007). ERR α (estrogen-related receptor α), qui contrôle entre autres l'expression de translocases permettant la translocation des protéines codées par le génome nucléaire à travers la membrane interne mitochondriale, est aussi associé à l'induction de la biogénèse mitochondriale (Mootha et al., 2004; Scarpulla et al., 2012).

La majorité des facteurs de transcription contrôlant la biogénèse mitochondriale est activée par interaction avec les co-activateurs transcriptionnels PGC-1 α et PGC-1 β (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha et bêta). L'expression de PGC-1 α est augmentée dans des situations physiologiques où la biogénèse mitochondriale est activée comme lors d'un exercice physique, une restriction calorique ou une exposition au froid (Meirhaeghe et al., 2003). A l'inverse, dans une situation pathologique, telle que l'insuffisance cardiaque, l'expression de PGC-1 α est diminuée parallèlement à une altération de la biogénèse mitochondriale et de la fonction mitochondriale (Ventura-Clapier et al., 2008). L'activité de PGC-1 α est régulée de manière post-traductionnelle par phosphorylation (notamment par l'AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) (Jäger et al., 2007), méthylation (par PRMT1 (Teyssier et al., 2005)), ubiquitinylation (par Necdin (Hasegawa et al., 2016) ou désacétylation (par SIRT1 (Rodgers et al., 2005)).

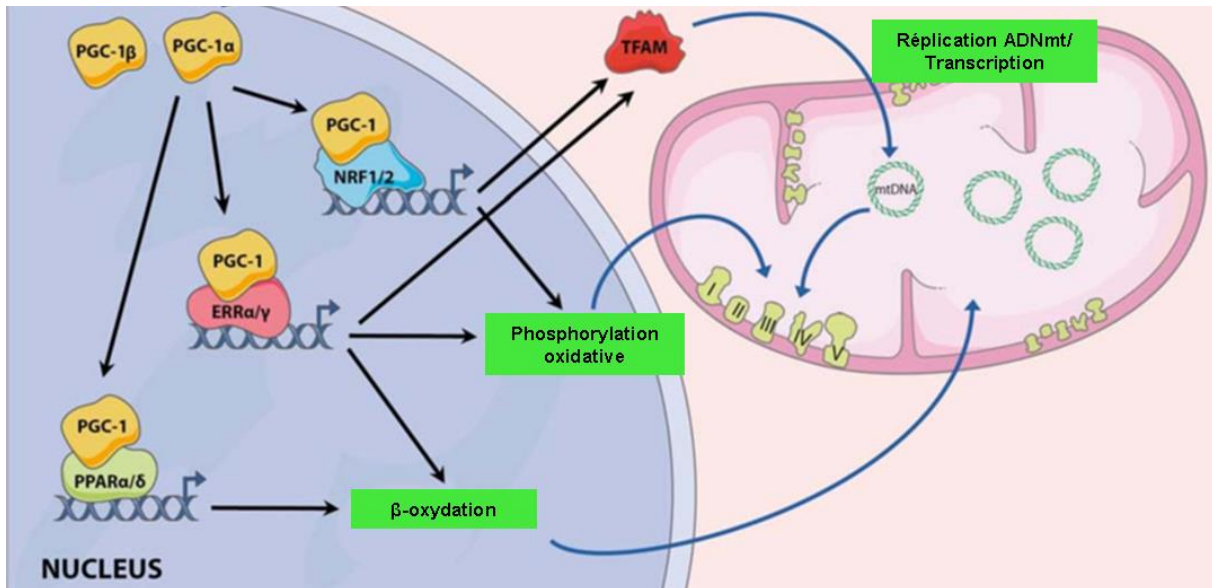


Figure 7 : Représentation schématique de la biogenèse mitochondriale (d'après (Zamora and Villena, 2014))

PGC-1α active NRFs et ERRα permettant la transcription des gènes nucléaires codant les protéines mitochondriales telles que des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire et le facteur de transcription mitochondrial Tfam. Ce dernier est importé dans la mitochondrie pour permettre la transcription et la réplication du génome mitochondrial.

d. Les différentes fonctions de la mitochondrie

Les fonctions de la mitochondrie sont multiples mais cet organe est principalement impliqué dans la synthèse d'énergie (ATP et phosphocréatine) (pour revue (Neubauer, 2007)). Les mitochondries utilisent majoritairement deux sources de substrats : les hydrates de carbone et les acides gras. Les hydrates de carbone (glucose, glycogène ou lactate) sont transformés, dans le cytosol, en pyruvate par la glycolyse anaérobie. Celui-ci est importé dans la mitochondrie, décarboxylé par le complexe pyruvate-déshydrogénase donnant de l'acétyl-CoA. Les acides gras cytosoliques, pour leur part, dérivent soit des acides gras circulants, soit des triglycérides. Les acides gras sont dans un premier temps transformés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase dans le cytoplasme puis importés dans la mitochondrie où ils vont être dégradés lors de plusieurs cycles successifs de β-oxydation en acétyl-CoA. L'acétyl-CoA est la molécule de convergence des deux voies métaboliques et va être dégradé par une série de réactions appelée cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques. La dégradation de l'acétyl-CoA est associée à la production de quatre équivalents réduits (3 NADH et 1 FADH₂) qui vont être oxydés par la chaîne respiratoire (par le complexe I ou NADH-déshydrogénase pour le NADH et par le complexe II ou succinate-ubiquinone oxydoréductase pour le FADH₂).

La chaîne respiratoire est la voie finale d'oxydation des substrats énergétiques. En effet, l'oxydation des équivalents réduits va permettre le transfert d'électrons au sein des différents complexes de la chaîne respiratoire, de l'ubiquinone et du cytochrome c ainsi que

l'accumulation d'ions H⁺ dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Ce gradient de protons crée une force dite « protomotrice » qui est utilisée pour faire fonctionner l'ATP synthase et synthétiser de l'ATP.

Il est à noter que la fonction mitochondriale n'est pas limitée à la production d'énergie. En communication directe avec le réticulum sarco-endoplasmique, elle est également impliquée dans le maintien de l'homéostasie calcique (Chernorudskiy and Zito, 2017; Marchi et al., 2018). Le calcium est un signal intracellulaire ubiquitaire responsable du contrôle de plusieurs processus cellulaires physiologiques, comme la prolifération, la contraction et la sécrétion. Cependant, un excès de calcium dans la matrice mitochondriale entraîne l'ouverture du PTP (pore de transition de perméabilité) et une chute du potentiel de membrane mitochondrial conduisant à un processus de mort cellulaire. Les niveaux de calcium doivent ainsi être très finement régulés. Les mitochondries vont participer au maintien de l'homéostasie calcique via l'activité de canaux et de transporteurs localisés dans les membranes externe et interne des mitochondries permettant un contrôle de la concentration en calcium entre la mitochondrie et le reste de la cellule.

La mitochondrie participe aussi à la thermogénèse et à la régulation du pH intracellulaire et joue un rôle majeur dans la signalisation liée aux espèces réactives de l'oxygène, la chaîne respiratoire étant le premier site de production d'espèces réactives de l'oxygène de la cellule (Chouchani et al., 2017; Ježek et al., 2018; Swenson, 2018). Enfin, la mitochondrie joue un rôle majeur dans le processus de mort cellulaire par apoptose que nous décrirons plus en détails dans la suite de ce manuscrit.

II. Les pathologies cardiaques

Le cœur est l'organe à l'origine de la circulation du sang dans l'organisme. Grâce à son système de contraction il agit comme une pompe assurant la distribution du sang vers les différents organes du corps. Le sang apporte, entre autres, les nutriments et l'oxygène indispensables au fonctionnement de ces organes. Toute perturbation du fonctionnement du cœur va avoir de graves conséquences pour l'organisme. En réponse à un stress, l'organisme met en place un système d'adaptation permettant de maintenir un débit cardiaque suffisant (accélération du rythme cardiaque, vasoconstriction...). Cependant, si le stress persiste, ces adaptations deviennent délétères et aboutissent au développement de l'insuffisance cardiaque.

A. L'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque se définit par l'incapacité du muscle cardiaque à assurer un débit sanguin systémique normal avec un régime de pression de remplissage normal (pour revue (Brink, 2018)). Les principaux symptômes de l'insuffisance cardiaque sont la dyspnée,

l'asthénie, une prise de poids et l'apparition d'œdème au niveau des membres inférieurs. Le diagnostic de la maladie repose sur une radio du thorax pour rechercher une cardiomégalie, un bilan biologique pour mesurer entre autre le taux plasmatique de peptides natriurétiques, une échocardiographie pour détecter des troubles du rythme et mesurer des paramètres structuraux (diamètres des cavités ventriculaires en systole et en diastole) et fonctionnels (fraction d'éjection systolique), et une IRM cardiaque afin de dépister la formation de plaques de fibrose qui favorisent la survenue de troubles du rythme.

Les causes de l'insuffisance cardiaque sont multiples mais il s'agit principalement d'une altération de la fonction systolique c'est-à-dire une diminution de la force de contraction du myocarde. Elle est due à une altération de la fonction contractile du cœur due par exemple à une nécrose des myocytes suite à un infarctus ou à une exposition à une substance toxique. L'insuffisance cardiaque peut aussi être due à l'altération de la fonction diastolique c'est-à-dire liée à une mauvaise relaxation impliquant donc une altération au niveau du remplissage des ventricules lors de la diastole. D'autre part, une augmentation de la post-charge entraîne une réduction du volume d'éjection systolique conduisant au développement de l'insuffisance cardiaque.

Des mécanismes compensateurs se mettent en place pour permettre le maintien de l'oxygénation correcte des tissus le plus longtemps possible, mais à plus long terme ils participent aussi à l'aggravation de l'insuffisance cardiaque. Au niveau cardiaque, les premiers mécanismes mis en place sont une augmentation de la fréquence cardiaque, permettant d'augmenter le débit cardiaque afin de compenser la diminution du volume d'éjection systolique, et une hypertrophie des cardiomyocytes augmentant le volume d'éjection systolique et diminuant la post-charge. Au niveau hormonal, les premiers mécanismes sont l'activation du système adrénergique et du système rénine-angiotensine-aldostérone (Cody, 1997). L'activation du système adrénergique permet une augmentation de la fréquence cardiaque et de la vasoconstriction maintenant une pression artérielle correcte. Cependant, l'effet bénéfique des catécholamines sur le myocarde n'est pas pérenne, d'une part à cause de la diminution du nombre des récepteurs adrénergiques et d'autre part, dû à l'effet toxique des catécholamines sur le myocarde. Par ailleurs, la vasoconstriction en augmentant les résistances périphériques augmente la post-charge et donc tend à diminuer le volume d'éjection et à aggraver l'insuffisance cardiaque. La production de rénine va conduire à l'augmentation de l'angiotensine II qui va d'une part avoir une action vasoconstrictrice, et d'autre part être responsable d'une augmentation de la sécrétion d'aldostérone. L'aldostérone va induire une rétention hydro-sodée qui, en augmentant la volémie, va maintenir la pression artérielle et augmenter le volume d'éjection systolique. Cependant, l'augmentation de la volémie va entraîner une augmentation des pressions de remplissage et affaiblir le cœur. De

plus, l'aldostérone présente une action pro-fibrosante au niveau du myocarde qui peut entraîner une mort subite par troubles du rythme ventriculaire (Rocha and Stier, 2001).

B. Les traitements de l'insuffisance cardiaque

Dans l'évolution de la plupart des cardiopathies, l'insuffisance cardiaque est extrêmement fréquente. Elle touche 1% de la population globale. Les objectifs des traitements actuels sont : d'améliorer la qualité de vie du patient en soulageant ses symptômes pour permettre les activités de la vie quotidienne, de prévenir les épisodes de décompensation et réduire le nombre et la durée des hospitalisations, de ralentir la progression de la maladie et de réduire la mortalité. Les traitements développés cherchent à augmenter le débit cardiaque et/ou à diminuer les pressions de remplissage. Les traitements de l'insuffisance peuvent se classer en deux groupes : les traitements non pharmacologiques et les traitements pharmacologiques.

Les traitements non pharmacologiques sont le régime hyposodé (<6g/24h), indiqué uniquement chez les patients au stade avancé de l'insuffisance cardiaque, la suppression de toute consommation d'alcool et une activité physique adaptée aux possibilités et aux préférences des patients afin de lutter contre la sédentarité. Les principaux traitements pharmacologiques actuellement utilisés sont les diurétiques, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et les β -bloquants.

Les diurétiques, principalement des inhibiteurs de l'aldostérone, sont utilisés en cas de signes de congestion. Ils inhibent la réabsorption sodée permettant la diminution de la volémie et par conséquent la charge de travail du cœur (Patterson et al., 1994).

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) sont actuellement les plus couramment utilisés et reposent sur une inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II. L'inhibition de l'IEC entraîne donc une diminution de la concentration d'angiotensine II et de ce fait, le tonus vasculaire diminue et la pression artérielle baisse limitant la dilatation ventriculaire.

Les β -bloquants ont longtemps été contre-indiqués dans l'insuffisance cardiaque car ils diminuent la contraction du muscle cardiaque et contrecarrent l'effet du système adrénergique, ralentissant la fréquence cardiaque. Cependant, le ralentissement du cœur induit par les β -bloquants permet la diminution des contraintes et des volumes ventriculaires réduisant les troubles du rythme ventriculaire et le risque de mort subite faisant des β -bloquants un des médicaments clés contre l'insuffisance cardiaque (Trifunović and Pavlović, 1992).

Selon les patients et l'avancée de leur insuffisance cardiaque d'autres médicaments doivent être associés aux traitements précédemment cités comme les antagonistes de l'aldostérone qui associés aux IEC ont pour but de compléter le blocage du système rénine-

angiotensine-aldostérone permettant de diminuer la tension artérielle et la rétention d'eau. Les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II utilisés à la place (en cas d'intolérance) ou en association avec les IEC et les β -bloquants réduisent la tension artérielle et diminuent la charge de travail du cœur (Tai et al., 2017). Les digitaliques (glycosides cardiotoniques), qui n'ont certes aucun effet sur la mortalité des patients, diminuent les symptômes et les ré-hospitalisations grâce à leur effet inotrope positif et bradycardisant (Upshaw et al., 2017).

Par ailleurs, il existe des traitements dit « électriques ». En effet, si l'équipe médicale considère que le patient réagit insuffisamment au traitement médicamenteux et qu'ils observent un retard entre la contraction du ventricule droit et celle du ventricule gauche une stimulation biventriculaire peut être envisagée. Il s'agit d'introduire un pacemaker triple chambre (une sonde dans l'oreillette droite, une dans le ventricule droit et une le long de la paroi latérale du ventricule gauche). Ce pacemaker va permettre la resynchronisation de la contraction des ventricules droit et gauche, d'optimiser le débit cardiaque, d'améliorer les symptômes et de diminuer la mortalité (Leyva et al., 2014). L'autre système électrique pouvant être mis en place est le défibrillateur automatique implantable. L'appareil comporte un boîtier placé sous le muscle pectoral relié à des électrodes introduites jusqu'au cœur. Il surveille le rythme cardiaque et, au besoin, produit un choc électrique. Son but est de prévenir la mort subite, cause majeure de décès des patients insuffisants cardiaques (Kusumoto et al., 2014; Yancy et al., 2013).

La transplantation cardiaque constitue la dernière possibilité thérapeutique (Yancy et al., 2013). Cependant, compte tenu du manque de greffons disponibles, de la lourdeur de la chirurgie et des complications post-greffe, elle ne peut être envisagée comme solution viable pour le traitement de l'insuffisance cardiaque sur le long terme. Récemment, une avancée spectaculaire a été réalisée via la thérapie cellulaire (Silvestre and Menasché, 2015). Les chercheurs sont parvenus à pratiquer une greffe de cellules cardiaques issues de cellules souches embryonnaires qui ont été transformées en cellules du muscle cardiaque. Ces cellules ont été implantées, sous forme de patch, sur le cœur d'une patiente de 68 ans atteinte d'insuffisance cardiaque sévère. Cinq mois plus tard, l'état de la patiente s'était nettement amélioré sans aucune complication notable. Cependant, ce type d'opération ne s'adresse qu'aux insuffisants cardiaques graves qui ne répondent pas aux traitements médicamenteux habituels. Par ailleurs, la société CARMAT a développé un cœur artificiel réservé aux patients en insuffisance cardiaque grave qui remplace totalement le cœur biologique. Le cœur artificiel est une prothèse intra-corporelle (ou para-corporelle) conçue pour se substituer au cœur biologique et exécuter les fonctions moteur de la circulation sanguine du corps humain (Mohacsi and Leprince, 2014). Suite au décès du 5^{ème} patient greffé, l'Agence nationale du médicament a suspendu l'essai clinique mis en place par l'entreprise CARMAT (Latrémouille et al., 2018).

En dépit d'importants efforts produits par la recherche sur les pathologies cardiaques, la mortalité et les coûts socio-économiques liés à ce syndrome restent malgré tout élevés. La transition du stade où les adaptations sont bénéfiques vers un stade où la fonction cardiaque est altérée est encore mal comprise. De nombreuses études sont donc menées afin de mieux comprendre le développement de la pathologie et d'identifier de nouvelles voies de signalisations associées. Parmi les processus cellulaires, l'autophagie (voir ci-après) joue un rôle indéniable dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire. En effet, on observe une modification du flux autophagique dans de nombreuses pathologies cardiaques. Ces modifications de l'autophagie peuvent être adaptatives, entraînant alors une réponse bénéfique au stress, mais elles peuvent également être délétères, contribuant ainsi au développement ou à l'aggravation de la maladie cardiaque, notamment via l'activation du processus apoptotique. La modulation des voies autophagiques et apoptotiques dans le domaine cardiaque représente donc un axe de recherches important que je détaillerai dans la suite de ce manuscrit.

Partie 2 : Le processus autophagique

Le terme autophagie vient du grec et signifie se manger soi-même (« auto » : soi-même et « phagie » : manger). L'autophagie est un processus de dégradation lysosomale des constituants cellulaires, des organites dysfonctionnels et des macromolécules, présent dans toutes les cellules eucaryotes. Les produits de dégradation formés sont recyclés pour la synthèse de nouvelles molécules et pour la production d'énergie nécessaire à la cellule.

I. Les différents types d'autophagie

Il existe trois types d'autophagie : la microautophagie, l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes et la macroautophagie (figure 8).

L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes (CMA : Chaperone-Mediated-Autophagy) est le seul type d'autophagie qui permet la dégradation sélective des protéines solubles en les délivrant directement dans les lysosomes via un récepteur membranaire spécifique LAMP-2A (Lysosome-Associated Membrane Protein type 2A) (Li et al., 2010). Les protéines dégradées par CMA contiennent toutes un motif consensus de 5 acides aminés : KFERQ. Ce motif permet la liaison des protéines solubles avec la chaperonne hsp70 de la famille des « heat shock » protéines ainsi que le recrutement d'autres chaperonnes de la même famille. La formation du complexe protéine à dégrader/chaperonnes permet la liaison de ce dernier avec la queue cytoplasmique de la protéine lysosomale membranaire LAMP-2A, afin de transloquer la protéine dans la lumière du lysosome pour que cette dernière soit dégradée (Majeski and Dice, 2004).

La microphagie est un processus non sélectif de séquestration directe de portions du cytoplasme ou d'organelles à l'intérieur de la membrane des lysosomes. Cette séquestration se produit grâce à des invaginations aléatoires de la membrane du lysosome. Ces invaginations s'allongent et se différencient en structures tubulaires nommées « tubes autophagiques » qui renferment les portions du cytoplasme. Des vésicules sont formées à l'extrémité de ces tubes et vont ensuite être déversées dans la lumière des lysosomes grâce à une scission des membranes. Le contenu du lysosome est alors dégradé par les hydrolases présentes à l'intérieur du lysosome (Li et al., 2011).

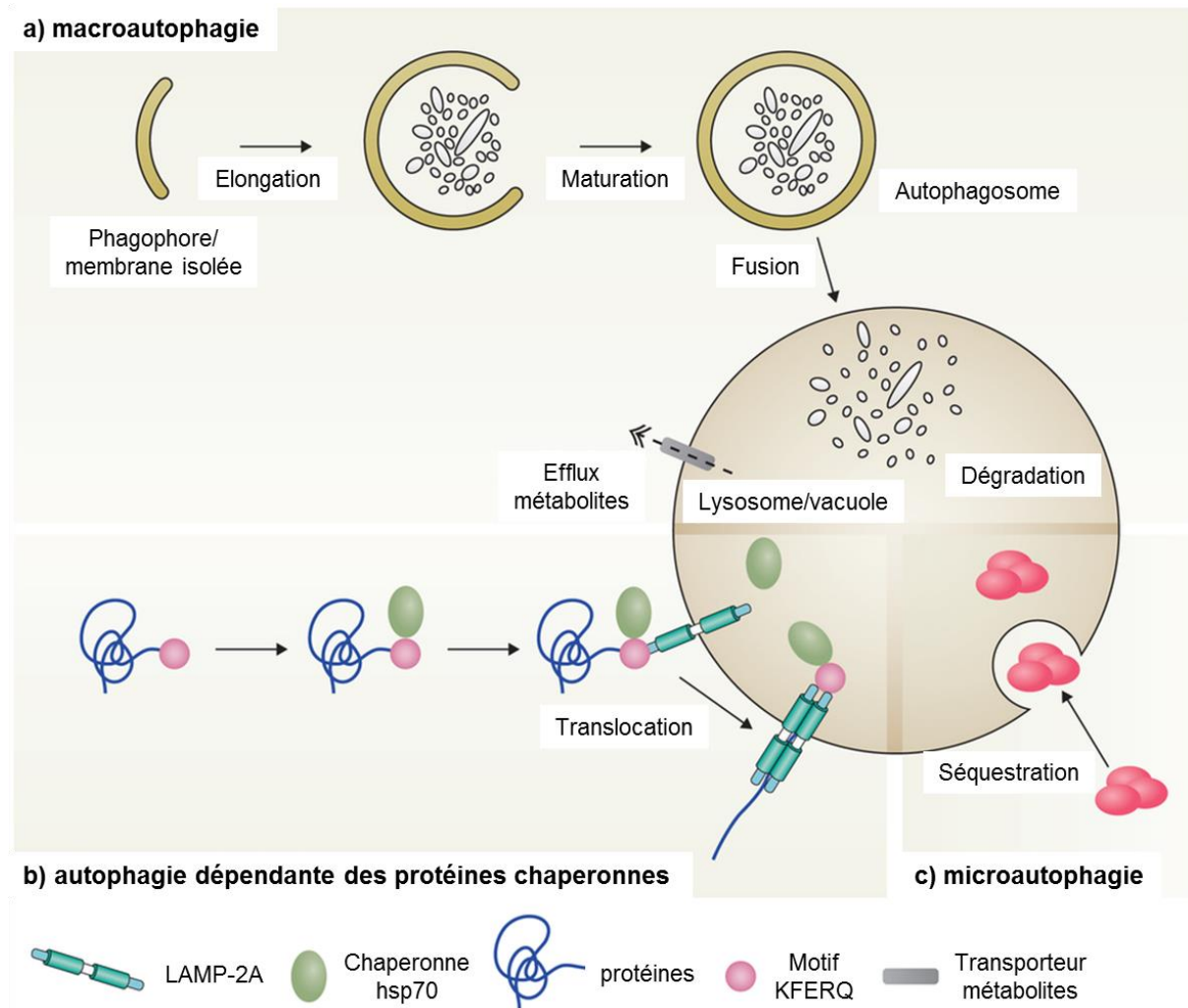


Figure 8 : Les différents types d'autophagie

a) La macroautophagie se caractérise par la séquestration de structures ciblées dans les autophagosomes. Ce dernier va fusionner avec les lysosomes et le matériel séquestré est alors hydrolysé par les enzymes lysosomales. Les métabolites qui en résultent sont transportés dans le cytoplasme et utilisés pour la synthèse de macromolécules ou comme source d'énergie. b) Lors de l'autophagie médiée par les chaperonnes, les protéines portant la séquence KFERQ sont reconnues par la chaperonne hsp70 qui s'associe à la protéine membranaire du lysosome LAMP-2A, déclenchant son oligomérisation. Cet événement conduit à la translocation de la protéine liée à l'intérieur du lysosome. c) La microautophagie implique le recrutement de composants spécifiques à la membrane du lysosome qui s'invagine et rétrécit pour former des vésicules dont le contenu sera libéré par scission de la membrane des vésicules. Adapté d'après (Boya et al., 2013).

La macroautophagie, plus communément appelée autophagie, se décompose en trois étapes. La première étape consiste en la formation dans le cytoplasme de la cellule d'une double membrane appelée phagophore. Cette membrane va ensuite s'allonger pour séquestrer une partie du contenu cytoplasmique et former une vésicule délimitée par une

double membrane nommée autophagosome. La dernière étape est la fusion de l'autophagosome avec des lysosomes. La structure ainsi formée est appelée autophagolysosome. Le matériel séquestré est alors hydrolysé par les enzymes lysosomales, puis libéré dans le cytoplasme de la cellule après dégradation de la membrane de l'autolysosome (He and Klionsky, 2009). La macroautophagie a été considérée pendant longtemps comme un processus de dégradation non sélectif emprisonnant « au hasard » des portions du cytoplasme. Il est actuellement considéré qu'il existe deux types de macroautophagie : 1) une macroautophagie qui n'est pas ou peu sélective, comme par exemple celle activée en réponse à une carence en nutriments qui permet de recycler des acides aminés pour assurer la survie, et 2) une macroautophagie très sélective permettant d'éliminer spécifiquement des organelles endommagés ou des agrégats protéiques même dans un milieu riche en nutriments (Johansen and Lamark, 2011). Différents termes ont été utilisés pour décrire la sélectivité de chaque procédé en fonction des organelles, tels que la ribophagie pour la dégradation des ribosomes (Kraft et al., 2008), la réticulophagie pour la dégradation du réticulum endoplasmique (Bernales et al., 2006) ou la mitophagie pour la dégradation des mitochondries (Kim et al., 2007b).

La mitophagie joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie mitochondriale régulant la taille et la qualité de la population mitochondriale. Chez les mammifères, la mitophagie est principalement régulée par l'E3 ubiquitine ligase Parkin et la serine/thréonine kinase mitochondriale PINK1. Dans les mitochondries saines, PINK1 est rapidement dégradée par les protéases mitochondriales. Lorsque les mitochondries sont endommagées, la chute du potentiel de membrane mitochondrial inhibe la dégradation de PINK1 entraînant son accumulation à la membrane externe des mitochondries. PINK1 recrute alors la protéine cytosolique Parkin à la mitochondrie et l'active par phosphorylation sur la sérine 65 (Kazlauskaitė et al., 2015; Narendra et al., 2010) (figure 9). L'activation de Parkin va permettre l'ubiquitination de différentes protéines de la membrane externe des mitochondries telles que les mitofusines 1 et 2, et la porine VDAC (Chan et al., 2011). Les protéines mitochondriales ubiquitinées par Parkin, et en particulier VDAC, vont être prises en charge par la protéine récepteur p62, appelée aussi sequestosome 1 (SQSTM1), qui se lie en parallèle aux protéines de la famille LC3 (Microtubule-associated protein light chain 3) et GABARAP (Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein) associées à la membrane des autophagosomes en formation (Pankiv et al., 2007). Le complexe p62-ubiquitine-mitochondries est alors dégradé dans les autophagolysosomes. Il est à noter que lorsque l'autophagie est induite, l'expression de p62 est diminuée. A l'inverse p62 s'accumule lorsque l'autophagie est inhibée permettant l'utilisation de p62 comme marqueur pour étudier le flux autophagique (Bjørkøy et al., 2009).

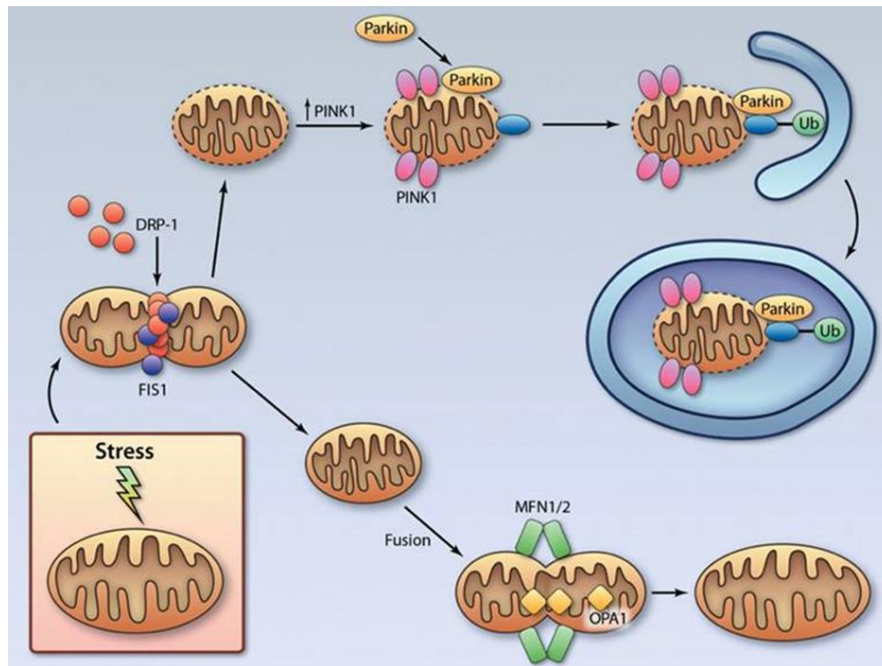


Figure 9 : Régulation de la mitophagie (Kubli and Gustafsson, 2012)

Une chute de potentiel mitochondrial conduit à l'accumulation de PINK1 et le recrutement de Parkin à la membrane externe de la mitochondrie. Parkin favorise l'ubiquitination des protéines de la membrane mitochondriale conduisant à leur dégradation dans l'autophagolysosome.

La régulation de l'autophagie est complexe car elle fait intervenir de multiples acteurs moléculaires. En effet, plus de 30 gènes régulant l'autophagie sont décrits chez la levure et nombreux sont ceux qui possèdent des orthologues chez les mammifères.

II. La machinerie moléculaire de l'autophagie

La première mise en évidence de l'autophagosome par microscopie électronique date de 1950, mais ce n'est qu'en 1990 avec la découverte des gènes, autophagy related genes (ATG), que des avancées importantes ont pu être réalisées dans la compréhension des mécanismes de régulation moléculaire de l'autophagie, ainsi que des fonctions physiologiques et physiopathologiques de ce processus (Tsukada and Ohsumi, 1993). Les protéines ATG sont impliquées dans les différentes étapes de l'autophagie telles que la phase d'initiation du phagophore, ainsi que la maturation et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (figure 10).

A. Induction de l'autophagie

L'autophagie est initiée par la formation d'une membrane appelée phagophore. L'origine de cette membrane n'a pas encore été clairement identifiée, mais il semblerait qu'elle

ne soit pas synthétisée *de novo* mais provienne d'organelles pré-existantes. Du fait de la proximité des autophagosomes et du RE, celui-ci semble la source préférentielle du phagophore (Ylä-Anttila et al., 2009) mais il n'est pas le seul. Certaines données de la littérature démontrent également l'émergence du phagophore à partir de l'appareil de Golgi, des mitochondries, ou de la membrane plasmique (Geng et al., 2010; Hailey et al., 2010; Ravikumar et al., 2010).

La formation et l'élongation de l'autophagosome nécessite la participation de différents complexes protéiques :

- le complexe ULK1
- le complexe PI3K de classe III
- les systèmes de conjugaison ATG5/ATG12 et LC3-PE

1. Le complexe ULK1

La protéine ULK1 (Unc-51-Like kinase) est une sérine/thréonine kinase. Elle forme un complexe avec ATG13, ATG101 et FIP200 (Focal adhesion kinase family interacting protein of 200kDA) (Lin and Hurley, 2016). Suite à l'induction de l'autophagie, le complexe ULK1 migre au sites d'initiation de l'autophagie pour permettre la formation de l'autophagosome via le recrutement et l'activation du complexe PI3K de classe III par phosphorylation de AMBRA1 (Activating Molecule in 1 Regulating Autophagy) et BECLIN 1 (Russell et al., 2013; Zachari and Ganley, 2017). Le complexe ULK1 peut être activé par phosphorylation par l'AMPK (Egan et al., 2011). A l'inverse, MTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin complex 1), qui comme son nom l'indique est une cible de la rapamycine (figure 10), peut inhiber l'autophagie en phosphorylant ULK1 et ATG13, réduisant l'activité kinase d'ULK1. Lorsque MTORC1 est inhibé, il se dissocie d'ULK1 permettant son autophosphorylation, celle d'ATG13 et celle de FIP200 et contribuant au recrutement du complexe sur la membrane du phagophore (Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009).

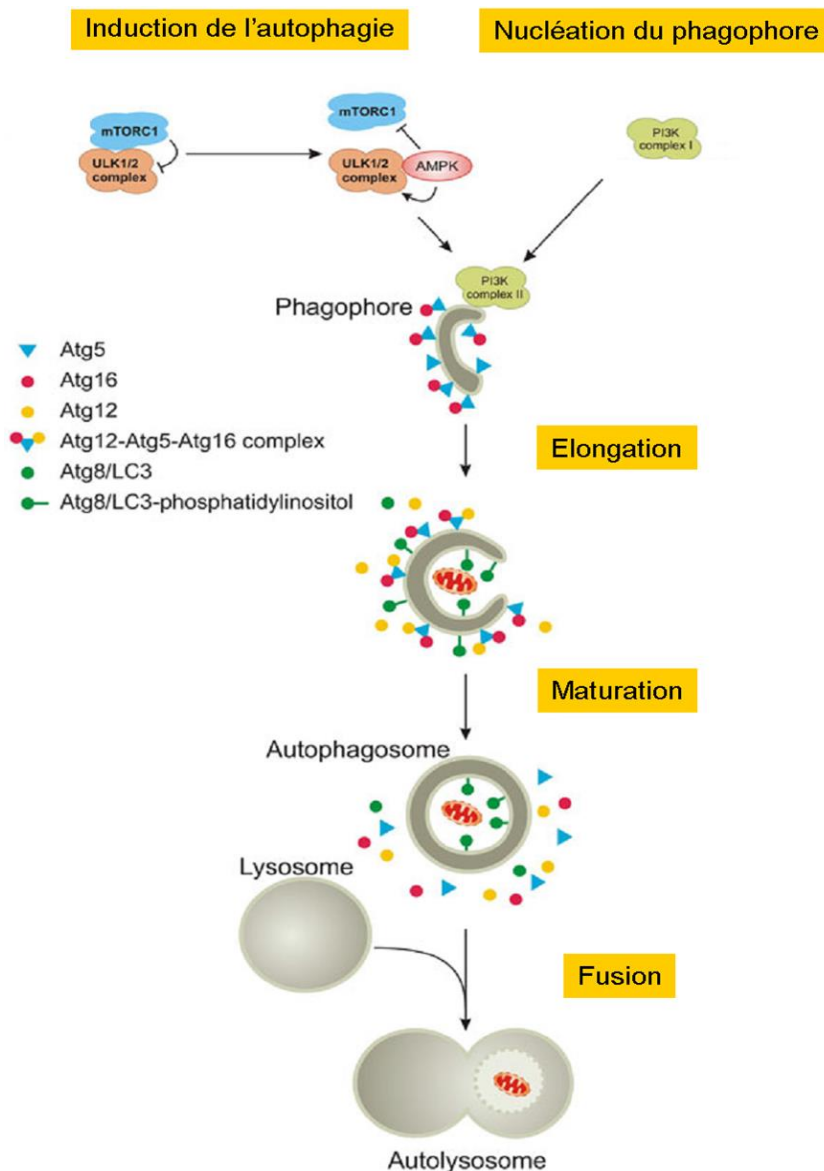


Figure 10 : Mécanisme moléculaire de l'autophagie

L'autophagie est divisée en différentes étapes : l'induction, la nucléation, l'allongement, la maturation, la fusion et la dégradation lysosomale. L'induction du complexe ULK1 nécessite l'inhibition de MTORC1 et sa phosphorylation par l'AMPK. Ce complexe est essentiel pour l'induction du phagophore. Le complexe PI3K est requis pour l'induction et la nucléation du phagophore. L'allongement de l'autophagosome nécessite la conversion du LC3-I en LC3-II et la formation du complexe ATG12/ATG5/ATG16. L'autophagosome mature va fusionner avec le lysosome permettant la dégradation de son contenu par les enzymes lysosomales. Adapté d'après (Deegan et al., 2013)

2. Le complexe PI3K de classe III

La nucléation et l'assemblage de la double membrane du phagophore, précurseur de l'autophagosome nécessite le complexe PI3K de classe III (figure 10). Ce complexe existe sous deux versions qui sont composées de Vps34 (PI3K de classe III), Vps15

(phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4), BECLIN 1, p150 et soit de UVRAG (UV irradiation Resistance-Associated Gene), soit de ATG14L/Barkor (Beclin 1-associated ATG key regulator) (Shanware et al., 2013). En effet, les protéines UVRAG et Barkor sont en compétition pour leur liaison avec BECLIN 1, mais chacune assiste BECLIN 1 séquentiellement pour la formation de l'autophagosome puis pour la fusion entre l'autophagosome et le lysosome (Abrahamsen et al., 2012; Sun et al., 2009). UVRAG interagit avec deux protéines : BIF-1 (Bax-Interacting Factor 1) et RUBICON (Run domain cystein rich domain containing BECLIN 1 Interacting protein), respectivement des régulateurs positifs et négatifs du complexe PI3K de classe III (O Farrell et al., 2013). L'activité autophagique de BECLIN 1 peut également être régulée négativement par son interaction avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Marquez and Xu, 2012). Enfin, AMBRA1 peut également faire partie du complexe PI3K de classe III en se liant à BECLIN 1. Lorsque l'autophagie n'est pas induite, AMBRA1, qui est capable de se lier à la dynéine, accroche le complexe aux microtubules. Lorsque l'autophagie est activée ULK1 phosphoryle AMBRA1 permettant la libération du complexe des microtubules et le recrutement de celui-ci au niveau du RE induisant ainsi la formation de la plateforme oméogosome pour la biogenèse de l'autophagosome (Di Bartolomeo et al., 2010; Liang et al., 2006).

L'activité de la PI3K de type III permet la génération de PI3P (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) à partir de PI (phosphatidylinositol). PI3P est une molécule lipidique importante dans la formation des autophagosomes car en recrutant les protéines nécessaires à l'élongation du phagophore elle contrôle leur biogenèse et leur maturation (Burman and Ktistakis, 2010). Experimentalement, l'étape d'initiation de l'autophagie est généralement étudiée par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques tels que le 3-méthyladénine (3-MA), un inhibiteur des PI3K (Wu et al., 2010).

B. Elongation de l'autophagosome

Une fois la double membrane du phagophore assemblée celle-ci s'allonge pour former une vésicule à double membrane, appelée autophagosome, contenant des macromolécules et des organites endommagés. Cette étape nécessite deux systèmes de conjugaison « *ubiquitin-like* », le système de conjugaison ATG12/ATG5 et le système de conjugaison LC3-phosphatidyléthanolamine (PE) (figure 10). On parle de système « *ubiquitin-like* » en référence au mécanisme de conjugaison de l'ubiquitine aux substrats qui nécessite une enzyme d'activation (E1), une enzyme de conjugaison (E2) et une ligase (E3).

1. Le système de conjugaison ATG12/ATG5

ATG12 est activée par la protéine ATG7 (enzyme E1), puis transférée sur ATG10 (enzyme E2) pour finalement se lier de façon covalente à ATG5. Le complexe ATG12/ATG5

ainsi formé s'associe de manière non covalente à ATG16 pour former un complexe multimérique. Le complexe ATG12/ATG5/ATG16 s'oligomérisent via des motifs superhélice présents sur ATG16, créant de grands complexes multimériques qui s'associent à la membrane externe du phagophore. Après la formation des autophagosomes, ces complexes sont dissociés de la membrane de l'autophagosome et les ATGs retournent dans le cytoplasme (Pyo et al., 2012). Le complexe ATG12/ATG5/ATG16 est très important dans l'étape d'élongation car il va agir comme ligase (enzyme E3) dans le deuxième système de conjugaison permettant le recrutement de LC3 à la membrane du pré-autophagosome (Mizushima et al., 2003).

2. Le système de conjugaison LC3-PE

Le système de conjugaison LC3-PE est impliqué dans l'élongation et la maturation de l'autophagosome via la lipidation de LC3. LC3 est la première protéine de la membrane de l'autophagosome identifiée. Elle existe sous la forme non lipidée cytosolique appelée LC3-I et sous la forme lipidée ancrée dans la membrane des autophagosomes appelée LC3-II (Kabeya et al., 2000). La protéine LC3 est synthétisée sous une forme pro-LC3 qui est immédiatement clivée par la protéine ATG4 pour former la protéine LC3-I soluble. LC3-I se lie ensuite à la PE grâce à l'action successive de ATG7 et ATG3 (enzyme E2) pour générer la forme LC3-II (Lee and Lee, 2016; Pyo et al., 2012). LC3-II peut alors s'ancrer à la fois dans la membrane externe et interne des autophagosomes pour favoriser leur élongation. Lorsque la formation de l'autophagosome est terminée, les protéines LC3-II fixées sur la membrane externe de ce dernier sont clivées par la protéine ATG4 et recyclées. Les protéines LC3-II liées à la membrane interne de l'autophagosome restent présentes jusqu'à la fusion avec les lysosomes contrairement aux autres ATGs. L'association stable et spécifique de LC3-II aux autophagosomes fait de lui un excellent marqueur lors de l'étude de l'autophagie (Klionsky et al., 2016; Mizushima and Yoshimori, 2007).

C. Maturation et fusion autophagosome-lysosome

La maturation des autophagosomes est la dernière étape de l'autophagie permettant la dégradation du contenu des autophagosomes grâce à leur fusion avec les lysosomes. Pour cela les autophagosomes nouvellement formés doivent rejoindre le cytoplasme afin de fusionner avec les endosomes précoces puis tardifs. Cette fusion permet la formation d'amphisome et nécessite l'intervention des protéines de la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Lee et al., 2007; Rusten and Stenmark, 2009). Les amphisomes fusionnent ensuite avec les lysosomes pour former les autophagolysosomes impliquant les protéines de la famille SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) et LAMP (Lysosomal membrane proteins) (Huynh et al., 2007;

Nair et al., 2011). Le contrôle de l'acidification des lysosomes et de l'intégrité du contenu lysosomal représente une étape cruciale pour la maturation et la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Expérimentalement, les inhibiteurs de fusion des autophagosomes avec les lysosomes tels que la bafilomycine A ou la chloroquine sont souvent utilisés pour étudier le flux autophagique (Perry et al., 2009; Yamamoto et al., 1998).

III. L'autophagie dans le cœur

Les cardiomyocytes sont des cellules à capacité répliquative limitée, dans lesquelles les systèmes de contrôle de la qualité comme l'autophagie sont fondamentaux pour maintenir l'homéostasie cellulaire (Bravo-San Pedro et al., 2017; Willis and Patterson, 2013). Au-delà de son rôle dans la dégradation des protéines et des organites non fonctionnels, l'autophagie basale joue également un rôle important dans la régulation du métabolisme cardiaque. Ainsi, lorsque les ressources en nutriments sont limitées ou que les cellules sont soumises à un stress cardiaque, l'autophagie est déclenchée pour alimenter le cœur. D'autres part, plusieurs études ont démontré le rôle protecteur de l'autophagie dans les cardiomyocytes lors du développement de pathologies cardiaques (pour revue (Mialet-Perez and Vindis, 2017; Wang et al., 2016b). Par exemple, l'activation pharmacologique de l'autophagie pendant un stress cardiaque ischémique est cardioprotectrice (Hamacher-Brady et al., 2006; Huang et al., 2010) alors que son inhibition provoque la mort cellulaire (Gurusamy et al., 2009; Yan et al., 2005).

L'activation de l'autophagie dans le cœur apparaît donc comme une démarche thérapeutique envisageable. En effet, plusieurs composés naturels activant l'autophagie ont démontré un rôle cardioprotecteur (tableau 1). Parmi ces composés le resvératrol et le ptérostilbène, deux polyphénols, sont en essai clinique de phase II. Le resvératrol induit l'autophagie via l'activation de l'AMPK atténuant ainsi le remodelage cardiaque post-infarctus et permettant la conservation des performances cardiaques (Kanamori et al., 2013). Une autre étude montre que de faibles doses de resvératrol augmentent l'expression de Rictor, un composant de mTORC2, qui phosphoryle et active Akt pour induire l'autophagie (Gurusamy et al., 2010). Néanmoins, bien que rapidement et efficacement absorbé après administration orale, le resvératrol a une faible biodisponibilité, ce qui limite son effet cardioprotecteur (Vitaglione et al., 2005). D'autres études suggèrent que le ptérostilbène, un analogue naturel méthylé du resvératrol, déclencherait une élévation rapide de la concentration de calcium intracellulaire induisant l'autophagie via l'activation de l'AMPK. Le ptérostilbène présentant une demi-vie plus longue et une biodisponibilité plus élevée que le resvératrol *in vivo*, apparaît donc comme un meilleur candidat pour les thérapies contre les maladies cardiovasculaires (Lin et al., 2009).

Néanmoins, le processus autophagique n'est pas toujours bénéfique pour le système cardiovasculaire et en cas de dérégulation, peut contribuer au développement de maladies

cardiaques (Lampert and Gustafsson, 2018; Lavandero et al., 2015). En effet, une altération du processus autophagique ou un niveau excessif d'autophagie entraîne une forme de mort appelée « mort cellulaire dépendante de l'autophagique » ou autosis lorsque que cette mort implique l'ATPase Na⁺/K⁺ de la membrane plasmique (Galluzzi et al., 2018; Liu and Levine, 2015). Cette mort non apoptotique est caractérisée principalement par l'absence de condensation de la chromatine, et la vacuolisation du cytoplasme avec accumulation d'autophagosomes et d'autolysosomes. Elle est prévenue par l'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie mais pas par les inhibiteurs de l'apoptose ou de la nécrose (Liu and Levine, 2015). Dans le cœur, il a par exemple été mis en évidence que l'autophagie induite par l'ischémie-reperfusion est diminuée et que la taille de la zone infarctée est réduite chez les souris invalidées pour Beclin 1, indiquant que dans ce modèle l'activation excessive de l'autophagie est délétère et contribue au développement de la dysfonction cardiaque (Matsui et al., 2007).

Composés naturels	Provenances	Effets sur l'autophagie	Mécanismes	Maladies	Références
Acide Ursolique	Herbes aromatiques, baies, pommes	Induction	Augmente l'expression d'ATG5 et ATG16	Athérosclérose	(Leng et al., 2016)
Arglabine	Armoise	Induction	Augmente l'expression de LC3 et diminue l'expression d'IL-1β	Athérosclérose	(Abderrazak et al., 2015)
Resvératrol	Vin, baies	Induction	Active la voie AMPc/AMPK/SIRT1	Post-infarctus	(Kanamori et al., 2013)
			Active la protéine Rictor	Ischémie reperfusion	(Gurusamy et al., 2010)
Ptérostilbène	Vin, baies	Induction	Active l'AMPK via le calcium	Athérosclérose	(Zhang et al., 2013a)

Tableau 1 : Composés naturels induisant une autophagie cardioprotectrice. Adapté d'après (Wang et al., 2016b)

Partie 3 : Mort cellulaire et apoptose dans le coeur

L'apoptose a été décrite pour la première fois en 1972 par Kerr, Wyllie et Currie (Kerr et al., 1972). Elle est caractérisée par une réduction du volume cellulaire, des bourgeonnements de la membrane plasmique, une condensation de la chromatine, une fragmentation du noyau, puis la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques. *In vivo*, les corps apoptotiques sont reconnus via l'exposition des phosphatidylsérines sur la bicouche externe de la membrane plasmique (Fadok et al., 1992) puis éliminés par les macrophages, les cellules épithéliales ou les fibroblastes. Au cours des étapes précoces du processus apoptotique, l'intégrité de la membrane plasmique est maintenue empêchant le déversement du contenu cellulaire dans le milieu environnant et limitant le déclenchement d'une réaction inflammatoire, à l'inverse de ce qui est observé au cours de la nécrose.

Dans le cœur, il a été longtemps considéré que les cardiomyocytes ne possédaient pas de potentiel de prolifération et que par conséquent chaque cellule morte était définitivement perdue. Cependant, certaines études ont montré que contrairement à ce que l'on pensait initialement, certains cardiomyocytes possèdent un potentiel prolifératif (Bergmann et al., 2009; Bersell et al., 2009; Kajstura et al., 2010) et qu'en réponse à un stress tel que l'infarctus, des cardiomyocytes préexistants sont capables de se diviser pour remplacer les cellules mortes (Senyo et al., 2013). Néanmoins, le remplacement des cardiomyocytes morts en réponse à un stress est un phénomène dont l'importance est limitée puisque le turnover estimé n'est que très faible et de l'ordre de 0.76% par an.

Dans une situation physiologique, chez un individu sain, le taux de mort cellulaire des cardiomyocytes est considéré comme très faible (entre 1 et 11 cellules mortes pour 10^5 cellules selon les auteurs (Guerra et al., 1999; Olivetti et al., 1997; Saraste et al., 1999)). Chez l'homme atteint d'insuffisance cardiaque, ainsi que dans plusieurs modèles animaux de pathologies cardiaques tels que la constriction de l'aorte transverse ou l'hyperstimulation des récepteurs β -adrénergiques, une augmentation faible mais significative de la mort cellulaire des cardiomyocytes a été observée et associée au développement de pathologies cardiaques (e.g. 80 à 237 cellules mortes pour 10^5 cellules pour des patients atteints d'insuffisance cardiaque (Guerra et al., 1999; Olivetti et al., 1997; Saraste et al., 1999)).

Parmi les nombreux acteurs du processus apoptotique, nous n'évoquerons ici que les caspases, protéines exécutrices de l'apoptose, les membres de la famille Bcl2, qui régulent ce processus de mort, et la voie mitochondriale de l'apoptose.

I. Les caspases

Les caspases (cysteinyll aspartate specific protease), dont on dénombre actuellement chez les mammifères 16 membres, sont des endoprotéases intracellulaires qui occupent une

place centrale dans le mécanisme moléculaire de l'apoptose. Elles sont toutes capables de reconnaître et de cliver sélectivement leur protéines cibles du côté C-terminal du résidu aspartate (Stennicke and Salvesen, 1999). Les caspases sont initialement synthétisées sous la forme de pro-caspases inactives qui nécessitent une dimérisation et un clivage pour être activées (Mcllwain et al., 2013). La structure primaire d'une caspase est un pro-domaine amino-terminal et un domaine protéase carboxy-terminal, qui contient le résidu cysteine catalytique. Les caspases impliquées dans l'apoptose sont regroupées en deux catégories en fonction de la longueur et de la séquence primaire du pro-domaine N-terminal (Philchenkov, 2004). On distingue les caspases à pro-domaine long (> 90 acides aminés) appelées caspases initiatrices (-2, -8, -9, -10, -12), qui initient la cascade protéolytique des caspases, et les caspases à pro-domaine court (<30 acides aminés) appelées caspases exécutrices ou effectrices (-3, -6 et -7), activées par clivage par les caspases initiatrices (figure 11).

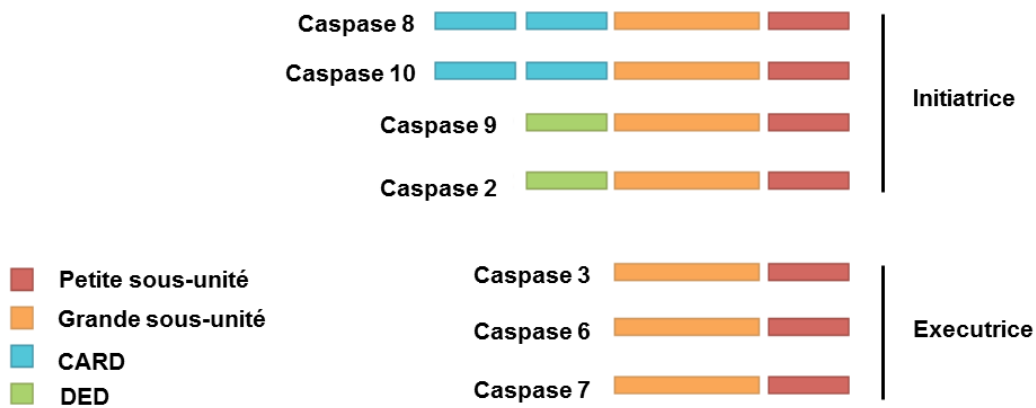


Figure 11 : Structure des caspases impliquées dans l'apoptose

Les caspases initiatrices -8, -10, -9 et -2 ont un long pro-domaine alors que les caspases exécutrices -3, -6 et -7 ont un pro-domaine court. Adapté d'après (Mcllwain et al., 2013).

Une fois activée les caspases exécutrices clivent leur protéines cibles afin d'activer des protéines impliquées dans le déroulement de l'apoptose comme par exemple d'autres caspases exécutrices (Mcllwain et al., 2013), ou d'inactiver des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire (Ségal-Bendirdjian, 1999). En effet, l'une des caractéristiques de l'apoptose est le clivage de l'ADN chromosomique en nucléosomes. Les caspases jouent un rôle important dans ce processus en activant les DNases, en inhibant les enzymes de réparation de l'ADN et en décomposant les protéines structurales dans le noyau (Larsen and Sørensen, 2017). Les caspases peuvent subir des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitinylation ou nitrolylation) entraînant leur interaction avec plusieurs modulateurs qui vont augmenter ou diminuer leur activité. De plus, l'activité des caspases peut

aussi être régulée par différentes protéines anti-apoptotiques telles que FLIP (FLICE-like Inhibitory Protein), un homologue inactif de la procaspase-8, et les IAPs (Inhibitors of Apoptosis), qui constituent une famille d'inhibiteurs dont les cibles principales sont les caspases -3, -7 et -9 (Parrish et al., 2013).

II. La famille Bcl-2

La famille Bcl-2 comprend des membres pro-apoptotiques comme les protéines Bax, Bak et Bid et des membres anti-apoptotiques dont fait partie Bcl-2, le membre fondateur de cette famille (Antonsson, 2004). Les protéines de la famille Bcl-2 possèdent des domaines d'homologie (Bcl-2 Homology, BH1 à BH4) permettant de les classer en trois catégories (Kelekar and Thompson, 1998) (figure 12). Les protéines anti-apoptotiques qui possèdent généralement les quatre domaines BH, comme Bcl-2 et Bcl-X_L (B-cell lymphoma-extra large). Les protéines pro-apoptotiques qui comportent les domaines BH1 à BH3, telles que Bak et Bax. Enfin, les protéines pro-apoptotiques qui ne possèdent qu'un seul domaine BH3 : les protéines BH3-only, telles que Bad, Bid, Noxa ou Puma qui favorisent l'activation de Bax.

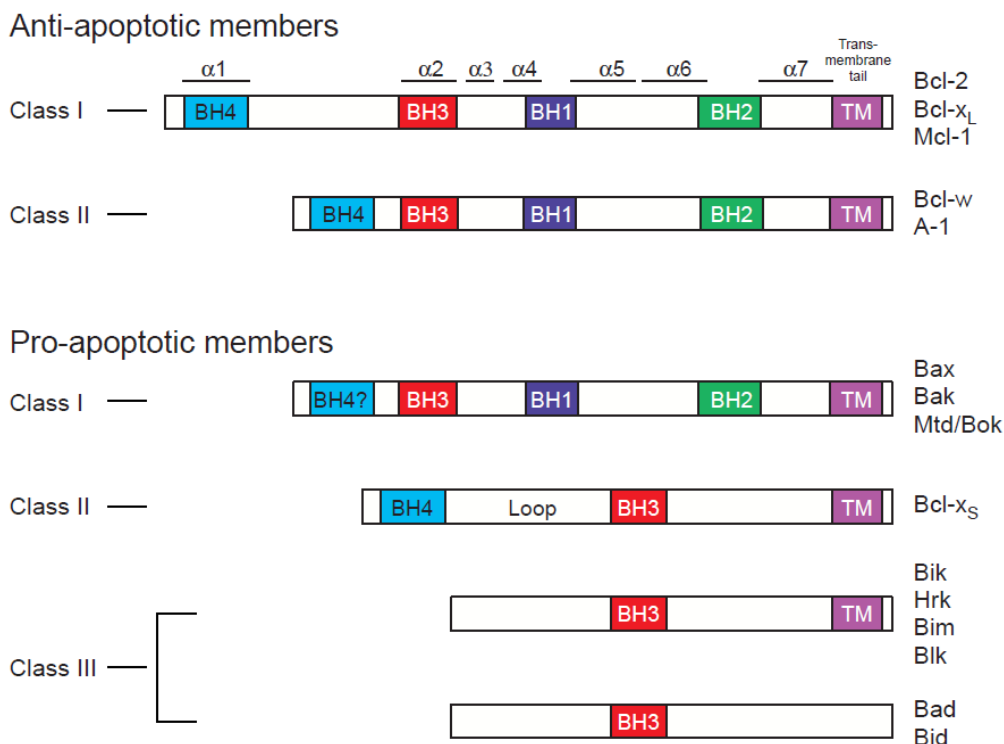


Figure 12 : Classification des membres de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 sont classées en trois catégories : les protéines anti-apoptotiques à quatre domaines BH (ex : Bcl-2), les protéines pro-apoptotiques à plusieurs domaines (BH1, BH2 et BH3) comme Bax, et les protéines pro-apoptotiques BH3-only (Bad). D'après (Kelekar and Thompson, 1998).

La structure des membres de la famille Bcl-2 leur permet de former des homo-oligomères ou des hétérodimères. Le contrôle de la régulation de l'apoptose est réalisé par l'inactivation de ces protéines par hétérodimérisation entre les membres pro- et anti-apoptotiques (Lucken-Ardjomande and Martinou, 2005). Ainsi, les membres en excès conservent leur effet sur la régulation de l'apoptose et les autres sont inhibés. Différents membres de la famille Bcl-2 ayant une localisation mitochondriale, le maintien de l'homéostasie de la mitochondrie est de ce fait modulé par le ratio des protéines pro- et anti-apoptotiques de cette famille (Chipuk et al., 2008). Plusieurs membres de la famille Bcl-2, incluant Bax et Bcl-2, ont également été retrouvés dans la membrane du RE et participent à la régulation de la communication apoptotique entre cet organite et la mitochondrie en réponse au stress du réticulum endoplasmique (stress RE) (Sharaf El Dein et al., 2009).

III. La voie mitochondriale de l'apoptose

Le processus apoptotique conduisant à l'activation des caspases, peut être activé par deux voies majeures de signalisation : la voie des récepteurs de mort (ou voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (ou voie intrinsèque) (figure 13). La voie des récepteurs de mort est déclenchée par la liaison de ligands extracellulaires sur leurs récepteurs membranaires spécifiques, appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) et au NGF (Nerve Growth Factor). La voie mitochondriale est initiée en réponse à différents stimuli tels que les altérations irréversibles de l'ADN, l'activation d'oncogènes, un choc thermique, le stress oxydatif ou encore le stress RE.

L'activation de la voie mitochondriale conduit à la perméabilisation des membranes mitochondriales (PMM), à la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) et au relargage, de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol, de protéines pro-apoptotiques comme le cytochrome c, AIF (Apoptosis Inducing Factor), Endonuclease G, Smac/DIABLO et Omi/Htra2. Ces protéines initient alors la cascade protéolytique des caspases ou la fragmentation de l'ADN, aboutissant au démantèlement de la cellule (Kroemer et al., 2007).

Le déclenchement de la voie des récepteurs de mort entraîne la formation du complexe de signalisation inducteur de la mort (DISC). Ce complexe contient le récepteur de mort trimérisé, une molécule adaptatrice (FADD, TRADD) et la pro-caspase 8. Une fois activée la caspase 8 transmet le signal de mort aux caspases effectrices. La caspase 8 peut aussi cliver la protéine pro-apoptotique Bid en tBid (truncated Bid) qui active Bax et la voie mitochondriale de l'apoptose. En réponse à un signal apoptotique, Bax et Bak vont subir des changements de conformation et s'oligomériser, conduisant à la formation de pores mitochondriaux qui induisent la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie. La perméabilisation de

la membrane entraîne la libération de composés apoptogènes, tel que le cytochrome c. Le cytochrome c se lie à APAF-1 (Apoptotic peptidase activating factor-1) pour faciliter la formation de l'apoptosome permettant le recrutement et l'activation de la pro-caspase 9. La caspase 9 va ensuite activer les caspases effectrices.

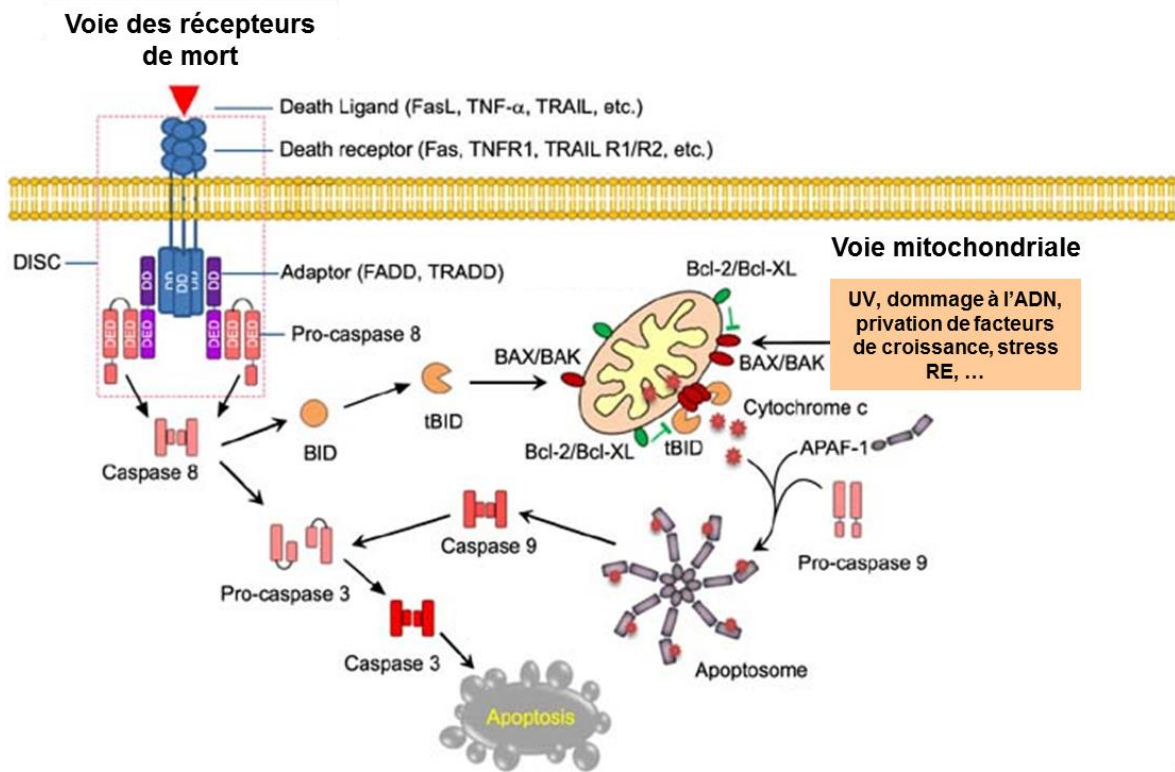


Figure 13 : Les deux voies principales d'activation de l'apoptose

IV. Interconnexion entre autophagie et apoptose

Il a été démontré que l'autophagie et l'apoptose se produisent souvent dans la même cellule et que l'autophagie précède l'apoptose (Ben Salem et al., 2017; Wirawan et al., 2010). Néanmoins, ces processus sont étroitement liés et sont capables de se réguler mutuellement comme nous le verrons brièvement dans le paragraphe ci-dessous.

De manière non exhaustive, il a été montré que l'inhibition de l'autophagie par l'extinction de BECLIN 1 et PI3K augmente l'activation des caspases, la libération du cytochrome c et l'apoptose (Hou et al., 2010). De plus, l'inhibition de l'autophagie par la chloroquine ou par l'extinction d'ATG5 ou d'ATG7 rend les cellules hypersensibles à l'apoptose induite par un stress RE (Bartolome et al., 2012). Il apparaît donc que la modulation de l'autophagie module le processus apoptotique.

D'autres études ont mis en évidence que le clivage par des caspases de la partie C-terminal de BECLIN 1 entraîne sa relocalisation à la mitochondrie où il participe à la libération du cytochrome c, favorisant ainsi l'apoptose (Wirawan et al., 2010). De manière similaire, le

clivage d'ATG5 par les caspases entraîne sa relocalisation à la mitochondrie où il s'associe avec la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L pour l'inhiber et favoriser le relarguage du cytochrome c dépendant de Bax et l'apoptose (Yousefi et al., 2006). En plus d'inhiber l'autophagie, le clivage des membres de la machinerie autophagique favorise donc l'induction de l'apoptose.

Afin de limiter la mortalité associée aux maladies cardiaques et d'améliorer le confort de vie des patients, il est crucial d'identifier de nouvelles voies de signalisations associées au développement des pathologies cardiaques et de développer de nouvelles stratégies médicamenteuses plus ciblées. Dans ce contexte, les voies de signalisations impliquées dans la réponse au stress RE ont récemment fait l'objet d'études dans le domaine cardiovasculaire et représentent un domaine de recherche prometteur pour lutter contre le développement de pathologies cardiaques.

Partie 4 : Le Réticulum Endoplasmique

I. Réticulum endoplasmique vs réticulum sarcoplasmique

Le Réticulum Endoplasmique (RE) est un organite central des cellules eucaryotes constitué d'un vaste réseau membranaire continu de tubules et de saccules. Le RE peut être divisé en deux domaines : le RE lisse (REL) et le RE rugueux (RER), ce dernier se distinguant par la présence de ribosomes à sa surface (Baumann and Walz, 2001; Voeltz et al., 2002). Le RE est impliqué dans un grand nombre de processus tels que la synthèse, l'assemblage, les modifications post-traductionnelles et le transport des protéines (RER), ainsi que la synthèse de lipides et de stéroïdes, la détoxification des cellules, le stockage et le relargage du calcium (REL) (Benyair et al., 2011; Berridge, 2002; Braakman and Bulleid, 2011). Dans les cardiomyocytes, le REL a évolué en une forme spécialisée appelé réticulum sarcoplasmique (RS). Le RS est composé de nombreuses protéines impliquées dans la régulation calcique et joue un rôle dans le couplage excitation-contraction (Michalak and Opas, 2009). Pendant très longtemps, le RS a été considéré comme le seul type de réticulum présent dans les cardiomyocytes, assurant ainsi l'ensemble des fonctions réticulaires de la cellule et notamment la synthèse et le repliement des protéines. Des expériences plus récentes ont montré qu'en plus du RS, il existait du RER dédié spécifiquement à la synthèse et maturation des protéines (figure 14) (Kaisto and Metsikkö, 2003).

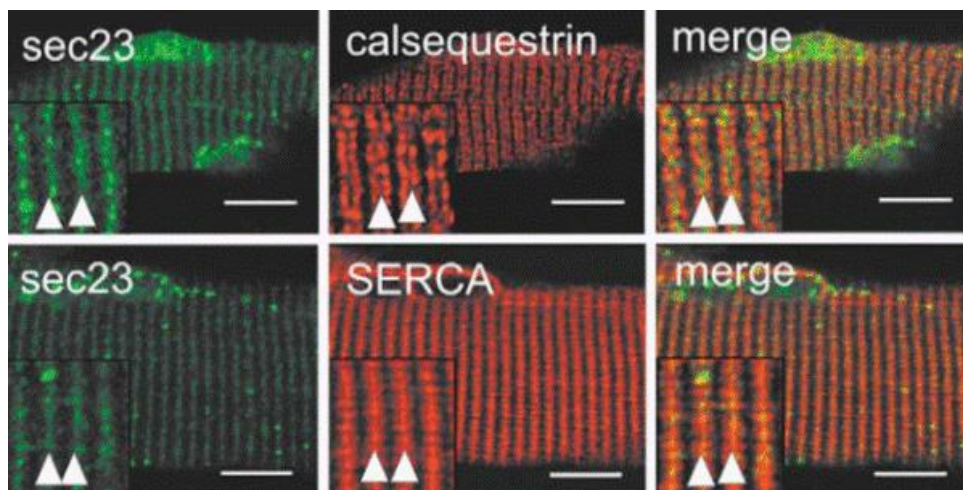


Figure 14 : Colocalisation partielle du réticulum endoplasmique et sarcoplasmique (d'après (Kaisto and Metsikkö, 2003))

La protéine sec23 impliquée dans la synthèse protéique ne colocalise que partiellement avec SERCA et calsequestrine qui sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique, indiquant l'existence de compartiments réticulaires dédiés à la synthèse des protéines et d'autre dédiés à la régulation de l'homéostasie calcique.

Aujourd'hui, le consensus admis propose que le RE et le RS ne soient pas des organites complètement distincts mais plutôt des compartiments capables de communiquer entre eux. Il existerait donc des compartiments de réticulum plutôt adaptés pour la synthèse des protéines, largement équipés en protéines chaperonnes mais faiblement en protéines régulatrices de l'homéostasie calcique et d'autres compartiments mieux adaptés à la régulation du calcium et du couplage excitation-contraction. Le RE/RS est donc un réseau présentant une grande plasticité pouvant évoluer en fonction des besoins de la cellule.

II. Les fonctions physiologiques du RE

La principale fonction du réticulum endoplasmique rugueux est la synthèse et le repliement des protéines de la voie de sécrétion. Ces protéines représentent 30% des protéines cellulaires et sont adressées aux membranes plasmiques (canaux ioniques, transporteurs...), au RE (chaperonnes, récepteurs KDEL...), à l'appareil de Golgi, aux lysosomes (protéases, lipases...) ou sont sécrétées (albumine, facteurs de croissance, insuline...).

A. La synthèse des protéines

La synthèse des protéines, correspondant à la traduction des ARN messagers (ARNm) en protéine, est un processus complexe et finement régulé que l'on peut décrire en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison de la traduction.

1. Initiation de la traduction

La traduction débute par la liaison d'un complexe ternaire, composé de l'ARNt méthylé, d'eIF2 (eukaryotic Initiation Factor 2, constituée de trois sous unités α , β et γ) et d'une molécule de GTP, à la petite sous unité du ribosome (40S) par l'intermédiaire d'eIF3 et d'eIF5. Le complexe 43S ainsi formé, s'associe à l'ARNm par l'intermédiaire d'eIF4F, pour former le complexe de pré-initiation de la traduction (complexe 48S, qui se déplace le long de l'ARNm jusqu'au codon d'initiation AUG (codant la méthionine)). Une fois le complexe situé au niveau du codon d'initiation, eIF2 lié au GTP, déclenche la traduction en créant un lien entre l'ARNtmet fixé sur sa sous unité γ et le codon d'initiation 5'-AUG-3'. L'anti-codon 5'-UAC-3' de l'ARNtmet se fixe au codon d'initiation, ce qui déclenche l'hydrolyse de la molécule de GTP liée à eIF5, la dissociation des facteurs d'initiation et l'association de la grande sous unité ribosomale (60S) avec la petite sous unité (40S). L'ARNm est alors pris entre les deux sous unités ribosomales et peut donc coulisser par rapport au ribosome (figure 15).

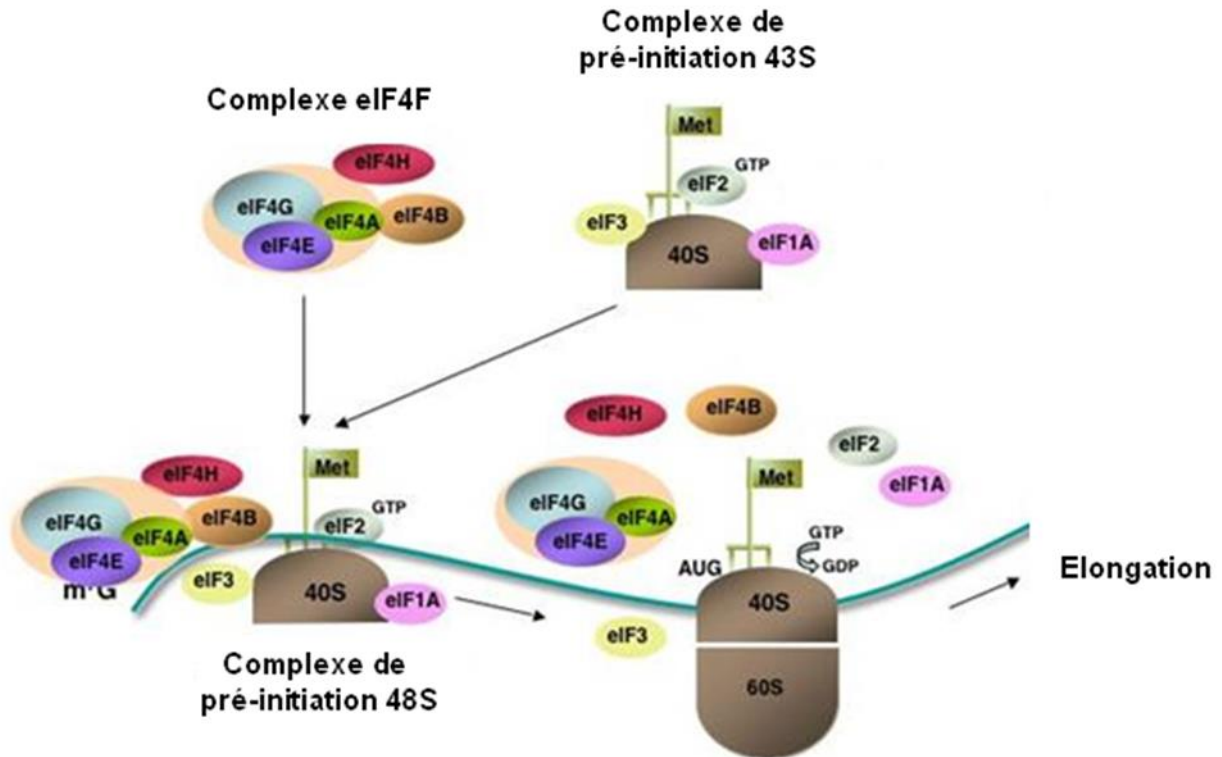


Figure 15 : Initiation de la traduction

Le complexe ternaire eIF2-Met-ARN^tmet-GTP se lie avec la petite sous-unité du ribosome 40S pour former le complexe de pré-initiation 43S. Le complexe 43S s'associe à l'ARNm par l'intermédiaire d'eIF4F et forme le complexe 48S. eIF2 va alors faire le lien entre l'ARN^t et l'ARN traduit déclenchant ainsi l'initiation de la traduction, qui se poursuit grâce à la dissociation des facteurs d'initiation et au recrutement de la grande sous unité ribosomale 60S. Adapté d'après Xiaojin Sha, Université de Berlin (<http://edoc.hu-berlin.de>).

2. Elongation de la traduction

Une fois initiée par le facteur eIF2, la traduction se poursuit grâce au facteur d'élongation eEF1 (eukaryotic Elongation factor 1) lié au GTP et à un ARN^t. Si cet ARN^t possède l'anticodon correspondant au second codon (codon situé à la suite du codon d'initiation), le lien codon-anticodon est créé, ce qui déclenche l'hydrolyse du GTP d'eEF1 et la formation de la liaison peptidique entre la méthionine (l'acide aminé n°1) et l'acide aminé n°2. Le facteur d'élongation eEF2, grâce à son activité GTPasique permet la poursuite de la traduction en faisant coulisser l'ARNm par rapport au ribosome (processus appelé translocation) et en rendant accessible le ribosome à l'ARN^t possédant l'anticodon correspondant au codon suivant. La synthèse de la chaîne polypeptidique continue grâce à la répétition successive de ces cycles (figure 16).

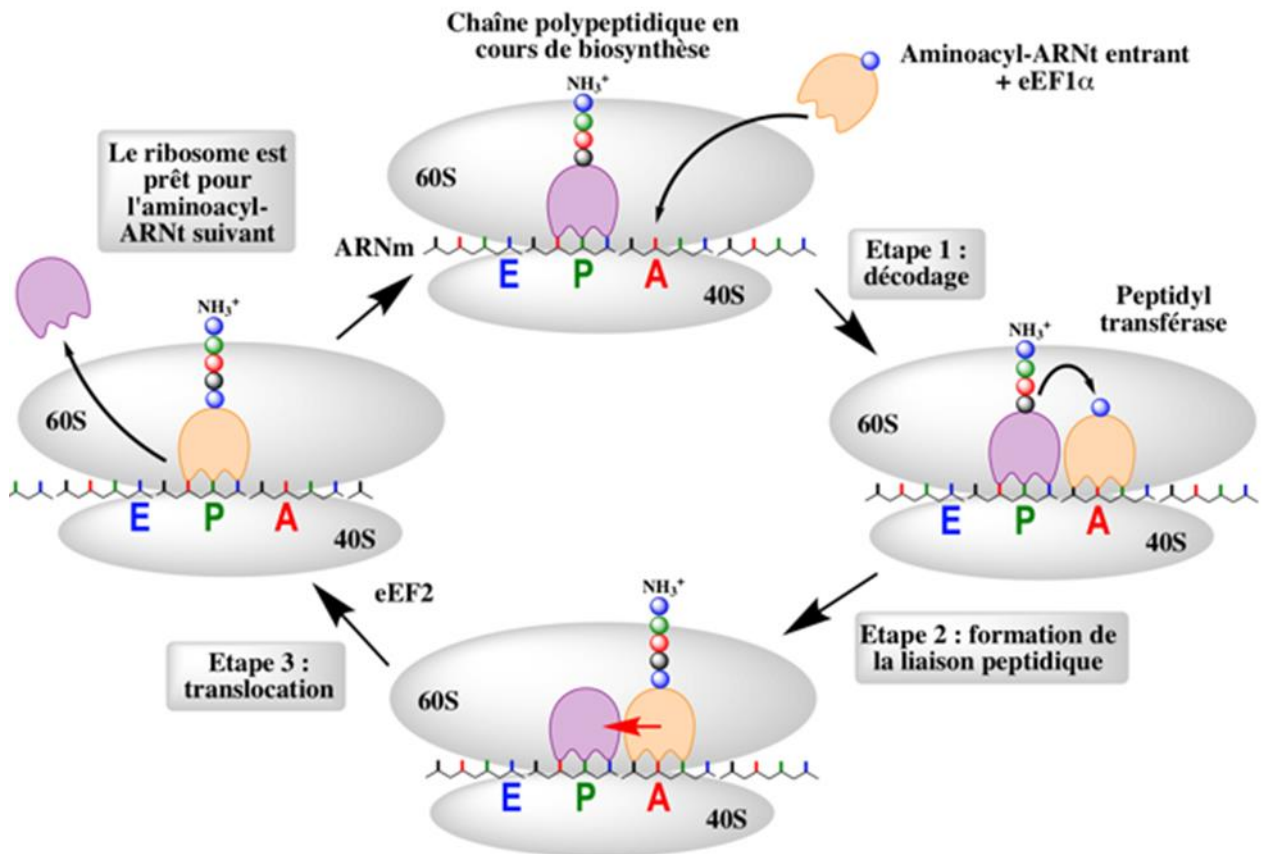


Figure 16 : Elongation de la chaîne polypeptidique

eEF1 fixe et délivre un aminoacyl-ARNt au site A du ribosome. La reconnaissance du second codon par l'ARNt possédant l'anticodon correspondant, entraîne l'hydrolyse du GTP d'eEF1 permettant la formation de la liaison peptidique entre la méthionine et l'acide aminé n^o2. Simultanément, l'ARNt "vide" est décalé du site P vers le site E et le peptidyl-ARNt est transloqué du site A au site P permettant la poursuite de la traduction. Le processus est facilité par l'hydrolyse du GTP du facteur d'élongation eEF2. D'après <http://biochimej.univ-angers.fr/>

3. Terminaison de la traduction

Lorsqu'un codon stop se situe au niveau du ribosome, la reconnaissance de ce codon par le facteur de terminaison de la traduction eRF1 (eukaryotic Release factors 1) amorce la fin de la traduction. L'activité GTPasique d'eRF3 lié à eRF1 entraîne la rupture de la liaison entre le dernier acide aminé et l'ARNt. La protéine est alors libérée et le complexe ribosomal se dissocie, ce qui marque la fin de la traduction (figure 17).

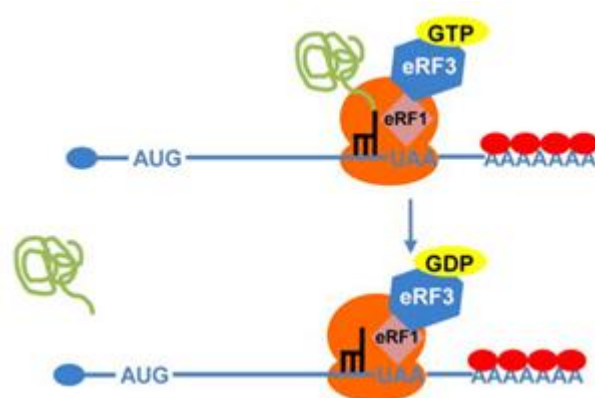


Figure 17 : Terminaison de la traduction : hydrolyse de la liaison ARNt-acide aminé

La reconnaissance du codon stop par eRF1 entraîne l'hydrolyse du GTP d'eRF3, la libération de la chaîne polypeptidique et la dissociation du complexe ribosomal. Adapté d'après (Celik et al., 2015).

B. Le repliement des protéines dans le RE

L'ensemble du processus de traduction est rapide puisqu'il permet la synthèse de 5 à 10 acides aminés par seconde et ainsi, une protéine d'une taille de 50 kDa est produite en environ 64 secondes. Le fruit de la traduction est une protéine dont la structure est primaire, c'est-à-dire sous la forme d'une chaîne linéaire d'acides aminés, déterminée par sa séquence. La protéine entame alors un processus de maturation lui permettant d'acquérir une structure secondaire puis tertiaire puis éventuellement quaternaire (assemblage de plusieurs chaînes polypeptidiques).

La traduction des protéines de la voie de sécrétion commence dans le cytosol puis la protéine est importée de manière co-translationnelle dans le RE grâce à la présence d'un peptide signal. Pour éviter l'accumulation de protéines mal repliées et la formation d'agrégats, le RE dispose d'un nombre important de protéines impliquées dans le repliement des protéines, de manière à assurer une capacité de repliement supérieure à la quantité de protéines naissantes entrant dans le RE. Le repliement des protéines est assuré par des protéines chaperonnes (figure 18). La fixation d'une protéine cliente à sa chaperonne empêche un mauvais repliement ou la formation d'agrégats. GRP78/BiP (Glucose-Related Protein 78/Binding immunoglobulin Protein) est la protéine la plus abondante du RE. Cette chaperonne a une forte affinité pour des séquences de 7-8 acides aminés hydrophobes présentes sur les protéines naissantes. Son interaction avec les protéines clientes est dépendante de l'ATP dont l'hydrolyse assure un événement du cycle d'association/dissociation (Gething, 1999; Melnick et al., 1994). Une fois partiellement repliées, les protéines clientes sont prises en charge par une autre chaperonne, GRP94 (Glucose-Related Protein 94), qui s'insère dans des crevasses de la protéine grâce à un doigt amphipathique.

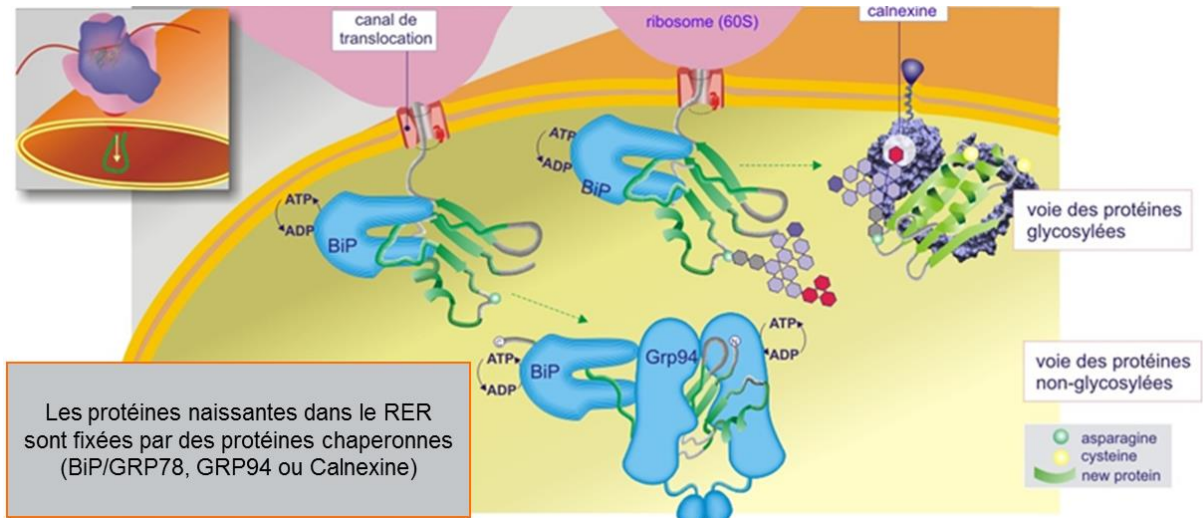


Figure 18 : Repliement des protéines naissantes dans le RE : fixation des chaperonnes

Les protéines naissantes sont repliées dans le RE grâce à l'assistance des protéines chaperonnes (notamment GRP78, GRP94 et calnexine). D'après <http://ressources.unisciel.fr>

Dans le processus de maturation des protéines, l'addition co-translationnelle d'un oligosaccharide, appelée N-glycosylation, est spécifique du RE. Cet oligosaccharide qui est composé de 14 résidus glucidiques comprenant 2 acétylglucosamines, 9 mannoses et 3 glucoses, est ajouté sur le groupement NH_2 d'un résidu asparagine par l'oligosaccharyltransférase (OST) (Burda et al., 1999). Ce processus de N-glycosylation est primordial puisqu'il joue un rôle dans l'adressage, la maturation et dans le contrôle qualité du repliement correct des protéines en empêchant notamment la translocation des protéines dans le cytoplasme tant que les protéines ne sont pas correctement repliées (Wormald and Dwek, 1999). Les résidus glucoses sont ensuite enlevés successivement et de manière réversible par les α -glucosidases I et II. Seule la protéine monoglucosylée est reconnue par les chaperonnes calnexine ou calréticuline (Hammond et al., 1994), qui permettent le repliement protéique et la rétention des protéines mal conformées (Williams, 2006). Lorsque la protéine aura atteint un certain degré de repliement, le dernier glucose est éliminé par l' α -glucosidase II. Si la protéine n'a pas atteint son état de repliement définitif (appelé « native fold »), elle est reconnue par la glucosyltransférase GGT (par reconnaissance de séquences hydrophobes et du N-acétylglucosamine uniquement accessible sur les protéines mal repliées), reglucosylée en position 1 et de nouveau fixée par les chaperonnes calnexine ou calréticuline (Sousa et al., 1992; Taylor et al., 2004). Ce cycle peut se répéter plusieurs fois jusqu'à ce que la protéine soit correctement repliée ou dégradée (en cas de repliement incorrect persistant) et constitue une étape importante du contrôle qualité du repliement des protéines (Ireland et al., 2006).

Deux systèmes de dégradation des protéines coopèrent dans le RE, la voie ERAD (pour Endoplasmic Reticulum-Associated protein Degradation) qui est majoritaire et dégrade

les protéines solubles, et la macroautophagie qui permet de dégrader les agrégats de protéines non solubles (Bernales et al., 2006). Les protéines N-glycosylées mal repliées sont transloquées dans le cytoplasme via le canal Sec61 α , sont poly-ubiquitinilées puis reconnues et détruite par le protéasome (Jarosch et al., 2003; McCracken and Brodsky, 2005).

III. Le stress du réticulum endoplasmique

Les altérations des fonctions physiologiques du RE, telles qu'une modification de l'homéostasie calcique intraluminale, un stress oxydant ou un dysfonctionnement de la N-glycosylation des protéines, provoquent l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE, ce qui déclenche une réponse appelée stress RE. En réponse au stress RE, des voies de signalisation regroupées sous le terme Unfolded Protein Response (UPR) sont activées.

A. La réponse UPR

La réponse UPR est un mécanisme adaptatif permettant de rétablir l'homéostasie du RE. L'activation de la réponse UPR a pour but (i) de diminuer la synthèse générale des protéines afin de réduire l'accumulation de protéines dans la lumière du RE, (ii) d'augmenter la synthèse des protéines chaperonnes afin d'optimiser le repliement des protéines, et (iii) d'augmenter la traduction des protéines impliquées dans la machinerie de dégradation des protéines associées au RE (ERAD) afin de désengorger le RE (Schröder and Kaufman, 2005). La réponse UPR se caractérise par l'activation de trois senseurs du RE : PERK (Protein kinase RNA (PKR)-like ER Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor- 6) et IRE1 (Inositol-REquiring protein-1). En absence de stress, ces senseurs transmembranaires sont maintenus dans un état inactif via leur association à la chaperonne BiP/GRP78. Lors d'un stress RE, la protéine BiP/GRP78, en qualité de chaperonne, s'associe préférentiellement aux protéines mal conformées et se dissocie de PERK, IRE1 et ATF6, conduisant ainsi à leur activation (Bertolotti et al., 2000). La figure 19 illustre les mécanismes moléculaires déclenchés lors de la réponse UPR.

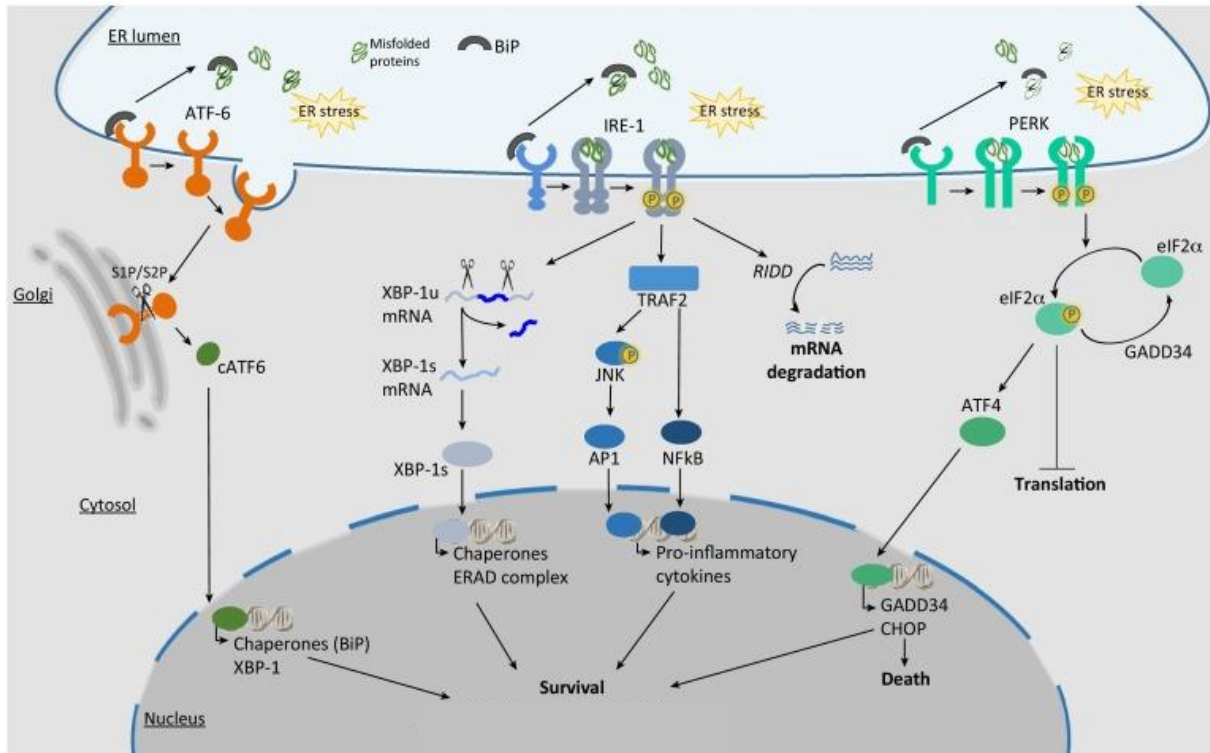


Figure 19 : Activation de la voie UPR en réponse au stress RE (Vanacker et al., 2017)

La réponse UPR est médiée par trois senseurs : ATF6, IRE1 et PERK. En absence de stress RE, l'activation des trois senseurs est empêchée par leur fixation à la protéine chaperonne BiP/GRP78. En réponse au stress RE, BiP/GRP78 va préférentiellement se fixer aux protéines mal repliées entraînant la libération des trois senseurs et leur activation. PERK va alors se dimériser et s'autophosphoryler activant son domaine kinase qui phosphoryle eIF2 α , ce qui diminue la majorité des synthèses protéiques de novo mais permet l'expression d'ATF4, un facteur de transcription régulant des gènes de réponse au stress RE. ATF6 migre vers le Golgi où elle est clivée par les protéases S1P et S2P, son extrémité N-terminale transloque au noyau pour activer la transcription gène codant pour XBP1, ainsi que de gènes impliqués dans la production de protéines chaperonnes et d'acteurs de la voie ERAD. La dimérisation et l'autophosphorylation d'IRE1 α activent ses fonctions de kinase et d'endoribonucléase requises pour épisser le mRNA d'XPB1 et générer le facteur de transcription XBP1s actif. XBP1s contrôle un large éventail de gènes impliqués dans le repliement et le contrôle qualité des protéines, dans la biogénèse RE/Golgi, dans le système ERAD, l'homéostasie redox et la réponse au stress oxydatif.

1. La branche ATF6

ATF6 est une glycoprotéine transmembranaire de 90kDa. La dissociation de BiP/GRP78 d'ATF6 permet à ce facteur de transcription de migrer vers l'appareil de Golgi où les protéases S1P et S2P (« site-1 protease » et « site-2 protease ») clivent son domaine N-terminal (Shen et al., 2002). Le fragment N-terminal d'ATF6 migre alors dans le noyau pour réguler la transcription de gènes de la réponse UPR en se fixant aux séquences ERSE (ER Stress Response Element) ou CREs (ATF/Camp response elements) de leur promoteur. Il

permet, entres autres, l'expression de protéines impliquées dans la voie de dégradation des protéines du RE (voie ERAD), de protéines chaperonnes comme BiP/GRP78, GRP94 et PDIA6 et du gène codant pour XBP1u (unspliced X-Box Binding Protein 1) (Yoshida et al., 2001). En augmentant la transcription de protéines chaperonnes, la voie ATF6 permet donc d'augmenter la capacité de repliement du RE.

2. La branche IRE1

IRE1 est une protéine kinase transmembranaire du RE de 110 kDa. Le domaine C-terminal cytoplasmique d'IRE1 a la particularité de posséder une double activité enzymatique : une activité kinase et une activité endoribonucléase. En réponse au stress RE, la libération de BiP/GRP78 permet l'oligomérisation d'IRE1, sa trans-autophosphorylation et l'activation de son domaine endoribonucléase (Lee et al., 2008b). L'activité nucléasique d'IRE1 entraîne l'épissage d'un intron de 26 nucléotides de l'ARNm de XBP1u, préalablement transcrit par ATF6, pour produire la forme mature d'XBP1s (spliced XBP1 mRNA) qui sera traduite (Lee et al., 2003). XBP1s régule l'expression de gènes impliqués dans le repliement et le contrôle qualité des protéines, dans la biogénèse RE/Golgi et dans le système ERAD (Lee et al., 2003; Yamamoto et al., 2004). De plus, XBP1s est impliqué dans la régulation de gènes participant à l'homéostasie redox et à la réponse au stress oxydatif (Acosta-Alvear et al., 2007; Liu et al., 2009), suggérant que la branche IRE1 peut jouer un rôle dans la lutte contre le stress oxydatif et la protection contre les ROS (Reactive Oxygen Species). La voie IRE1/XBP1s permet donc la transcription de gènes permettant d'augmenter les capacités fonctionnelles de repliement du RE et de dégrader de manière plus efficace les protéines mal conformées.

3. La branche PERK

PERK est une sérine/thréonine kinase transmembranaire de 125 kDa. Lors d'un stress RE, la dissociation de PERK d'avec BiP/GRP78 active l'oligomérisation de PERK et permet sa trans-autophosphorylation. La phosphorylation de PERK induit son changement de conformation ce qui augmente son affinité pour le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (Marciniak et al., 2006). PERK phosphoryle la sérine 51 d'eIF2 α inhibant son activité GTPasique, ce qui réduit la quantité des complexes eIF2 α -ARNmet-GTP nécessaires à l'initiation de la traduction (Nika et al., 2001). La phosphorylation d'eIF2 α conduit à une inhibition générale de la synthèse des protéines permettant ainsi d'éviter une accumulation supplémentaire de protéines dans le RE. Bien qu'elle diminue de manière générale la synthèse des protéines, la phosphorylation d'eIF2 α permet également la traduction d'ARNm spécifiques grâce à la reconnaissance dans leur région 5' d'une petite phase ouverte de lecture, appelée μ ORF (micro Open Reading Frame), qui n'est pas traduite dans une situation physiologique. Le facteur de transcription ATF4 est notamment traduit en réponse à la phosphorylation

d'eIF2 α (Harding et al., 2003) et active l'expression de protéines impliquées dans le processus d'autophagie/mitophagie telles qu'ATG12, Beclin 1, LC3, dans le maintien du statut redox de la cellule telles que Hmox1 (heme oxygenase-1) et de GADD34 (Growth Arrest DNA Damage inducible protein 34) qui régule la phosphorylation d'eIF2 α . En effet, GADD34 s'associe à la phosphatase PP1C pour exercer un rétrocontrôle négatif de l'activation de la voie PERK en déphosphorylant eIF2 α (Brush et al., 2003). PERK phosphoryle également Nrf2 (Nuclear factor-E2-related factor 2), un facteur de transcription impliqué dans la réponse des cellules au stress oxydatif (Cullinan and Diehl, 2006). Nrf2 est maintenu inactif dans le cytoplasme en formant un complexe avec la protéine KEAP1 (Kelch-like E2-associated protein 1). La phosphorylation de Nrf2 entraîne la dissociation du complexe Nrf2/KEAP1 et l'accumulation de Nrf2 dans le noyau. Ce dernier se fixe sur les séquences ARE (Anti-oxidant Response Element) des promoteurs de gènes codant des enzymes détoxifiantes pour activer leur transcription (Ishii et al., 2000). La branche PERK se dissocie en deux voies : la voie PERK/eIF2 α /ATF4 et PERK/Nrf2 permettant de diminuer de manière globale la synthèse protéique et dans le même temps d'induire un programme transcriptionnel adapté à la régulation du statut redox de la cellule.

4. Relations entre les différentes branches de la voie UPR

Outre le lien que représente XBP1 entre les branches ATF6 et IRE1, d'autres protéines ont été impliquées dans la communication entre les différentes branches de la voie UPR. P58^{IPK} (Protein 58kDa Inhibitor of the eIF2 α Protein Kinases PKR), une protéine chaperonne de la famille des Hsp40, dont l'expression est activée par ATF6 en réponse au stress RE, déphosphoryle PERK et ainsi limite l'activation de cette branche en réponse au stress RE (Yan et al., 2002). Ce rétrocontrôle négatif permet d'éviter une suractivation délétère de PERK et joue ainsi un rôle protecteur en favorisant le retour à l'homéostasie (Rutkowski et al., 2007). Une autre étude montre dans le foie que la voie PERK/eIF2 α /ATF4 favorise la transcription d'ATF6 et son transport entre le Golgi et le RE (Teske et al., 2011).

Les micro ARN (MiR), sont des ARN non codants endogènes d'une taille moyenne de 22 nucléotides qui modulent l'expression des gènes en induisant la dégradation ou en inhibant la traduction des ARN. Plusieurs MiRs ont été identifiés comme régulateurs ou comme étant régulés par la réponse UPR (pour revue (Maurel and Chevet, 2013)). Parmi ces MiRs, certains participent à la communication entre les différentes branches de la voie UPR. Par exemple, le MiR-30c 2* est activé par la branche PERK et inhibe l'expression de XBP1. De plus, l'inhibition du MiR-214 par la voie UPR permet de lever l'inhibition de la traduction de l'ARNm d'ATF4. Plus récemment, il a été montré que le miR-424 inhibe la transcription d'ATF6 et d'IRE1. PERK est capable de réprimer le miR-424 afin de favoriser l'activation des deux autres branches de la réponse UPR (Gupta et al., 2015). Par ailleurs, l'activation de l'apoptose par le miR-216b

nécessite la coordination des branches PERK et IRE1. En effet, la branche PERK va activer la transcription du facteur de transcription CHOP (CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein) qui active à son tour le miR216b. Ce dernier va inhiber l'activation de c-Jun, membre de la voie IRE1, permettant ainsi l'activation de l'apoptose (Xu et al., 2016).

Les différentes interconnexions présentées ci-dessus entre les trois branches de la réponse UPR démontrent la complexité de cette réponse et mettent en évidence que ces branches peuvent se réguler mutuellement afin de moduler plus finement la réponse UPR. Les mécanismes de la réponse UPR sont donc très complexes et ne sont toujours pas totalement élucidés à ce jour.

IV. Stress RE, réponse UPR et autophagie

Comme nous venons de le voir, la réponse UPR est une réponse adaptative activée pour permettre un retour à l'homéostasie du RE. En participant à l'élimination des protéines mal repliées ou agrégées et des organites dysfonctionnels, l'autophagie contribue à cette réponse adaptative induite par le stress RE (par exemple) (Ding et al., 2007a, 2007b). Les trois branches de la réponse UPR ont été impliquées dans la régulation de l'induction, de la nucléation et de l'élongation des autophagosomes lors du processus autophagique (figure 20) (pour revue (Song et al., 2017a)).

A. Branche ATF6 et autophagie

Le facteur de transcription ATF6 est impliqué dans la régulation de l'autophagie grâce aux interactions qu'il possède avec des acteurs des deux autres branches. En effet, il a été montré qu'après son clivage et sa translocation dans le noyau ATF6 pouvait se lier au promoteur de CHOP et de XBP1 tous les deux impliqués dans la régulation de l'autophagie (voir ci-dessus) (figure 20). ATF6 régule donc indirectement l'autophagie via CHOP et XBP1 (Adachi et al., 2008; Guo et al., 2014; Hirsch et al., 2014; Song et al., 2017a).

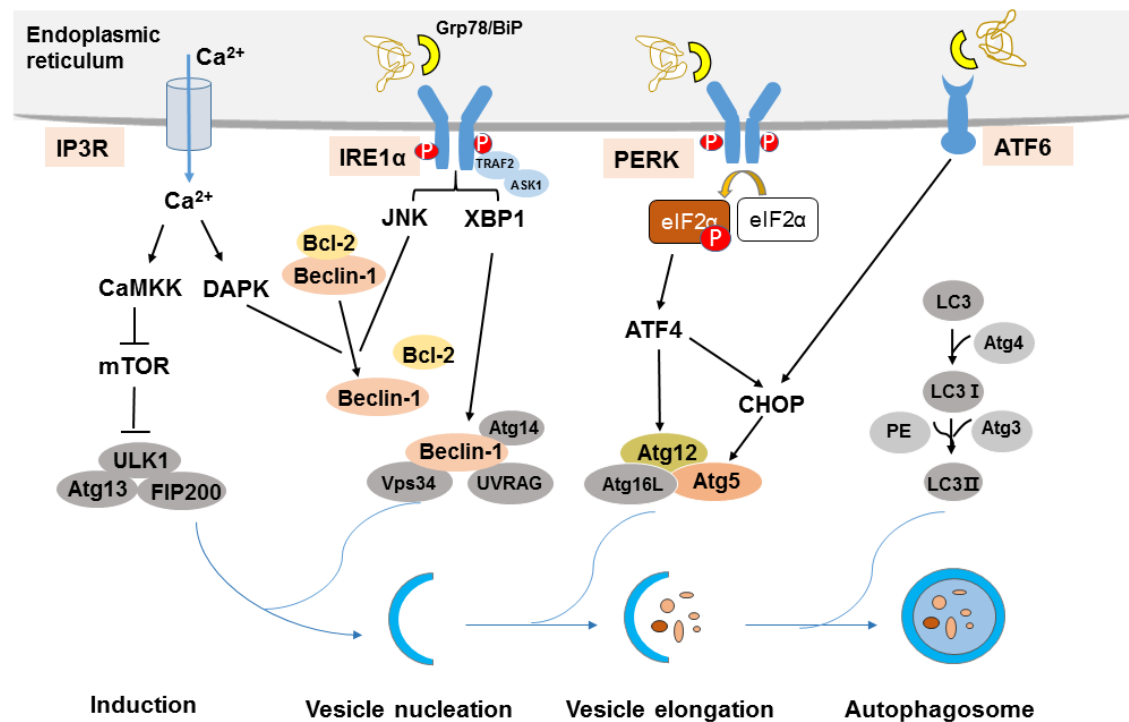


Figure 20 : Régulation de l'autophagie en réponse au stress RE (Song et al., 2017a)

Le stress RE peut induire l'autophagie via la libération de calcium ou via les trois branches de la réponse UPR (IRE1 α , PERK et ATF6). Le calcium libéré par le RE à travers le canal IP3R active une voie dépendante de la CamKK qui lève l'inhibition de mTOR sur le complexe ULK1. La libération de calcium active la kinase DAPK favorisant la phosphorylation de BECLIN 1. IRE1 α activé forme un complexe avec TRAF2 et ASK1, ce qui provoque l'activation de JNK. JNK phosphoryle Bcl-2 entraînant la dissociation du complexe BECLIN 1/Bcl-2. Une fois libérée BECLIN 1 forme un complexe avec PI3K pour favoriser la nucléation du phagophore. XBP1 déclenche également l'activation transcriptionnelle de BECLIN 1. PERK activée permet l'élongation du phagophore via l'activation transcriptionnelle des gènes de l'autophagie médiée par ATF4 et CHOP. ATF6 est impliqué indirectement dans la régulation de l'autophagie via CHOP et XBP1.

B. Branche IRE1 et autophagie

L'activation d'IRE1 entraîne son association avec TRAF2 et ASK1 permettant l'activation de JNK qui favorise l'autophagie (Gardner and Walter, 2011; Ron and Hubbard, 2008). JNK va se dimériser avec Bcl-2 perturbant le complexe BECLIN 1/Bcl-2 et libérant BECLIN 1. BECLIN 1 va pouvoir former un complexe avec la PI3K pour induire la nucléation du phagophore (Pattingre et al., 2005; Yamamoto et al., 1999) (figure 20). De plus, il a été montré que XBP1 participe à la régulation de l'autophagie en se liant et en activant BECLIN 1 (Hetz et al., 2009; Margariti et al., 2013).

C. Branche PERK et autophagie

La branche PERK est la plus impliquée des trois branches de la réponse UPR dans la régulation du processus autophagique car elle contrôle l'expression de nombreux gènes de l'autophagie (ATGs). L'activation de la kinase PERK conduit à la phosphorylation d'eIF2 α qui entraîne l'expression d'ATF4 qui à son tour entraîne l'expression de CHOP. B'chir et coll. ont mis en évidence trois classes de gènes d'autophagie en fonction de leur dépendance à ATF4, à CHOP ou à ces deux facteurs en même temps (figure 21). Ces gènes sont impliqués au niveau de la formation, de l'élongation et du bon fonctionnement de l'autophagosome (B'chir et al., 2013). Par exemple, ATF4 seul permet la transcription d'ATG12 et ATG16 et CHOP seul permet la transcription d'ATG5. Ces trois gènes forment le complexe ATG12/ATG5/ATG16 impliqué dans le processus d'élongation du phagophore. ATF4 et CHOP régulent ensemble l'expression de p62 et ATG7. Une autre étude montre que l'induction de la voie PERK entraîne l'activation de la protéine DDIT4 (DNA damage-inducible transcript 4) qui augmente l'activité de la kinase eEF2K (eukaryotic Elongation factor-2 kinase) conduisant à l'induction de l'autophagie protégeant les cellules contre le stress RE (Cheng et al., 2013).

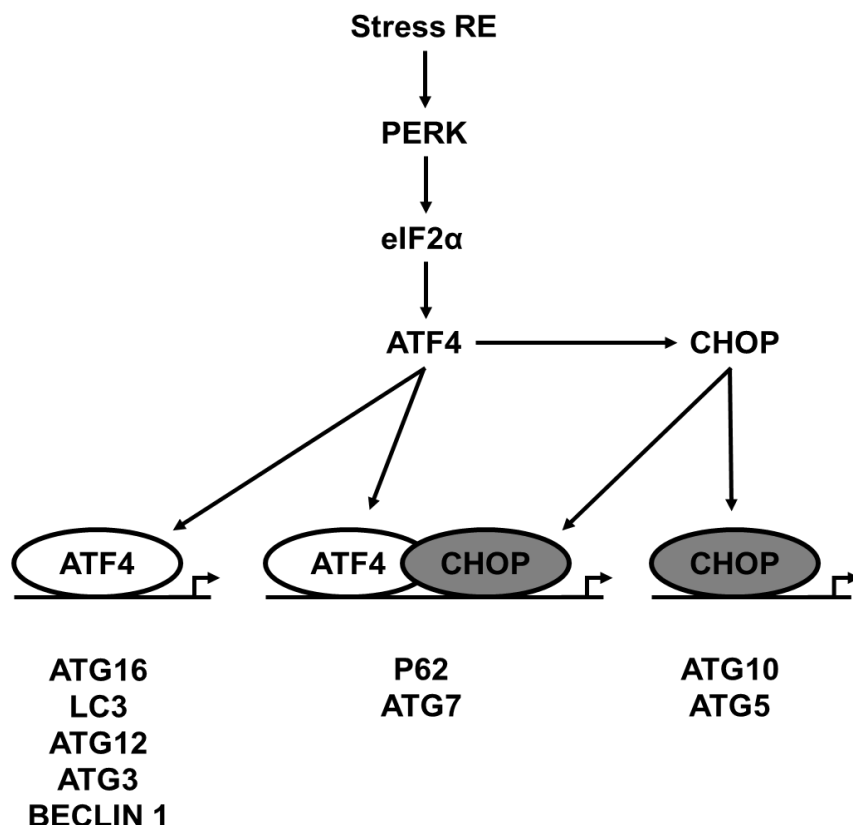


Figure 21 : Rôle de la voie de signalisation PERK/eIF2 α /ATF4 dans l'activation transcriptionnelle des gènes autophagiques en réponse au stress RE. Adapté d'après (B'chir et al., 2013).

D. Calcium et autophagie

En 1993, Gordon et son équipe montrent pour la première fois l'implication du calcium dans la régulation de l'autophagie. Ils suggèrent un rôle complexe pour le calcium car la chélation du calcium intracellulaire et extracellulaire ainsi que l'augmentation du calcium cytosolique inhibent l'autophagie (Gordon et al., 1993). Lors d'un stress RE, la libération du calcium du RE par le canal IP3R active la CAMKK (CamKK/AMPK-dependent pathway) qui lève l'inhibition de mTOR sur le complexe ULK1 entraînant l'induction de l'autophagie (figure 20) (Borodkina et al., 2016; Høyer-Hansen et al., 2007). De plus, la libération du calcium intraluminal entraîne l'activation de la kinase DAPK (Death-associated protein kinase) qui phosphoryle BECLIN 1, activant ainsi l'autophagie (Simon et al., 2016; Zalckvar et al., 2009).

V. Stress RE, réponse UPR et apoptose

L'activation du stress du RE a pour but le maintien de l'homéostasie cellulaire mais lorsque celui-ci est intense et/ou prolongé, la réponse UPR induit un programme de mort cellulaire par apoptose (figure 22). Même si suite à un stress RE, les mécanismes moléculaires responsables du « switch » de la réponse adaptative à la réponse apoptotique sont encore mal connus, les protéines clés de la réponse UPR ont été impliquées dans le déclenchement de cette mort cellulaire (Szegezdi et al., 2006).

1. Branche ATF6 et apoptose

En réponse à un stress RE sévère, la branche ATF6 contribue au déclenchement de l'apoptose en augmentant l'expression de la protéine pro-apoptotique WBP1 (WW domain Binding Protein) et la réduction de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (induced Myeloid Leukemia Cell differentiation), membre de la famille Bcl-2 (Morishima et al., 2011). ATF6 active également la transcription de CHOP, un facteur de transcription pro-apoptotique clé de la réponse UPR (Huang et al., 2018; Iurlaro and Muñoz-Pinedo, 2016).

2. Branche IRE1 et apoptose

La branche IRE1 contribue à l'apoptose induite par un stress RE prolongé en activant la voie TRAF2/JNK qui entraîne l'inhibition de Bcl-2 par phosphorylation (Huang et al., 2016; Urano et al., 2000). De plus, il a été démontré que la stimulation de l'activité RNase d'IRE1 induirait la dégradation par clivage de plusieurs MiRs impliqués dans la répression de l'expression de la caspase-2 (tels que miR-17, -34a, -96, et -125b), ce qui induirait une augmentation du niveau d'expression de cette caspase et activerait la voie mitochondriale de l'apoptose (Upton et al., 2012). La branche IRE1, en permettant la production du facteur de transcription XBP1s, permet également l'expression du facteur pro-apoptotique CHOP (Oyadomari and Mori, 2004). Enfin, chez les rongeurs il a été montré que le complexe

IRE1/TRAF2 est une plateforme permettant le recrutement et l'activation de la caspase-12 (Yoneda et al., 2001).

3. Branche PERK et apoptose

L'activation de la kinase PERK conduit à la phosphorylation d'eIF2 α qui entraîne l'expression d'ATF4 qui à son tour induit l'expression de CHOP, le principal facteur pro-apoptotique de la voie UPR en réponse au stress RE (Oyadomari and Mori, 2004). Ce facteur de transcription active l'apoptose à la fois en inhibant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (McCullough et al., 2001) et en activant l'expression des protéines pro-apoptotiques Bim (Puthalakath et al., 2007), Puma (Cazanave et al., 2010; Wang et al., 2018a), ERO1 α (Li et al., 2009; Timmins et al., 2009), TRB3 (Tribbles Homolog 3 ; (Ohoka et al., 2005)) et GADD34 (Marciniak et al., 2004).

4. Caspase-12 et apoptose

Chez les rongeurs, il a été montré que la procaspase-12, localisée dans la membrane du RE, est activée spécifiquement en réponse au stress RE par les calpaïnes (protéases à cystéine dépendantes du calcium) en présence de Ca²⁺ ou par la voie de signalisation dépendante de IRE1 (Szegezdi et al., 2006; Tong et al., 2016). Une fois activée, la caspase-12 est transloquée du RE vers le cytosol où elle active les caspases-9 et -3 par clivage induisant ainsi l'apoptose (Minamino and Kitakaze, 2010). Néanmoins, d'autres travaux ont mis en évidence dans des cellules de carcinome et de mélanome murins, que l'absence de caspase-12 n'empêche pas la mort des cellules induite par le stress RE, suggérant ainsi que la caspase-12 ne serait pas indispensable au processus apoptotique induit par un stress RE (Jimbo et al., 2003; Kalai et al., 2003). De plus, chez l'homme la caspase-12 est non fonctionnelle à cause de différentes mutations (Saleh et al., 2004), et pourrait être remplacée par la caspase 4 (Hitomi et al., 2004).

5. Calcium et apoptose

Il existe des interactions locales physiques d'origine protéique entre la mitochondrie et le RE qui permettent la juxtaposition étroite des deux organites (Csordás et al., 2006), et génèrent des microenvironnements appelés microdomaines ou MAM (mitochondria associated membranes) favorisant les échanges, en particulier les flux calciques, entre le RE et les mitochondries (Hayashi et al., 2009). En réponse au stress RE, le nombre de ces contacts RE/mitochondrie est augmenté (Csordás et al., 2006), ce qui favorise les échanges et en particulier les transferts calciques. Dans un premier temps, ces transferts de calcium du RE vers la mitochondrie stimulent la respiration mitochondriale (Bravo et al., 2011), mais s'ils sont trop importants ou maintenus sur une durée prolongée, ils déclenchent la voie

mitochondriale de l'apoptose. En effet, en réponse au stress RE, l'ouverture prolongée de l'IP3R ou du RYR, entraîne une accumulation massive de Ca^{2+} du RE vers la matrice mitochondriale conduisant à l'ouverture du PTP, à la perméabilisation des membranes mitochondriales et à l'apoptose (Zoratti and Szabò, 1995).

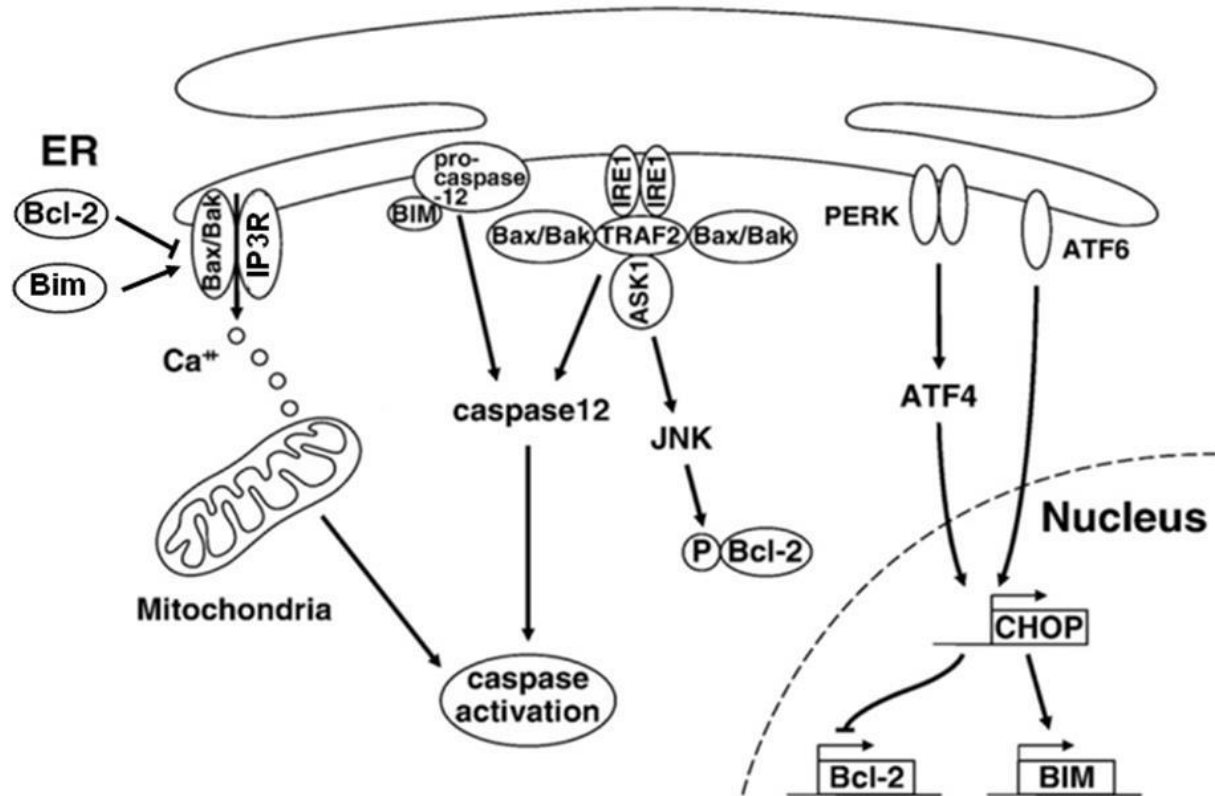


Figure 22 : Stress RE, réponse UPR et apoptose

IRE1 interagit avec la protéine adaptatrice TRAF2 et ASK1, ce qui entraîne la phosphorylation de JNK. Cette dernière favorise l'apoptose par phosphorylation et inhibition de Bcl-2. CHOP réprime l'expression de Bcl-2 et active celle de Bim qui migre au RE. Bak et Bax, dans la membrane du RE, s'oligomérisent et permettent un relargage de calcium dans le cytosol, ce qui active les voies mitochondriales de l'apoptose, dépendante et indépendante des caspases. D'après (Minamino and Kitakaze, 2010)

VI. Le stress RE dans les pathologies cardiaques

Alors que le stress RE est associé depuis plus de 20 ans à différentes pathologies telles que le diabète, certains cancers, ou encore les maladies neurodégénératives, son étude dans le domaine des maladies cardiovasculaires est relativement récente puisque la première publication date de 2004 (Okada et al., 2004). Cette étude démontre que le stress RE est activé dans un modèle de surcharge de pression induite par une constriction de l'aorte transverse (TAC) chez la souris. Après une semaine de TAC, l'hypertrophie, qui témoigne du remodelage du myocarde, est associée à une augmentation de l'expression de différents marqueurs de stress RE tels que BiP/GRP78 et GRP94. A ce stade, l'apoptose n'est pas

déclenchée et la fonction cardiaque est préservée. Après 4 semaines, l'hypertrophie devient plus importante, le facteur pro-apoptotique de la réponse au stress RE, CHOP est fortement exprimé, l'apoptose est induite, et la fraction d'éjection est diminuée, témoignant de la transition du stade compensé vers un stade pathologique. Ces résultats sont les premiers à avoir suggéré un lien entre le stress RE et le développement de la pathologie cardiaque. Depuis, différentes études ont mis en évidence que le stress RE est impliqué dans le développement de la majorité des pathologies cardiaques. Par exemple, il est connu que de nombreuses pathologies cardiaques entraînant une hypertrophie et une insuffisance cardiaque provoquent la réactivation du programme de gènes fœtaux. Or, de nombreux gènes fœtaux contiennent des promoteurs qui sont activés lors d'un stress RE comme MEF2c (myocyte enhancer factor-2), NFAT (nuclear factor of the activated T cells) ou GATA impliqué dans le remodelage cardiaque (Groenendyk et al., 2010). D'autre part, la mort cellulaire des cardiomyocytes induite par ischémie est associée au stress RE, mais peut être diminuée par un préconditionnement induisant la chaperonne GRP78 (Glembotski, 2008; Martindale et al., 2006; Shintani-Ishida et al., 2006). Dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le cochon d'inde, le stress RE est activé et conduit à l'apoptose, ce qui contribue au développement de la pathologie cardiaque (Xin et al., 2011). Chez la souris, une mutation du récepteur KDEL, impliqué dans le transport rétrograde des protéines du Golgi au RE, induit un stress RE dans tout l'organisme. Néanmoins, le principal phénotype observé dans ce modèle est une cardiomyopathie dilatée, soulignant la sensibilité du cœur au stress RE (Hamada et al., 2004). Par ailleurs, en cas d'hypertrophie cardiaque ou de cardiomyopathie dilatée, la voie ATF6 est activée permettant d'augmenter la production de protéines chaperonnes (Papp et al., 2008). Une hyperstimulation des récepteurs β -adrénergiques chez le rat et la souris, modèle connu pour induire une dysfonction cardiaque, est également associée à un stress RE (Ayala et al., 2012; Prola et al., 2016; Zhuo et al., 2013). Les maladies cardiaques auto-immunes ont également été associées à une augmentation de l'expression de marqueurs de stress RE (Chung et al., 2011). Dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque congestive l'utilisation de β -bloquants restaure l'homéostasie du RE et améliore significativement la fonction cardiaque en diminuant le stress RE (George et al., 2011). Enfin, l'utilisation de drogues anti-cancéreuses telles que le nilotinib (Lekes et al., 2016), la doxorubicine (Fu et al., 2016) ou le cisplatine (Chowdhury et al., 2016) entraîne une cardiotoxicité associée au stress RE.

Chez l'Homme, plusieurs études ont confirmé l'implication du stress RE dans les situations pathologiques cardiaques. Par exemple, chez des patients ayant subi un infarctus, une augmentation de l'expression de PDI (Protein Disulfide Isomerase), un marqueur du stress RE, est observée dans les cardiomyocytes dans la zone bordante de l'infarctus (Severino et al., 2007). De plus, chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque avancée, une augmentation de l'expression de BiP/GRP78 et de XBP1s et de la phosphorylation d'eIF2 α a

été mise en évidence (Castillero et al., 2015). Enfin, une augmentation du stress RE a été mise en évidence chez des patients atteints de fibrillation auriculaire persistante (Wiersma et al., 2017).

En conclusion, l'implication du stress RE dans le développement des pathologies cardiaques est désormais reconnue et il est admis qu'un stress RE modéré déclenche des réponses bénéfiques alors qu'un stress RE plus sévère ou prolongé provoque l'apoptose des cardiomyocytes et aggrave la dysfonction cardiaque (Liu and Dudley, 2015a; Minamino and Kitakaze, 2010; Sozen et al., 2014).

A. Stress RE bénéfique et pathologies cardiaques

Différentes études ont démontré que l'activation modérée de la voie UPR en réponse à un stress RE court ou peu intense est bénéfique dans les maladies cardiovasculaires. Par exemple, la protection de souris invalidées pour la cyclophiline D contre les atteintes cardiaques induites par l'ischémie-reperfusion est associée à un stress RE bénéfique et l'inhibition de ce stress RE empêche la protection des cardiomyocytes (Belaidi et al., 2013). Par ailleurs, la branche IRE1/XBP1 de l'UPR semble avoir un rôle protecteur dans l'ischémie. En effet, dans des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* d'ischémie une induction de XBP1 et de BiP/GRP78 a été observée (Qi et al., 2007; Thuerauf et al., 2006). Cette augmentation est aussi retrouvée dans des cœurs humains ischémiques (Sawada et al., 2010). De plus, l'invalidation cardiaque spécifique de XBP1 chez des souris ayant subi une ischémie-reperfusion entraîne un infarctus du myocarde plus important, une altération de la fonction cardiaque et un remodelage hypertrophique. À l'inverse, les souris transgéniques surexprimant XBP1 présentent un infarctus réduit et une amélioration significative de la fonction cardiaque, soulignant le rôle protecteur de XBP1 dans les cardiomyocytes (Wang et al., 2014c).

Les effets cardioprotecteurs de la réponse UPR sont principalement associés à l'induction de protéines chaperonnes améliorant le repliement des protéines. En effet, des cardiomyocytes soumis à une hypoxie ou une carence en nutriments présentent une expression importante d'ATF6. En outre, la surexpression cardiaque spécifique d'une forme activée d'ATF6 chez la souris permet une augmentation de l'expression des chaperonnes BiP/GRP78 et GRP94 ainsi qu'une protection contre les lésions tissulaires et contre la mort cellulaire induites par l'ischémie-reperfusion (Martindale et al., 2006). Chez des patients ayant subi un infarctus, il a été observé dans les cardiomyocytes proches de la zone infarctée que l'augmentation de l'expression de PDI est inversement proportionnelle à l'apoptose (Severino et al., 2007). De plus, dans un modèle d'insuffisance cardiaque induite par une surcharge de pression (TAC), la surexpression de PDI, une chaperonne de la réponse UPR, est

cardioprotectrice et protège de la dysfonction cardiaque. Enfin, la surexpression de la chaperonne GRP94 diminue la mort des cardiomyocytes induite par une surcharge de calcium ou une ischémie (Vitadello et al., 2003).

B. Modulation du stress RE et pathologies cardiaques

Différents travaux de la littérature montrent que l'inactivation d'acteurs de la réponse UPR protège la fonction cardiaque, démontrant le caractère parfois délétère du stress RE. Par exemple, en réponse à une surcharge de pression, des souris invalidées pour le facteur pro-apoptotique CHOP ou pour la kinase PERK développent moins d'hypertrophie, moins de fibrose et leur fonction cardiaque est préservée par rapport aux souris sauvages (Fu et al., 2010; Liu et al., 2014). Ces mêmes souris sont également protégées de la mort cellulaire, de l'inflammation et du stress oxydant induits dans un modèle d'ischémie-reperfusion (Miyazaki et al., 2011). De plus, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques dans des myocytes ventriculaires de rat induit un stress RE qui s'accompagne d'apoptose (Dalal et al., 2012), alors que des antagonistes des récepteurs β -adrénergiques (metoprolol ou propranolol) diminuent le stress RE et atténuent l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque (Ni et al., 2011).

Il apparaît donc qu'un stress RE lorsqu'il est aigu ou chronique est particulièrement délétère pour la fonction cardiaque notamment via l'induction du processus d'apoptose. Pour protéger le myocarde, la stratégie thérapeutique la plus intéressante consisterait donc à moduler la réponse UPR de manière à favoriser ses aspects adaptatifs et bénéfiques (pour revue (Wang et al., 2017)). Ainsi, il a été démontré qu'un traitement par des chaperonnes chimiques telles que l'acide Tauroursodeoxycholique (TUDCA) ou le sodium 4-phenyl-butyrate (PBA), qui limitent le stress RE, diminue l'apoptose, l'hypertrophie et limite la perturbation de la fonction cardiaque induite par l'ischémie (Ayala et al., 2012; Ceylan-Isik et al., 2011; Park et al., 2012) ou par un régime riche en acide gras (Turdi et al., 2013, 2016). D'autre part, le salubrinal, une molécule décrite comme inhibant la branche PERK de la voie UPR, protège les rats de la dysfonction cardiaque induite par une surcharge de pression ou par une hyperstimulation des récepteurs β -adrénergiques (Dalal et al., 2012; Rani et al., 2017). Dans un modèle d'insuffisance du myocarde, le salubrinal augmente considérablement l'expression de BiP/GRP78 et protège les cardiomyocytes de l'apoptose induite par le stress RE (Li et al., 2015). Récemment, l'inhibition de l'expression de XBP1 par les miR-214 et miR-30 a été associée au développement d'une hypertrophie et d'une insuffisance cardiaque (Duan et al., 2015).

D'autres molécules cardioprotectrices ont été mises en évidence comme les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II qui diminuent l'atteinte cardiaque en atténuant l'apoptose induite par le stress RE. Par exemple, le telmisartan diminue l'expression de BiP/GRP78, de CHOP, de la caspase-12 et de JNK chez des rats ayant subi une constriction

de l'aorte et l'olmesartan diminue l'expression de BiP/GRP78, de la caspase-12 et de JNK dans des cardiomyocytes de rats insuffisant cardiaque (Guan et al., 2011; Sukumaran et al., 2011). En outre, le calcitriol et le paricalcitol, les agonistes des récepteurs de la vitamine D, protègent de l'insuffisance du myocarde en inhibant l'expression de la caspase-12 et de CHOP chez la souris (Yao et al., 2014). Différentes molécules dont l'effet cardioprotecteur est associé à une inhibition du stress RE sont listées dans le tableau 2.

Molécules	Cibles	Modèles	Références
Métoprolol	BiP/GRP78, XBP1, CaMKII, CHOP, p-eIF2 α	Insuffisance cardiaque	(Ni et al., 2011)
Propranolol	BiP/GRP78, XBP1, CaMKII, CHOP	Insuffisance cardiaque	(Ni et al., 2011)
Telmisartan	BiP/GRP78, CHOP, Caspase-12, p-JNK	Constriction de l'aorte abdominale	(Guan et al., 2011)
Apeline-13	CHOP, Caspase-12, p-JNK	Ischémie reperfusion	(Tao et al., 2011)
Théaflavine	ATF3, ATF6, p-eIF2 α	Hyperhomocystéinémie	(San Cheang et al., 2015)
Berberine	ATF3, ATF6, p-eIF2 α , XBP1	Hypertension	(Liu et al., 2015)
Acide 4-phenylbutyrique	BiP/GRP78, p-PERK, p-eIF2 α	Hypertrophie cardiaque avec fibrose	(Park et al., 2012)
Metformine	ATF6, ATF3, eIF2 α	Athérosclérose	(Cheang et al., 2014)
Calcitriol	Caspase-12, CHOP	Ischémie reperfusion	(Yao et al., 2014)
Paricalcitol	Caspase-12, CHOP	Ischémie reperfusion	(Yao et al., 2014)
22α-hydroxycholestérol	Caspase-12, CHOP	Infarctus du myocarde	(He et al., 2014)
GW3965	Caspase-12, CHOP	Infarctus du myocarde	(He et al., 2014)
Salubrinal	eIF2 α	Hypertension et infarctus du myocarde	(Li et al., 2015)
Cyclosporine A	CaN, calcium	Hypertrophie cardiaque	(Fu et al., 1999)
Olmesartan	BiP/GRP78, caspase-12, p-JNK	Insuffisance cardiaque	(Sukumaran et al., 2011)
Atorvastatine	BiP/GRP78, caspase-12, CHOP	Infarctus du myocarde	(Song et al., 2011)
Kaempférol	BiP/GRP78, ATF6, IRE1, CHOP, p-eIF2 α	Ischémie reperfusion	(Kim et al., 2008a)
Darbépoétine	BiP/GRP78, CHOP	Cardiomyopathie auto-immune	(Mao et al., 2008)
Valsartan	CHOP	Cardiomyopathie dilatée	(Wu et al., 2011)
Klotho	BiP/GRP78, CHOP, HSP47	Hyperstimulation des récepteurs β -adrénergiques (isoproterenol)	(Song et al., 2013)

Molécules	Cibles	Modèles	Références
Ginseng américain	BiP/GRP78, CHOP	Infarctus du myocarde	(Xue et al., 2013)
Corydalis	BiP/GRP78, CHOP	Infarctus du myocarde	(Xue et al., 2013)
Pravastatine	CHOP, eIF2 α	Constriction de l'aorte transverse	(Zhao et al., 2008a)
Sulfide d'hydrogène	CHOP, BiP/GRP78, caspase-12	Hyperhomocystéinémie	(Wei et al., 2010)
Fasudil	CHOP, caspase-12, JNK	Ischémie reperfusion	(Li et al., 2012)
Gypenoside	CHOP	Ischémie reperfusion	(Yu et al., 2016a)
Neuregulin-1	BiP/GRP78, CHOP, caspase-12	Ischémie reperfusion	(Fang et al., 2016)
Nicorandil	CHOP, BiP/GRP78	Ischémie reperfusion	(Wu et al., 2015)
Icariine	BiP/GRP78, GRP94, CHOP	Tunicamycine	(Zhang et al., 2013b)
O-GlcNAc	CHOP	Ischémie reperfusion et tunicamycine	(Ngoh et al., 2009)
Salusins	BiP/GRP78, caspase-12, CHOP	Infarctus du myocarde	(Wang et al., 2012a)
Baicaline	CHOP	Tunicamycine	(Shen et al., 2014)
Guanabenz	eIF2 α , BiP/GRP78, CHOP	Tunicamycine	(Neuber et al., 2014)
Exendin 4	BiP/GRP78, CHOP	Hyperglycémie	(Younce et al., 2013)
Argirein	BiP/GRP78, PERK	Streptozotocine	(Shi et al., 2013)
CYP2J2	BiP/GRP78, CHOP, ATF6, PERK, IRE1	Isoprotérénol et angiotensine II	(Wang et al., 2014b)
5-Methoxytryptophane	ERO1L, PERK, calnexine	Ischémie reperfusion	(Chou and Chan, 2014)
Adiponectine	IRE1, CHOP, JNK, p38 MAPK, caspase-12	Hypoxie chronique	(Ding et al., 2014)
Elatoside C	BiP/GRP78, CHOP, caspase-12, JNK	Hypoxie-réoxygénation	(Wang et al., 2014a)
Curcumin	BiP/GRP78, CHOP, caspase-12, JNK	Myocardite auto-immune	(Mito et al., 2011)
Empagliflozine	BiP/GRP78, CHOP, caspase-12, XBP1, ATF4, TRAF2	Cardiomyopathie diabétique	(Zhou and Wu, 2017)
Ginkgolide	IRE1, XBP1, JNK	Infarctus du myocarde	(Wang et al., 2016c)
Resveratrol	PERK, eIF2 α , ATF6, CHOP	Streptozotocine/diabète	(Guo et al., 2015)
Acide ursolique	PERK, eIF2 α , CHOP	Choc thermique	(Yang et al., 2014)
Stac-3	p-eIF2 α	Tunicamycin	(Prola et al., 2017)

Tableau 2 : Molécules dont les effets cardioprotecteurs sont liés à une diminution du stress RE

L'ensemble de ces études a permis de démontrer l'implication et l'importance du stress RE dans le développement des maladies cardiaques. Nous avons vu que le stress RE peut dans certains cas être bénéfique et s'opposer au développement de la pathologie notamment en induisant un processus d'autophagie et dans d'autres cas être délétère et favoriser le développement de la maladie via l'induction de l'apoptose. Ces résultats ont permis l'émergence des notions de stress RE adaptatif dans le cadre d'un stress RE modéré et de stress RE délétère lorsque le stress RE est intense ou chronique. Ainsi, l'objectif actuel des recherches sur le stress RE en physiopathologie cardiaque vise non pas à inhiber la réponse au stress RE mais plutôt à la moduler, de manière à conserver les réponses adaptatives bénéfiques tout en limitant la survenue de l'apoptose délétère. Dans le but d'identifier de nouveaux régulateurs du stress RE dans le coeur, je me suis intéressée en particulier à la capacité de la désacétylase SIRT1 à moduler la réponse des cardiomyocytes au stress RE.

Partie 5 : Généralités sur les sirtuines

A. Historique

Le premier gène de la famille des sirtuines Sir2 (Silent information regulator 2) a été découvert chez la levure *S.cerevisiae* en 1979 (Klar et al., 1979) et fut d'abord appelé MAR1 (pour Mating-type Regulator 1). Ce gène a été identifié en étudiant des mutations spontanées causant la stérilité et entraînant une levée de l'inhibition de certains loci de type HMR et HML situés à proximité de télomères. Ces travaux ont été complétés par la découverte d'autres mutations entraînant également la stérilité et l'ensemble de cette famille de gènes a été renommés SIR (1-4) pour Silent Information Regulator (Rine and Herskowitz, 1987). L'engouement pour les sirtuines vient d'un article publié dans Science en 2000 démontrant que chez la levure les effets bénéfiques de la restriction calorique sur la longévité sont dépendants de Sir2 α (Lin et al., 2000). Depuis, l'allongement de la durée de vie par restriction calorique a été démontrée dans des organismes de taxons très différents tels que la drosophile (Mair et al., 2003), le ver (Lakowski and Hekimi, 1998), les rongeurs (Weindruch and Walford, 1982) et les primates (Mattison et al., 2007, 2017).

B. Les différentes isoformes de la famille des sirtuines

Chez les mammifères, cette famille comprend sept isoformes (SIRT1 à 7) (Haigis and Sinclair, 2010; Michan and Sinclair, 2007). Ces isoformes font partie de la famille des histones désacétylases de classe 3 (HDACs), et qui contrairement aux HDACs de classe 1 et 2, utilise le cofacteur NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide) comme substrat. Elles ont en commun une séquence conservée de 275 acides aminés correspondant au domaine portant l'activité catalytique. Les domaines N et C terminaux sont de longueurs et de séquences variables conférant aux sirtuines différentes fonctions et différentes localisations cellulaires (tableau 3). La compartimentation des sirtuines peut être modifiée durant des étapes spécifiques du développement ou lors d'un stress cellulaire. Des études ont ainsi montré que SIRT1 est capable de transiter entre le noyau et le cytoplasme (Tanno et al., 2007). De façon similaire, SIRT3 migre entre le noyau et les mitochondries lorsque la cellule subit un stress (Scher et al., 2007).

Dans les cardiomyocytes, SIRT1 est principalement localisée dans le cytoplasme et dans le noyau (Sundaresan et al., 2011a). Cependant, Aquilano et ses collègues ont également montré par des expériences de microscopie confocale et de fractionnement cellulaire la présence de SIRT1 au niveau des mitochondries (Aquilano et al., 2010, 2013).

Noms	Localisation	Activité enzymatique	Processus	Principales cibles	Références
SIRT1	Cytoplasme Noyau Mitochondrie	Désacetylase	Métabolisme, biogénèse et fonction mitochondriale, réponse au stress oxydant, autophagie, apoptose, inflammation, stabilité du génome, réparation des dommages à l'ADN	PGC-1 α , FOXO1/3, p53, p300, NF- κ B, HIF-1 α , eIF2 α	(Haigis and Sinclair, 2010)
SIRT2	Cytoplasme	Désacetylase MonoADP-rybosyl-transferase	Nécrose programmée, prolifération, stabilité du génome, métabolisme mitochondrial	Tubuline, HIF-1 α , FOXO1, histone H4, Ang 2, HDAC6	(Oliveira et al., 2012)
SIRT3	Mitochondrie	Désacetylase MonoADP-rybosyl-transferase	Biogénèse, dynamique et métabolisme mitochondrial, réponse au stress oxydant	PGC-1 α , complexe 1 et 2 de la chaîne respiratoire, FOXO3, SOD2	(Ansari et al., 2017)
SIRT4	Mitochondrie	MonoADP-rybosyl-transferase	Réparation des dommages à l'ADN, métabolisme des acides gras, métabolisme mitochondrial, réponse à l'hypoxie	Glutamate déshydrogénase, pyruvate déshydrogénase, Bax	(Osborne et al., 2016)
SIRT5	Mitochondrie	Désacetylase Dessuccinylase Démalonylase Déglutarylase	Métabolisme mitochondrial, biogénèse mitochondriale, protection contre les espèces réactives de l'oxygène.	CPS1, Bcl, cytochrome c	(Gertz and Steegborn, 2010)
SIRT6	Noyau	Désacetylase MonoADP-rybosyl-transferase	Stabilité du génome et des télomères, expression du génome, réparation des dommages à l'ADN	Histones H3K9, ADNpolymerase β , TNF- α	(Kugel and Mostoslavsky, 2014)
SIRT7	Noyau	Désacétylase	Synthèse d'ARNt et d'ARNr, biogénèse des ribosomes, prolifération, morphologie de la chromatine, réparation des dommages à l'ADN	ARNpolymerase 1, histone H3, p53	(Kiran et al., 2015; Vazquez et al., 2017)

Tableau 3 : Localisations, activités enzymatiques, principales cibles et fonctions des différentes sirtuines

C. Activité de la sirtuine 1

SIRT1 catalyse le transfert du groupement acétyl d'une protéine au NAD⁺ produisant ainsi du 2-O-acetyl-ADP-ribose et du nicotinamide (NAM) (figure 23). Cette désacétylation qui a lieu sur un résidu lysine est une modification post-traductionnelle des protéines qui va avoir pour conséquence l'augmentation ou l'inhibition de l'activité de la protéine ainsi modifiée. SIRT1 a d'abord été considérée comme une histone désacétylase (Imai et al., 2000), mais en 2001, p53, une cible non-histone de SIRT1 a été découverte (Vaziri et al., 2001). Depuis, de nombreuses protéines cibles non-histones incluant entre autres PGC-1 α ou FOXO, ont été découvertes comme étant désacétylées par cette sirtuine.

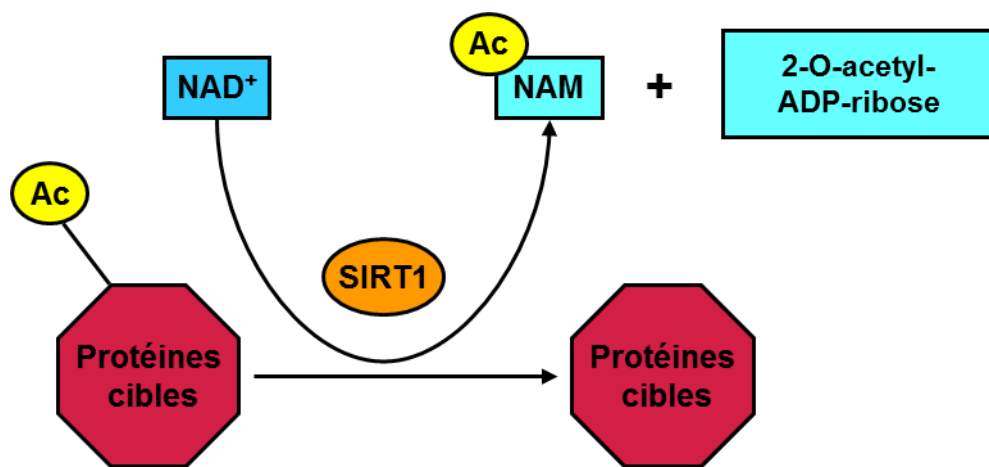


Figure 23 : Représentation schématique d'une réaction de désacétylation catalysée par SIRT1. SIRT1 catalyse le transfert d'un groupement acétyl d'une protéine au NAD⁺ produisant ainsi du 2-O-acetyl-ADP-ribose et du nicotinamide (NAM).

II. Régulation de l'expression et de l'activité de la sirtuine 1

Nous le verrons plus en détails ultérieurement mais SIRT1 participe à la régulation de multiples fonctions cellulaires fondamentales, telles que la biogenèse mitochondriale, le métabolisme, la réparation des dommages à l'ADN, la résistance au stress, l'apoptose et l'inflammation (Haigis and Sinclair, 2010). Par conséquent, des perturbations dans la régulation de l'expression ou de l'activité de SIRT1 ont été associées au développement de maladies majeures, comme le diabète, le cancer et les maladies cardiovasculaires (Cao et al., 2016; Lin and Fang, 2013; Matsushima and Sadoshima, 2015).

A. Régulation de l'expression de SIRT1

1. Régulation de la transcription de SIRT1

Un nombre important de protéines régulent directement l'expression de SIRT1 en se fixant sur son promoteur (tableau 4). Parmi ces protéines nous pouvons citer ATF4, dont l'expression est augmentée en réponse au stress RE, p53 activée en réponse au stress génotoxique ou Hu70 activée en réponse au stress oxydant. FOXO et CREB sont impliquées dans l'augmentation de la longévité induite par la restriction calorique en stimulant l'expression de SIRT1. Les membres de la famille C/EBP régulent l'expression de SIRT1 lors du vieillissement. Certains facteurs sont capables de réguler à la fois l'expression et l'activité de SIRT1. Par exemple, une augmentation de la disponibilité en NAD⁺ permet d'augmenter l'activité enzymatique de SIRT1 ainsi que son expression (Bai et al., 2011a; Rodgers et al., 2005).

Protéines	Modèle étudié	Régulation SIRT1	Rôle physiologique	Références
CREB	Cancer du foie	↑	Augmente l'expression de SIRT1 en réponse à la restriction calorique	(Noriega et al., 2011)
FOXO	Carcinome cervical	↑	Augmente l'expression de SIRT1 en réponse à la restriction calorique	(Nemoto et al., 2004)
PPARα/β/σ	Hépatocytes	↑	Augmente l'expression de SIRT1 favorisant les effets bénéfiques de la restriction calorique sur la longévité	(Hayashida et al., 2010; Okazaki et al., 2010)
chREBP	Cancer du foie	↓	Diminue l'expression de SIRT1 en réponse à un gavage	(Noriega et al., 2011)
PPARγ	Fibroblastes de cellule pulmonaire	↓	Diminue l'expression de SIRT1 favorisant la sénescence	(Han et al., 2010)
HIC1	Cancer des poumons	↓	Protège de l'apoptose induite par HIC1 et p53 en réponse aux dommages à l'ADN	(Tseng et al., 2009)
p53	Cellules d'estomac de singe	↑	Protège de l'apoptose et des dommages à l'ADN	(Chen et al., 2005)
E2F1	Cancer des poumons	↑	Protège de l'apoptose et des dommages à l'ADN	(Wang et al., 2006)
TLX	Cellules précurseurs de neurones	↑	Active la neurogénèse	(Iwahara et al., 2009)

Protéines	Modèle étudié	Régulation SIRT1	Rôle physiologique	Références
C/EBPα	Hépatocytes de souris âgées	↑	Protège des altérations du métabolisme lié à l'âge et favorise la prolifération des hépatocytes	(Jin et al., 2011)
C/EBPβ	Hépatocytes de souris âgées	↓	Diminue l'expression de SIRT1 aggravant les altérations du métabolisme lié à l'âge	(Jin et al., 2011)
BRCA1	Cancer des ovaires	↑	Inhibe la prolifération des cellules cancéreuses	(Li et al., 2014)
CLOCK/BMAL1	Hépatocyte	↑	Protège des altérations du métabolisme lié à un trouble des rythmes circadiens	(Zhou et al., 2014)
c-myc	Cancer du colon	↑	Inhibe la tumorigénèse	(Menssen et al., 2012)
Nkx2.5	Cardiomyocytes	↑	Protège de l'apoptose en réponse à un traitement à la doxorubicine	(Zheng et al., 2013)
ATF4	Cancer de l'estomac	↑	Protège de l'apoptose	(Zhu et al., 2012)
NFκB	Cancer rénal	↑	Protège de l'apoptose en réponse à l'inflammation	(Katto et al., 2013)
APE1/Ku70	Carcinome cervical	↑	Protège des dommages à l'ADN en réponse à un stress oxydant	(Antoniali et al., 2014)

Tableau 4 : Protéines modulant positivement ou négativement la transcription de SIRT1

2. Régulation de SIRT1 par les micro-ARNs

Plus de 20 micro-ARNs ont été identifiés dans différents tissus et organes comme étant capables de se lier à l'ARNm de SIRT1 et d'en limiter la traduction (Buler et al., 2016) (figure 24).

Parmi les 20 micro-ARNs, miR-34a est le premier à avoir été découvert et est le plus étudié. Il se lie à la région 3'UTR de SIRT1 avec une complémentarité partielle et supprime la traduction de l'ARNm de SIRT1 sans le dégrader (Yamakuchi et al., 2008). miR-34, en inhibant la transcription de l'enzyme NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransferase) responsable de la biosynthèse du NAD⁺, réduit la concentration en NAD⁺ et donc diminue également l'activité de SIRT1 (Choi et al., 2013). L'expression de SIRT1 est également régulée par HuR, une protéine connue pour se fixer sur des ARNm et pour en réguler la stabilité. Lors d'un stress oxydant HuR est phosphorylée par Chk2 entraînant la dissociation du complexe HuR-ARNm

SIRT1. Cette dissociation réduit la stabilité de l'ARNm SIRT1 et donc diminue son expression (Abdelmohsen et al., 2007). Par ailleurs, le miR-519 inhibe la transcription de HuR conduisant à la diminution de l'expression de SIRT1 (Abdelmohsen et al., 2008). Une étude récente a montré l'existence d'un ARN non codant appelé Sirt1 AS lncRNA pouvant se lier à l'ARNm de SIRT1 et entrer ainsi en compétition avec le miR-34a, ce qui limite l'inhibition de la traduction de SIRT1. Cet ARN stimule ainsi l'augmentation de l'expression de SIRT1 dans un modèle de cellules musculaires C2C12 entraînant la prolifération des myoblastes et l'inhibition de leur différenciation (Wang et al., 2016a). Au niveau cardiaque, miR-199a inhibe la traduction de l'ARNm de SIRT1, et lors de l'ischémie/reperfusion, une diminution du miR-199a a été corrélée à une augmentation de la traduction de SIRT1 (Rane et al., 2009).

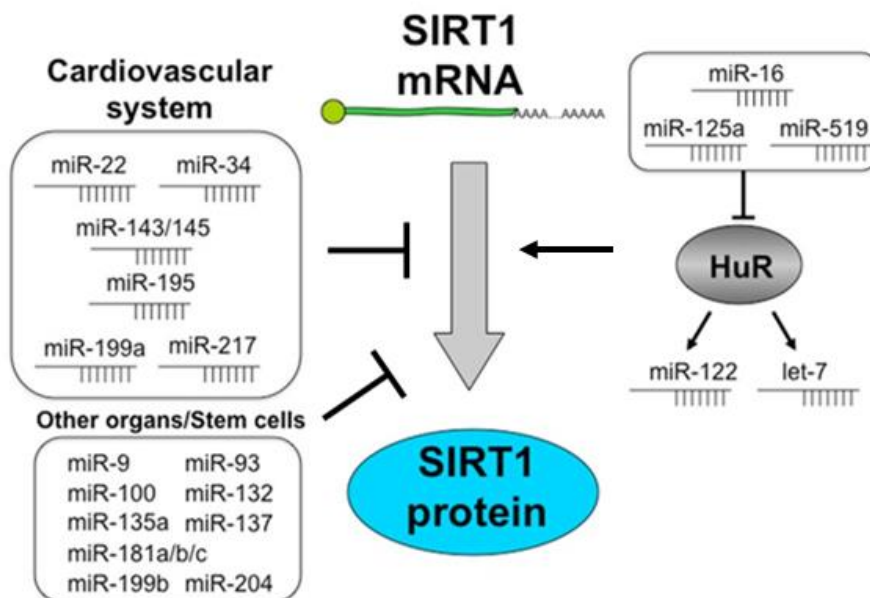


Figure 24 : Régulation de SIRT1 par les miRs (Yamakuchi, 2012)

Cette figure montre que les miRs régulent l'expression et la fonction de SIRT1 directement ou via HuR. miR-22, miR-34, miR-143/145, miR-195, miR-199a et miR-217 sont exprimés dans les tissus cardiovasculaires.

3. Régulation de la stabilité de la protéine SIRT1

Plusieurs études ont mis en évidence que l'augmentation de l'expression de SIRT1 n'était pas seulement corrélée à une augmentation de la transcription de SIRT1 mais également à l'augmentation de la stabilité de la protéine. Il a été montré que dans des cellules humaines cancéreuses les niveaux élevés de SIRT1 reflètent une stabilisation anormale de la protéine médiée par sa phosphorylation sur la sérine 27 via JNK2 (Ford et al., 2008). D'autres études ont montré que l'augmentation de la stabilité de SIRT1 était due à une diminution de son ubiquitination et de sa dégradation par le protéasome (Cheng et al., 2016a; Han et al.,

2014). Il a également été mis en évidence que les bénéfices métaboliques de l'augmentation de l'expression de la nicotinamide N-méthyltransferase (NNMT) sont corrélés à une stabilisation de la protéine SIRT1 (Hong et al., 2015).

B. Régulation de l'activité de SIRT1

1. Régulation de l'activité de SIRT1 par la disponibilité en NAD⁺

Le NAD ou Nicotinamide Adenine Dinucleotide est un coenzyme pouvant exister sous forme oxydé NAD⁺ ou sous forme réduite NADH. Comme nous l'avons vu, l'activité catalytique de SIRT1 dépend de la disponibilité du NAD⁺. Par conséquent, les protéines qui consomment le NAD⁺ telles que PARP-1 ou CD38 vont inhiber l'activité de SIRT1 en diminuant la concentration en NAD⁺ disponible (Aksoy et al., 2006; Bai et al., 2011b). Lors de la réaction enzymatique de désacétylation des protéines par SIRT1, le NAD⁺ est transformé en NAM, l'un des composés naturels contenant le nicotinamide (figure 25). Le NAM a été décrit comme un inhibiteur compétitif direct de SIRT1 (Anderson et al., 2003; Landry et al., 2000), qui se fixe à la place du NAD⁺ au niveau des sites catalytiques de cette désacétylase (Bitterman et al., 2002).

Deux autres composés contenant le nicotinamide, l'acide nicotinique (Na) et le nicotinamide riboside (NR), sont capables de générer du NAD⁺ et donc d'activer SIRT1. Ainsi, lorsque des cellules en culture ou des souris sont traitées avec du NR, qui est rapidement transformé en NAD⁺ notamment par les kinases de la famille NRK (Nicotinamide Ribosides Kinases), une augmentation importante de l'activité de SIRT1 a été observée (Bieganowski and Brenner, 2004; Cantó et al., 2012). Par ailleurs, dans une étude pilote menée chez l'homme, il a été récemment montré que le taux de NAD⁺ dans le sang peut être augmenté jusqu'à 2,7 fois avec une seule dose orale de NR, suggérant que cette molécule pourrait représenter une approche thérapeutique permettant d'augmenter l'activité de SIRT1 chez les patients (Trammell et al., 2016).

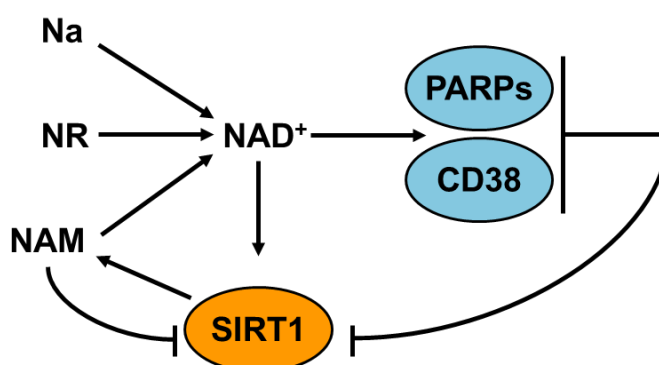


Figure 25 : Représentation schématique de la régulation de l'activité de SIRT1 par la disponibilité en NAD⁺

2. Régulation de l'activité de SIRT1 par modification post-traductionnelle

a. Régulation par phosphorylation

En réponse à différents types de stress, tels qu'un stress génotoxique, un stress oxydant ou encore une perturbation de l'homéostasie calcique, SIRT1 est phosphorylée sur différents résidus au niveau de ses domaines N- et C-terminaux. A ce jour, onze kinases ont été impliquées dans la phosphorylation de SIRT1 (tableau 5).

Kinases	Résidus phosphorylés	Références
CyclinB/CDK1	Thr350, Ser540	(Sasaki et al., 2008)
CamKII	Ser27, Ser47	(Wen et al., 2013)
CDK5	Ser47	(Bai et al., 2012)
CK2	Ser154, Ser649, Ser651, Ser683	(Kang et al., 2009)
DyRK1A	Thr522	(Guo et al., 2010)
DyRK3	Thr522	(Guo et al., 2010)
JNK1	Ser27, Ser47, Thr530	(Nasrin et al., 2009)
mTOR	Ser47	(Back et al., 2011)
PKA	Ser434	(Gerhart-Hines et al., 2011)
HIPK2	Ser682	(Conrad et al., 2016)
AMPK	Thr344	(Lau et al., 2014)

Tableau 5 : Liste des kinases phosphorylant et régulant l'activité enzymatique de SIRT1

La phosphorylation de SIRT1 est considérée comme une modification entraînant principalement une augmentation de son activité. Cette augmentation serait liée à une diminution de l'agrégation de cette protéine, limitante pour son activité (Guo et al., 2010). D'autres études ont décrits cette phosphorylation comme régulatrice de la translocation de SIRT1 du cytoplasme vers le noyau, permettant la régulation de l'activité de protéines nucléaires, notamment des facteurs de transcription et des histones (Nasrin et al., 2009). De plus, la phosphorylation de SIRT1 induit un changement conformationnel de la protéine, permettant une meilleure accessibilité aux substrats acétylés et une dissociation plus rapide des substrats désacétylés (Guo et al., 2010; Sasaki et al., 2008). A ce jour une seule étude a montré que la phosphorylation de SIRT1 pouvait entraîner une diminution de son activité (Conrad et al., 2016). Il est également intéressant de mentionner qu'une phosphorylation maintenue sur une longue durée induit la dégradation de SIRT1 (Gao et al., 2011).

b. Régulation par nitrosylation, méthylation, sumoylation, nitrosation et ubiquitynation

L'oxyde nitrique induit un stress conduisant à la nitrosylation de la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et sa liaison à la protéine Siah1. Ce complexe transloque dans le noyau pour nitrosyler SIRT1 sur les résidus Cys387 et Cys390 inhibant son activité (Kornberg et al., 2010). SIRT1 est également méthylée sur de nombreux résidus lysines (Lys233, 235, 236, 238) par la méthyltransferase Set7/9. Lors de dommages à l'ADN, la méthylation de SIRT1 est augmentée ce qui inhibe son activité (Liu et al., 2011). D'autres études ont montré que SIRT1 est sumoylée sur le résidu lysine 734 et désomoylée par la désomoylase nucléaire SENP1. Cette sumoylation permettrait de maintenir SIRT1 dans le noyau et d'augmenter son activité transcriptionnelle (Yang et al., 2007). Récemment d'autres modifications de SIRT1 ont pu être mises en évidence. Tout d'abord SIRT1 peut être nitrosée et inhibée par GSNO (S-Nitrosoglutathione) (Kalous et al., 2016). De plus, en réponse aux dommages à l'ADN, SIRT1 est ubiquitylée par l'E3 ligase MDM2 empêchant sa translocation au noyau et donc la désacétylation de protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN (Peng et al., 2015).

3. Régulation de l'activité de SIRT1 par interaction avec d'autres protéines

a. Régulation par CCAR2/DBC1

CCAR2 (Cell cycle activator and apoptosis regulator 2)/DBC1 (Deleted in Breast Cancer 1) est une protéine capable de se fixer sur la partie catalytique de SIRT1 et d'inhiber son activité (Kim et al., 2008b; Zhao et al., 2008b). SIRT1 peut réguler par elle-même son activité par un changement conformationnel entraînant un rapprochement entre le domaine d'activité désacétylase et un domaine appelé ESA (Essential for SIRT1 Activity). L'inhibition induite par CCAR2/DBC1 serait liée à une limitation de l'interaction entre ces deux domaines (Kang et al., 2011). Il a été proposé que l'activation de SIRT1 par l'AMPK serait liée à la dissociation de SIRT1 et de CCAR2/DBC1 (Nin et al., 2012). De plus, lors d'un stress génotoxique la protéine BRMS1 (Breast cancer metastasis suppressor 1) se lie à CCAR2/DBC1 entraînant la dissociation du complexe CCAR2/DBC1-SIRT1, permettant l'activation de SIRT1 (Liu et al., 2016a).

b. Régulation par AROS

AROS (Active Regulator Of SIRT1) est une protéine nucléaire de 142 acides aminés découverte en 2007 dont la fonction est d'activer SIRT1 (Kim et al., 2007a). Une étude suggère qu'AROS module l'activité de SIRT1 de manière antagoniste à l'inhibition induite par CCAR2/DBC1 (Raynes et al., 2013). Récemment, une étude sur la phosphorylation de SIRT1

via HIPK2 montre que cette modification post-traductionnelle provoque la séparation du complexe AROS-SIRT1 et induit l'inhibition de SIRT1 (Conrad et al., 2016).

III. Les processus biologiques régulés par SIRT1

A. SIRT1 et le métabolisme énergétique

SIRT1 est considérée comme un senseur métabolique puisqu'en réponse à une diminution des rapports NADH/NAD⁺ et ATP/AMP, son activité est augmentée et permet de rétablir l'homéostasie de la cellule, notamment grâce à son action sur PGC-1 α (Rodgers et al., 2005). SIRT1 en désacétylant PGC-1 α , stimule l'activité des nombreux facteurs de transcription régulés par ce cofacteur transcriptionnel, parmi lesquels PPAR α , ERR α et NRF1 connus pour stimuler l'utilisation des substrats énergétiques glycolytiques et lipidiques ainsi que la biogénèse mitochondriale (Huss et al., 2004; Vega et al., 2000). L'AMPK est un autre senseur métabolique qui constitue avec SIRT1 un circuit réciproquement positif de régulation. L'AMPK active SIRT1 via la régulation positive du gène de NAMPT qui produit le cofacteur NAD⁺ (Cantó et al., 2009; Fulco et al., 2008) et SIRT1 active l'AMPK en désacétylant la kinase LKB1 (liver kinase B1) (Lan et al., 2008).

B. SIRT1 et la réponse au stress cellulaire

Il a été démontré que SIRT1 joue un rôle protecteur en réponse à de nombreux stress cellulaires. Par exemple, SIRT1 protège du stress oxydatif en stimulant l'expression d'enzymes anti-oxydantes telles que SOD2 (superoxyde dismutase 2), GPx1 (glutathione peroxidase) et la catalase, via la désacétylation de p53, FOXO3, PGC-1 α ou p65 NF κ B (Santos et al., 2015). SIRT1 peut désacétyler HIF1 α (Hypoxia-inducible factor) (Lim et al., 2010) et HIF2 α (Dioum et al., 2009) et joue un rôle considéré comme protecteur en réponse à l'hypoxie (Gu et al., 2013). La désacétylation de HSF1 (Heat shock factor 1) par SIRT1 (Westerheide et al., 2009) augmente sa capacité à stimuler la transcription des protéines chaperonnes conférant aux cellules une résistance à la mort cellulaire en réponse à un choc thermique (Dayalan Naidu and Dinkova-Kostova, 2017). Enfin, SIRT1 limite l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β , et IL-6 (pour revue (Xie et al., 2013)), en désacétylant des protéines telles que les histones (Liu and McCall, 2013) ou les facteurs de transcription AP-1 (Zhang et al., 2010) et NF- κ B (Yang et al., 2012).

C. SIRT1, autophagie et apoptose

SIRT1 est capable de moduler l'autophagie de différentes façons (pour revue (Ng and Tang, 2013)). Elle peut agir directement sur certains acteurs du processus autophagique tels que ATG5, ATG7 et LC3 en les désacétylant (Lee et al., 2008a). La désacétylation de LC3

entraîne sa relocalisation dans le cytoplasme et son interaction avec ATG7, permettant la formation de l'autophagosome (Huang et al., 2015). SIRT1 peut également désacétyler FOXO1 et FOXO3 et ainsi favoriser l'induction de l'autophagie en réponse à un stress oxydatif (Sengupta et al., 2009, 2011). Suite à sa désacétylation, FOXO1 va augmenter l'expression de Rab7, une GTPase impliquée dans la fusion de l'autophagosome avec le lysosome et ainsi favoriser l'autophagie. La désacétylation de FOXO3 augmente l'expression de plusieurs gènes de l'autophagie tels que BECLIN 1, PI3K, ATG12 ou LC3 (Kroemer et al., 2010). SIRT1 peut indirectement inhiber mTOR en interagissant avec TSC2 (tuberous sclerosis complex 2), un membre du complexe inhibiteur de mTOR, conduisant à l'activation de l'autophagie (Ghosh et al., 2010). Dans le cœur (Ben Salem et al., 2017; Hariharan et al., 2010), les reins (Kume et al., 2010) ou le cerveau (Jeong et al., 2013), il a été démontré que SIRT1 favorise la survie cellulaire en induisant l'autophagie.

SIRT1 a été impliquée pour la première fois dans la régulation de l'apoptose par la découverte en 2001 de sa première cible non-histone, le facteur de transcription p53 (Vaziri et al., 2001). La désacétylation des protéines suppresseurs de tumeur comme p53, p73 (Dai et al., 2007) et Ku70 (Jeong et al., 2007) conduit à leur inactivation et donc à un effet anti-apoptotique. D'autres cibles non histones ont été découvertes, telles que FOXO (Brunet et al., 2004), Akt (Li et al., 2013) et E2F1 (Wang et al., 2006), dont la désacétylation inhibe également l'apoptose. De plus, et de manière indirecte, SIRT1 protège de l'apoptose en stimulant des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN, telles que XPA (Fan and Luo, 2010), WRN (Li et al., 2008) ou NBS1 (Yuan and Seto, 2007). Plus récemment, il a été montré que la désacétylation de la porine VDAC1 par SIRT1 empêchait sa liaison avec Bax inhibant l'apoptose mitochondriale (Tong et al., 2017). En réponse à un stress, l'activation de SIRT1 est donc généralement considérée comme protectrice vis-à-vis de l'apoptose.

IV. Rôles de SIRT1 dans le cœur

De plus en plus de publications montrent que les sirtuines et en particulier SIRT1 jouent un rôle essentiel dans la régulation des maladies cardiovasculaires (pour revue (Bindu et al., 2016)). Dans le cœur, l'expression de SIRT1 est augmentée lors d'une surcharge de pression, d'une restriction calorique, d'une ischémie aigue ou en réponse à l'exercice, alors que son expression est diminuée lors de l'ischémie-reperfusion (pour revue (Matsushima and Sadoshima, 2015)). Il semblerait que l'effet de SIRT1 dans le coeur soit dépendant de son niveau d'expression. En effet, une surexpression cardiaque faible (2.5 fois) à modérée (7.5 fois) de SIRT1 atténue l'hypertrophie, l'apoptose, la fibrose et la dysfonction cardiaque développée avec l'âge (Alcendor et al., 2007). A l'inverse, une plus forte expression de SIRT1 (12.5 fois) augmente l'apoptose et l'hypertrophie, diminue la fonction cardiaque et favorise le développement d'une cardiomyopathie (Alcendor et al., 2007). De manière similaire, une autre

étude montre qu'une surexpression cardiaque spécifique forte de SIRT1 (20 fois) induit le développement d'une cardiomyopathie dilatée (Kawashima et al., 2011). Les niveaux d'expression de SIRT1 doivent donc être rigoureusement régulés pour promouvoir la cardioprotection.

Le rôle cardioprotecteur de SIRT1 a également été étudié en utilisant des souris invalidées pour SIRT1. Les souris invalidées de manière homozygote pour SIRT1 ne sont pas viables et présentent de graves défauts de développement (Sundaresan et al., 2011b). En revanche, les souris invalidées pour SIRT1 croisées avec des souris d'autres lignées sont viables et fertiles. Ces souris ont des cœurs plus petits et montrent une résistance au développement de l'hypertrophie cardiaque en réponse à des stimuli hypertrophiques (Sundaresan et al., 2011b), suggérant que SIRT1 est nécessaire pour la croissance postnatale du cœur. Des modèles inductibles permettant la délétion de SIRT1 ont permis de caractériser le rôle de SIRT1 dans le cœur adulte. Plusieurs études ont ainsi confirmé le rôle protecteur de SIRT1 contre la mort cellulaire associée à l'insuffisance cardiaque (Pillai et al., 2005), à l'ischémie reperfusion (Hsu et al., 2010), au vieillissement ou au stress oxydant (Alcendor et al., 2007), à un traitement à la doxorubicine (Wang et al., 2012b), et à l'exposition aux acides gras (Zhu et al., 2011). Ainsi, SIRT1, en protégeant la mort cellulaire des cardiomyocytes, limite les altérations de la fonction cardiaque.

Suite à ces différents travaux, SIRT1 est apparue comme une cible particulièrement intéressante pour le traitement des pathologies cardiaques et différentes études ont révélé le potentiel thérapeutique de molécules activatrices de SIRT1. Par exemple, le resveratrol, un polyphénol décrit comme activateur de SIRT1, préserve la fonction cardiaque dans des modèles de myocardite auto-immune (Yoshida et al., 2007), de cardiomyopathie dilatée (Tanno et al., 2010), de diabète de type 1 (Sulaiman et al., 2010), d'insuffisance cardiaque (Gu et al., 2014) ou d'hypertension (Rimbaud et al PLoS One 6(10): e26391). Outre le resvératrol, le sildenafil (inhibiteur de la phosphodiesterase-5) ou le curcumin (un antioxydant naturel fort), ont montré un effet cardioprotecteur contre l'ischémie-reperfusion en activant SIRT1 (Matsushima and Sadoshima, 2015; Shalwala et al., 2014; Yang et al., 2013).

Les différentes études menées à ce jour ont permis de démontrer que SIRT1 est une protéine de réponse au stress qui, de manière générale vise à rétablir l'homéostasie de la cellule et dont l'activité est plutôt cardioprotectrice lorsqu'elle est finement modulée.

Matériel et Méthodes

I. Matériel

A. Lignée cellulaire, cardiomyocytes et animaux

La lignée cellulaire cardiomyoblastique H9c2 a été achetée chez ATCC (n° CRL-1446 Manassas, Virginie, USA).

Tous les animaux ont été nourris *ad libitum* et hébergés dans une pièce dans laquelle l'alternance jour/nuit de 12h/12h et une température constante de 22°C étaient imposées. Le jour du sacrifice, les animaux ont été sortis seulement quelques minutes avant le sacrifice afin d'écourter au maximum la période de stress engendrée par le changement d'environnement.

Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et une thoracotomie a été réalisée afin de prélever le cœur. Après un rinçage dans une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline), l'organe a subi une étape de dissection. Elle consiste en l'isolement du ventricule gauche qui a été immédiatement plongé dans de l'azote liquide puis conservé à -80°C afin d'effectuer des analyses biochimiques et moléculaires ultérieurement.

Les cardiomyocytes sont isolés à partir de cœurs de rats adultes de souche Wistar âgés de 8 semaines (environ 300g). Suite à une anesthésie avec 0.5ml de pentobarbital monosodique à 50 mg/ml en intra-péritonéal, le cœur est rapidement prélevé après thoracotomie et placé dans une solution physiologique (NaCl 117mM, KCl 5.7mM, NaHCO₃ 4.4mM, KH₂PO₄ 1.5mM, MgCl₂ 1.7mM, HEPES 2.1mM, Glucose 11.7mM, Créatine 10mM, Taurine 20mM), préalablement placée à 4°C afin de rincer le cœur de son sang. Après dégagement de l'aorte, le cœur est canulé afin de procéder à la dissociation.

Toutes les procédures d'expérimentation animale ont été réalisées dans le respect de la réglementation relative à la protection et à l'utilisation des animaux de laboratoire définie par la directive européenne 86/609/CEE.

II. Méthodes d'études cellulaires

A. Culture et transfection cellulaire

1. Conditions de culture et de traitements

La lignée cellulaire H9c2 est cultivée dans un milieu complet composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant, 4.5 g/L de glucose, du pyruvate de sodium et de la glutamine, complété avec 100 µg/mL de pénicilline (P), 100 U/mL de streptomycine (S) et 10% de sérum de veau foetal (SVF), à 37°C et placées dans un incubateur en atmosphère humide et en présence de 95% O₂ – 5% de CO₂.

2. Dissociation des cardiomyocytes de rats adultes

Après canulation du cœur par l'aorte sur un appareil de Langendorff en perfusion rétrograde, le cœur est perfusé avec une solution physiologique dite de « lavage » (Solution A : NaCl 117mM, KCl 5.7mM, NaHCO₃ 4.4mM, KH₂PO₄ 1.5mM, MgCl₂ 1.7mM, HEPES 2.1mM, Glucose 11.7mM, Créatine 10mM, Taurine 20mM) constamment oxygénée et maintenue à 37°C. Cette première perfusion se fait à un débit de perfusion de 6 mL/min pendant 5 minutes. La dissociation débute par le passage en perfusion de solution supplémentée de collagénase de type A à 1 mg/mL (0.232 U/mg, Roche Diagnostics) avec une concentration en Ca²⁺ libre fixée entre 20 et 25 µM (Solution B). Cette étape permet la digestion enzymatique de la matrice extracellulaire de façon homogène. Après 45 minutes de perfusion à un débit de 4 mL/min, le cœur est décroché de la canule, séparé de ses oreillettes et les myocytes sont dissociés mécaniquement dans la solution C (solution B dépourvue de collagénase) et laissés à décanter. Pour éviter une augmentation trop forte de la concentration de Ca²⁺ néfaste à l'intégrité cellulaire, le retour vers une concentration calcique intracellulaire physiologique est effectué progressivement en deux temps dans la solution C (70 µM de Ca²⁺ pendant 5 minutes à 37°C sous agitation lente, puis 320 µM de Ca²⁺ pendant 10 minutes). Les cellules vivantes sont ensuite séparées des cellules mortes par la mise en place d'un gradient en présence de BSA 5 mg/mL dans la solution D (NaCl 117mM, KCl 5.7mM, NaHCO₃ 4.4mM, KH₂PO₄ 1.5mM, MgCl₂ 1.7mM, HEPES 2.1mM, Glucose 11.7mM, Créatine 10mM, Taurine 20mM ; Ca²⁺ 300µM, BSA 5mg/mL). Les cellules préalablement décantées, sont resuspendues deux fois dans cette solution pendant 10 minutes de façon à ne favoriser que la sédimentation des cellules vivantes. Après comptage des cardiomyocytes en cellule de Malassez, les cellules sont réparties dans des boîtes de Pétri au préalable tapissées de laminine 10 µg/mL pour favoriser leur adhésion, à raison de 25 000 cellules par boîtes de 35 mm de diamètre, dans un milieu MEM (Minimum Essential Medium) additionné de SFV 2.5%, P/S 1%, HEPES 2% et Ca²⁺ 1.2 mM. Après environ 1 heure d'incubation à 37°C en atmosphère humide et à 95% O₂ – 5% de CO₂, les cellules adhèrent à la laminine et le milieu est remplacé par un milieu sans SVF pour éviter la dédifférenciation des cardiomyocytes. Les cardiomyocytes sont alors maintenus jusqu'à 48h en culture pour l'ensemble des expérimentations.

3. Transfections siRNA

Le siRNA SIRT1 (Santa Cruz) a été transfecté selon les instructions du fournisseur. Le taux de transfection a été mesuré en utilisant un siRNA couplé au FITC. Les volumes décrits sont utilisés pour la transfection de 40 000 cellules H9c2. Après la préparation d'un mix contenant 3 µl d'agent transfectant dans 50 µl de milieu de transfection et d'un mix contenant

16 pmol de siRNA dans 50 μ l de milieu de transfection, les deux mix sont mélangés puis incubés 45 minutes à température ambiante. Le mélange est ensuite dilué dans du milieu de transfection pour obtenir un volume final de 300 μ l qui est déposé sur les cellules en culture. Six heures après la transfection, 300 μ l de DMEM supplémenté de 20% de SVF et de 200 μ g/ml de P/S sont ajoutés au milieu de transfection. Vingt-quatre heures après le début de la transfection, les cellules transfectées avec le siRNA fluorescent sont analysées par cytométrie en flux, les cellules transfectées avec les siRNA contrôle ou SIRT1 sont rincées puis traitées. Dans ces conditions, le taux de transfection obtenu est d'environ 90% et la protéine n'est plus détectable jusqu'à 48 heures post-transfection.

B. Cytométrie en flux

1. Analyses cytométriques

Les données cytométriques sont obtenues avec un cytomètre FC500 (Beckman Coulter, Villepinte, France). Pour chaque échantillon, 5 000 cellules sont analysées. Dans chaque expérience, sont exclus de l'analyse les débris et les agrégats cellulaires.

2. Mesure du taux de mortalité cellulaire

La sonde fluorescente fluorescéine diacétate (FDA) a été utilisée pour évaluer la mortalité cellulaire. Après traitement, les cellules ont été incubées avec 0.1 μ g/ml de FDA pendant 10 min à 37°C. Le FDA est clivé par les estérases cellulaires en un produit fluorescent vert. Dans les cellules mortes, les estérases n'étant plus actives, le FDA n'est pas clivé et donc n'émet pas de fluorescence.

3. Mesure du flux autophagique

La sonde fluorescente CYTO-ID[®] a été utilisée pour évaluer le flux autophagique dans les cellules vivantes. Après traitement, les cellules sont incubées avec le CYTO-ID[®] pendant 30 min à 37°C. La sonde est un colorant cationique amphiphile qui s'incorpore rapidement dans les cellules et permet ainsi le marquage des vacuoles associés à la voie de l'autophagie (pré-autophagosomes, autophagosomes, et autolysosomes).

4. Mesure de la chute du $\Delta\Psi_m$ et de la nécrose

Après incubation avec les drogues, les cellules sont marquées pendant 30 minutes à 37°C avec 10 nM de DiOC6(3) qui s'accumule dans les mitochondries en fonction de leur potentiel de membrane. Pour chaque échantillon analysé, l'intégrité de la membrane plasmique (perdue lors de la nécrose) est évaluée en mesurant la perméabilité des cellules à

l'iodure de propidium (10 µg/mL final), ajouté dans l'échantillon quelques minutes avant la mesure en cytométrie.

C. Microscopie

1. Microscopie à fluorescence

a. Mesure de la mortalité des cardiomyocytes

Après dissociation puis traitement pendant 24h, les cardiomyocytes adultes de rats sont marqués avec la sonde FDA (0,2 µg/ml) pendant 5 minutes à 37°C, puis observés grâce à un microscope à fluorescence (Leica). Les cellules vivantes (fluorescence verte) et les cellules mortes (non fluorescentes) sont comptées manuellement (environ 500 cellules comptées par conditions).

2. Microscopie électronique à transmission

Les cellules H9c2 ont étéensemencées en plaque 6 puits. Après traitement, les cellules sont fixées dans un tampon contenant 4% de glutaraldéhyde et 0,2 M de cacodylate de sodium pendant 1h à température ambiante. Puis elles sont rincées dans un tampon contenant 0,2 M de cacodylate de sodium et 0,4 M de sucrose pendant 1h à température ambiante. Les échantillons sont inclus dans de la paraffine, coupés et montés sur lames. Les images ont été obtenues à la plate-forme de microscopie électronique de l'INRA (Jouy-en-Josas, France).

D. Dosage colorimétrique de protéines

La concentration protéique des échantillons est estimée par dosage en microplaques selon le kit micro-BCA (Thermo Fisher Scientific) puis lecture de l'absorbance à 540 nm par un spectrofluorimètre (TECAN-Genios). La réaction colorimétrique est réalisée grâce à une solution qui contient de l'acide bicinchoninique et du sulfate de cuivre (II). Les échantillons à doser sont dilués au 1/20^{ème} et au 1/50^{ème} dans de l'eau ultrapure. Après ajout de 200 µL de la solution de réaction, les échantillons sont incubés 15 min à 65°C ou 30 min à 37°C. La réaction est mesurée par l'absorbance du complexe Cu⁺ final à une longueur d'onde de 540 nm. La concentration en protéines étant proportionnelle à l'absorbance, elle est déterminée par comparaison de l'absorbance des échantillons avec celle d'une gamme étalon de concentration connue réalisée à partir d'une solution de sérum albumine bovine.

E. Gel SDS-PAGE et immunodétection par Western Blot

Les protéines des cellules H9c2 sont extraites par un tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,5% acide déoxycholique) complété avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche + PMSF 0,2mM), un cocktail d'inhibiteurs de désacétylases (Santa Cruz) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (NaF 50mM, NaPPi 5mM, DTT 1mM, β -glycérophosphate 1mM, Orthovanadate 1 mM) pendant 30 min à 4°C. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 30 minutes à 20 000 g à 4°C, les protéines extraites sont dosées par le test BCA puis dénaturées par chauffage pendant 5 min à 95°C en présence de tampon dénaturant Laemmli 5X (300 mM Tris, 50% glycérol, 12,5% SDS, 50 mM DTT, 0.05% de bleu de bromophénol, pH=6,8) en utilisant 1 volume de tampon pour 4 volumes de protéines. Trente microgrammes de protéines sont ensuite séparés par migration dans un gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Tris-glycine) à 10-15% d'acrylamide (selon la taille des protéines à séparer) sous l'action d'un voltage constant de 120 V. Les gels sont ensuite transférés sur une membrane de PVDF (0,45 μ m, Immobilon-P, Millipore). Le transfert est réalisé dans un appareil semi-sec Biorad (TRANS-BLOT SD[®]) en appliquant un courant de 15-20V pendant 45-60 minutes selon la taille des protéines à transférer. L'efficacité du transfert est contrôlée par coloration des protéines au rouge Ponceau pendant 5 min (rouge Ponceau 0,2%, TCA 0,3%). La membrane PVDF est saturée en protéines pendant 1 heure dans une solution de TBS-Tween 0,1% additionnée de BSA à 5% (p/v). Elle est ensuite incubée soit une nuit à 4°C, soit 2h à température ambiante, en présence de l'anticorps primaire (dilué dans du TBS-Tween 0,1% + BSA 1%) dirigé contre la protéine d'intérêt (tableau 6).

La membrane est ensuite rincée avec une solution de TBS-Tween 0,1% avant d'être incubée une heure sous agitation à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Les anticorps secondaires utilisés proviennent de chez Jackson Immunoresearch et sont utilisés à la dilution de 1/50 000^e. La membrane est rincée six fois 5 min dans une solution de TBS-tween 0,1%, puis incubée pendant 5 min en présence du substrat de la peroxydase (Millipore), avant révélation par un appareil Chemidoc XRS (Biorad) utilisant la méthode ECL selon les instructions de Millipore. Le logiciel Chemidoc a été utilisé dans le but de calculer les densités relatives de chaque bande. Les intensités des bandes correspondant aux protéines d'intérêt ont été normalisées avec celles de la β -actine. Les données obtenues sont exprimées sous forme du ratio de ces deux intensités.

II. Méthodes d'études cellulaires

Cibles de l'anticorps	Dilution	Fournisseurs
Actine	1/20000 ^e	Santa Cruz
ATF4	1/200 ^e	Santa Cruz
BiP/GRP78	1/250 ^e	Cell Signaling
CHOP	1/500 ^e	Cell Signaling
COX-IV	1/1000 ^e	Abcam
CS	1/1000 ^e	Abcam
DRP1	1/1000 ^e	Cell Signaling
DRP1- phosphorylée	1/1000 ^e	Cell Signaling
GADD34	1/200 ^e	Santa Cruz
FIS1	1/200 ^e	Santa Cruz
IP3R	1/1000 ^e	Abcam
LC3	1/1000 ^e	Abcam
LDH	1/1000 ^e	Abcam
MCU	1/1000 ^e	Cell Signaling
MFN1	1/1000 ^e	Abcam
MFN2	1/1000 ^e	Cell Signaling
OPA1	1/1000 ^e	Cell Signaling
OXPHOS	1/1000 ^e	Abcam
Parkin	1/1000 ^e	Sigma
p62	1/1000 ^e	Novus
PERK	1/500 ^e	Cell Signaling
PERK-phosphorylée	1/500 ^e	Cell Signaling
eEF2	1/1000 ^e	Cell Signaling

Cibles de l'anticorps	Dilution	Fournisseurs
eEF2-phosphorylée	1/500 ^e	Cell Signaling
eEF2K	1/1000 ^e	Proteintech
eIF2 α	1/1000 ^e	Cell Signaling
eIF2 α -phosphorylée	1/500 ^e	Cell Signaling
GRP94	1/500 ^e	Cell Signaling
RIBOPHORIN	1/200 ^e	Santa Cruz
RPS6	1/200 ^e	Santa Cruz
SEC61 α	1/200 ^e	Santa Cruz
SIRT1	1/4000 ^e	Abcam
VDAC	1/1000 ^e	Cell Signaling

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés

F. Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative

Les ARN sont extraits à partir des H9c2 grâce au kit ZymoResearch QuickRNA MiniPrep, selon les instructions du fabricant. Un microgramme d'ARN totaux est reverse-transcrit par le kit BioRad iScript. Lors de la PCR quantitative, l'ADNc est amplifié par le supermix Sso Advanced de BioRad en deux étapes : les ADNc sont chauffés à 95°C pendant 5 min, puis ils subissent 50 cycles de dénaturation (2 sec à 95°C) – hybridation/élongation (5 sec à 60°C). Les amorces utilisées provenant de chez Eurofins sont listées dans le tableau 7.

Gène	Espèces	Amorce sens	Amorce antisens
Atf4	Rats/souris	AAACCTCATGGGTTCTCCAG	TCTCCAACATCCAAGTCTCC
Atg5	Rats/souris	TTAGGGCAAGCTTTTTAGATGG	GCGGAAGGACAGACTTCTC
BiP/Grp78	Rats/souris	TGCAGCAGGACATCAAGTTC	TTTCTTCTGGGGCAAATGTC
Cd36	Rats/souris	CCACTGTGTACAGACAGTTTTGG	GCTCAAAGATGGCTCCATTG

Gène	Espèces	Amorce sens	Amorce antisens
Chop	Rats/souris	TATCTCATCCCCAGGAAACG	CAGGGTCAAGAGTAGTGAAGGTTT
Cox IV	Rats/souris	TGGGAGTGTTGTGAAGAGTGA	GCAGTGAAGCCGATGAAGAAC
Cpt1	Rats/souris	TCACCTGGGCTACACGGAGA	TCGGGGCTGGTCCTACACTT
Cpt2	Rats/souris	ACCTGCTCGCTCAGGATAAA	AAACGACAGAGTCTCGAGCAG
CS	Rats/souris	CAAGATTGTGCCCAATATCCTC	TTCATCTCCGTCATGCCATA
Fis1	Rats/souris	GCCTGGTTCGAAGCAAATAC	CACGGCCAGGTAGAAGACAT
Gadd34	Rats/souris	GGACCCTGAGATTCCTCTGA	GCCCAGACAGCAAGGAAAT
Grp94	Rats/souris	GCTTCTGATGCTTTAGACAAGA	CTGTGACATGCAGCAGGTTT
Lc3-II	Rats/souris	CCTGGACAAGACCAAGTTCC	CCATTCACCAGGAGGAAGAA
Mcad	Rats/souris	CCGTTCCCTCTCATCAAAG	ACACCCATACGCCAACTCTT
Mfn2	Rats/souris	GGGGCCTACATCCAAGAGAG	CCTTGGACAGGTACCCTTTG
Nrf1	Rats/souris	TTACTCTGCTGTGGCTGATGG	CCTCTGATGCTTGCGTCGTCT
Opa1	Rats/souris	TCAGCAAAGCTTACATGCAGA	TGCTTGGACTGGCTACATTTT
Pgc-1α	Rats/souris	CACCAAACCCACAGAGAACAG	GCAGTTCCAGAGAGTTCCACA
Ppara	Rats/souris	AAGTGCCTGTCTGTCTGGGAT	GCTTCGTGGATTCTCTTGCC
P58ipk	Rats/souris	CAGTTTCATGCTGCCGTAGA	GCTTTTGATTTGCCCATAGC
p62	Rats/souris	TGACATCTTCCGCATCTACATT	ATAGCGAGTTCCCACCACAG
Parkin	Rats/souris	AACTCCAGCCATGGTTTCC	AAATCACACGCAACTGGTCA
Pdia4	Rats/souris	CTGATTGGACACCTCCACCT	AGGGGCAAGTTTCTTGCAG
Xbp1u	Rats/souris	TCAGACTATGTGCACCTCTGC	ACAGGGTCCAACCTGTCCAG
Xbp1s	Rats/souris	TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG	ACAGGGTCCAACCTGTCCAG

Tableau 7 : Séquence des amorces PCR utilisées

Les résultats sont analysés selon la méthode des « delta » de Cq, où Cq est le « cycle de quantification », cycle auquel le produit amplifié commence à être détecté. Le ratio suivant est calculé : $(1+E_{\text{gène cible}})^{-(Cq_{\text{échantillon}} - Cq_{\text{contrôle}})_{\text{gène cible}}} / (1+E_{\text{gène de référence}})^{-(Cq_{\text{échantillon}} - Cq_{\text{contrôle}})_{\text{gène de référence}}}$, où E correspond à l'efficacité de la réaction de PCR. Selon ce calcul, l'expression du contrôle est égale à 1.

G. Immunoprécipitation

1. Immunoprécipitation en condition dénaturante

Pour mesurer l'acétylation de protéines d'intérêt, nous avons utilisé une approche par immunoprécipitation (IP) en conditions dénaturantes.

a. Lyse des cellules

Les cellules sont resuspendues dans un tampon de lyse dénaturant (1% SDS, 50 mM Tris HCl, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 15 U/ml de DNase I à pH 7.4), complété par un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche + PMSF 0,2 mM) et un cocktail d'inhibiteurs de désacétylases (Santa Cruz), puis le lysat est chauffé 5 minutes à 95°C. Pour neutraliser le SDS afin de pouvoir effectuer l'immunoprécipitation sans dégrader les anticorps, le lysat est resuspendu dans un tampon non-dénaturant (1% triton, 50 mM Tris HCl, 5 mM EDTA, 300 mM NaCl, 0.02% azide de sodium, 1 mM PMSF, à pH 7.4) complété par un cocktail d'anti-protéases (Roche) et un cocktail d'anti-désacétylases (Santa Cruz). Le triton présent dans ce tampon va interagir avec le SDS pour former des micelles et le piéger. La lyse est achevée à la seringue (aiguille 25G), puis le lysat est centrifugé 30 minutes à 20 000 g, à 4°C.

b. Préparation des complexes billes/anticorps

Les billes magnétiques Pureproteome de chez Millipore sont lavées dans du PBSTween0.1% (PBST puis bloquées dans un tampon PBST + BSA 2% pendant 1 heure à 4°C. Les billes sont ensuite lavées dans du PBST (0.1%) puis sont incubées avec les anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt pendant 1h à 4°C.

c. Immunoprécipitation

Les complexes billes/anticorps sont rincés dans du PBST (0.1%), resuspendus avec le lysat de protéines puis incubés toute la nuit à 4°C sur une roue. Les complexes billes/anticorps/antigènes sont ensuite rincés dans du PBST (0.1%), resuspendus dans du tampon Laemmli, chauffés 10 minutes à 90°C puis vortexés. L'immunoprécipitat est récupéré puis déposé sur gel pour être analysé par western blot.

2. Immunoprécipitation en condition native

Pour visualiser les complexes protéiques, nous avons utilisé une approche par immunoprécipitation (IP) en conditions natives.

a. Lyse des cellules

Les cellules sont lavées dans un tampon PBS froid puis resuspendues dans un tampon non-dénaturant (20 mM Tris HCl pH8, 137 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA) complété par un cocktail d'anti-protéases (Roche) et un cocktail d'anti-désacétylases (Santa Cruz), puis maintenues sous agitation 30 minutes à 4°C. Le lysat est ensuite centrifugé 30 minutes à 20 000 g, à 4°C.

b. Preclearing du lysat

Les billes magnétiques Pureproteome de chez Millipore sont lavées dans du PBST (0.1%) puis bloquées dans un tampon PBST + BSA 2% pendant 1 heure à 4°C. Les billes sont ensuite lavées dans du PBST (0.1%) puis sont incubées avec le lysat pendant 30 minutes à 4°C.

c. Immunoprécipitation

Le lysat est récupéré puis resuspendu avec l'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt puis incubé toute la nuit à 4°C sur une roue. Le complexe lysat/anticorps est incubé avec les billes magnétiques pendant 1 heure à 4°C. Les billes sont préalablement lavées dans du PBST (0.1%) et bloquées dans un tampon PBST + BSA 2% pendant 1 heure à 4°C. Les complexes billes/anticorps/antigènes sont ensuite rincés dans un tampon de lavage (10 mM Tris pH7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA pH8, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.2 mM sodium orthovanadate) complété par un cocktail d'anti-protéases (Roche) et un cocktail d'anti-désacétylases (Santa Cruz). Ils sont ensuite resuspendus dans du SDS 2X, chauffés 10 minutes à 90°C puis 100 mM de DTT est ajouté. L'immunoprécipitat est récupéré puis déposé sur gel pour être analysé par western blot.

H. Spectrométrie de masse

Pour identifier les sites acétylés d'eIF2 α , nous avons choisi une approche par spectrométrie de masse. Pour cela, l'immunoprécipitat obtenu avec l'anticorps anti eIF2 α a été déposé sur un gel gradient 4/16% Nu-page de chez Invitrogen. Cette étape de séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire permet de limiter la présence de protéines autres qu'eIF2 α (protéines immunoprécipitées de manière non spécifique ou protéines issues de contaminations de type kératine) dans l'échantillon qui sera analysé par spectrométrie de

III. Modèle d'étude *in vivo* : les souris invalidées pour SIRT1

masse. L'utilisation de gel pré-coulés et de tampon de migration commercial permet de limiter les contaminations. Après migration, plusieurs bandes de gel de 1mm de hauteur par 1cm de largeur sont découpées aux alentours de la zone du gel correspondant à 38 kDa, poids moléculaire d'eIF2 α . Ces morceaux de gels sont lavés puis les protéines encore dans le gel subissent une réduction par le TCEP, suivie d'une alkylation par l'iodoacétamide. Les protéines sont ensuite digérées par la trypsine et les peptides obtenus sont analysés par un spectromètre de masse de type Orbitrap (Orbitrap Velos, Thermofisher

III. Modèle d'étude *in vivo* : les souris invalidées pour SIRT1

A. Description des souris

Les souris KO SIRT1 général inductible nous ont été fournies par le Dr David Sinclair (Harvard Medical School, Boston). Au sein de son laboratoire, des souris C57BL/6J ont été croisées avec des souris exprimant, de façon ubiquitaire (sous le contrôle du promoteur de l'ubiquitine, Ub), la protéine de fusion Cre-ERT2, constituée de la recombinaison Cre et du domaine de liaison du récepteur des oestrogènes (ERT2) muté. En absence de tamoxifène, qui est un modulateur sélectif des récepteurs des oestrogènes, Cre-ERT2 est retenue dans le cytoplasme. La liaison du tamoxifène à l'ERT2 engendre la translocation de Cre-ERT2 dans le noyau, où elle peut recombiner ces substrats, à savoir des séquences d'ADN flanquées des séquences loxP (flox), entraînant ainsi leur excision du génome. La descendance de ce croisement (C57BL/6J Ub-CreERT2) a ensuite été croisée avec des souris où l'exon 4 de la Sirtuine 1 (SIRT1), qui fait partie du domaine catalytique (exons 3-8), était flanqué (SIRT1 flox/flox). Le résultat est la production de souris où il est possible d'induire, après injection de tamoxifène, la délétion de SIRT1 au stade adulte, ce qui permet de s'affranchir des problèmes développementaux observés chez les souris KO SIRT1 dans la lignée germinale (Price et al., 2012).

B. Génotypage des souris invalidées pour SIRT1

Afin de vérifier l'invalidation du gène SIRT1, un génotypage des souris est effectué. L'ADN génomique est extrait de la queue de souris par le NaOH : une partie de la queue est incubée avec du NaOH à 50 mM à 95°C pendant 45 minutes, du Tris-HCl pH 8 est ajouté et les queues désagrégées sont enfin centrifugées pendant 15 minutes à 4°C à 14000 rpm.

Une PCR est ensuite effectuée à partir de 2 μ l de surnageant avec les amorces détaillées ci-dessous, afin d'amplifier un segment, présent uniquement chez les souris SIRT1 KO, qui contient une partie du promoteur de l'ubiquitine et une partie du gène codant pour la protéine de fusion Cre-ERT2.

III. Modèle d'étude *in vivo* : les souris invalidées pour SIRT1

Primer sens: Ubc-Pro : 5'- GAG GGG AGG GAT AAG TGA GG -3'

Primer anti-sens: Cre2 : 5'- GCA AAC GGA CAG AAG CAT TT -3'

Pour avoir la certitude que l'absence de bande correspond bien à une souris contrôlée et non à un problème survenu au cours de la PCR, le gène ubiquitaire XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*), est également amplifié. Les amorces utilisées sont les suivantes :

Primer sens XIAP : 5'- GCA CGG ATC GTT ACT TTT GG -3'

Primer anti-sens XIAP : 5'- GGC TGC TAA GAT TGC TGG AA -3'

L'invalidation du gène SIRT1 est également vérifiée par Western blot.

C. Traitement des souris invalidées pour SIRT1

Des souris SIRT1 flox/flox âgées de 8 semaines, exprimant ou non Cre-ERT2, reçoivent une dose de 120 mg/kg de tamoxifène (une injection de 30 mg/kg/jour pendant quatre jours consécutifs). Après 21 jours, lorsque la délétion de SIRT1 est effective, les souris contrôles et KO sont divisées en deux groupes : un groupe de souris reçoit du sérum physiologique (PBS ou du 0.9% NaCl) et l'autre groupe reçoit soit une injection de tunicamycine 2 mg/kg ou 4 injections d'isoprotérénol (300 mg/kg) à 6h d'intervalle sur 2 jours. A la fin du traitement les souris sont sacrifiées et les organes prélevés pour notre étude

D. Etude de la fonction cardiaque par échocardiographie

L'exploration de la fonction cardiaque par échocardiographie a été effectuée avant et après traitement au moyen d'une sonde spécifiquement dédiée aux petits animaux (Vivid 9, 15MHz, General Electric Healthcare). Une anesthésie est réalisée par inhalation d'un gaz composé de 3% d'isoflurane et de 100% d'oxygène (débit 1 L/min), de manière à obtenir une anesthésie très légère pour minimiser les effets tels que la diminution de la fréquence cardiaque. Le dispositif utilisé a permis d'obtenir des images en deux dimensions à partir desquelles le diamètre de la cavité du ventricule gauche (en diastole (Dtd) et en systole (Dts)), l'épaisseur totale des parois (postérieure (PP) + antérieure (PA)) ainsi que la fréquence cardiaque ont pu être déterminés. Ces données brutes ont également été utilisées afin de déterminer les paramètres de la contraction du myocarde, à savoir la fraction de raccourcissement ($FR = [(Dtd-Dts)/Dtd] \times 100$), les volumes télédiastolique (Vtd) et télésystolique (Vts) (en ayant recours à la formule de Teicholz ($Vtd = 7 Dtd^3 / (2,4 + Dtd)$)) et la fraction d'éjection ($FE = [(Vtd-Vts)/Vtd] \times 100$).

E. Mesure de l'apoptose des cardiomyocytes par la méthode TUNEL

La mort cellulaire par apoptose a été mesurée sur des coupes de coeur de souris grâce à la méthode TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end

abeling) en utilisant le kit Apoptag de chez Millipore. Le clivage de l'ADN par les endonucléases activées au cours du processus apoptotique génère des extrémités 3'OH libres. Le terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) est une enzyme qui catalyse l'accrochage de nucléotides (dUTP) couplés à la digoxigénine aux extrémités 3'OH. La digoxigénine peut ainsi être reconnue par un anticorps couplé à une peroxydase, ce qui permet le marquage des noyaux apoptotiques. Brièvement, en accord avec les instructions fournies avec le kit, les coeurs ont été fixés dans 10% de formaline puis inclus en paraffine. L'apoptose a été détectée sur des coupes de tissus de 4 µM d'épaisseur par un scanner de lames (Scanscope, Aperio). La surface des zones positives a été quantifiée puis exprimée en pourcentage de la surface totale de la coupe de coeur (logiciel TRIBVN ICS Framework).

F. Mesure des capacités oxydatives des mitochondries

L'évaluation de la fonction de la chaîne respiratoire des mitochondries a été réalisée au moyen de la technique des fibres cardiaques perméabilisées mise au point en 1987 par Vladimir Veksler et ses collègues (Veksler et al., 1987). Cette méthode repose sur le traitement des fibres cardiaques avec la saponine qui est un détergent perforant sélectivement le sarcolemme, tout en laissant les membranes des structures internes (mitochondries, RS...) intactes, en raison de sa forte affinité pour le cholestérol. Cette perméabilisation permet à des substrats exogènes de pénétrer dans la cellule et de stimuler les mitochondries dont la fonction est évaluée par la mesure de la consommation de dioxygène reflétant les capacités oxydatives de l'organite.

1. Préparation des fibres perméabilisées

Immédiatement après le sacrifice et le rinçage du coeur, le ventricule gauche a été isolé et transféré dans une solution dite relaxante ((en mM) : EGTA (10), CaCo₃ (2,77), KOH (70), imidazole (20), Mg²⁺ libre (1), taurine (20), dithiothréitol (0,5), MgATP (5,7), phosphocreatine (15), potassium-methasulfonate (50) ; pH : 7,1). Les fibres ont alors été disséquées de manière à obtenir de petits amas de fibres de 100 à 200 µm de diamètre avant d'être mises en présence de saponine (50 µg/mL dans la solution relaxante) pendant 30 minutes à 4°C sous agitation pour une perméabilisation optimale des membranes plasmiques. Un lavage de 10 minutes à 4°C avec la solution relaxante exempte de saponine a permis l'élimination du détergent. Les fibres ont alors été conservées, jusqu'au moment de l'expérimentation, dans cette solution qui, de part sa composition, permet le maintien des fonctions cellulaires.

2. Mesure de la respiration mitochondriale

Dix minutes avant les protocoles de mesure de la respiration mitochondriale, les fibres ont été lavées dans une solution de respiration ((en mM) : EGTA (10), CaCO₃ (2,77), KOH (110), NaOH (10), K₂HPO₄ (3), imidazole (20), Mg²⁺ libre (1), taurine (20), dithiothréitol (0,5), glutamate (10), malate (4), potassium-methasulfonate (100) ; pH : 7,1) supplémentée de 2 mg/mL de BSA pour éliminer l'ATP présent dans la solution de relaxation. Les fibres ont ensuite été déposées dans les chambres de respiration contenant 3 mL de cette même solution de respiration contenant de la BSA ainsi que du glutamate et du malate constituant une source d'équivalents réduits (NADH) capable d'initier le transfert d'électrons depuis le complexe I de la chaîne respiratoire. La consommation d'oxygène des fibres contenues dans les chambres a alors été mesurée sous agitation à 22°C par une électrode à oxygène (de type Clark) reliée à une interface Oxygen Interface Model 928 (Strahtkelvin Instruments) qui transmet l'information à un ordinateur équipé du logiciel Strahtkelvin 928 System permettant l'enregistrement des données générées.

3. Analyse fonctionnelle des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et du Km pour l'ADP

Un premier protocole nous a permis, grâce aux ajouts successifs de deux concentrations d'ADP, d'estimer un Km pour l'ADP mitochondrial en présence ou en absence de créatine. En fin de protocole, des activateurs et des inhibiteurs spécifiques des complexes I, II et IV permettent également d'estimer l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire. Après avoir mesuré la diminution de la concentration de dioxygène dans les chambres en l'absence de fibres, qui reflète la consommation de dioxygène par la membrane de téflon de l'électrode (V_i), la vitesse basale de consommation du dioxygène des fibres (V_o), c'est-à-dire sans ADP exogène dans le milieu réactionnel, a été enregistrée. Cette mesure des paramètres initiaux a été suivie de l'ajout de 100 μ M d'ADP pour stimuler la phosphorylation oxydative mitochondriale. Vingt mM de créatine ont ensuite été ajoutés pour stimuler le système des transferts énergétiques des créatines kinases. Une concentration saturante d'ADP (2mM) permettant de mesurer la vitesse maximale (V_{max}) de la consommation de dioxygène a été ajoutée. Enfin, un ajout de 20 mM de succinate (concentration saturante), conduisant à la production de FADH₂ qui est oxydé par le complexe II, a permis de mesurer l'activité simultanée du complexe I et du complexe II. Un inhibiteur spécifique du complexe I, l'amytal (2 mM), a ensuite été utilisé pour déterminer l'activité individuelle du complexe II. L'activité maximale du complexe IV a été mesurée après ajout de 0,5 mM de tétraméthyl pphénylènediamine (TMPD) supplémenté de 0,5 mM d'acide ascorbique pour éviter l'autooxydation du TMPD. La fin du protocole expérimental a été signée par l'ajout d'azide de

sodium dans les chambres qui inhibe sélectivement le complexe IV. L'activité réelle du complexe IV a ainsi pu être déterminée par le calcul de la différence entre les vitesses de consommation de dioxygène mesurée avant et après l'ajout de cet inhibiteur.

4. Analyse fonctionnelle de l'utilisation de différents types de substrats par la mitochondrie

Le second protocole utilisé au cours de l'étude des propriétés intrinsèques des mitochondries a été élaboré dans le but de déterminer les capacités des fibres perméabilisées à oxyder un acide gras à chaîne longue (16 carbones), le palmitoyl-Coenzyme A (PCoA) ou à oxyder un substrat de type glycolytique, le pyruvate. Les fibres sont ajoutées dans la cuve de respiration dans une solution dépourvue de substrats (glutamate) mais contenant 2 mM d'ADP. Cent μM de PCoA sont ajoutés pour mesurer la consommation d'oxygène maximale pour ce type de substrat. En parallèle du PCoA, 2mM de Carnitine permettent la stimulation des carnitine palmitoyl transférases, le système de navette permettant l'entrée des acides gras à chaîne longues dans la mitochondrie. La consommation maximale d'oxygène pour le pyruvate est mesurée par l'ajout de 1 mM de ce substrat. En fin de protocole, 10 mM de glutamate permettent une stimulation maximale de l'activité du complexe I.

5. Analyse des données

En fin de protocole, les fibres sont récupérées afin d'être séchées sous vide à 75°C pendant une heure puis pesées. Cette étape permet la normalisation de toutes les vitesses mesurées (à l'aide du logiciel Strahtkelvin 928 System) au poids de tissu sec. L'activité des différents complexes et la capacité à utiliser les différents types de substrat ont été déduites des valeurs de vitesse de consommation de dioxygène mesurées avec le logiciel d'analyse. Les données générées par le premier protocole ont permis de calculer l'ACR (Accepting Control Ratio = V_{max}/V_0) qui permet d'estimer le couplage mitochondriale. Ce protocole a également permis l'estimation d'un K_m pour l'ADP en présence ou en absence de créatine en utilisant la formule : $K_m = 100 \mu\text{M} \times (V_{\text{max}}/V_{100} - 1)$.

Les vitesses de consommations d'oxygène pour le PCoA et le pyruvate ont été rapportées à la V_{max} obtenue en fin de protocole de manière à calculer un pourcentage d'utilisation pour les deux types de substrats.

G. Analyse du calcium mitochondrial *in situ*

La teneur en calcium mitochondrial a été étudiée *in situ* dans des fibres cardiaques isolées. Les fibres ont été séparées de la surface endocardique du ventricule gauche dans une solution de respiration à 4°C, puis incubées dans la solution I complétée avec 200 nM du MitoTracker Green (Life Technologies, France) et 5 $\mu\text{mol/L}$ de l'indicateur de calcium

III. Modèle d'étude *in vivo* : les souris invalidées pour SIRT1

mitochondrial Rhod-2-AM (Life Technologies, France) pendant 60 min à 4°C, puis pendant 30 min à 37°C. La solution I contient (en mM): 10 K₂EGTA, 1 Mg²⁺ libre, 3 K₂HPO₄, 20 taurine, 0,5 DTT, 54,2 méthanesulfonate de potassium, (force ionique 160 mM), 3,6 Na₂ATP, 12 phosphocréatine 10 glutamate, 4 malate, 60 Bes (pH 7,1) et 6% de dextran. Avec cette procédure de chargement à froid/incubation à chaud, le Rhod-2-AM se localise au niveau des mitochondries. La colocalisation du Rhod-2-AM et du Mitotracker Green a été évaluée avec un microscope confocal à balayage Leica TCS SP8 (Leica, Allemagne) en utilisant un objectif HC PL APO CS2 63x/1.40 à huile et quantifié avec le plugin Fiji Coloc 2. La fluorescence du Rhod-2 (λ excitation: 552 nm, λ émission: 581 nm) et du Mitotracker Green (λ excitation: 490 nm, λ émission: 516 nm) a été mesurée dans des plaques 96 puits à 37°C via un spectrofluorimètre (TECAN infinite M200, TECAN, Autriche).

H. Microscopie électronique à transmission

La mitophagie a été observée par microscopie électronique à transmission. Cette technique développée dans les années 1930 est basée sur l'utilisation d'un faisceau d'électrons à haute tension qui en passant au travers d'un échantillon perd des électrons et permet alors la constitution d'une image. Un microscope électronique à transmission (MET) présente un pouvoir de résolution beaucoup plus important (de l'ordre de l'Angström) qu'un microscope optique et permet d'obtenir des images avec un grossissement beaucoup plus grand.

L'observation des échantillons de coeur de souris a été réalisée en collaboration avec le Dr Marta Novotova (Institute of Molecular Physiology and Genetics, Bratislava, Slovaquie). L'observation des échantillons par microscopie électronique nécessite une première étape de fixation des tissus qui a été initiée par perfusion rétrograde du muscle cardiaque selon la méthode de Langendorff. Le myocarde a ainsi été perfusé pendant 5 minutes avec une solution de Krebs sans calcium à 4°C équilibrée avec un gaz composé de 95 % d'O₂ et 5 % de CO₂, puis la solution saline a été remplacée par une solution fixant les protéines (en mM : Na-Cacodylate 150, HCl 3.6, MgCl₂ 2, EGTA 1, Glutaraldéhyde 2 % ; pH : 7,3). Le myocarde a été perfusé pendant 5 minutes avec cette solution avant d'être retiré de la canule pour être plongé dans cette même solution de fixation durant 45 minutes. Les muscles papillaires ainsi qu'une partie superficielle de la paroi interne du ventricule gauche ont ensuite été isolés et traités de nouveau 45 minutes dans la solution de fixation. Après avoir été rincées une dizaine de fois dans une solution exempte de glutaraldéhyde (en mM : Na-Cacodylate 150, HCl 3.6, MgCl₂ 2, EGTA 1 ; pH : 7,3) pendant 10 minutes, ces pièces de tissus ont été traitées 45 minutes avec une solution d'osmium permettant la fixation des lipides membranaires (en mM : Na-Cacodylate 150, HCl 3.6, MgCl₂ 2, EGTA 1, Osmium 1 % ; pH : 7,3). Consécutivement à un lavage à l'eau distillée de 10 minutes, les tissus ont été traités avec une solution saturée

d'acétate d'uranyle, indispensable pour obtenir un bon contraste des membranes. Les échantillons ont ensuite été déshydratés au moyen de bains d'alcool à concentration croissante puis de bains d'acétone avant d'être plongés dans un mélange d'acétone et de durcupan durant une heure. Les pièces de tissus ont enfin été disposées selon l'orientation choisie (longitudinale ou transversale) pour être inclus dans du durcupan qui polymérise pour constituer un bloc. La réalisation des coupes ultrafines a été réalisée au moyen d'un ultramicrotome équipé d'un couteau de diamant qui, à partir des blocs, produit des tranches de tissus d'une épaisseur comprise entre 60 et 90 nm. Après avoir été préalablement traitées au citrate de plomb, les coupes ont été insérées dans la chambre du MET (JEM 1200) afin d'y être observées avec des grossissements variant de x4000 à x100000.

I. Préparation de mitochondries isolées

Les mitochondries cardiaques ont été isolées en utilisant la procédure standard. Les cœurs ont été hachés dans 4 ml de solution IB-1 (en mM: 225 mannitol, 75 saccharose, 0,5% de BSA, 0,5 EGTA, 30 Tris-HCl, pH 7,4) avec un homogénéisateur en verre (Teflon®). L'homogénat a été centrifugé à 800 g pendant 5 minutes. La fraction surnageante a été centrifugée à 9000 g pendant 10 minutes. La fraction de culot obtenue a été remise en suspension dans 2 ml de tampon IB-2 (en mM: 225 mannitol, 75 saccharose, 0,5% de BSA, 30 Tris-HCl, pH 7,4) et centrifugée à 10 000 g pendant 10 minutes. La fraction de culot a ensuite été remise en suspension dans 2 ml de tampon IB3 (en mM: 225 mannitol, 75 saccharose, 30 Tris-HCl, pH 7,4) et centrifugée à 10000 g pendant 10 minutes. La fraction finale de culot a été remise en suspension dans 50 µl de tampon RIPA avec anti-protéase (PMSF 1 mM, Na3VO4 1 mM, 2 µg / ml d'apoptinine et 5 µg / ml de leupeptine), Triton™ X-100 à 1% et anti-deubiquitinase (2 mM de n-éthylmaléimide). Les protéines extraites sont dosées par le test BCA et le western blot est ensuite réalisé selon la méthode décrite dans les méthodes cellulaires.

J. Mesure des activités enzymatiques mitochondriales et cytoplasmiques

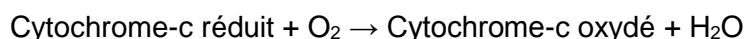
La fonction des mitochondries a également été déterminée par la mesure de l'activité de différentes enzymes mitochondriales.

1. Extraction des protéines

La mesure d'activité enzymatique a nécessité l'extraction des protéines contenues dans les tissus ventriculaires prélevés lors du sacrifice des animaux. Environ 30 mg de tissu pour 1 mL de tampon d'homogénéisation à 4°C (en mM : HEPES 5, EGTA 1, TritonX100 0,1%; pH = 8,7) ont donc été homogénéisés au moyen d'un micro-broyeur Precellys 24 (Bertin, France).

2. Mesure de l'activité du complexe IV

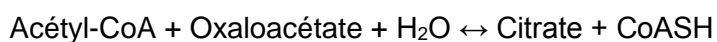
Le complexe IV, ou cytochrome-c oxydase (COX), est responsable de l'oxydation du cytochrome-c préalablement réduit par le complexe III (cytochrome-c réductase). Son activité est dosée dans un tampon phosphate 50 mM (pH 7,4) contenant 50 μ M de cytochrome-c réduit à 90% (par ajout de dithionite de sodium) à 30°C.



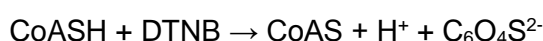
Le cytochrome-c n'ayant pas le même spectre d'absorption à l'état réduit et l'état oxydé, la disparition de la forme réduite, révélatrice de l'activité de la COX, est suivie pendant 3 minutes à 550 nm.

3. Mesure de l'activité de la citrate synthase

La CS est une enzyme impliquée dans le cycle de Krebs dont l'activité est traditionnellement mesurée pour estimer la masse mitochondriale car cette activité est révélatrice de la quantité de mitochondries fonctionnelles dans le tissu. Elle catalyse la réaction de condensation de l'acétyl-CoA, obtenu à partir des réactions cataboliques des sucres et des acides gras, et de l'oxaloacétate pour former l'acide citrique (ou citrate).



De la même manière que pour la mesure de l'activité des complexes, le dosage a été réalisé au moyen de méthodes spectrophotométriques. La réaction précédemment décrite ne permet cependant pas de mesurer directement la disparition ou l'apparition d'un des composants engagés dans la réaction. C'est pourquoi du DTNB (5,5'-ditiobis-(2-Nitrobenzoic acid) a été ajouté dans le milieu réactionnel. L'interaction de ce composé avec le CoaSH formé par la réaction régie par CS conduit à la formation de l'ion mercaptique ($\text{C}_6\text{O}_4\text{S}^{2-}$) qui présente un spectre d'absorption à une longueur d'onde de 412 nm.

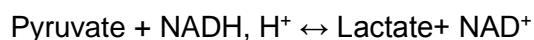


Le dosage de l'activité de la CS a ainsi été effectué en suivant l'apparition de l'ion mercaptique dans le milieu réactionnel pendant 3 minutes à 30°C.

4. Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase

La LDH est responsable de la dernière étape de la glycolyse anaérobie qui conduit à la formation du lactate à partir de la réduction du pyruvate.

III. Modèle d'étude *in vivo* : les souris invalidées pour SIRT1

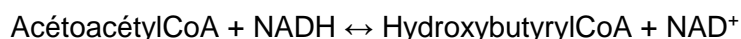


La mesure de l'activité enzymatique de la LDH a simplement été réalisée en suivant la disparition du NADH à 340 nm durant 3 minutes à 30°C dans un tampon contenant (en mM) :

K₂HPO₄ (34,1), KH₂PO₄ (7,35), Pyruvate (0,63), NADH (12,4) et NaHCO₃ (0,12) (pH 7,5).

5. Mesure de l'activité de l'hydroxyacylCoA déshydrogénase

La 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase est une oxydoréductase qui catalyse la 3^{ème} étape de la β-oxydation, c'est-à-dire l'oxydation de la 3-hydroxyacyl-CoA par le NAD⁺ :



La mesure de l'activité enzymatique de la LDH a simplement été réalisée en suivant la disparition du NADH à 340 nm durant 3 minutes à 30°C dans un tampon contenant (en mM) :

Pyrophosphate (200), EDTA (5), NADH (1) et H₂O

6. Analyse des données de spectrophotométrie

La méthode de quantification par spectrophotométrie se base sur la loi de Beer Lambert selon laquelle l'absorbance d'une solution, à une longueur d'onde donnée, est proportionnelle à la concentration des substances en solution capables d'absorber les rayons lumineux à cette longueur d'onde. L'évolution de la Densité Optique (DO) de chacun des échantillons au cours d'un protocole donné est donc proportionnellement liée à l'apparition ou la disparition de la molécule absorbante. Ceci permet ainsi le calcul de l'activité de l'enzyme (AE) considérée avec la formule suivante : $AE = ((DO_{finale} - DO_{initiale}) \cdot F) / (\epsilon \cdot L \cdot \Delta t)$ où F correspond au facteur de dilution de l'échantillon, ϵ à l'absorptivité molaire de la molécule absorbante (L.mol⁻¹.cm⁻¹) ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6220$; $\epsilon_{\text{Cyt-c réduit}} = 18500$; $\epsilon_{\text{C6O4S2-}} = 13600$), L à la longueur de la cuve (1 cm) et Δt au temps de mesure. Cette activité a enfin été rapportée à la concentration protéique des échantillons de manière à être exprimée en $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ par gramme de protéines.

K. Western Blot

L'analyse de l'expression de différentes protéines par western blot a nécessité l'extraction des protéines contenues dans les tissus ventriculaires prélevés lors du sacrifice des animaux. Environ 20 mg de tissu sont extraits dans 200 μ L de tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,5% acide déoxycholique)

III. Modèle d'étude *in vivo* : les souris invalidées pour SIRT1

complété avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche + PMSF 0,2mM), un cocktail d'inhibiteurs de désacétylases (Santa Cruz) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (NaF 50mM, NaPPi 5mM, DTT 1mM, β -glycérophosphate 1mM, Orthovanadate 1 mM) à 4°C. Ce tampon, associé à une homogénéisation mécanique au moyen d'un micro-broyeur Precellys 24 (Bertin, France) permet la lyse des cardiomyocytes. Le lysat est ensuite centrifugé pendant 30 min à 20 000 g à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Les protéines extraites sont dosées par le test BCA. Le western blot est ensuite réalisé selon la méthode décrite dans les méthodes cellulaires.

IV. Etudes statistiques

Les données sont présentées sous forme de moyenne +/- SEM (Standard Error of Mean). Ces données ont été analysées par le logiciel Sigma Stat (Sigma Stat, version 3.0, Systat Software, San Jose, CA, USA). Une ANOVA unidirectionnelle a été utilisée pour déterminer les éventuelles différences entre groupes, suivie d'un test post hoc de Newman-Keuls. Quand deux groupes seulement sont comparés, les différences sont évaluées par un test t de Student.

Les différences sont considérées comme significatives lorsque $P < 0.05$. Les légendes utilisées sur les figures sont les suivantes :

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ par comparaison avec les cellules non traitées ou avec les souris traitées avec le véhicule.

\$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$, \$\$\$ $P < 0.001$ par comparaison avec les cellules traitées avec TG et TN, ou avec les souris sauvages traitées avec TN.

Résultats

Article 1

Prola A, Nichtova Z, Pires Da Silva J, Piquereau J, Monceaux K, Guilbert A, Gressette M, Ventura-Clapier R, Garnier A, Zahradnik I, Novotova M and Lemaire C.

ER stress induces cardiac dysfunction through architectural modifications and alteration of mitochondrial function in cardiomyocytes

En révision dans Cardiovascular Research

Contexte scientifique :

Le stress du réticulum endoplasmique (stress RE), induit suite à l'altération des fonctions du RE, est reconnu comme un mécanisme impliqué dans le développement de nombreuses pathologies cardiovasculaires (Wang et al., 2018b). Cependant, les mécanismes physiopathologiques engendrés par le stress RE dans les cardiomyocytes sont encore mal connus. L'étude du stress RE dans le domaine cardiaque est relativement récente et seul un modèle d'induction directe de stress RE *in vivo* est décrit et reconnu dans la littérature. Ce modèle correspond à l'injection intra-péritonéale de tunicamycine (TN), un inhibiteur spécifique de la N-glycosylation des protéines (Heifetz et al., 1979). La N-glycosylation est un processus qui n'a lieu que dans le RE et son inhibition perturbe le repliement correct des protéines, provoquant l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE et par conséquent un stress RE. Le modèle d'injection intra-péritonéale de TN est désormais validé et utilisé dans la littérature (Liao et al., 2012; Petrovski et al., 2011; Prola et al., 2017), mais très peu de données sont disponibles concernant le développement et les caractéristiques de la dysfonction cardiaque induite par la tunicamycine. En effet, seule l'activation de la réponse UPR, la fonction contractile cardiaque, et l'apoptose ont été mesurées en réponse à TN.

Nous avons donc décidé de caractériser plus en détails les effets d'une injection intra-péritonéale de TN chez la souris, de manière à mieux comprendre le rôle du stress RE délétère dans le développement de la pathologie cardiaque. Dans la présente étude, nous avons évalué les effets précoces du stress RE sur la fonction cardiaque, l'ultrastructure des cardiomyocytes et la fonction mitochondriale.

Résultats :

Dans cet article, nous montrons que l'injection de tunicamycine (2 mg/kg) s'accompagne comme attendu d'un stress RE et de l'activation des trois branches de la réponse UPR. Après 72 h, la diminution de la fraction d'éjection et de la fraction de raccourcissement observées chez les souris traitées à la tunicamycine montre que le stress RE provoque une altération de la fonction cardiaque. Afin de caractériser les événements précoces induits par le stress RE, nous avons analysé l'effet de la TN sur l'ultrastructure des cardiomyocytes par microscopie électronique à transmission. Nous avons observé des modifications importantes au niveau de l'architecture du cardiomyocyte, et notamment une augmentation de la présence de ribosomes et de RE en réponse au stress RE. De nombreuses images ont montré que le stress RE favorise les connections physiques entre le RE et le RS avec partage de leur lumen. Ces résultats suggèrent qu'il existe une grande plasticité du réticulum dans le cœur permettant au réticulum sarcoplasmique d'évoluer en réticulum

endoplasmique en fonction des besoins du cardiomyocyte. Par ailleurs, le réseau mitochondrial est également apparu modifié en réponse au stress RE, avec une très grande hétérogénéité de la population mitochondriale en termes de forme et de taille. L'étude stéréologique de l'environnement mitochondrial (organites situés à une distance de 20 nm ou moins de la surface des mitochondries), a démontré que seuls les contacts RE/mitochondries (appelés MAM pour Mitochondria Associated Membranes) étaient augmentés par le stress RE. De plus, d'importantes altérations des transferts calciques RE/mitochondries et de la fonction énergétique mitochondriale sont induites par le stress RE. En effet, la capacité de la mitochondrie à générer l'ATP et la biogénèse mitochondriale sont diminuées en réponse à TN. La diminution de la fonction énergétique mitochondriale est associée à un shift de l'utilisation des acides gras vers l'utilisation des substrats glycolytiques et à une altération du système de transfert énergétique des créatines kinases.

Conclusions :

Cette étude nous a permis de mettre en évidence pour la première fois les évènements précoces induits dans le cardiomyocyte par le stress RE. Elle révèle que le stress RE induit des altérations de la cytoarchitecture et de la fonction des mitochondries du cardiomyocyte. Le stress RE pourrait donc représenter un mécanisme primaire contribuant à la détérioration du métabolisme énergétique qui a été rapporté dans la plupart des maladies cardiaques.

ER stress induces cardiac dysfunction through architectural modifications and alteration of mitochondrial function in cardiomyocytes

Alexandre Prola^{1,2}, Zuzana Nichtova³, Julie Pires Da Silva¹, Jérôme Piquereau¹, Kevin Monceaux¹, Arnaud Guilbert¹, Mélanie Gressette¹, Renée Ventura-Clapier¹, Anne Garnier¹, Ivan Zahradnik³, Marta Novotova³ and Christophe Lemaire²

¹Inserm UMR-S 1180, Univ Paris-Sud, Université Paris Saclay, 92296 Chatenay-Malabry, France

²U955-IMRB Team 10 BNMS, Inserm, UPEC, Université Paris-Est, Ecole nationale vétérinaire de Maisons-Alfort, France.

³Institute of Molecular Physiology and Genetics, Centre of Biosciences, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovak Republic

⁴Université Versailles St-Quentin, Inserm UMR-S 1180, Univ Paris-Sud, Université Paris Saclay, 92296 Chatenay-Malabry, France

Corresponding author:

Christophe Lemaire

UMR-S 1180 – Laboratory of Signalling and Cardiovascular Pathophysiology

Laboratory of Excellence LERMIT

Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud

5, Rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry

Phone : (+33)(0)1 46 83 52 41, Fax : (+33)(0)1 46 83 54 75

christophe.lemaire@u-psud.fr

Number of words: 9026

SUMMARY

Aims: Endoplasmic reticulum (ER) stress has recently emerged as an important mechanism involved in the pathogenesis of cardiovascular diseases. However, the molecular mechanisms by which ER stress leads to cardiac dysfunction remain poorly understood.

Methods and results: In the present study, we evaluated the early cardiac effects of ER stress induced by tunicamycin (TN) in mice. Echocardiographic analysis indicated that TN-induced ER stress led to a significant impairment of the cardiac function. Electron microscopic observations revealed that ultrastructural changes of cardiomyocytes in response to ER stress manifested extensively at the level of the reticular membrane system. Smooth tubules of sarcoplasmic reticulum in connection with short sections of rough endoplasmic reticulum were observed. The presence of rough instead of smooth reticulum was increased at the interfibrillar space, at the level of dyads and in the vicinity of mitochondria. At a functional level, ER stress resulted in a substantial decrease in the expression of the major regulator of mitochondrial biogenesis PGC-1 α and of its targets NRF1, Tfam, CS and COXIV. ER stress **also induced impairment of mitochondrial Ca²⁺ uptake that led to an alteration of** mitochondrial oxidative phosphorylation and to a metabolic remodeling characterized by a shift from fatty acid to glycolytic substrate consumption.

Conclusion: Our findings show that ER stress induces cytoarchitectural and metabolic alterations in cardiomyocytes and provide evidences that ER stress could represent a primary mechanism that contributes to the impairment of energy metabolism reported in most cardiac diseases.

INTRODUCTION

Heart failure is a major global health problem and a leading cause of mortality. In response to cardiac stress, several adaptations occur such as hypertrophy and metabolism modifications as an initial compensatory mechanism required for maintenance of cardiac output. However, in the long term these processes may become maladaptive and ultimately lead to cardiac decompensation and heart failure. Despite the considerable attention focused on pathological development of cardiac diseases, the understanding of the transition from adaptive to maladaptive response is still limited.

The rough endoplasmic reticulum (rER) is the site for synthesis and folding of secreted and membrane proteins. Disruption of ER homeostasis leads to accumulation of unfolded/misfolded proteins and ER stress. As a compensatory pro-survival response, the unfolded protein response (UPR) is activated to restore normal ER function. The canonical UPR is initiated by activation of three sensors, the kinase PERK, the transcription factor ATF6 and the kinase/endoribonuclease IRE1, which are normally kept inactive through the interaction with the ER-resident chaperone GRP78/BiP¹. Upon activation, these sensors induce the transcription of UPR target genes (e.g. *atf4*, *xbp1* and *chop*) resulting in the downregulation of protein synthesis, upregulation of ER chaperone expression, and upregulation of proteins involved in ERAD (ER Associated protein Degradation). However, in the case of prolonged or severe ER stress, where ER homeostasis cannot be restored, the mitochondrial apoptotic pathway is triggered to eliminate damaged cells². ER stress-dependent apoptosis was reported to be mediated mainly by the pro-apoptotic transcription factor CHOP, by pro-apoptotic members of the Bcl-2 family and by direct calcium transfer from ER to mitochondria³⁻⁵. Thereby, acute activation of ER stress response is protective while prolongation of the response typically leads to apoptosis and contributes to the maladaptive response.

Recently, ER stress has been linked to both physiological and pathological conditions in the cardiovascular system including oxygen and fuel starvation, myocardial infarction, ischemia, dilated cardiomyopathy, pressure overload, hypertrophy, and heart failure⁶. It has been suggested that the ER stress response is cardioprotective as part of the beneficial compensatory mechanism activated in the heart during a stress, while inhibition of this response is deleterious. For example, extinction of the central regulator of the ER stress response GRP78 aggravates insults upon

ischemia⁷. Protein disulfide isomerase (PDI), a major component of the UPR, is upregulated in peri-infarct myocardial region in humans and this increase is inversely correlated with the apoptotic rate and the presence of heart failure⁸. However, in the long term, ER stress response triggers apoptosis, which is part of the heart's maladaptive response and contributes to cardiac decompensation⁹. Thus, extinction of the ER stress-activated pro-apoptotic factor CHOP has been shown to reduce the cardiac dysfunction induced by pressure overload in mice¹⁰. Besides, treatment with the chemical chaperones 4-phenyl butyric acid (4-PBA) or TUDCA, which alleviate ER stress, protects the heart against isoproterenol- and anthracycline-induced cardiotoxicity and against obesity-induced myocardial contractile dysfunction¹¹⁻¹³.

Although understanding the pathophysiological role of ER stress in cardiovascular diseases has progressed in recent years, the exact physiological effect of ER stress on cardiomyocytes is still poorly understood. In the present study, we evaluated the effect of tunicamycin-induced ER stress on cardiac function, cardiomyocyte ultrastructure and mitochondrial function. Transmission electron microscopy analysis revealed that ER stress-induced cardiac dysfunction is associated with important ultrastructural modifications that manifest extensively at the level of the endomembrane system. Skinned cardiac fibers present slower mitochondrial oxidation rate and a shift from fatty acid to glucose utilization. Taken together, our results show that alteration of the cardiomyocyte ultrastructure and metabolism contributes to the maladaptive response of the heart to severe ER stress.

METHODS

Animals and treatments

To study ER stress *in vivo*, mice were given i.p. injection of TN 2 mg/kg body weight or the equivalent volume of vehicle (Dextrose 150 mM). Echocardiographic parameters were assessed 72 h after injection and hearts were harvested for molecular studies. **Mice were euthanized by cervical elongation.** This procedure was carried out in conformity with the European Community guiding principles in the care and use of animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament). Authorizations to conduct animal experiments were obtained from the French Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (n° B9201901, November 3rd, 2015).

Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed using a 15 MHz transducer under 2.5% isoflurane gas anesthesia. Two-dimensional-guided (2D) M-mode echocardiography was used to determine wall thickness and left ventricular chamber volume at systole and diastole and contractile parameters, such as fractional shortening (FS) or ejection fraction (EF).

Biochemical analysis

Frozen tissues were homogenized with Precellys 24 Bertin technologies in a buffer (50 mg/mL) containing (in mM) HEPES 5, EGTA 1, DTT 1 and 0.1% Triton X-100 and were incubated for 1 h at 0°C for complete enzyme extraction. Activities of total creatine kinase (CK), citrate synthase (CS), hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADHA) and mitochondrial cytochrome c oxidase (COX) were measured using standard spectrophotometric assays.

Western blot analysis

Frozen tissues were homogenized with Precellys 24 Bertin technologies in RIPA lysis buffer plus a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Roche), and PMSF for 30 min at 4 °C. Proteins (30 µg) were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Merck Millipore). Membranes were incubated overnight at 4°C with the following antibodies: anti-GRP78, anti-phospho-eIF2 α , anti-eIF2 α , **anti-MCU**, **anti-phospho-DRP1**, **anti-DRP1**, **anti MFN2**, **anti-OPA1** and anti-CHOP from Cell Signaling, **anti-IP3R**, **anti-VDAC**, **anti-MFN1**, **anti-COXIV**

and anti-OXPHOS from Abcam, anti-Actin, anti-FIS1, anti-SEC61 α , anti-RIBOPHORIN I, anti-RPS6 and anti-GADD34 from Santa Cruz. Proteins were detected on a ChemiDoc XRS (BioRad) by using the ECL method according to the manufacturer's instructions (Merck Millipore). To calculate the relative density (RD), ImageJ software was used and the intensity of each protein was normalized to actin. The data obtained were then expressed as the ratio of the intensity of the protein in treated mice to that of the corresponding protein in vehicle-treated mice (RD: relative density). The level of eIF2 α **and DRP1** phosphorylation was expressed as the ratio of the phosphorylated protein vs the total protein.

RNA isolation and RT-PCR

RNA was isolated from cultured cells using Zymo Research Quick RNA MiniPrep according to the manufacturer's instructions. Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed using BioRad iScript reverse transcription kit. cDNA was amplified by the “two-step” SsoFast EvaGreen supermix (BioRad), heated at 95°C for 30 s, followed by 50 cycles of denaturation at 95°C during 2 s and hybridization/elongation at 60°C during 5 s. The PCR primers were obtained from Eurofins and are listed in table S1. The results were quantified according to the Cq value method, where Cq is defined as the quantification cycle of PCR at which the amplified product is detected. The ratio $(1+E_{\text{target gene}})^{-(Cq_{\text{sample}}-Cq_{\text{control}})}$ $\text{target gene} / (1+E_{\text{reference gene}})^{-(Cq_{\text{sample}}-Cq_{\text{control}})}$ gene was calculated, where E represents the efficiency of the quantitative PCR reaction. With this calculation, expression of control was equivalent to one.

Electron Microscopy

Left ventricular papillary muscles were isolated from 3 control and 3 tunicamycin-treated (TN) mouse hearts, fixated with 2% glutaraldehyde in cacodylate buffer (in mM: 150 Na-Cacodylate, 2CaCl₂, pH 7.3) for 1 h, postfixated by 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer for 30 min and stained with 1% aqueous solution of uranyl acetate. After dehydration in graded ethanol series and acetone, the tissue was embedded in Durcupan (ACM Fluka).

Preparation of sections

Ultrathin (58-60 nm) longitudinal sections were cut using an ultramicrotome (Power-Tome MT-XL, RMC/Sorvall, Tucson, USA). The sections were mounted on formvar-coated copper grids,

contrasted with lead citrate and examined with a JEM 1200 electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan) at 80 kV. Random images of cardiomyocytes were recorded with a CCD camera (Gatan DualVision 300 W) at a magnification of 15,000 \times and analyzed using **Graphic Cell Analyzer**¹⁴ (see below).

Stereological Analysis

Estimation of volume densities (V_v)

Random images of random samples of papillary muscle tissue were analyzed by the point integration method¹⁵. The size of the point test grid generated by the program **Graphic Cell Analyzer**¹⁴ was calibrated to the image scale and the point distance set to preferred resolution. Relative V_v of organelles of interest was estimated as the fraction p/P , where p represents the number of test points falling on the structure of interest and P represents the total number of test points falling on profiles of cardiomyocytes in the evaluated image. Altogether, we analyzed 152 images of control and 161 images of TN-treated mice

Estimation of mitochondrial environment.

The mitochondrial environment was estimated according to Novotova et al.¹⁶ by the cycloidal intersection method implemented in the **Graphic Cell Analyzer**¹⁴. The intersections of cycloidal curves with the mitochondrion outer surface were counted and classified according to the nearest organelle present at the mitochondrion surface at the point of intersection. For evaluation of mitochondrial environment, we used the relation $E = I_s/I$, where I_s corresponds to the number of intersections pertinent to individual nearest organelle at a distance of 20 nm or less and I represents total number of intersections with all mitochondria in the analyzed image. The total number of classified intersections with mitochondrial surface was 10150 (4962 for control vs. 5188 for TN-treated cardiomyocytes). The final image magnification for analysis was 50000 \times .

Quantification of mitochondrial surface

EM quantification of individual mitochondrial surface in CTL and WT hearts was performed using Image J software on 20 slices (randomly chosen, magnification 15,000 \times) per animal as previously described¹⁷. The mean value of individual mitochondrial surface

was obtained on the whole population of mitochondria (for each group), and the distribution of these mitochondrial surfaces calculated for each animal in each group.

Analysis of *in situ* mitochondrial function

Mitochondrial respiration was studied *in situ* in saponin-skinned fibers, as previously described¹⁸. Briefly, fibers were separated from the endocardial surface of the left ventricle in skinning (S) solution (see below) at 4°C and permeabilized with 50 µg/ml of saponin for 30 min. Permeabilized fibers were rinsed in (R) solution (see below) for 10 min and transferred into a 3 ml oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments, Glasgow, UK). Solutions R and S contained (in mM): 2.77 CaK₂EGTA, 7.23 K₂EGTA (100 nM free Ca²⁺), 1 free Mg²⁺, 20 taurine, 0.5 DTT, and imidazole (pH 7.1). Solution S also contained (in mM) 50 potassium methanesulfonate, (160 mM ionic strength), 5.7 Na₂ATP, 15 phosphocreatine, while solution R contained 10 glutamate, 4 malate, 3 phosphate, 90 potassium methanesulfonate, 10 sodium methanesulfonate (ionic strength 160 mM) and 2 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin. Experiments were performed at 22°C under continuous stirring. Different experimental protocols were used based on substrate utilization pathways. One protocol determined mitochondrial respiration using fatty acids (0.1 mM Palmitoyl-Coenzyme A) or glycolytic substrate (1 mM pyruvate) in the presence of 2 mM ADP, 4 mM malate. Another protocol was intended to determine the dependency of respiration on external [ADP] in the presence or absence of 20 mM creatine with glutamate and malate. Fibers were exposed to increasing [ADP], to determine the apparent K_m for ADP and maximal mitochondrial respiration (V_{max}). The acceptor control ratio (ACR), an index of oxidation phosphorylation coupling, was calculated as V_{max}/V_o. Succinate (20 mM) was then added to measure respiration involving complex I and II, amobarbital (2 mM) was added to inhibit complex I and to measure respiration on complex II. Finally, TMPD (0.5 mM) and ascorbate (2 mM) were added to give electrons to complex IV and sodium azide (5 mM) was added to inhibit complex IV. Respiration for complex IV was then calculated as TMPD/ascorbate respiration cut off the remaining azide respiration.

Analysis of *in situ* mitochondrial calcium uptake

Mitochondrial calcium content was studied *in situ* in isolated cardiac fibers. Fibers were separated from the endocardial surface of the left ventricle in skinning (S) solution (see

analysis of mitochondrial function) at 4°C and then incubated in solution I with 200 nM MitoTracker Green (Life Technologies, France) and 5 µmol/L of the mitochondrial calcium indicator Rhod-2-acetoxymethyl ester (Rhod-2-AM; Life Technologies, France) for 60 min at 4°C, and then for 30 min at 37°C^{19, 20}. Solution I contained (in mM): 10 K₂EGTA, 1 free Mg²⁺, 3 K₂HPO₄, 20 taurine, 0.5 DTT, 54.2 potassium methanesulfonate, (160 mM ionic strength), 3.6 Na₂ATP, 12 phosphocreatine 10 glutamate, 4 malate, 60 Bes (pH 7.1) and 6% dextran. With this cold loading/warm incubation procedure, Rhod-2-AM localized to mitochondria. Colocalization of Rhod-2-AM and Mitotracker Green was evaluated with an inverted confocal laser scanning microscope Leica TCS SP8 (Leica, Germany) using a HC PL APO CS2 63x/1.40 oil immersion objective lens and quantified with the Fiji plugin Coloc 2. Rhod-2 (λ excitation: 552 nm, λ emission: 581 nm) and Mitotracker Green (λ excitation: 490 nm, λ emission: 516 nm) fluorescence was acquired in 96-well plates at 37°C in a spectrofluorimeter (TECAN infinite M200, TECAN, Austria).

Public data analysis

Analysis of gene expression using public repository data was performed using BioGPS webtools (<http://biogps.org/#goto=welcome>), a free scientific web resource²¹. We analyzed the microarray of wildtype mice from the dataset E-GEOD-19322. One-way ANOVA test with Benjamini and Hochberg false discovery rate (FDR) correction was applied to the comparison between the conditions, using a 0.05 threshold for statistical significance. Only C57BL/6J data were used.

Statistical analysis

All data are presented as mean±SEM. Data were analyzed using Sigma Stat (Sigma Stat, version 3.0, Systat Software, San Jose, CA, USA). Differences were assessed by Student's t-test when the data follow a normal distribution. Differences were assessed by Mann–Whitney U test when the data distribution was not normal. Differences between groups were considered significant if the P value was less than 0.05. *: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.005 vs CTL. Microarray analysis was conducted using One-way ANOVA test with Benjamini and Hochberg false discovery rate (FDR) correction, using a 0.05 threshold for statistical significance. Only C57BL/6J

data were used. Correlation coefficient and significance were calculated using Spearman correlation test.

RESULTS

ER stress induces cardiac dysfunction in mice

To investigate the effects of ER stress on cardiac function, ER stress was induced in mice by intraperitoneal injection of tunicamycin (2 mg/kg), which inhibits N-linked glycosylation of proteins in the ER. This model is known to elicit activation of the UPR leading to cardiomyocyte apoptosis and development of cardiomyopathy^{22, 23}. TN injection provoked sustained ER stress **and activation of the three arms of the UPR**, as demonstrated by increased transcriptional expression of *Grp78*, *Grp94*, **full-length *Xbp1* (*Xbp1u*)**, **spliced *Xbp1* (*Xbp1s*)** and *Chop* (Figure 1A), upregulation of GRP78, CHOP and GADD34 protein levels and increase in eIF2 α phosphorylation (Figure 1B). At the anatomical level, 72 h of ER stress challenge induced a loss of body weight and liver weight (Table S2) but did not overtly affected the weight of other organs. TN-induced ER stress led to a significant impairment of cardiac function as judged by the decrease in ejection fraction and fractional shortening (Figure **1D-E**) induced by TN relative to vehicle-treated mice. In contrast, heart rate (Figure 1C), left ventricular internal diameters in diastole and systole or wall thickness were not affected (Table S3). Together, these data indicate that tunicamycin injection is a valuable model to study ER stress-induced cardiac dysfunction.

ER stress induces ultrastructural alterations in cardiomyocytes

To characterize the effects of ER stress induction in heart, ultrastructural analysis of cardiomyocytes was carried out by transmission electron microscopy. Application of vehicle did not induce any ultrastructural changes in control cardiomyocytes. Myofibrils were aligned in the longitudinal direction and sarcomeres were in register. Sub-sarcolemmal as well as intermyofibrillar mitochondria were regular in shape and size and formed columns grouped along myofibrils (Figure 2A). ER stress induction led to modification of the ultrastructure of cardiomyocytes. **While some cardiomyocytes were similar to control, we also observed cardiomyocytes with hypertrophying areas characterized by local accumulation of cytosol (Figures 2D, E, F and S2) and the presence of mitochondrial clusters (Figures 2B and S2).**

Ultrastructural alterations of the reticular membrane system

The endomembrane system in control cardiomyocytes consists of a prevailing network of smooth sarcoplasmic reticulum (SR) occurring near the sarcomeres (Figure 2C, 4C), whereas rough endoplasmic reticulum is observed near nuclei and to a lesser extent in regions of I-bands, near the Z-line. ER stress greatly influenced the composition and distribution of the reticular membrane system in cardiomyocytes. Generally, increased amount of the network of rER was observed. Hypertrophying areas (Figure 2D) were rich in ribosomes, polyribosomes and branches of rER. These regions were similar by their composition to the growing areas in developing myocytes. The network of smooth SR was maintained in some regions of the A-band, but in other regions of the A-band, network of rER or branches of rER dominated (Figure 2E). Interestingly, the network of SR and rER sometimes shared their lumen (Figure 2F), indicating continuation of their inner volumes. From the morphological point of view, the character of reticular membrane system has been changed. An increased occurrence of rER in the area of I-band and A-band in TN-treated cardiomyocytes led to substantial ultrastructural changes at the level of dyadic microdomains (Figure 3). Dyads of control cardiomyocytes consist of a central t-tubule and of a SR cistern (Figure 3A). Remodeling of dyadic microdomains in TN-treated hearts was manifested by the appearance of ribosomes and polyribosomes on the reticular membranes occurring in a close proximity to the membrane of the central t-tubule (Figure 3B, D) and on the cistern of SR (Figure 3C). **The increased amount of rER network was also evidenced by the TN-induced increased expression of the ribosomal protein RBP6, the ribosome-binding protein of the ER Ribophorin I and the translocon protein Sec61 α (Figure 3E).** These observations reveal for the first time a plasticity of the reticulum network in the heart. It seems that the reticulum evolved from a SR to an ER morphology in response to ER stress, probably leading to important modifications of Ca²⁺ cycling.

Ultrastructural alterations of mitochondrial population

Mitochondria of control cardiomyocytes had a typical cylindrical shape extended along the axis of the cell. In comparison to control (Figure 4A), the mitochondria **of the intermyofibrillar region** of TN-treated cardiomyocytes appeared to be heterogeneous in shape and size (Figure 4B). In the hypertrophying region of cardiomyocytes, inner mitochondrial membrane of some mitochondria was changed, and fragmentation of mitochondrial cristae was observed (Figure 4E). **Moreover, quantification of mitochondrial surface revealed a significant increase of the**

proportion of small mitochondria (<0.2 μm^2) associated with a decrease of large mitochondria (>0.5 μm^2 , Figure 4G). To investigate whether a more fragmented network would be triggered by increased profission or reduced profusion signals, we quantified the expression level of the main regulators of these processes. However, the transcriptional expression of *Mfn2*, *Opa1* and *Fis1*, the protein levels of MFN1, MFN2, OPA1 and FIS1 and the phosphorylation of DRP1 were not modified by ER stress (Figure 4H-I and S1A).

ER stress induces mitochondrial dysfunction

We reasoned that changes in mitochondrial architecture induced by ER stress may produce changes in the oxidative capability of the heart. We therefore measured mitochondrial respiration rates and substrate preference *in situ* in permeabilized fibers. Basal respiration in the presence of substrates but without ADP in the respiratory medium (V_o) and thus without ATP production, was not modified by TN treatment. In contrast, maximal coupled respiration rate with ADP in the medium was decreased in the presence of glutamate (complex I), succinate (complex I+II), amytal (complex II) and TMPD/ascorbate (complex IV) (Figure 5A). Consequently, the coupling between oxidation and phosphorylation estimated by the ratio of maximal respiration on basal respiration was decreased following ER stress induction (Figure 5B). This low respiratory efficiency was associated with reduced enzymatic activity of citrate synthase (CS) and cytochrome c oxidase (COX) (Figure 5C, D). The reduced mitochondrial capability to generate ATP was accompanied by a dramatic inhibition of mitochondrial biogenesis as the transcriptional expression of the master coordinator of mitochondrial biogenesis *Pgc-1 α* and its targets *Nrf1*, *Tfam*, *Cs*, *CoxIV* were profoundly decreased by ER stress (Figure 5E). **The decrease of mitochondrial mass suggested by the decrease of CS activity was also evidenced by reduced protein levels of the subunits of complex I, II, IV and V of the respiratory chain (Figure 5F), the mitochondrial calcium uniporter (MCU) and the porin VDAC (Figure S1C).**

Stereological analysis revealed a significant decrease of the volume density of lipid droplets in cardiac muscle tissue in TN-treated mice (Table S4), while no significant change in other components of cardiomyocytes were found. The volume of lipid droplets significantly decreased from 1.25 ± 0.38 % of the unit cell volume in controls to 0.87 ± 0.18 % in TN-treated cardiomyocytes. This result suggests a modification of the lipid metabolism by ER

stress. Mitochondrial respiration was decreased when fueled by palmitoyl-Coenzyme A or by glutamate and succinate (V_{max}) but not changed when fueled with the glycolysis-derived substrate pyruvate (Figure 6A). Consequently, in TN-treated mice the relative oxidation of fatty acids (FA) was significantly decreased, whereas the relative oxidation of pyruvate was increased (Figure 6B). Accordingly, the activity of the lactate dehydrogenase involved in glycolysis was increased, whereas the activity of the fatty acid β -oxidation enzyme HADHA was decreased (Figure 6C, D). Moreover, mRNA level of the master regulator of FA oxidation PPAR α , as well as the β -oxidation enzyme MCAD, were markedly decreased after TN injection (Figure 6E). The transcriptional expression of mitochondrial FA transporters CPT1, CPT2 and CD36 remained unchanged, suggesting that the decreased oxidation rate of FA induced by ER stress is not the result of FA transport alterations but is rather due to a global decrease of mitochondrial β -oxidation (Figure 6E).

In cardiomyocytes, a localized crosstalk between energy producing and energy consuming sites is required to ensure proper cardiac contractility. This phosphotransfer is achieved by creatine kinase much more efficiently than by simple diffusion of nucleotides through the bulk cytosol²⁴. We thus assessed the functionality of the creatine kinase shuttle. We first measured creatine kinase enzymatic activity and we reported a decrease after TN injection (Figure 6F). We next analyzed the mitochondrial respiration regulation by ADP in the presence or absence of creatine to estimate the K_m to ADP. Whereas K_m to ADP was not modified in the absence of creatine, TN injection induced an increase of the K_m after creatine addition (Figure 6G), showing a decreased efficiency of mitochondrial creatine kinase. These results suggest that ER stress induces an alteration of the creatine kinase energy transfer function that could contribute to ER stress-mediated metabolic alterations in cardiomyocytes.

Mitochondrial environment

We then sought to determine the mechanism that led to mitochondrial dysfunction in response to ER stress. As we observed substantial cytoarchitectural modification in response to TN treatment, we first performed a morphometric analysis of the mitochondrial environment, which corresponds to the presence of organelles at a distance of 20 nm or less from mitochondrial surface. As shown in Table S5, the most common structures close to

mitochondria in control and TN-treated cardiomyocytes were myofibrils (41.3 ± 9.2 % vs. 36.5 ± 2.2 %, respectively) and neighboring mitochondria (29.9 ± 6.1 % vs. 35.0 ± 6.9 %, respectively). The remaining environment of mitochondria was represented by SR, rER and mixed smooth and rough reticulum, ribosomes and polyribosomes, dyads and transversal tubules, cytoplasm, plasma membrane and lipid droplets (Table S5). Among the different organelles found in the mitochondrial environment, only the proportion of rER that lies in close contact with mitochondria, the so-called mitochondria-associated-membranes fraction (MAM), was increased by ER stress induction from 0.7 ± 0.2 in control to 2.1 ± 0.6 while the total occurrence of reticular network (smooth and rough) near mitochondria was not changed.

Mitochondrial calcium homeostasis

Given that MAM plays a key role in the transport of calcium from the SR/ER to mitochondria, the mitochondrial calcium content in response to ER stress was examined. Assessment of specific mitochondrial calcium loading with Rhod-2-AM was performed on isolated cardiac fibers. With our staining protocol, fluorescent dye showed a specific mitochondrial staining, overlapping with the mitochondrial marker MitoTracker Green (Manders coefficient $>97\%$, Figure S1B). First, we observed that when cardiac fibers isolated from control mice were treated with TN ($40 \mu\text{g/ml}$), a fast and progressive increase of the Rhod-2-AM signal was induced, indicating that acute ER stress induces a rapid mitochondrial calcium uptake (Figure 6H). Second, when cardiac fibers were isolated from mice challenged for 72 h with vehicle (CTL) or with TN, we observed that the mitochondrial calcium content, normalized to mitochondrial mass (MitoTracker Green), was unchanged (Figure 6I-J). Calcium fluxes between ER and mitochondria were then monitored upon histamine stimulation (IP3R-dependent ER Ca^{2+} efflux activator), in order to release calcium from ER through the IP3R. Mitochondrial Ca^{2+} uptake induced by histamine was significantly reduced in TN-treated mice by comparison with CTL (Figure 6I-K). The alteration of Ca^{2+} flux between ER and mitochondria was associated with unchanged IP3R1 protein level but decreased VDAC and MCU contents (Figure S1C). Altogether, these results demonstrate that 72 h after ER stress, the Ca^{2+} transfer between SR/ER and mitochondria is impaired.

ER stress and cardiac disease

The important alteration of mitochondrial function should represent a major pathological event contributing to cardiac dysfunction. Therefore, we reasoned that ER stress could contribute to the alteration of mitochondrial function reported in cardiac diseases. To support these results, we conducted a search of public gene expression repositories on BioGPS (<http://biogps.org/#goto=welcome>) to identify a possible link between ER stress and mitochondrial function.²¹ Using microarray analyses of the dataset E-GEOD-19322²⁵, we reported an activation of the ER stress response in a mouse model of myocardial infarction (MI) (Figure 7A). Interestingly, the expression profile of genes of the ER stress response was heterogeneous. The increased expression of some genes was transient and reached a maximum 1 day after MI and returned to normal level 5 days after MI (e.g. *Chop*, *Grp78*, *Xbp1*, *Atf3* and *Atf4*), whereas the expression of other genes increased progressively (e.g. *Edem1*, *P58ipk*, *Pdia4* and *Calreticulin*) (Figure 7A). Given that the expression of all members of the PGC-1 α pathway were dramatically decreased upon TN injection, we paid a specific attention to PGC-1 α expression in the context of MI. PGC-1 α expression varies highly among the different conditions of the dataset (Sham and MI, infarct and border region, 1 day or 5 days after MI) and in agreement with our data, a dramatic decrease of PGC-1 α mRNA in the stressed region 1 day and 5 days after MI was observed (Figure 7B). Consequently, the expression of citrate synthase, (*Cs*), *Tfam* and *CoxIV* were decreased. Moreover, a strong negative correlation between the expression of genes of the UPR and *Pgc-1 α* was observed (Figure 7C-M). **Interestingly, the negative correlation between the IRE1 and ATF6 branches of the ER stress response and *Pgc-1 α* is strong and highly significant (Figure 7C-I), whereas the correlation with the PERK branch of the UPR is less (*Atf4* and *Atf3*, Figure 7J, K) or not (*Gadd34* and *Chop*, Figure 7L, M) significant. This suggests that a member of the IRE1 or ATF6 pathway could directly regulate *Pgc-1 α* expression.**

Altogether, these results demonstrate that ER stress induces a robust alteration of mitochondrial function and biogenesis and suggest that the well described decrease of PGC-1 α expression during cardiac disease could be induced by ER stress.

DISCUSSION

Different studies have demonstrated the importance of ER stress in the development of cardiac diseases, but the lack of reliable models raises the difficulty to distinguish primary effects of ER stress from secondary adaptive response of the heart. Because the ER stressor tunicamycin specifically affects N-linked glycosylation of proteins in the ER, intraperitoneal injection of TN constitutes an interesting model to study the functional effects of ER stress in the heart but was never precisely characterized. Here, we provide evidence that TN injection corresponds to a valuable model and reveal undescribed early adaptations of cardiomyocytes to ER stress. We demonstrated that ER stress induces an important alteration of the ultrastructure of cardiomyocytes that **presented as early signs of cardiomyopathy/hypertrophy** phenotype, accompanied by a reorganization of the endomembrane system and modifications of mitochondrial structures. ER stress induced a profound inhibition of mitochondrial biogenesis pathway, an inhibition of mitochondrial respiration and a decrease in mitochondrial fatty acid utilization. These metabolic alterations may play an important role in the ER stress-induced cardiac dysfunction.

One purpose of this study was to evaluate the effect of acute ER stress in the heart *in vivo*. Our results demonstrate that TN-induced ER stress triggers a rapid phosphorylation of eIF2 α and an increase in the expression of the ER stress markers GRP78, CHOP and GADD34 in cardiomyocytes. Furthermore, TN injection resulted in the reduction of cardiac contractility after 72 h and thus represents a valuable tool to evaluate the early effects of ER stress in cardiomyocytes. In a previous study, it was reported that ER stress impairs intracellular Ca²⁺ homeostasis and excitation-contraction coupling in cardiomyocytes²⁶. However, the mechanisms underlying these defects were not investigated. Here, we show that early effects of ER stress are accompanied by a reorganization of the reticulum network. Importantly, we evidenced the presence of rough instead of smooth reticulum at the interfibrillar space. The presence of tubules covered by ribosomes/polyribosomes in the vicinity of myosin myofilaments (A band) in TN-treated mice shows the possible changes of the properties of the endomembrane network in adult cardiomyocytes and could be an adaptive response to ER stress. The increased occurrence of rER in TN-treated cardiomyocytes at the level of dyads suggests higher protein synthesis in these areas and reorganization of the dyadic microdomains. Our findings suggest that structural

alterations of the excitation-contraction coupling apparatus could be involved in ER stress-mediated cardiac dysfunction and that ER stress could contribute to the depressed Ca^{2+} cycling observed in cardiac diseases.

In the heart, the SR has been widely considered as just a different name for the ER, but recent biochemical and ultrastructural analysis support the concept of functionally distinct SR and ER compartments.⁶ In agreement, we observed in control mice distinct SR and ER systems. In response to ER stress, an increase in the amount of rough endoplasmic reticulum was observed **in the intermyofibrillar region. This observation might appear surprising because a hallmark of the UPR via the PERK/eIF2 α axis is translational arrest to prevent overloading of ER with nascent proteins. In fact, as a consequence of UPR induction, a continued association, rather than release, of ER-bound ribosomes has been reported²⁷. In addition, the authors showed that when UPR is elicited, mRNA translation is sustained in the ER compartment, whereas it is suppressed in the cytosol. Therefore, the increased rER and ribosome content after TN treatment observed in cardiomyocytes could be considered as a compensatory mechanism to cope with ER stress. We also observed ultrastructural continuity between rough and smooth reticulum that were shown to share their lumen, indicating that the endomembrane system may form one continuous network. These observations reveal that the reticular network not only is a dynamic membrane system but also may have a high plasticity evolving from smooth to rough morphology to adapt to cellular conditions.**

Optimal mitochondrial ATP production is essential in normal cardiac function and it is now established that mitochondrial biogenesis and function is altered in numerous cardiac diseases including heart failure^{28, 29}. However, the pathological mechanisms associated with alteration of the mitochondrial function in cardiac diseases remain not fully understood. In this study, we demonstrate that ER stress induces important alterations of the mitochondrial oxidative function. In functional experiments on permeabilized cardiac fibers, alteration of the mitochondrial respiration induced by ER stress is not specific to a respiratory complex as values for complex I, I+II, II and IV dependent-respiration are similarly decreased. Remarkably, this global alteration of mitochondrial function is only visible in phosphorylating state suggesting a decrease in ATP production. **This is accompanied by an increased occurrence of small mitochondria suggesting an increase in mitochondrial fragmentation, although it cannot be excluded that**

these small mitochondria represent protrusions of large mitochondria. These results suggest that ER stress could contribute to the development of cardiac diseases by impairing mitochondrial **structure and functions**.

It has been demonstrated that cardiac dysfunction is associated with a shift from fatty acid to glucose utilization for ATP generation^{30, 31}. The implication of this metabolic shift in the pathogenesis of cardiac diseases is still debated as both activation and inhibition of fatty acid oxidation are considered as potential therapeutic strategies.³² In any cases, the decrease of fatty acid oxidation is interpreted as an oxygen-sparing mechanism, but the mechanism that triggers this shift is still poorly understood. We demonstrate here that ER stress induced a shift from fatty acid oxidation to glucose utilization as evidenced by an increase of the lactate dehydrogenase activity and a decrease of β -oxidation capacity after TN treatment. ER stress could thus represent a new mechanism underlying the metabolic shift observed in cardiac disease.

One other important finding of this study is the dramatic ER stress-induced decrease in expression of proteins involved in mitochondrial biogenesis that are regulated by the co-activator PGC-1 α . This alteration of PGC-1 α levels could represent a major insult in the pathological development of the disease. This hypothesis is supported by the bioinformatic study that we conducted on a mice model of myocardial infarction²⁵ that revealed a similar alteration of PGC-1 α expression. Importantly, we found strong negative correlations between several members of the **IRE1 and ATF6 branches of the UPR** and PGC-1 α expression, suggesting that one member of **these pathways** may be a direct regulator of PGC-1 α expression at the transcriptional level. **The high similarity of the activation IRE1 and ATF6 pathways probably reflect their interconnection through XBP1.** These results also evidenced that **the PERK pathway is less connected to the other branches and present its own kinetic of activation.** Interestingly, a decrease of PGC-1 α expression was also reported upon induction of ER stress in liver³³, suggesting that this alteration is not organ specific. However, additional studies are needed to confirm the close relationship between the UPR and PGC-1 α expression in cardiac diseases. Although mitochondrial biogenesis was decreased upon ER stress, the short onset of apparition of mitochondrial dysfunction associated with the fact that in the heart, mitochondria are stable organelles with a half-life of 5.6 to 6.2 days, suggest that mitochondrial alteration could not be

entirely explained by a mitochondrial self-renewal defect and that other mechanisms may underlie this process.

The main physiological role of Ca^{2+} uptake in mitochondria is to increase the activity of rate-limiting enzymes of the Krebs cycle and ATP production⁹. Oppositely, mitochondrial Ca^{2+} overload uncouple oxidations from phosphorylations and triggers opening of the mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) leading to apoptotic cell death³⁴. Several studies have shown that alterations in organelles' functional tethering is a common hallmark in different pathologies, such as metabolic syndrome, cancer and neurodegenerative diseases³⁴. In the heart, Ca^{2+} crosstalk between SR/ER and mitochondria has been involved in myocardial reperfusion injury³⁵ and the inhibition of SR/ER/mitochondria interactions protects cells against reperfusion injury³⁶. Here, we demonstrated that acute ER stress challenge provokes a rapid mitochondrial calcium uptake, as previously described in other cell types³⁷. Intriguingly, despite increased contact between rER and mitochondria, a prolonged ER stress (72 h) leads to a decrease of mitochondrial Ca^{2+} uptake in response to histamine-induced rER calcium release. We reasoned that acute ER stress induces mitochondrial Ca^{2+} overload leading to a reduction of mitochondrial membrane potential that in turn, reduces mitochondrial Ca^{2+} uptake. This hypothesis is in agreement with the demonstration that ER stress slows intracellular Ca^{2+} clearance in cardiac cells²⁶. Decreased mitochondrial calcium content and membrane potential may thus explain decreased respiration rates.

It was recently showed that the three subsets of heart mitochondria (i.e. intermyofibrillar, subsarcolemmal and perinuclear mitochondria) are morphologically different and respond differently to ischemic stress³⁸. In our model of ER stress induction, the reduction of mitochondrial size was detected only in the intermyofibrillar region, in which the occurrence of rER as well as rER-mitochondria interactions was increased. Our observations that TN induces a rapid mitochondrial Ca^{2+} uptake and a decrease of mitochondrial size, suggest that increased Ca^{2+} transfer from rER to mitochondria can induce mitochondrial fragmentation in cardiomyocytes, as reported for other cells³⁹.

In conclusion, we identified ultrastructure modifications of cardiomyocytes in response to ER stress with reticulum network disorganization. An important finding was that **after 72 h, ER**

stress reduces mitochondrial Ca²⁺ uptake and triggers an alteration of all components of cardiac energy metabolism, from the substrate utilization to the oxidative phosphorylation and the transport of energy to the myofibrils. These results provide evidence that ER stress could represent an early mechanism that contributes to the impaired energy metabolism reported in most cardiac diseases.

FUNDING

This work was funded by the grant ANR-10-LABX-33 as members of the Laboratory of Excellence LERMIT, FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) to A. Garnier (#DPM20121125546), Région Ile de France CODDIM to R. Ventura-Clapier (#cod110153) and by grant VEGA 2/0110/15, APVV-15-0302 and SK-FR-2015-0007 to M. Novotova. A. Prola received a fellowship from Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC). A. Guilbert received a fellowship from Région Ile de France CORDDIM.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank F. Lefebvre for helpful technical assistance and V. Domergue-Dupont and the animal core facility of IPSIT for efficient handling and preparation of the animals. We thank L. Novota for skillful technical assistance and preparation sections for electron microscopy. We gratefully acknowledge Dr AM. Gomez and Dr R. Fischmeister for continuous support.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

REFERENCES

1. Hetz C, Papa FR. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Molecular cell* 2018;**69**:169-181.
2. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;**13**:89-102.
3. Csordas G, Thomas AP, Hajnoczky G. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J* 1999;**18**:96-108.
4. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 2007;**129**:1337-1349.
5. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 2011;**13**:184-190.
6. Minamino T, Kitakaze M. ER stress in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:1105-1110.
7. Shintani-Ishida K, Nakajima M, Uemura K, Yoshida K. Ischemic preconditioning protects cardiomyocytes against ischemic injury by inducing GRP78. *Biochemical and biophysical research communications* 2006;**345**:1600-1605.
8. Severino A, Campioni M, Straino S, Salloum FN, Schmidt N, Herbrand U, Frede S, Toietta G, Di Rocco G, Bussani R, Silvestri F, Piro M, Liuzzo G, Biasucci LM, Mellone P, Feroce F, Capogrossi M, Baldi F, Fandrey J, Ehrmann M, Crea F, Abbate A, Baldi A. Identification of protein disulfide isomerase as a cardiomyocyte survival factor in ischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2007;**50**:1029-1037.
9. Bravo R, Vicencio JM, Parra V, Troncoso R, Munoz JP, Bui M, Quiroga C, Rodriguez AE, Verdejo HE, Ferreira J, Iglewski M, Chiong M, Simmen T, Zorzano A, Hill JA, Rothermel BA, Szabadkai G, Lavandero S. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *Journal of cell science* 2011;**124**:2143-2152.
10. Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, Sawada T, Okuda K, Asano Y, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, Komuro I, Kitakaze M, Minamino T. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation* 2010;**122**:361-369.
11. Ayala P, Montenegro J, Vivar R, Letelier A, Urroz PA, Copaja M, Pivet D, Humeres C, Troncoso R, Vicencio JM, Lavandero S, Diaz-Araya G. Attenuation of endoplasmic reticulum stress using the chemical chaperone 4-phenylbutyric acid prevents cardiac fibrosis induced by isoproterenol. *Exp Mol Pathol* 2012;**92**:97-104.
12. Ceylan-Isik AF, Sreejayan N, Ren J. Endoplasmic reticulum chaperon tauroursodeoxycholic acid alleviates obesity-induced myocardial contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**50**:107-116.
13. Daosukho C, Chen Y, Noel T, Sompol P, Nithipongvanitch R, Velez JM, Oberley TD, St Clair DK. Phenylbutyrate, a histone deacetylase inhibitor, protects against Adriamycin-induced cardiac injury. *Free Radic Biol Med* 2007;**42**:1818-1825.

14. Parulek J, Sramek M, Cerveansky M, Novotova M, Zahradnik I. A cell architecture modeling system based on quantitative ultrastructural characteristics. *Methods in molecular biology* 2009;**500**:289-312.
15. Baddeley AJ, Gundersen HJ, Cruz-Orive LM. Estimation of surface area from vertical sections. *Journal of microscopy* 1986;**142**:259-276.
16. Novotova M, Pavlovicova M, Veksler VI, Ventura-Clapier R, Zahradnik I. Ultrastructural remodeling of fast skeletal muscle fibers induced by invalidation of creatine kinase. *American journal of physiology Cell physiology* 2006;**291**:C1279-1285.
17. Piquereau J, Caffin F, Novotova M, Prola A, Garnier A, Mateo P, Fortin D, Huynh le H, Nicolas V, Alavi MV, Brenner C, Ventura-Clapier R, Veksler V, Joubert F. Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload. *Cardiovascular research* 2012;**94**:408-417.
18. 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. *Nat Protoc* 2008;**3**:965-976.
19. Li Y, Boehning DF, Qian T, Popov VL, Weinman SA. Hepatitis C virus core protein increases mitochondrial ROS production by stimulation of Ca²⁺ uniporter activity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2007;**21**:2474-2485.
20. Trollinger DR, Cascio WE, Lemasters JJ. Selective loading of Rhod 2 into mitochondria shows mitochondrial Ca²⁺ transients during the contractile cycle in adult rabbit cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 1997;**236**:738-742.
21. Wu C, Jin X, Tsueng G, Afrasiabi C, Su AI. BioGPS: building your own mash-up of gene annotations and expression profiles. *Nucleic acids research* 2016;**44**:D313-316.
22. Prola A, Silva JP, Guilbert A, Lecru L, Piquereau J, Ribeiro M, Mateo P, Gressette M, Fortin D, Boursier C, Gallerne C, Caillard A, Samuel JL, Francois H, Sinclair DA, Eid P, Ventura-Clapier R, Garnier A, Lemaire C. SIRT1 protects the heart from ER stress-induced cell death through eIF2 α deacetylation. *Cell death and differentiation* 2017;**24**:343-356.
23. Zhang Y, Xia Z, La Cour KH, Ren J. Activation of Akt rescues endoplasmic reticulum stress-impaired murine cardiac contractile function via glycogen synthase kinase-3 β -mediated suppression of mitochondrial permeation pore opening. *Antioxid Redox Signal* 2011;**15**:2407-2424.
24. Kaasik A, Veksler V, Boehm E, Novotova M, Minajeva A, Ventura-Clapier R. Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circ Res* 2001;**89**:153-159.
25. Hunt DL, Campbell PH, Zambon AC, Vranizan K, Evans SM, Kuo HC, Yamaguchi KD, Omens JH, McCulloch AD. Early postmyocardial infarction survival in Murphy Roths Large mice is mediated by attenuated apoptosis and inflammation but depends on genetic background. *Experimental physiology* 2012;**97**:102-114.
26. Yang L, Wang J, Yang J, Schamber R, Hu N, Nair S, Xiong L, Ren J. Antioxidant metallothionein alleviates endoplasmic reticulum stress-induced myocardial apoptosis and contractile dysfunction. *Free Radic Res* 2015;**49**:1187-1198.
27. Stephens SB, Dodd RD, Brewer JW, Lager PJ, Keene JD, Nicchitta CV. Stable ribosome binding to the endoplasmic reticulum enables compartment-specific regulation of mRNA translation. *Molecular biology of the cell* 2005;**16**:5819-5831.

28. Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* 2007;**356**:1140-1151.
29. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochimica et biophysica acta* 2011;**1813**:1360-1372.
30. Nascimben L, Ingwall JS, Lorell BH, Pinz I, Schultz V, Tornheim K, Tian R. Mechanisms for increased glycolysis in the hypertrophied rat heart. *Hypertension* 2004;**44**:662-667.
31. Osorio JC, Stanley WC, Linke A, Castellari M, Diep QN, Panchal AR, Hintze TH, Lopaschuk GD, Recchia FA. Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor-alpha in pacing-induced heart failure. *Circulation* 2002;**106**:606-612.
32. Abdurrachim D, Luiken JJ, Nicolay K, Glatz JF, Prompers JJ, Nabben M. Good and bad consequences of altered fatty acid metabolism in heart failure: evidence from mouse models. *Cardiovascular research* 2015;**106**:194-205.
33. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell metabolism* 2009;**9**:327-338.
34. Filadi R, Theurey P, Pizzo P. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. *Cell calcium* 2017;**62**:1-15.
35. Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inseste J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovascular research* 2012;**94**:168-180.
36. Paillard M, Tubbs E, Thiebaut PA, Gomez L, Fauconnier J, Da Silva CC, Teixeira G, Mewton N, Belaidi E, Durand A, Abrial M, Lacampagne A, Rieusset J, Ovize M. Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation* 2013;**128**:1555-1565.
37. Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, Brenner C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* 2008;**27**:285-299.
38. Kalkhoran SB, Munro P, Qiao F, Ong SB, Hall AR, Cabrera-Fuentes H, Chakraborty B, Boisvert WA, Yellon DM, Hausenloy DJ. Unique morphological characteristics of mitochondrial subtypes in the heart: the effect of ischemia and ischemic preconditioning. *Discoveries* 2017;**5**.
39. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R, Zecchini E, Pinton P. Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochimica et biophysica acta* 2009;**1787**:1342-1351.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Tunicamycin increases ER stress markers and induces cardiac dysfunction.

(A) Mice were injected intraperitoneally with TN (2 mg/kg) or with vehicle (150 mM dextrose) for 72 h and the expression of cardiac *Grp78*, *Grp94*, *Xbp1u*, *Xbp1s* and *Chop* were quantified by qPCR and expressed as fold change over untreated controls. Each genes expression is normalized on the geometrical mean of three references genes (n=6). (B) Cardiac content of the ER stress markers GRP78, CHOP, GADD34 and phosphorylation of eIF2 α were analyzed by western blot and expressed as fold change over untreated controls. Actin and total eIF2 α were used as loading controls (n=6). (C, D, E) Following 72 h of TN treatment, cardiac function was assessed by echocardiography (n=8). Results are represented as mean \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005 vs. control (**Student's t-test**).

Figure 2. Ultrastructural alterations of the reticular membrane network induced by ER stress in cardiomyocytes.

Electron micrographs of control cardiomyocytes (A, C) and tunicamycin-treated cardiomyocytes (B, D, E, F) are presented. (A) Longitudinal section of cardiomyocyte from a control heart with regular arrangement of myofibrils (mf) and mitochondria (m). (B) Cardiomyocyte from tunicamycin-treated heart with myofibrillar irregularities (mf) and cluster of mitochondria (m) in the central part of the cell. (C) Area of the plasma membrane of control hearts. Myofibrils (mf) and network of smooth SR (arrow) are located just beneath plasma membrane (short arrow), m – mitochondrion. (D) Hypertrophying area of cardiomyocyte from TN-treated hearts. The space between the plasma membrane (short arrow) and myofibrils (mf) is filled with cytosol containing ribosomes or polyribosomes (*), short branches of rER (arrowheads), nascent myofibrils and cluster of mitochondria (m). (E) Hypertrophying area of cardiomyocytes in intermyofibrillar space with presence of the smooth (arrow) and rough reticular network (arrowhead), m - mitochondria. (F) Hypertrophying area of TN-treated cardiomyocytes with longitudinally oriented branches of smooth SR (arrows), arrowhead - branches of rER.

Figure 3. ER stress induces alteration of the dyadic microdomains in cardiomyocytes.

The micrographs present the dyadic microdomains in control (A) and TN-treated mice (B-D). (A) Dyadic microdomain in control cardiomyocyte, t – t-tubule, arrows - terminal cisternae of SR. (B) Dyadic microdomain in TN-treated cardiomyocyte; arrow – lumen of smooth SR, arrow head - section of the rER, t - central t-tubule of dyadic microdomain, m - mitochondrion. (C) Dyadic microdomain in cardiomyocyte after TN treatment, t – t-tubule, arrow - terminal cisterna of SR, arrowhead - polyribosomes localized at the face opposite to that facing the t-tubule membrane. (D) Longitudinal reticular membrane near the myosin myofilaments covered with ribosomes, arrow - rough reticular membrane, t – t-tubule of the longitudinal oriented dyadic microdomain. (E) **Cardiac content of RPS6, RIBOPHORIN I and SEC61 α were analysed by western blot and expressed as fold change over untreated controls. Actin was used as loading controls (n=6). Results are represented as mean \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01 vs. control (Student's t-test for RPS6 and SEC61 α quantification, Mann–Whitney U test for RIBOPHORIN I quantification).**

Figure 4. Ultrastructural alteration of the mitochondrial environment induced by ER stress.

The mitochondrial environment in control cardiomyocytes (A, C) and TN-treated cardiomyocytes (B, D, E, F) are presented. (A) Longitudinal section of cardiomyocyte from a control heart. Intermyofibrillar mitochondria (m) have regular shape and regularly arranged mitochondrial cristae (arrow). (B) Heterogeneity of mitochondrial population (m) after TN treatment. (C) Transversal section through the I-band area in control cardiomyocyte with the presence of smooth SR vesicles (arrows), m – mitochondrion, L – lipid droplet. (D) Transversal section through the I-band area in TN-treated cardiomyocyte, arrow – vesicle of smooth SR, arrowheads - reticular membrane with ribosomes, m – mitochondrion. (E) Mitochondria (m) in hypertrophying area of TN-treated cardiomyocyte, short arrows – fragmentation of mitochondrial cristae, arrowheads - branches of rER. (F) Hypertrophying area with mitochondria (m) and Golgi apparatus (GA) in TN-treated cardiomyocyte. (G) **Distribution of individual mitochondrial surface between small (<0.2 μm^2), intermediate (between 0.2 and 0.5 μm^2) or large (>0.5 μm^2) mitochondria evaluated on 20 slices per mouse (≥ 500 mitochondria quantified per mouse).** (H) **mRNA expression of fission and fusion proteins. Results are expressed as fold change over**

untreated controls. Each gene expression is normalized on the geometrical mean of three references genes. **(I) Cardiac levels of OPA1, phospho-DRP1, DRP1, MFN1, MFN2 and FIS1 were analysed by western blot and expressed as fold change over untreated controls. Actin and total DRP1 were used as loading controls (n=6). Results are represented as mean±SEM. *P<0.05 vs. control (Student's t-test).**

Figure 5. Cardiac energy metabolism of control and TN-treated mice.

(A) Oxygen consumption rate of skinned ventricular fibers in the absence (V_o) or presence of 2 mM ADP with 10 mM glutamate and malate (complex I, CxI), 15 mM succinate (both CxI and complex II, CxI+CxII), after complex I inhibition with 250 μ M amytal (CxII), in the presence of TMPD (0.5 mM) and ascorbate (2 mM) (CxIV). (B) Mitochondrial coupling (Ratio of Complex I respiration on V_o). (C) Citrate synthase activity. (D) Cytochrome c oxidase activity (COX). (E) mRNA levels of factors involved in mitochondrial biogenesis. Results are expressed as fold change over untreated controls. Each gene expression is normalized on the geometrical mean of three references genes. **(F) Cardiac levels of ATP5A (CxV), SDHB (CxII), NDUFB8 (CxI) and COXIV-1 (CxIV) were analysed by western blot and expressed as fold change over untreated controls. Actin was used as loading controls (n=6). Values represent mean±SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005 vs. control (Student's t-test except for CI-NDUFB8 quantification, Mann–Whitney U test).**

Figure 6. Cardiac lipid metabolism and energy transfer of control and TN-treated mice.

(A) Oxygen consumption rate without (V_o) or with 2 mM ADP and 4 mM malate and 0.1 mM octanoyl-carnitine (FA), 250 μ M pyruvate (pyruvate), 10 mM glutamate and 15 mM succinate (V_{max}). (B) Relative substrate utilisation in percent of V_{max} for octanoyl-carnitine (%FA) and for Pyruvate (%Pyruvate). (C) Lactate dehydrogenase activity (LDH). (D) Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity (HADHA). (E) mRNA levels of protein involved in lipid utilization. **Results are expressed as fold change over untreated controls. Each gene expression is normalized on the geometrical mean of three references genes.** (F) Total creatine kinase activity (CK). (G) Apparent K_m of oxygen consumption for ADP with (+Cr) or without (-Cr) 20 mM creatine. **(H) Mitochondrial calcium accumulation in cardiac fibers stimulated or not with TN (40 μ g/ml). (I) Mitochondrial calcium accumulation in cardiac fibers isolated from**

CTL and TN-treated animals (72 h) challenged with histamine (100 μ M). (J-K) Basal Ca^{2+} (J) and maximal mitochondrial Ca^{2+} peak fluorescence (K) determined from (I). Values represent mean \pm SEM (n=6). *P<0.05, **P<0.01, *P<0.005 vs. control (Student's t-test except for G and J, Mann–Whitney U test).**

Figure 7. ER stress negatively regulates *Pgc-1 α* expression in a mouse model of myocardial infarction.

(A-F) Data from the datasets E-GEOD-19322 were analyzed with BioGPS webtools (<http://biogps.org/#goto=welcome>). (A) The expression of UPR target genes in the heart of surgically infarcted **wild-type** mice (1 day and 5 days after infarction) were compared to SHAM **wild-type** animals. Results were expressed as fold change over SHAM animals. (B) The expression of *Pgc-1 α* , *Citrate Synthase (CS)*, *Tfam* and *Coxiv* in the heart of surgically infarcted **wild-type** mice (1 day and 5 days after infarction) were compared to SHAM **wild-type** animals. Results were expressed as fold change over SHAM animals. (C-M) The correlation between the expression of *Pgc-1 α* and *Xbp1* (C), *Edem1* (D), *Calreticulin* (E), *P58ipk* (F), *Grp78* (G), *Grp94* (H), *Pdia4* (I), *Atf4* (J), *Atf3* (K), *Gadd34* (L) and *Chop* (M) were calculated using Spearman's correlation test. (A-B) Values represent mean \pm SEM (n=3 for SHAM and n=4 for MI 1 d and MI 5 d). For correlation analysis (C-M), values include samples from SHAM wild-type animals in the same region as infarct tissue (n=3), in the same region as non-infarct tissue (n=3) and samples from MI wild-type animals in the infarct and non-infarct region 1 d and 5 d post MI (n=4 for each group). One-way ANOVA test with Benjamini and Hochberg false discovery rate (FDR) correction was applied to the comparison between the conditions, using a 0.05 threshold for statistical significance. Only C57BL/6J data were used. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005 vs. control (One-way ANOVA test with Benjamini and Hochberg false discovery rate (FDR) correction).

Supplementary Figures

Supplementary Figure 1. ER stress, mitochondrial dynamics and Ca²⁺ homeostasis.

(A) Quantification of western blot shown in Figure 4I. Results are expressed as fold change over untreated controls. Actin and total DRP1 were used as loading controls (n=6). Values represent mean±SEM. (B) Cardiac fibers were loaded with the Ca²⁺ indicator Rhod-2-AM and MitoTracker Green. Merge signal revealed a mitochondrial pattern. The quantitative pixel-by-pixel analysis measured with Fiji software (plugin Coloc 2) showed strong correlation between Rhod-2-AM and MitoTracker Green (Manders coefficient >97%). (C) Cardiac levels of IP3R1, MCU and VDAC were analysed by western blot and expressed as fold change over untreated controls. Actin was used as loading controls (n=6). Values represent mean±SEM. *P<0.05 vs control (Student's t-test).

Supplementary Figure 2: Ultrastructural alterations induced by ER stress in cardiomyocytes.

Electron micrographs of control cardiomyocytes (S2A-B) and tunicamycin-treated cardiomyocytes (S2C-F) are presented at low magnification (1 μM). t - t-tubules, m - mitochondrion, L - lipid droplet, mf- myofibrils, cy – cytosol.

Supplementary Tables

Table S1. Sequence of qPCR primers used in this study

Table S2. Anatomical parameters in response to ER stress.

Mice were injected i.p. with TN (2 mg/kg) or with vehicle (150 mM dextrose) for 72 h and anatomical parameters were recorded. BW: body weight. Initial BW: body weight before TN treatment, final BW: body weight after TN treatment, BW loss: difference between initial and final body weight, HW: heart weight. HW/BW: heart weight to body weight ratio, Lung/BW: Lung weight to body weight ratio, Liver/BW: Liver weight to body weight ratio, Kidney/BW, Kidney weight to body weight ratio. Results are represented as mean±SEM. n=8. ***P<0.005 vs. control values (**Student's t-test**).

Table S3: Echocardiographic parameters in response to ER stress.

Mice were injected i.p. with TN (2 mg/kg) or with vehicle (150 mM dextrose) for 72 h and transthoracic echocardiography was performed. EF: ejection fraction; FS: fractional shortening; HR: heart rate; LViDd: left ventricular internal dimension (diastole); LViDs: left ventricular internal dimension (systole); LVAWd: left ventricular anterior wall thickness (diastole); LVAWs: left ventricular anterior wall thickness (systole); LVPWd: left ventricular posterior wall thickness (diastole); LVPWs: left ventricular posterior wall thickness (systole); TWTd: total wall thickness (diastole); TWTs: total wall thickness (systole). Results are represented as mean±SEM. n=9. **P<0.01, ***P<0.005 vs. control values (**Student's t-test**).

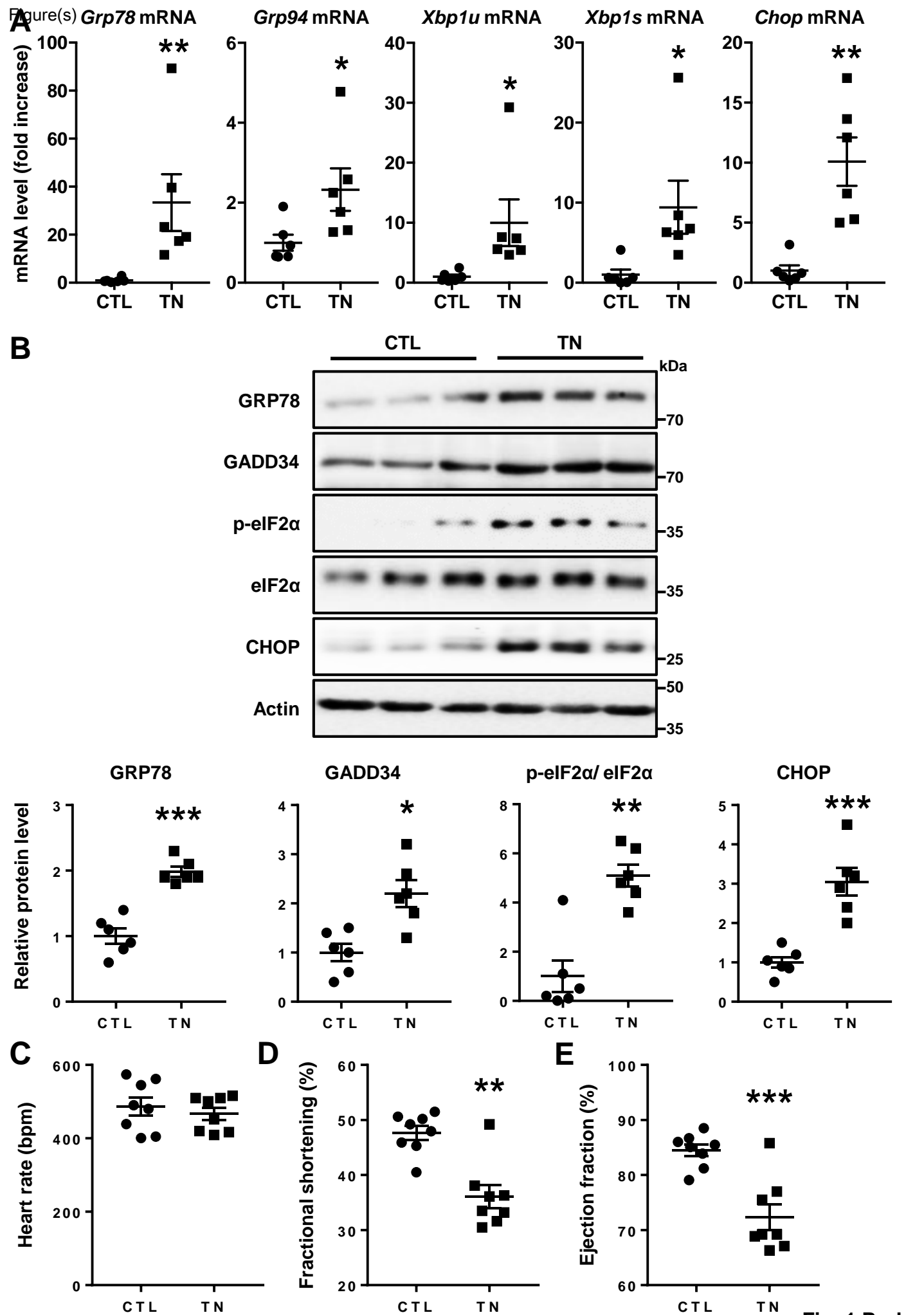
Table S4: Quantification of the cardiomyocyte composition.

Mice were injected i.p. with TN (2 mg/kg) or with vehicle (150 mM dextrose) for 72 h and stereological analysis were performed at the test grid point distance of 280 nm to quantify the cardiomyocyte composition. The volume density of organelles is presented as mean percentage ± SEM. *P<0.05 vs control (Mann–Whitney U test).

Table S5: Environment of mitochondria in control and TN-treated mice.

Mice were injected i.p. with TN (2 mg/kg) or with vehicle (150 mM dextrose) for 72 h and stereological analysis were performed to determine the mitochondrial environment (**organelles at**

a distance of 20 nm or less from mitochondrial surface). Results are represented as mean percentage \pm SEM. #P<0.1 vs control (**Mann–Whitney U test**).



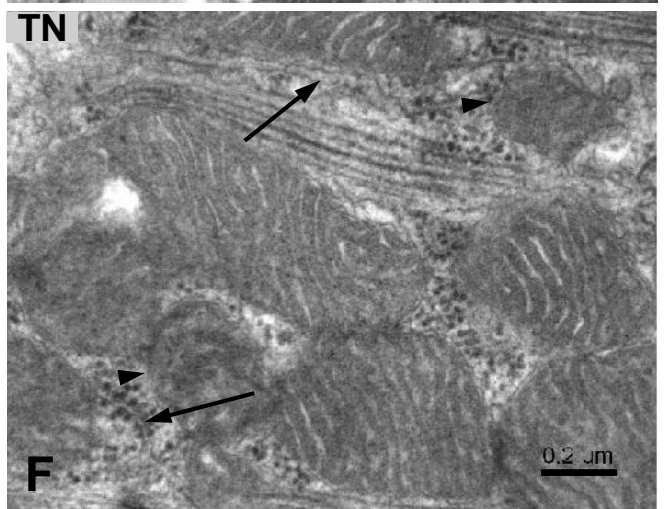
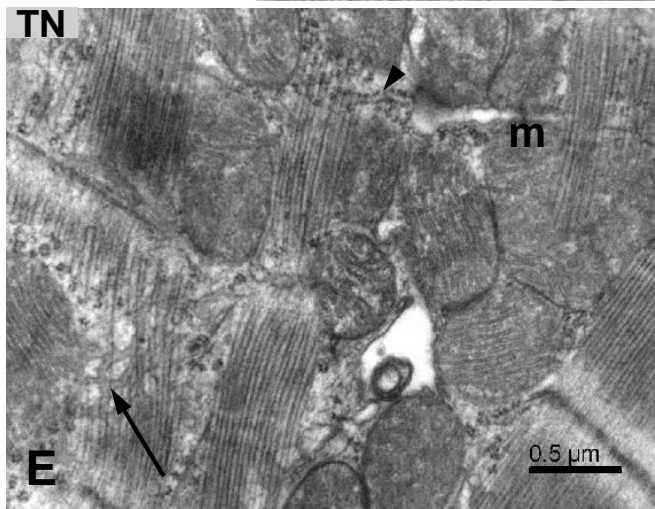
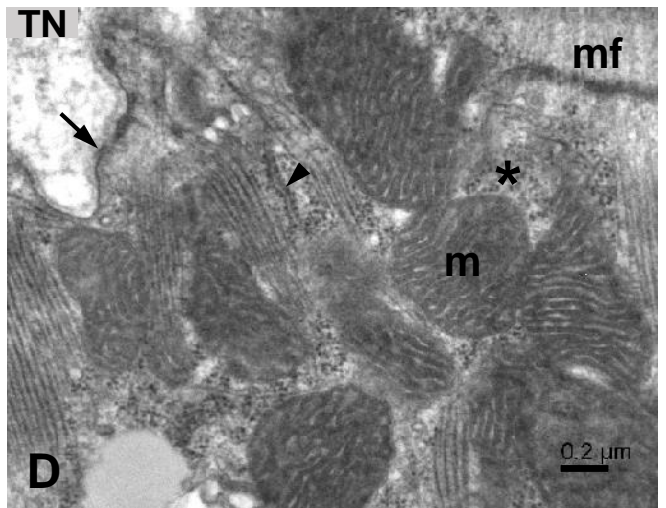
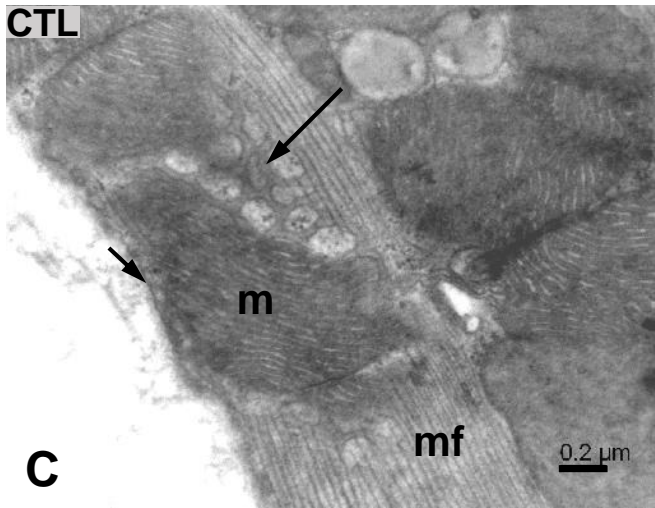
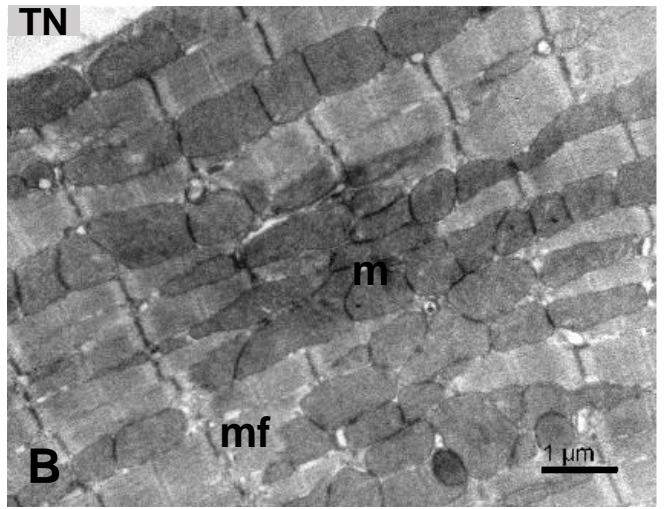
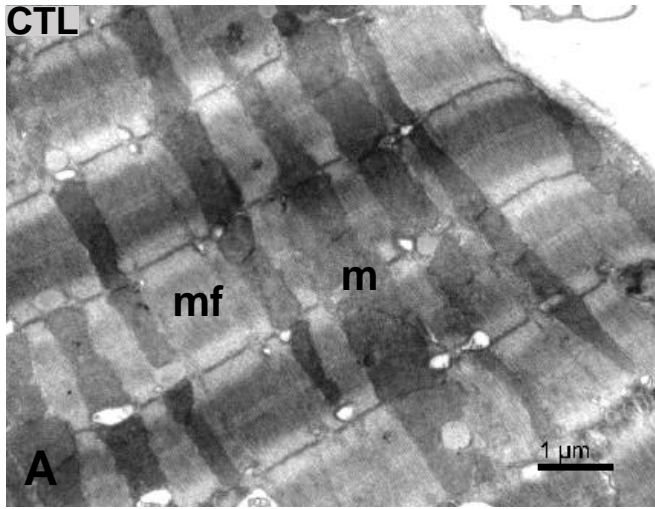


Fig. 2 Prola

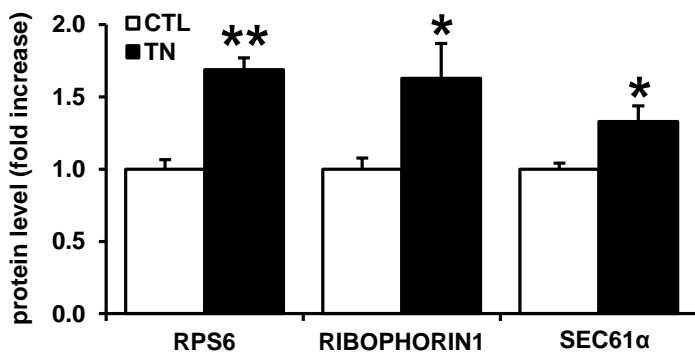
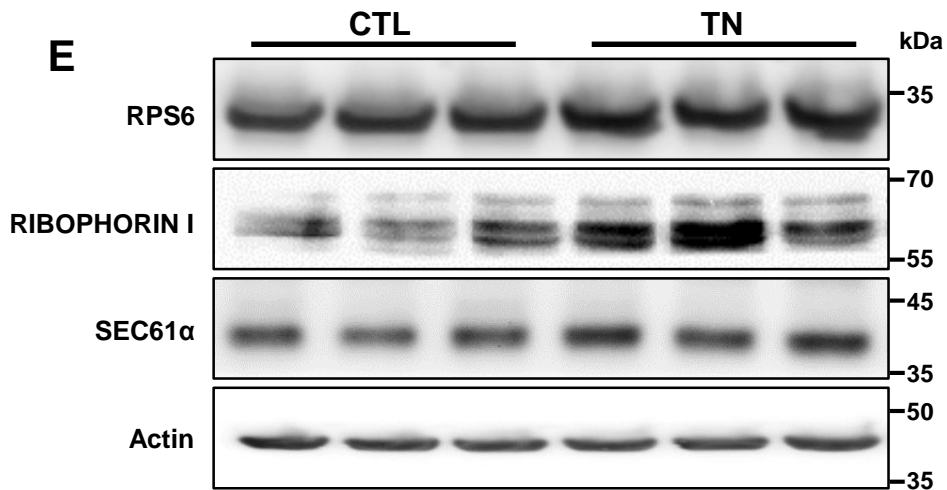
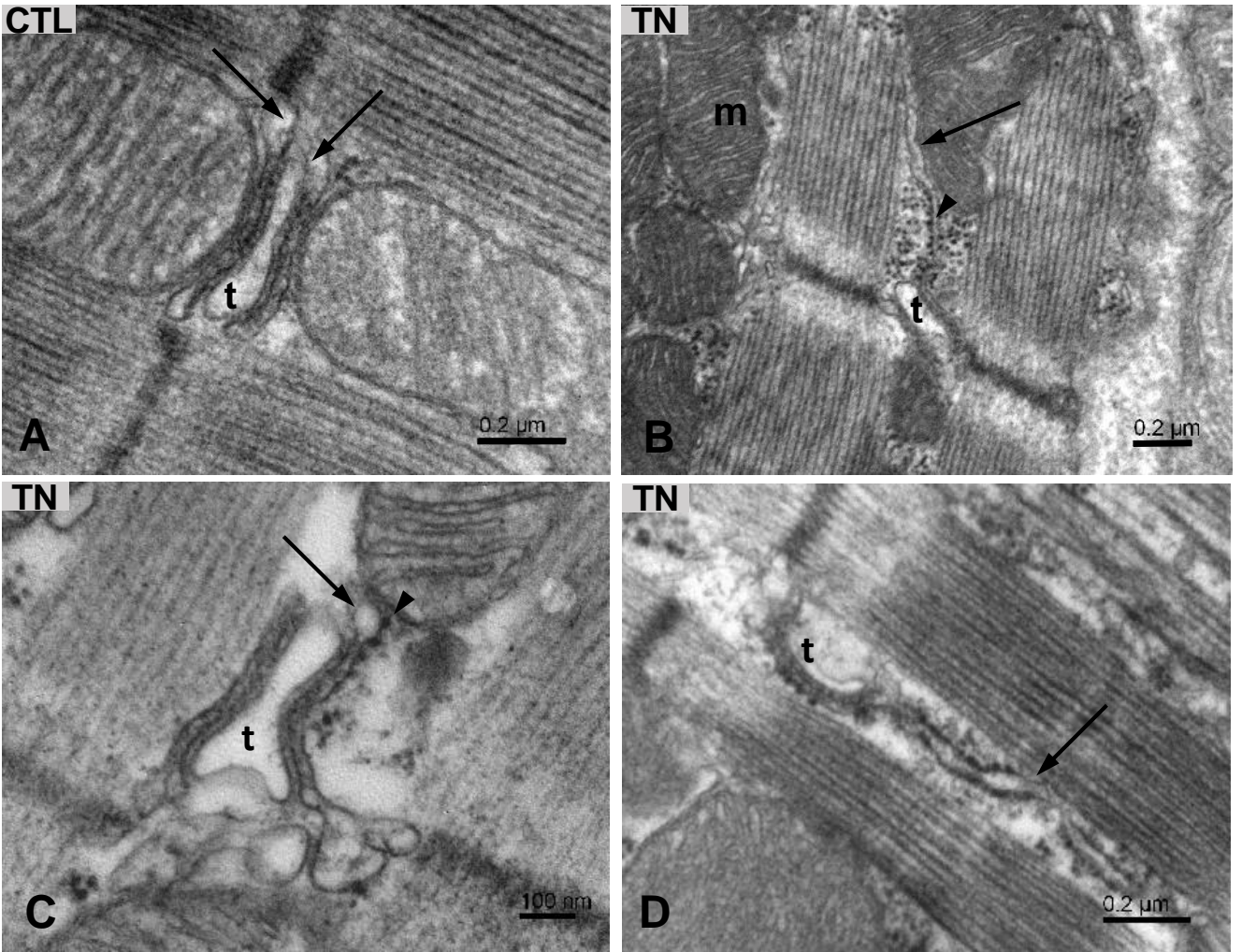


Fig. 3 Prola

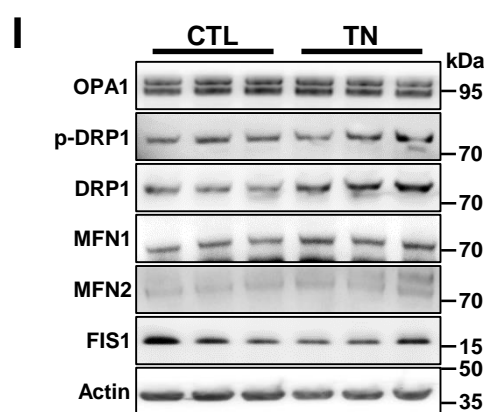
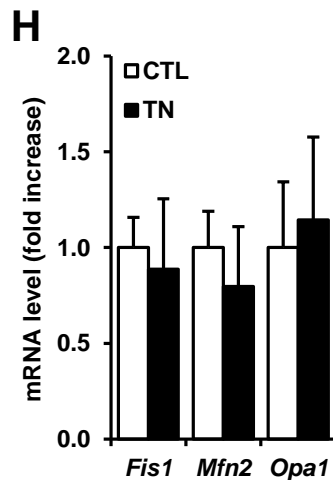
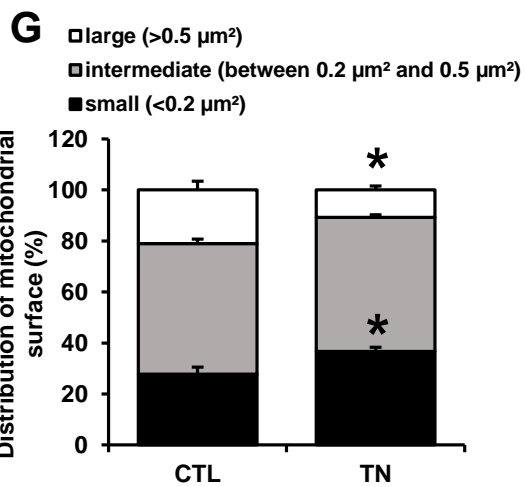
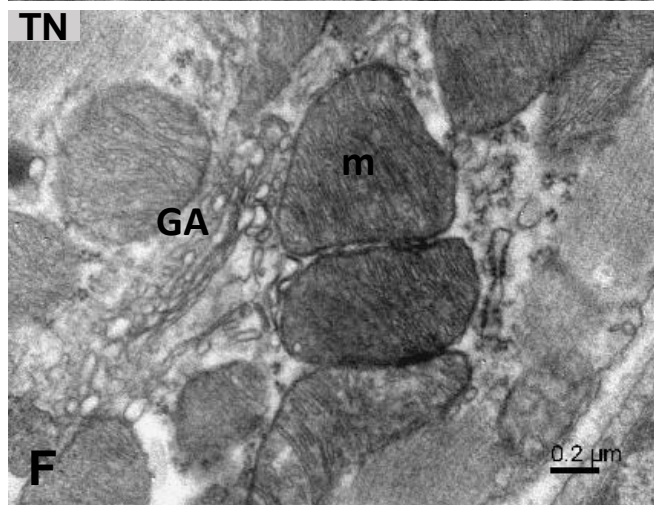
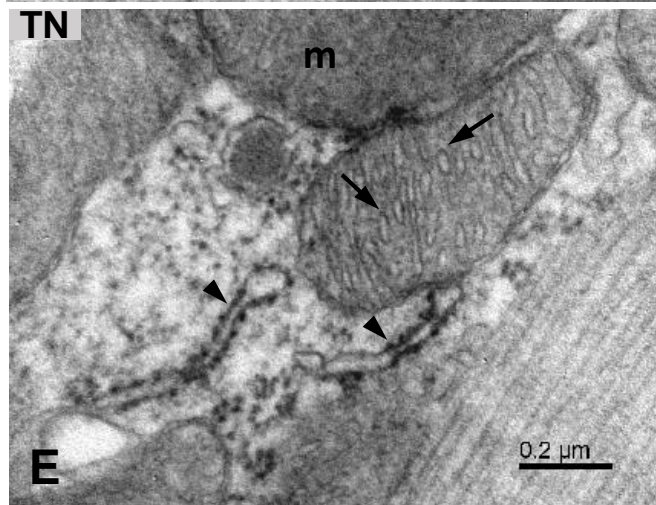
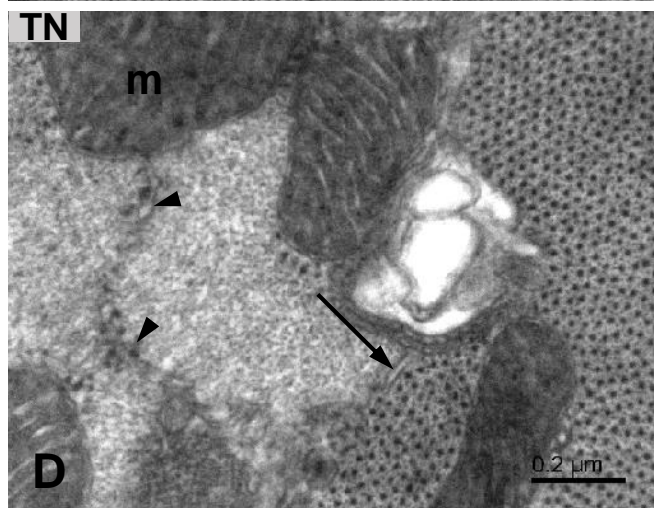
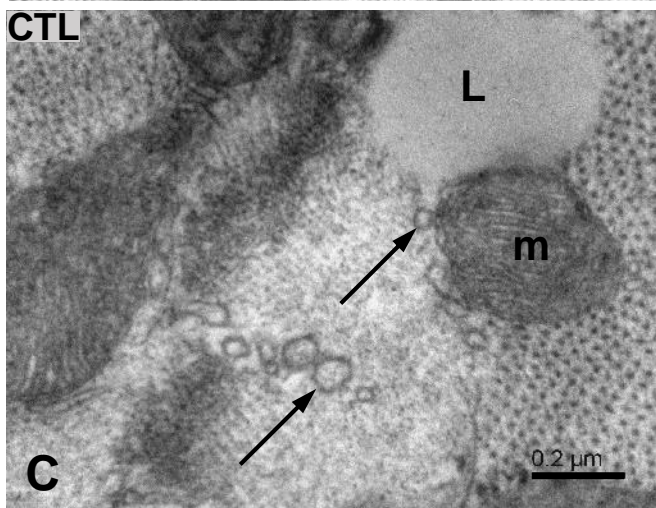
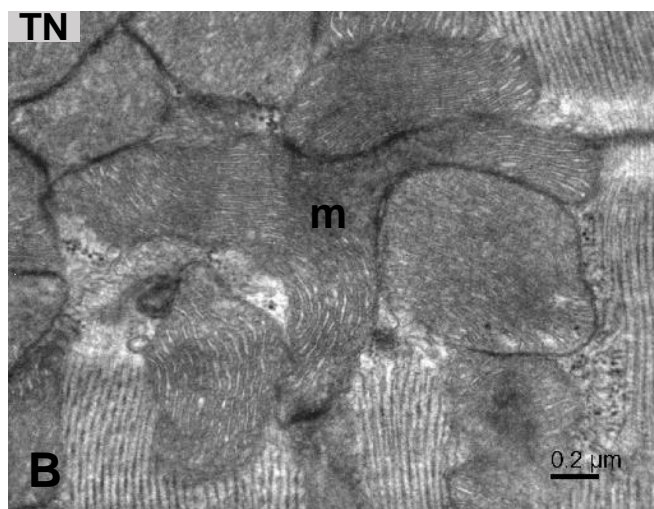
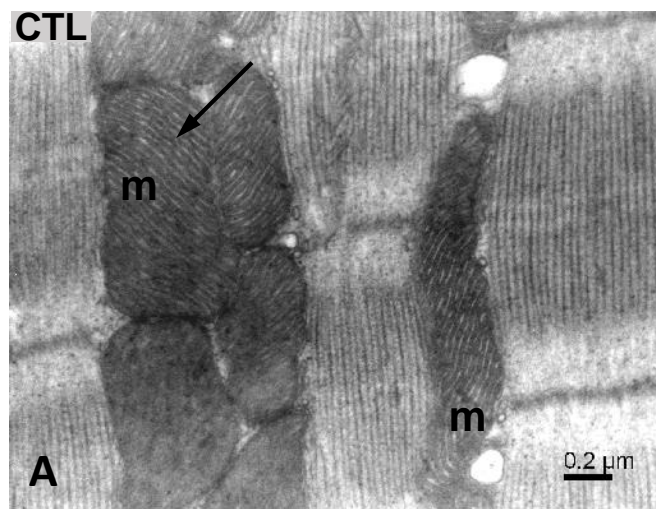


Fig. 4 Prola

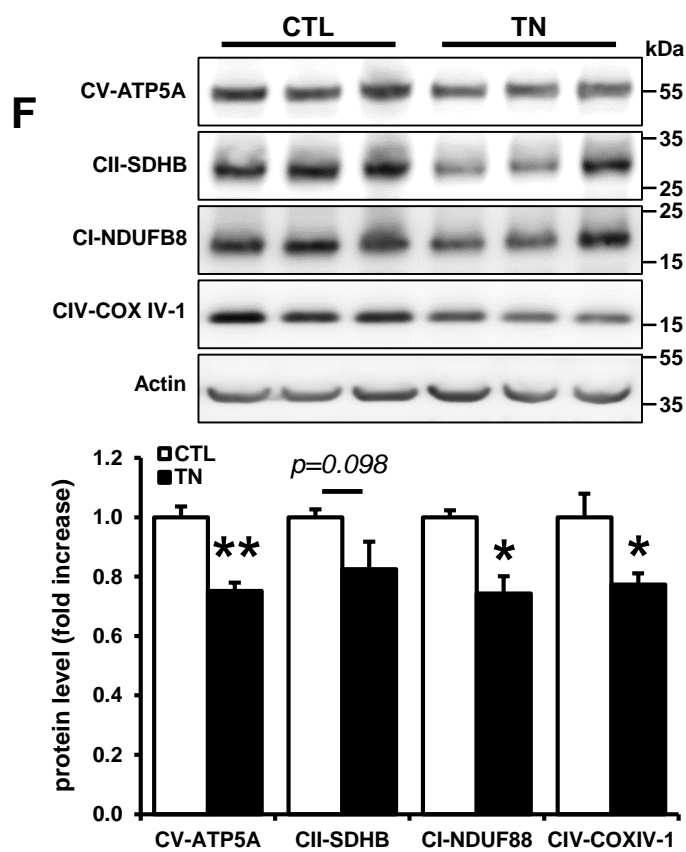
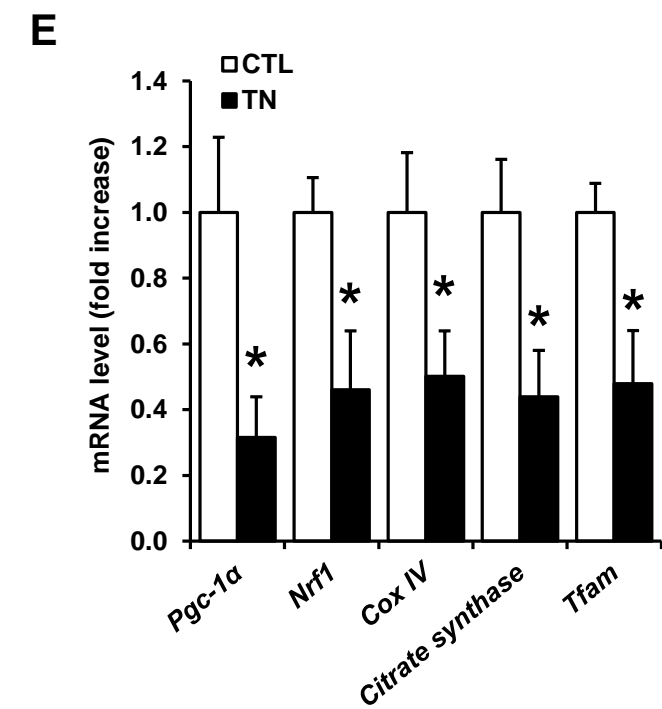
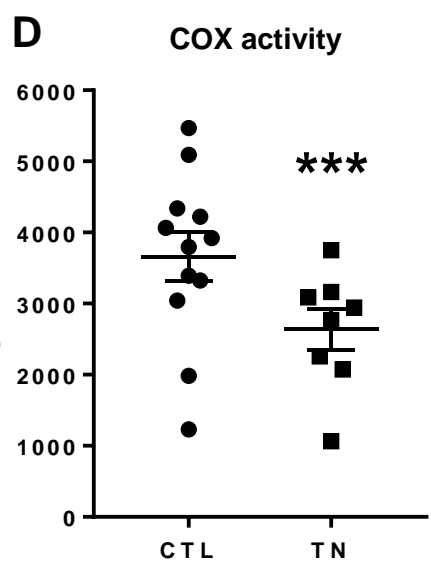
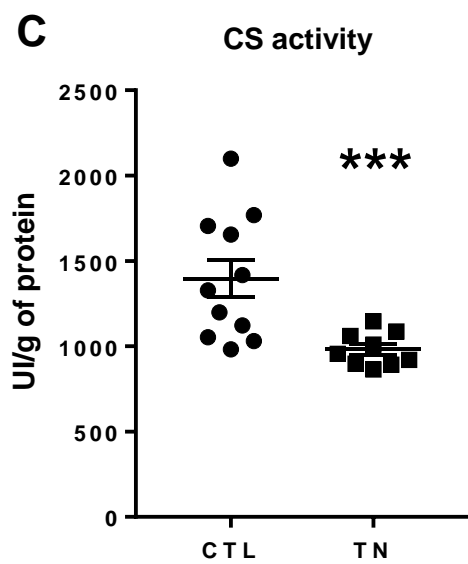
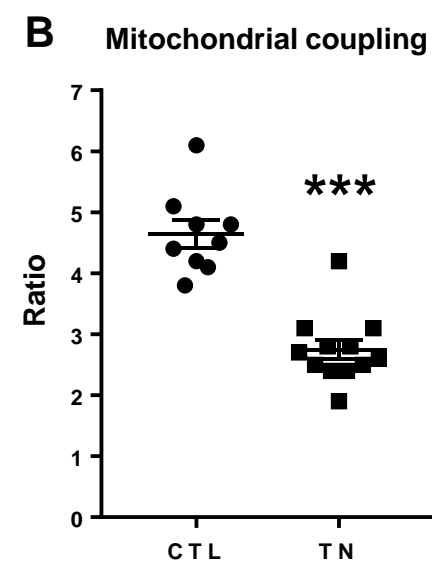
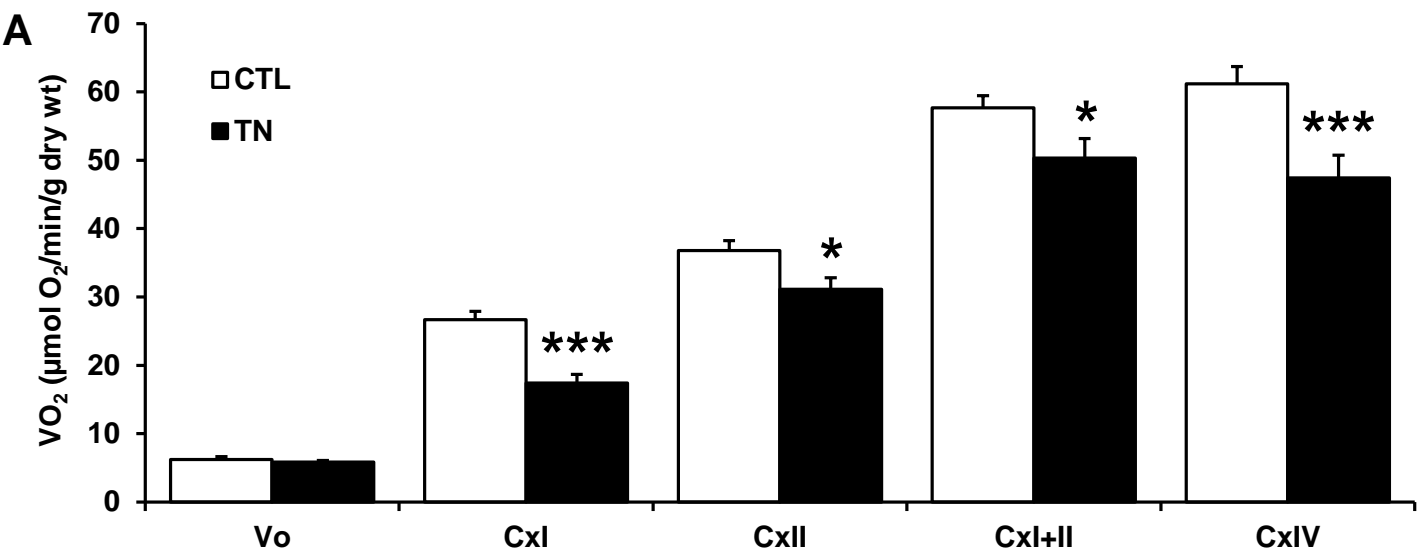


Fig. 5 Prola

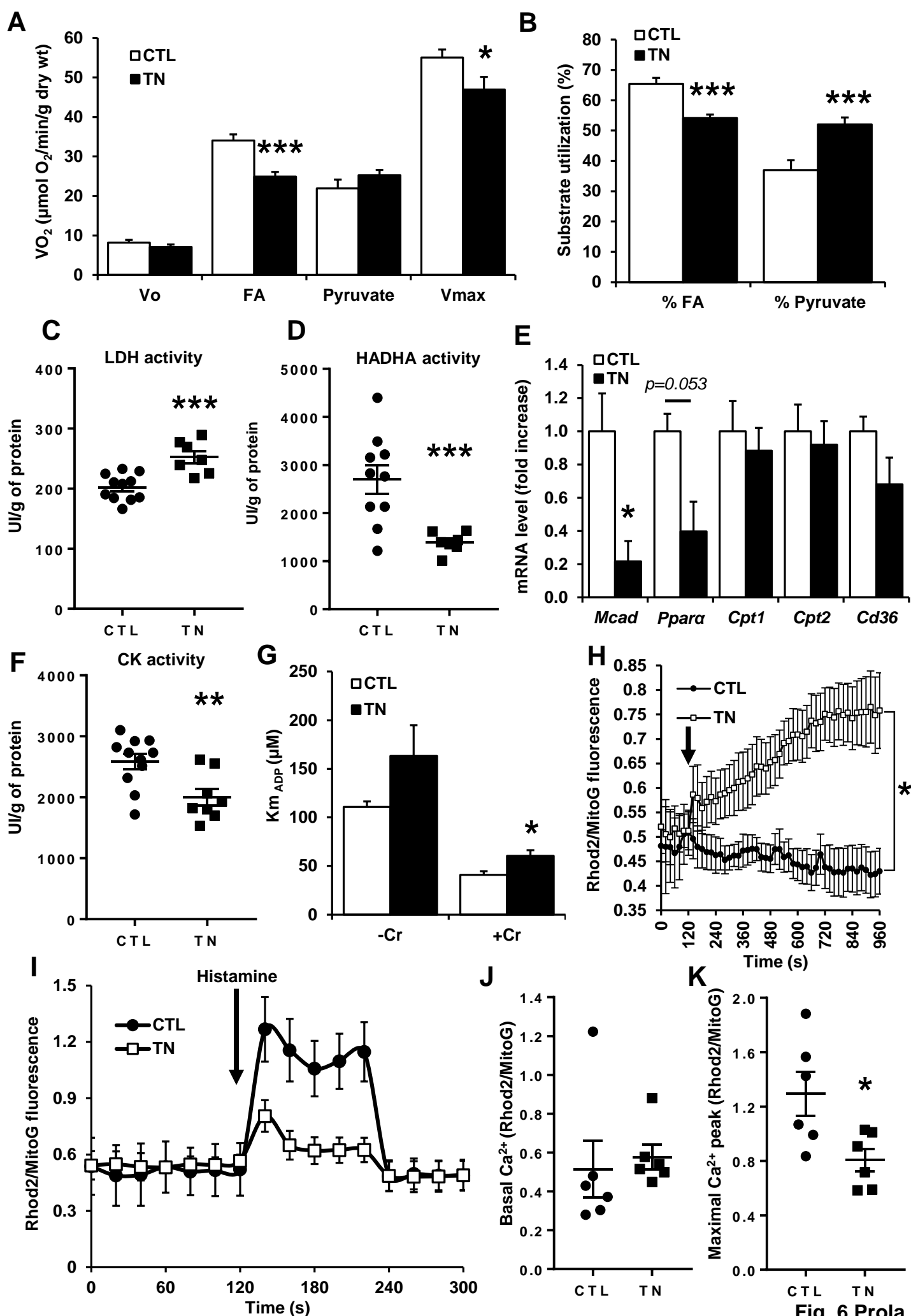


Fig. 6 Prola

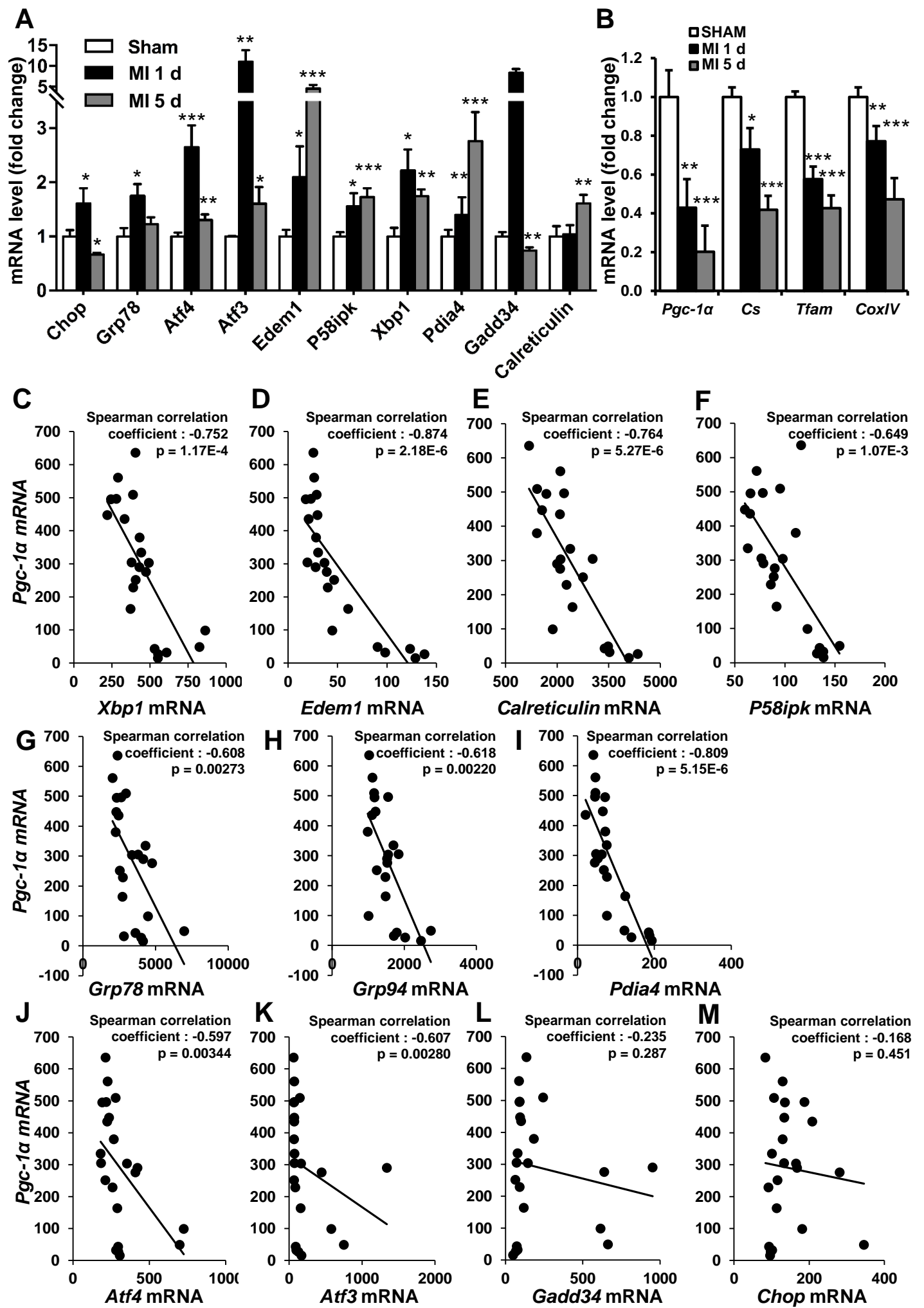
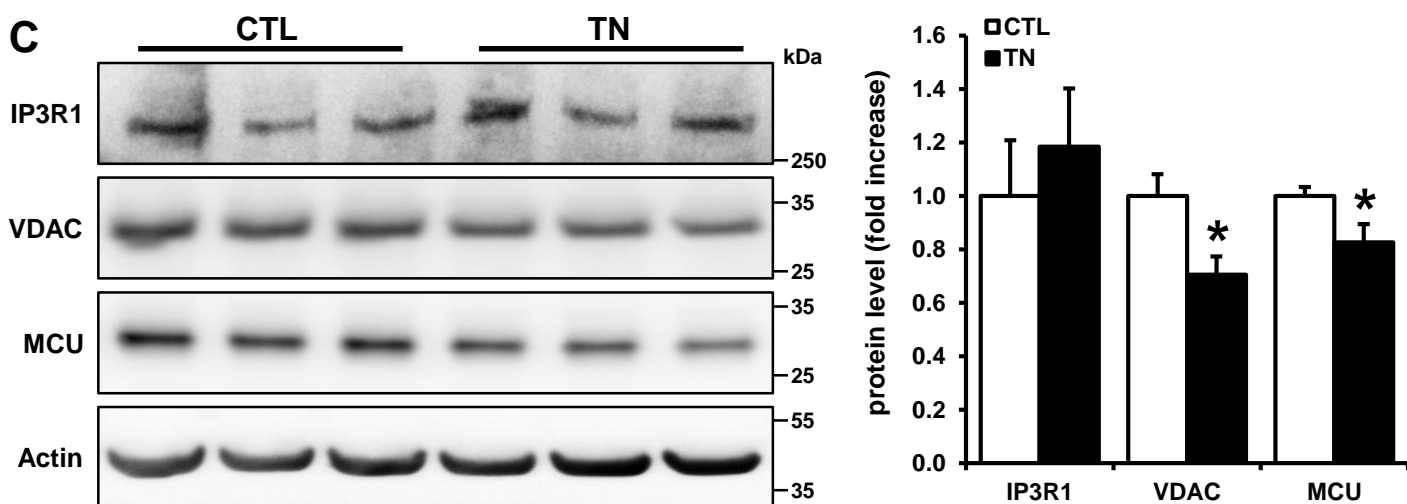
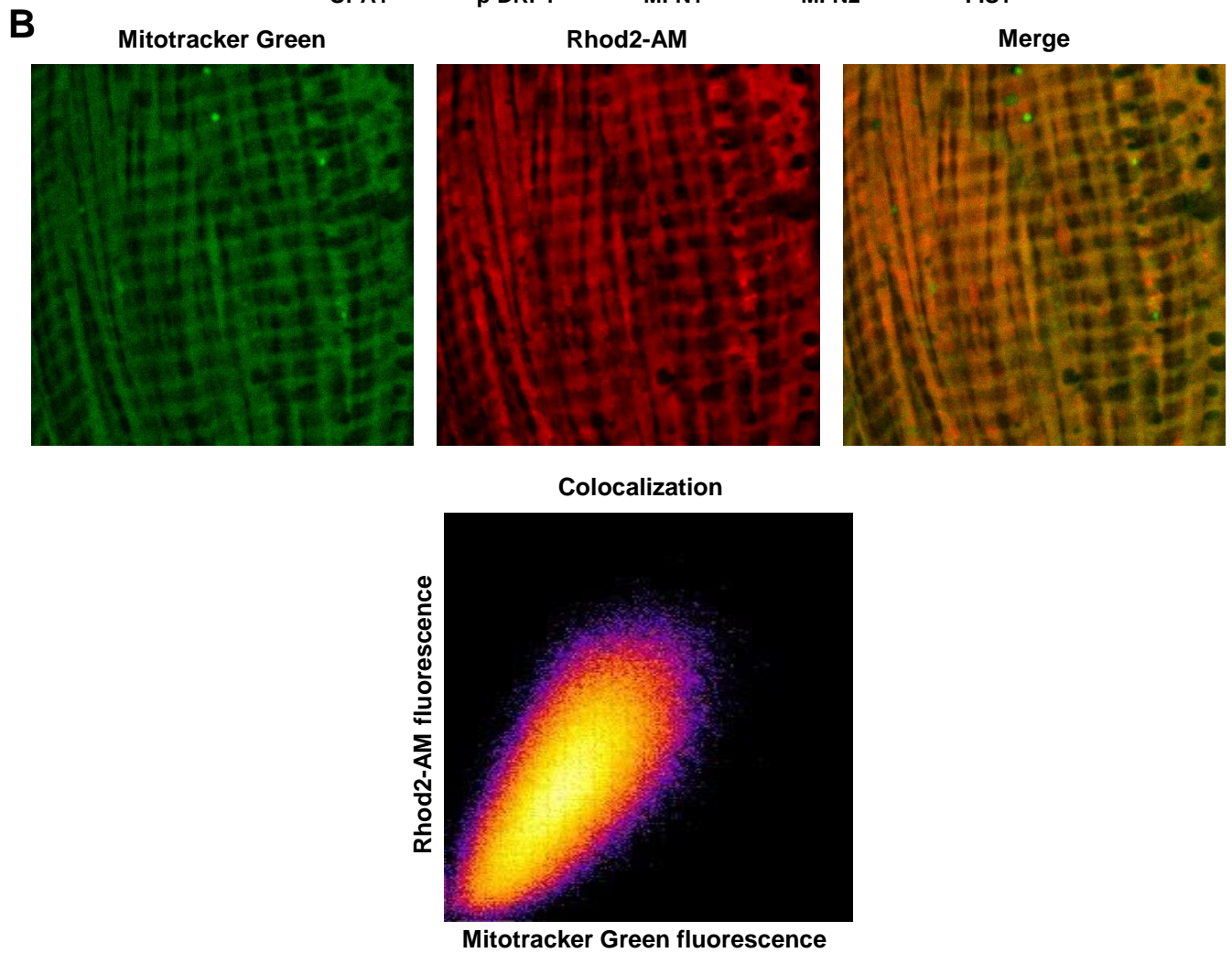
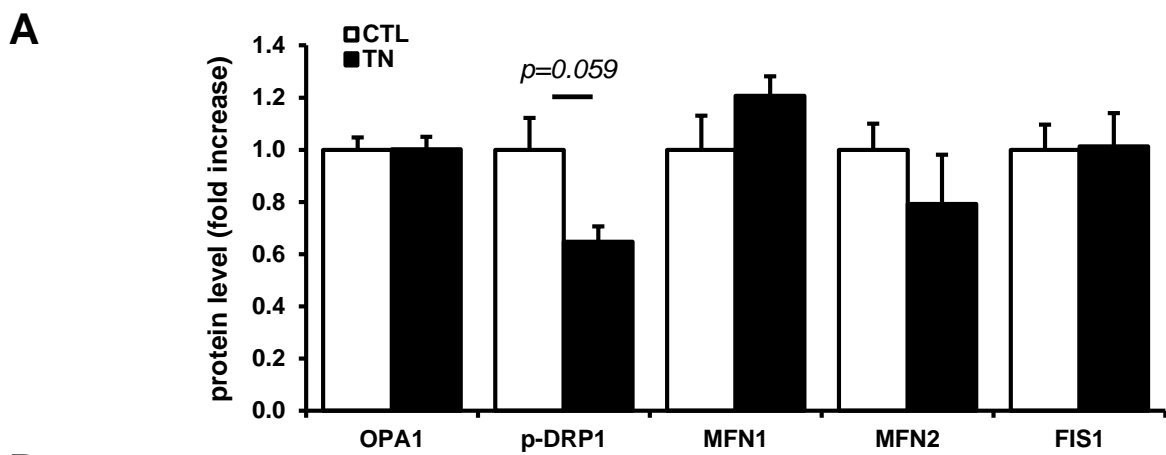


Fig. 7 Prola



Supplementary Figure 1

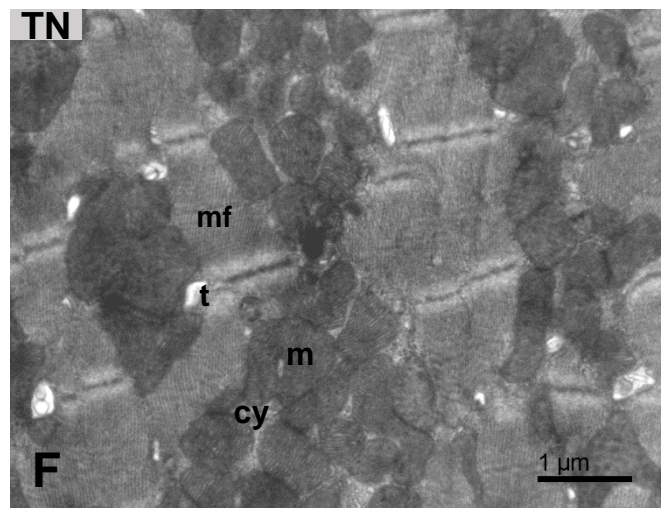
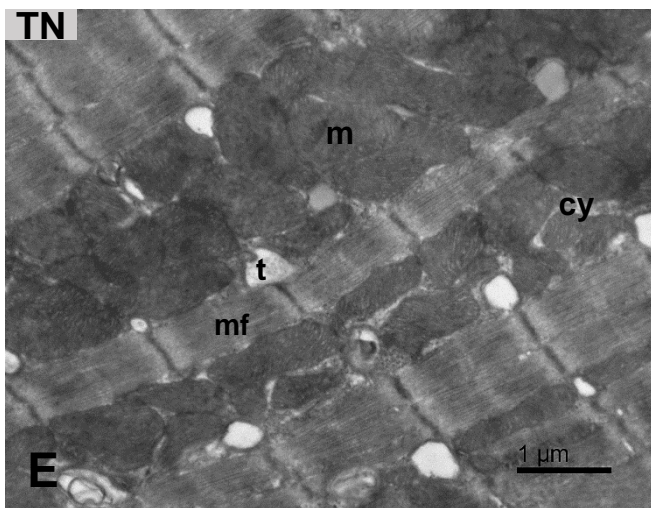
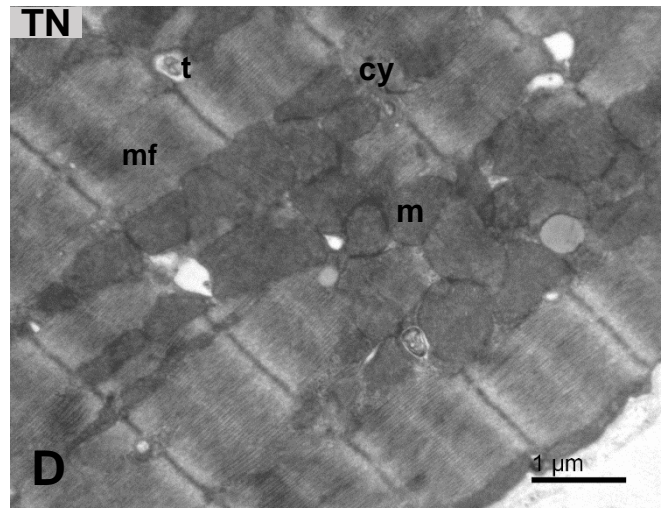
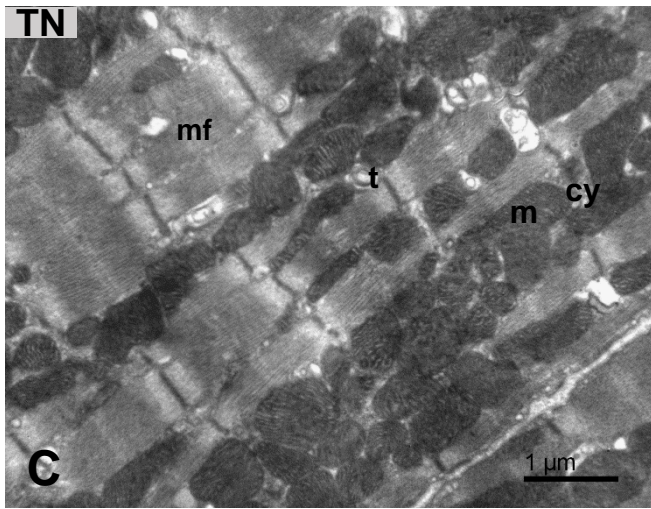
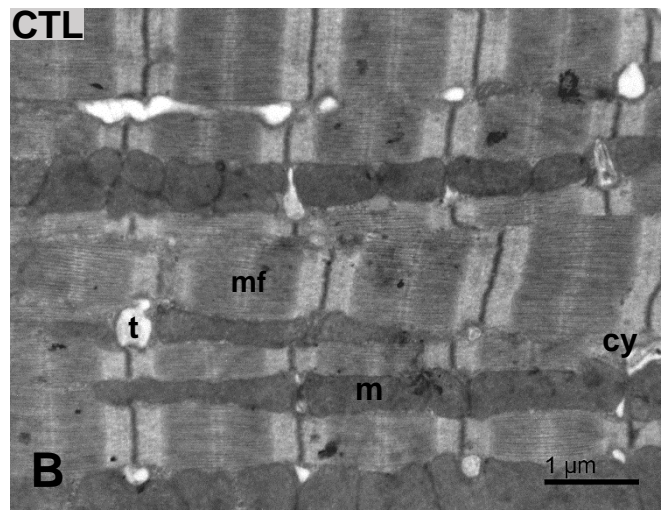
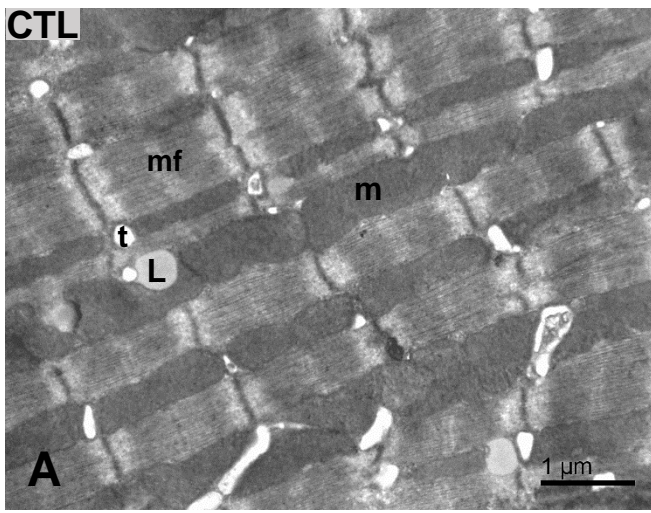


Table S1 : Sequence of qPCR primers used in this study
Related to Methods

Gene	Species	Forward primer	Reverse primer
<i>Cd36</i>	mouse/rat	CCACTGTGTACAGACAGTTTTGG	GCTCAAAGATGGCTCCATTG
<i>Chop</i>	mouse/rat	TATCTCATCCCCAGGAAACG	CAGGGTCAAGAGTAGTGAAGGTTT
<i>Cox IV</i>	mouse/rat	TGGGAGTGTTGTGAAGAGTGA	GCAGTGAAGCCGATGAAGAAC
<i>Cpt1</i>	mouse/rat	TCACCTGGGCTACACGGAGA	TCGGGGCTGGTCCTACTT
<i>Cpt2</i>	mouse/rat	ACCTGCTCGCTCAGGATAAA	AAACGACAGAGTCTCGAGCAG
<i>CS</i>	mouse/rat	CAAGATTGTGCCCAATATCCTC	TTCATCTCCGTCATGCCATA
<i>Fis1</i>	mouse/rat	GCCTGGTTCGAAGCAAATAC	CACGGCCAGGTAGAAGACAT
<i>Grp78</i>	mouse/rat	TGCAGCAGGACATCAAGTTC	TTTCTTCTGGGGCAAATGTC
<i>Grp94</i>	mouse/rat	TGCTTCTGATGCTTTAGACAAGA	CTGTGACATGCAGCAGGTTT
<i>Mcad</i>	mouse/rat	CCGTTCCCTCTCATCAAAG	ACACCCATACGCCAACTCTT
<i>Mfn2</i>	mouse/rat	GGGGCCTACATCCAAGAGAG	CCTTGGACAGGTACCCTTTG
<i>Nrf1</i>	mouse/rat	TACTCTGCTGTGGCTGATGG	CCTCTGATGCTTGCGTCGTCT
<i>Opa1</i>	mouse/rat	TCAGCAAAGCTTACATGCAGA	TGCTTGGACTGGCTACATTTT
<i>Pgc-1α</i>	mouse/rat	CACCAAACCCACAGAGAACAG	GCAGTTCCAGAGAGTTCCACA
<i>Ppara</i>	mouse/rat	AAGTGCCTGTCTGTCGGGAT	GCTTCGTGGATTCTCTTGCC
<i>Tfam</i>	mouse/rat	GCTGATGGGTATGGAGAAG	GAGCCGAATCATCCTTTGC
<i>Xbp1u</i>	mouse/rat	TCAGACTATGTGCACCTCTGC	ACAGGGTCCAACCTTGCCAG
<i>Xbp1s</i>	mouse/rat	TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG	ACAGGGTCCAACCTTGCCAG

Table S2 :Anatomical parameters in response to ER stress

	CTL	TN
Initial BW (g)	30 ± 0.45	30.7 ± 0.54
Final BW (g)	29.03 ± 0.52	26.03 ± 0.61***
BW loss (g)	0.97 ± 0.25	4.67 ± 0.55***
Tibial length (cm)	1.86 ± 0.04	1.84 ± 0.02
Heart weight (mg)	181.2 ± 6.0	168.3 ± 6.4
Lung weight (mg)	196.0 ± 5.7	188.7 ± 8.6
Liver weight (mg)	1592 ± 41	1183 ± 48***
Kidney weight (mg)	214.2 ± 5.4	211.1 ± 8.5
HW/BW	6.24 ± 0.19	6.47 ± 0.18
Lung/BW	6.75 ± 0.19	7.25 ± 0.33
Liver/BW	54.83 ± 0.87	45.48 ± 1.17***
Kidney/BW	7.38 ± 0.16	8.11 ± 0.32

Mice were injected i.p. with TN (2 mg/kg) or with vehicle (150 mM dextrose) for 72 h and anatomical parameters were recorded. BW: body weight. Initial BW: body weight before TN treatment, final BW: body weight after TN treatment, BW loss: difference between initial and final body weight, HW: heart weight. HW/BW: heart weight to body weight ratio, Lung/BW: Lung weight to body weight ratio, Liver/BW: Liver weight to body weight ratio, Kidney/BW, Kidney weight to body weight ratio. Results are represented as mean±SEM. n=8. ***P<0.005 vs. control values

Table S3: Echocardiographic parameters in response to ER stress

	CTL	TN
EF (%)	84.5 ± 1.1	72.4 ± 2.3***
FS (%)	47.6 ± 1.3	36.1 ± 2.1**
HR (bpm)	487 ± 24	467 ± 17
LViDd (mm)	3.47 ± 0.09	3.54 ± 0.15
LViDs (mm)	1.82 ± 0.08	2.18 ± 0.16
LVAWd (mm)	0.99 ± 0.05	1.08 ± 0.04
LVAWs (mm)	1.57 ± 0.04	1.54 ± 0.06
LVPWd (mm)	0.99 ± 0.05	0.95 ± 0.04
LVPWs (mm)	1.39 ± 0.04	1.24 ± 0.07

Mice were injected i.p. with TN (2 mg/kg) or with vehicle (150 mM dextrose) for 72 h and transthoracic echocardiography was performed. EF: ejection fraction; FS: fractional shortening; HR: heart rate; LViDd: left ventricular internal dimension (diastole); LViDs: left ventricular internal dimension (systole); LVAWd: left ventricular anterior wall thickness (diastole); LVAWs: left ventricular anterior wall thickness (systole); LVPWd: left ventricular posterior wall thickness (diastole); LVPWs: left ventricular posterior wall thickness (systole). Results are represented as mean±SEM. n=9. **P<0.01, ***P<0.005 vs. control values

Table S4: Cellular content in control and TN-treated mice

	CTL [%]	TN [%]
Myofibrils	47.0 ± 1.6	48.5 ± 0.8
Mitochondria	37.3 ± 0.4	36.3 ± 0.5
Cytosol	12.6 ± 1.00	12.4 ± 0.07
T-tubules	1.90 ± 0.07	1.77 ± 0.19
Lipids droplets	1.25 ± 0.23	0.87 ± 0.10*

Mice were injected i.p. with TN (2 mg/kg) or with vehicle (150 mM dextrose) for 72 h and stereological analysis were performed at the test grid point distance of 280 nm to quantify the cardiomyocyte composition. The volume density of organelles is presented as mean percentage ± SEM. *P<0.05 vs control.

Table S5: Environment of mitochondria in control and TN-treated mice

Environment of mitochondria	CTL [%]	TN [%]
Myofibrils	41.3 ± 5.3	36.5 ± 1.3
Neighboring mitochondria	29.9 ± 3.5	35.0 ± 4.0
SR	7.9 ± 1.7	5.2 ± 0.8
rER	0.7 ± 0.2	2.1 ± 0.6[#]
Mixed smooth and rough reticulum	0.5 ± 0.2	1.1 ± 0.2
Ribosomes and polyribosomes	4.3 ± 2.3	5.7 ± 1.5
Dyads and t-tubules	4.3 ± 1.0	4.2 ± 0.2
Cytoplasm	4.1 ± 0.3	8.5 ± 2.7
Plasma membrane	3.7 ± 1.2	2.7 ± 0.9
Lipid droplets	2.1 ± 1.3	2.0 ± 0.3

Mice were injected i.p. with TN (2 mg/kg) or with vehicle (150 mM dextrose) for 72 h and stereological analysis were performed to determine the mitochondrial environment (**organelles at a distance of 20 nm or less from mitochondrial surface**). Results are represented as mean percentage±SEM. [#]P<0.1 vs control.

Article 2

Prola A, **Pires Da Silva J**, Guilbert A, Ribeiro M, Lecru L, Piquereau P, Mateo P, Gressette M, Fortin D, Boursier C, Gallerne C, Caillard A, Samuel JL, François H, Sinclair DA, Eid P, Ventura-Clapier R, Garnier A and Lemaire C

SIRT1 protects the heart from ER stress-induced cell death through eIF2 α deacetylation

Cell Death and Differentiation (2017) 24(2):343-356. doi: 10.1038/cdd.2016.138

Contexte scientifique :

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'objectif actuel des recherches sur le stress RE en physiopathologie cardiaque n'est pas d'inhiber la réponse UPR mais plutôt de la moduler, de manière à conserver les réponses adaptatives bénéfiques tout en limitant la survenue de l'apoptose délétère. SIRT1, qui est activée en réponse à différents stress (Haigis and Sinclair, 2010) et présente des propriétés cardioprotectrices dans des modèles d'hypertrophie, d'infarctus du myocarde, d'insuffisance cardiaque et de vieillissement (Alcendor et al., 2007; Hsu et al., 2010; Planavila et al., 2011) est apparue comme un candidat potentiel pour moduler le stress RE et protéger le cœur de ses effets délétères. Nous avons donc mené une étude afin de répondre à plusieurs questions : 1) SIRT1 joue-elle un rôle cardioprotecteur en réponse au stress RE ? 2) SIRT1 module-elle la réponse UPR ? 3) Si oui, quels sont les mécanismes impliqués et quelle est la(les) cible(s) de SIRT1 ?

Résultats :

Dans cette étude nous avons combiné les approches utilisant des modèles cellulaires (lignée cardiomyoblastique de rat H9c2 et cardiomyocytes adultes isolés de cœur de rat) et des modèles animaux (souris invalidées de manière conditionnelle pour SIRT1) dans lesquels un stress RE délétère a été induit par la tunicamycine (TN) ou par l'isoprotérénol (ISO), un agoniste des récepteurs β -adrénergiques. Dans les cellules cardiaques, l'inhibition (EX527) ou l'inactivation (siRNA SIRT1) de SIRT1 augmente l'apoptose induite par le stress RE, alors que l'activation de SIRT1 (STAC-3) est cardioprotectrice. *In vivo*, l'invalidation de SIRT1 augmente l'apoptose et aggrave la dysfonction cardiaque induite par le stress RE en réponse à TN ou à l'ISO. Ces résultats démontrent donc que SIRT1 joue un rôle cardioprotecteur en réponse au stress RE.

L'analyse de l'expression de marqueurs des trois branches de la réponse UPR (i.e. PERK/eIF2 α , ATF6 et IRE1) indique que SIRT1 protège les cardiomyocytes de l'apoptose induite par le stress RE en diminuant uniquement l'activation de la voie PERK/eIF2 α , suggérant qu'il existerait dans cette branche un facteur régulé par SIRT1. Parmi les différents membres de la voie PERK étudiés, nous avons observé que seul eIF2 α est acétylé, ce qui nous a permis de mettre en évidence une nouvelle modification post-traductionnelle de ce facteur clé de la voie PERK. Par des expériences d'immunoprécipitation, nous avons également montré que SIRT1 interagit physiquement avec eIF2 α et le désacétyle. L'analyse par spectrométrie de masse nous a permis d'identifier les lysines K141 et K143 comme sites d'acétylation/désacétylation d'eIF2 α régulés par SIRT1. De plus, la construction et l'utilisation

de mutants pour ces sites d'acétylation a révélé que SIRT confère une protection contre l'apoptose induite par le stress RE en désacétylant eIF2 α sur la lysine K143.

Conclusions :

Notre étude a permis de mettre en évidence que la désacétylation d'eIF2 α sur la lysine K143 par SIRT1 est un nouveau mécanisme de régulation permettant de protéger les cellules cardiaques de l'apoptose induite par un stress RE délétère et suggère que l'activation de SIRT1 serait une approche thérapeutique envisageable pour protéger le cœur contre le stress RE.

SIRT1 protects the heart from ER stress-induced cell death through eIF2 α deacetylation

Alexandre Prola¹, Julie Pires Da Silva¹, Arnaud Guilbert¹, Lola Lecru², Jérôme Piquereau¹, Maxance Ribeiro¹, Philippe Mateo¹, Mélanie Gressette¹, Dominique Fortin¹, Céline Boursier³, Cindy Gallerne², Anaïs Caillard⁴, Jane-Lise Samuel⁴, Hélène François², David A Sinclair^{5,6}, Pierre Eid², Renée Ventura-Clapier¹, Anne Garnier¹ and Christophe Lemaire^{*1,7}

Over the past decade, endoplasmic reticulum (ER) stress has emerged as an important mechanism involved in the pathogenesis of cardiovascular diseases including heart failure. Cardiac therapy based on ER stress modulation is viewed as a promising avenue toward effective therapies for the diseased heart. Here, we tested whether sirtuin-1 (SIRT1), a NAD⁺-dependent deacetylase, participates in modulating ER stress response in the heart. Using cardiomyocytes and adult-inducible SIRT1 knockout mice, we demonstrate that SIRT1 inhibition or deficiency increases ER stress-induced cardiac injury, whereas activation of SIRT1 by the SIRT1-activating compound STAC-3 is protective. Analysis of the expression of markers of the three main branches of the unfolded protein response (i.e., PERK/eIF2 α , ATF6 and IRE1) showed that SIRT1 protects cardiomyocytes from ER stress-induced apoptosis by attenuating PERK/eIF2 α pathway activation. We also present evidence that SIRT1 physically interacts with and deacetylates eIF2 α . Mass spectrometry analysis identified lysines K141 and K143 as the acetylation sites on eIF2 α targeted by SIRT1. Furthermore, mutation of K143 to arginine to mimic eIF2 α deacetylation confers protection against ER stress-induced apoptosis. Collectively, our findings indicate that eIF2 α deacetylation on lysine K143 by SIRT1 is a novel regulatory mechanism for protecting cardiac cells from ER stress and suggest that activation of SIRT1 has potential as a therapeutic approach to protect the heart against ER stress-induced injury.

Cell Death and Differentiation (2017) 24, 343–356; doi:10.1038/cdd.2016.138; published online 2 December 2016

The endoplasmic reticulum (ER) is the site for synthesis, folding and quality control of secreted and membrane proteins. Impairment of ER function in response to stresses such as disruption of calcium homeostasis or ischemia causes the accumulation of misfolded proteins in the ER lumen, resulting in ER stress.¹ When ER stress occurs, the unfolded protein response (UPR) is activated to restore normal ER function. The UPR is initiated by activation of three proximal sensors, namely PERK, ATF6 and IRE1, which lead to eIF2 α phosphorylation to attenuate global protein synthesis and to the transcription of UPR target genes (e.g., ATF4 and XBP1) to upregulate the expression of ER chaperones and proteins involved in ER-associated protein degradation. Activation of this self-protective pathway gives the cell a chance to restore normal ER function. However, in the case of severe or prolonged ER stress, the mitochondrial apoptotic process is triggered to eliminate damaged cells.^{2–5}

Over the past two decades, ER stress has emerged as an important mechanism involved in the pathogenesis of human diseases such as diabetes, obesity, neurodegenerative disorders and cancer. More recently, ER stress has also been implicated in cardiac diseases including myocardial infarction, ischemia, dilated cardiomyopathy and heart failure.⁶ Moderate

induction of ER stress response is currently considered as protective, whereas prolongation of the response typically leads to apoptosis and contributes to the maladaptive response to injury. For example, overexpression of UPR-related proteins ATF6, XBP1s or PDI lowers apoptosis and protects the myocardium from I/R injuries.^{7–9} Furthermore, extinction of GRP78, the central regulator of UPR, induces more severe cardiac insults upon ischemia,¹⁰ whereas knockout of the pro-apoptotic factor CHOP protects mice against pressure overload-induced heart failure.¹¹ Besides, chemical chaperones, such as 4-phenylbutyrate or tauroursodeoxycholic acid, protect the heart against isoproterenol (ISO)- or obesity-induced dysfunction by alleviating ER stress.^{12,13} Therefore, cardiac therapy based on ER stress modulation could be promising to promote beneficial adaptations and avoid apoptosis.

Sirtuin-1 (SIRT1), a NAD⁺-dependent lysine deacetylase, is activated in response to various cellular stress¹⁴ and is cardioprotective in the context of aging, hypertrophy and myocardial infarction.^{15–17} However, whether and how SIRT1 modulates ER stress response in the heart has not been elucidated yet. Thus, we tested the role of SIRT1 in the modulation of the cardiac ER stress response *in vitro* and

¹UMR-S 1180, INSERM, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France; ²UMR-S 1014, INSERM, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France; ³Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France; ⁴UMR-S 942, INSERM, Univ Denis Diderot, Hôpital Lariboisière, Paris, France; ⁵Glenn Labs for the Biological Mechanisms of Aging, Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA, USA; ⁶Department of Pharmacology, School of Medical Sciences, The University of New South Wales, Sydney, New South Wales, Australia and ⁷Université Versailles St. Quentin, Université Paris-Saclay, Versailles, France

*Corresponding author: C Lemaire, UMR-S 1180, INSERM – Signalling and Cardiovascular Pathophysiology, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 5, Rue Jean-Baptiste Clément, Châtenay-Malabry 92296 France. Tel: +33 146 835241; Fax: +33 146 835475; E-mail: christophe.lemaire@u-psud.fr

Received 04.1.16; revised 22.9.16; accepted 11.10.16; Edited by A Villunger; published online 02.12.16

in vivo using adult-inducible SIRT1 knockout mice. We report that SIRT1 protects cardiomyocytes against ER stress-induced apoptosis by modulating the PERK/eIF2 α pathway of the UPR at least through eIF2 α deacetylation on lysine residue K143.

Results

SIRT1 deficiency increases cardiac dysfunction induced by ER stress.

To investigate the functional role of SIRT1 in the context of cardiac ER stress, adult-inducible SIRT1 knockout (SIRT1 iKO) and control mice were injected with the ER stressor tunicamycin (TN, 2 mg/kg body weight). TN provoked an ER stress, as demonstrated by the upregulation of GRP94 and GRP78, which was not significantly modified by SIRT1 deletion (Figure 1a). Intra-peritoneal challenge with TN did not affect organ weights except for liver (Supplementary Table S1). ER stress was accompanied by a decrease in ejection fraction (EF; Figures 1b and c) and fractional shortening (FS) (Supplementary Table S2). By contrast, the heart rate (Supplementary Table S2), left ventricular internal diameters (Figures 1d and e) or wall thickness (Figures 1f and g) were not affected. The deletion of SIRT1 exacerbated the deterioration of cardiac function induced by ER stress, with a significant decrease in EF and FS (Figures 1b, c and Supplementary Table S2), an increase of left ventricular systolic diameter (Figure 1e) and a decrease of systolic total wall thickness (Figure 1g). Given that ER stress is known to elicit myocardial damages through induction of apoptosis,¹⁸ the effects of SIRT1 deletion on ER stress-induced cardiomyocyte apoptosis was measured by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick-end labeling (TUNEL) assay on mouse myocardium. The number of apoptotic cardiomyocytes induced by TN injection was significantly increased in myocardium of SIRT1 iKO mice (Figure 1h). Together, these data support a model in which activation of SIRT1 during ER stress is cardioprotective.

Activation of SIRT1 protects adult cardiomyocytes from ER stress-induced cell death.

To establish that TN directly targets cardiomyocytes to induce cell death, we tested the effect of this ER stressor on the viability of adult rat ventricular cardiomyocytes (ARVMs) with or without the SIRT1-specific inhibitor EX527. TN treatment (10 μ g/ml, 24 h) induced

an increase of cell death (Figure 1i and Supplementary Figure S1), which was higher when SIRT1 was inhibited, corroborating the data obtained *in vivo*. By contrast, pretreatment of ARVM with STAC-3, a SIRT1-specific activator,¹⁹ almost totally abrogated cell death (Figure 1i), indicating that SIRT1 activation protects adult cardiomyocytes from ER stress-induced cell death. These results, combined with those obtained *in vivo*, show that activation of SIRT1 has a protective role against ER stress-induced cardiomyocyte death.

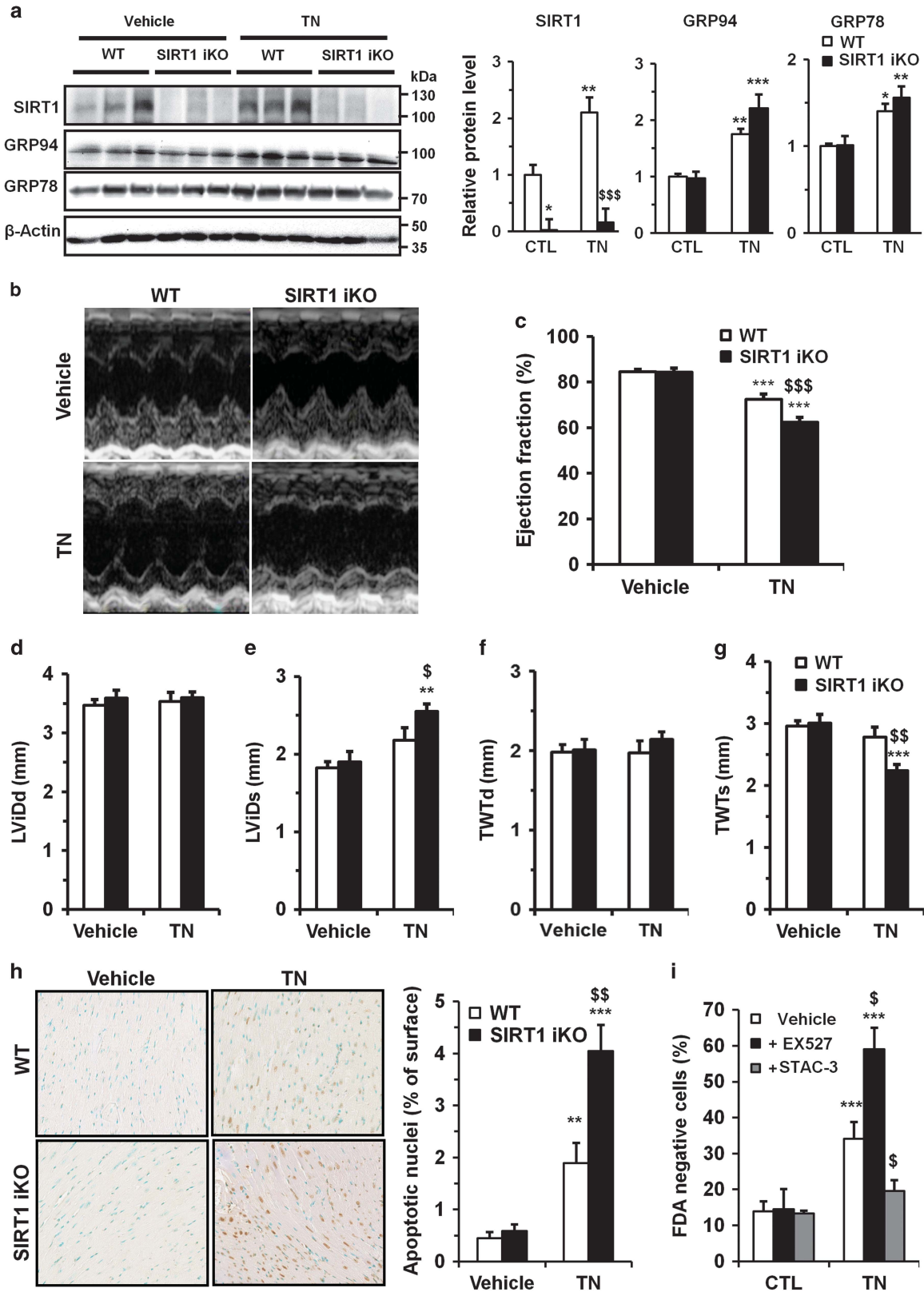
SIRT1 regulates ER stress-induced mitochondrial apoptosis in cardiac cells.

To deeply investigate the mechanism underlying the modulating activity of SIRT1 against ER stress-induced apoptosis, we developed a cell culture model of ER stress induction using H9c2 cardiac cell line. As expected, in response to the ER stressors thapsigargin (TG) or TN, an increase in the level of the ER stress markers GRP78 and CHOP was observed (Supplementary Figure S2a). Inhibition of SIRT1 by EX527 resulted in sensitization of cells to ER stress-induced cell death as shown in Figure 2a and Supplementary Figure S3. We then characterized the mode of cell death triggered by SIRT1 inhibition upon ER stress. In response to TG and TN, with or without SIRT1 inhibitor, the percentage of cells with compromised plasma membrane integrity remained very low (Figure 2b), excluding the involvement of necrosis. By contrast, $\Delta\Psi$ m loss (Figure 2c), caspase-3 activation (Figure 2d) and DNA fragmentation (Figure 2e and Supplementary Figure S2b) induced by ER stress were markedly increased by SIRT1 inhibitor. The general caspase inhibitor ZVAD-fmk and specific caspase-9 or caspase-3 inhibitors (Ac-LEHD-cmk and Ac-DEVD-cmk, respectively) conferred protection against TG- and TN-induced cell death both in the absence or the presence of EX527 (Supplementary Figures S2c and d), confirming that caspase are involved in our model. Moreover, depletion of SIRT1 with siRNA (Figure 2f) significantly enhanced cell death induced by TG and TN (Figure 2g). Therefore, SIRT1 inhibition or knockdown exacerbates the mitochondrial-regulated apoptotic pathway triggered by ER stress. In addition, TN-treated cells exhibited ultrastructural features of apoptosis and ER stress, including nuclear condensation/fragmentation, multiple contact sites between ER and mitochondria, ER dilatation and mitochondria enlargement (Supplementary Figures S5a and b). In cells incubated with the combination of the ER stressor and the SIRT1 inhibitor, the ER appeared swollen and

Figure 1 Knockout of SIRT1 sensitizes mice to ER stress-induced cardiac injury. (a) WT and SIRT1 iKO mice were injected i.p. with TN (2 mg/kg) or vehicle (150 mM dextrose) for 16 h and the levels of SIRT1 and ER stress markers GRP94 and GRP78 were analyzed by western blot in heart tissue. β -Actin was used as loading control. Relative expression of proteins (normalized to WT CTL) is presented in bar graphs. Error bars, S.E.M. ($n=3$). (b-g) Echocardiographic data were recorded 72 h after vehicle or TN treatment. (b) Representative images obtained by transthoracic echocardiography. (c) EF of WT and SIRT1 iKO mice 72 h after vehicle or TN treatment. ($n=9$). (d) Left ventricular internal dimension (diastole), LVIDD, in vehicle or TN-treated mice ($n=9$). (e) Left ventricular internal dimension (systole), LVIDS, in vehicle or TN-treated mice ($n=9$). (f) Total wall thickness (diastole), TWTd, in vehicle or TN-treated mice ($n=9$). (g) Total wall thickness (systole), TWTs, in vehicle or TN-treated mice ($n=9$). Results are presented as mean \pm S.E.M. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.005$ versus respective control. $^{\S}P<0.05$, $^{\S\S}P<0.01$, $^{\S\S\S}P<0.005$ versus WT TN. (h) WT and SIRT1 iKO mice were injected i.p. with TN (2 mg/kg) or with vehicle (150 mM dextrose) for 72 h and subjected to TUNEL assay. Representative micrographs showing apoptotic cardiomyocyte nuclei (brown) are presented (scale bar = 40 μ m). Quantification of apoptotic nuclei is shown in bar graph. Error bars, S.E.M. ($n=6$). (i) Freshly isolated ARVMs were left untreated or treated with 10 μ g/ml TN for 24 h \pm 10 μ M EX527 or 1 μ M STAC-3 pretreatment and cell viability was determined. Results presented in bar graph are expressed as mean \pm S.E.M. of percentages of dead cells (FDA-negative cells, $n=6$). ** $P<0.01$, *** $P<0.005$ versus control. $^{\S}P<0.05$, $^{\S\S}P<0.01$ versus TN alone

mitochondria were rounded, considerably enlarged and devoid of cristae, indicating that organelle morphology was dramatically altered. Taken together, our results show that

inhibition of SIRT1 enhanced ER stress-induced apoptosis in H9c2 cells. As these observations are similar to those observed *in vivo*, H9c2 cardiomyoblasts constitute a valuable



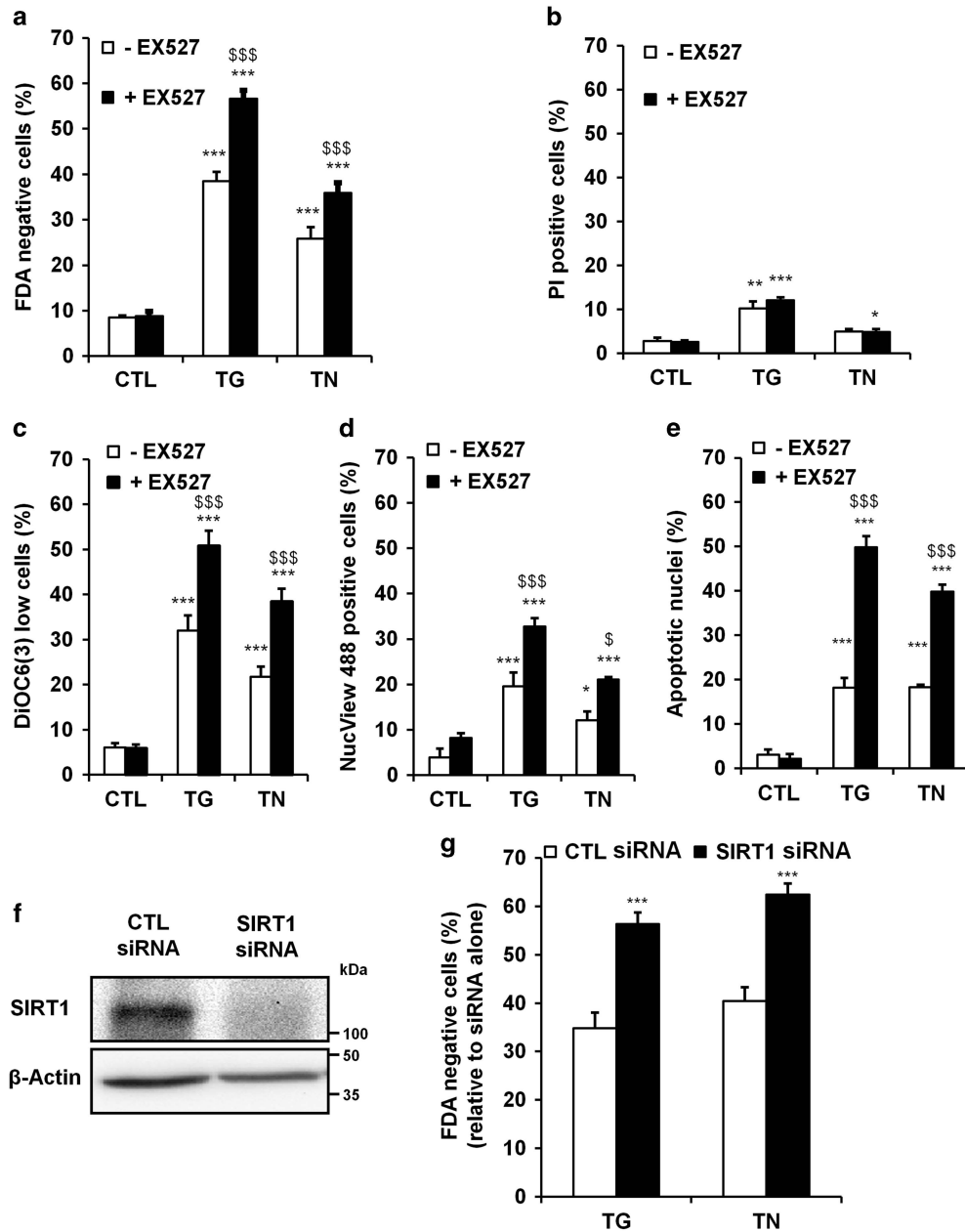


Figure 2 SIRT1 protects cardiac cells from ER stress-induced apoptosis. (a) The percentage of dead cells (FDA-negative cells) was assessed by flow cytometry after treatment of H9c2 cells for 48 h with TG (5 μ M) or TN (10 μ g/ml) in the absence or presence of SIRT1 inhibitor EX527 (10 μ M). (b-d) Same as (a) except that cells were stained with (b) PI to determine the percentage of necrosis/late apoptosis (PI high cells), (c) DiOC6(3) to estimate $\Delta\Psi$ m loss (DiOC6(3) low cells), (d) DEVD-NucViewTM 488 to measure active caspase-3 (NucView 488-positive cells), (e) DAPI to analyze apoptotic nuclei. (f) H9c2 cells were transfected with SIRT1 or control siRNA and SIRT1 expression was assessed after 24 h by western blot. (g) H9c2 cells were transfected with SIRT1 or control siRNA for 24 h then treated for 48 h with TG or TN and cell death (FDA-negative cells) was measured by flow cytometry. Data in the bar graphs represent mean \pm S.E.M. (n = 4). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.005 versus control. $^{\$}P$ < 0.05, $^{\$ \$ \$}P$ < 0.005 versus TG or TN alone

cell model to study the mechanism of SIRT1-mediated protection against severe ER stress. We also tested whether the protective role of SIRT1 in response to ER stress can be mediated through autophagy modulation. TG and TN enhanced the autophagic flux as evidenced by the accumulation of LC3-II (Supplementary Figure S4). However, no further modulation of autophagy was observed when SIRT1 was inhibited.

SIRT1 regulates the UPR by modulating PERK/eIF2 α pathway signaling. To elucidate the mechanisms underlying the cardioprotective effects of SIRT1 in severe ER stress, we measured the expression of different markers of the three branches of the UPR (i.e., PERK, ATF6 and IRE1) in H9c2 cells. As expected, TG and TN treatments induced a robust increase in the expression of all members of the UPR tested (Figures 4a-c). The inhibition of SIRT1 did not

significantly affect the expression of the members of the ATF6 branch (Figure 4a) or of the IRE1 branch (Figure 4b) induced by ER stressors. By contrast, SIRT1 inhibition further stimulated TG- and TN-mediated transcription of ATF4, ATF3, GADD34 and CHOP genes (Figure 4c), suggesting a hyperactivation of the PERK/eIF2 α pathway. To consolidate our results, we measured the protein level of members of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP branch. TG and TN induced an increase in GRP94 and GRP78 protein levels and a rapid phosphorylation of PERK, which were not modified by SIRT1 inhibitor (Figure 4d), suggesting a mechanism in which SIRT1 acts downstream of PERK to regulate this pathway. Interestingly, the phosphorylation of eIF2 α and the level of the downstream effectors ATF4, GADD34 and CHOP were higher when SIRT1 was inhibited. In addition, the induction of eIF2 α phosphorylation and the upregulation of CHOP expression (Figure 4e, WT mice) were also increased in the myocardium of SIRT1 knockout mice. Collectively, these results indicate that SIRT1 regulates the UPR and attenuates the activation of the PERK/eIF2 α pathway in response to ER stress in cardiac cells.

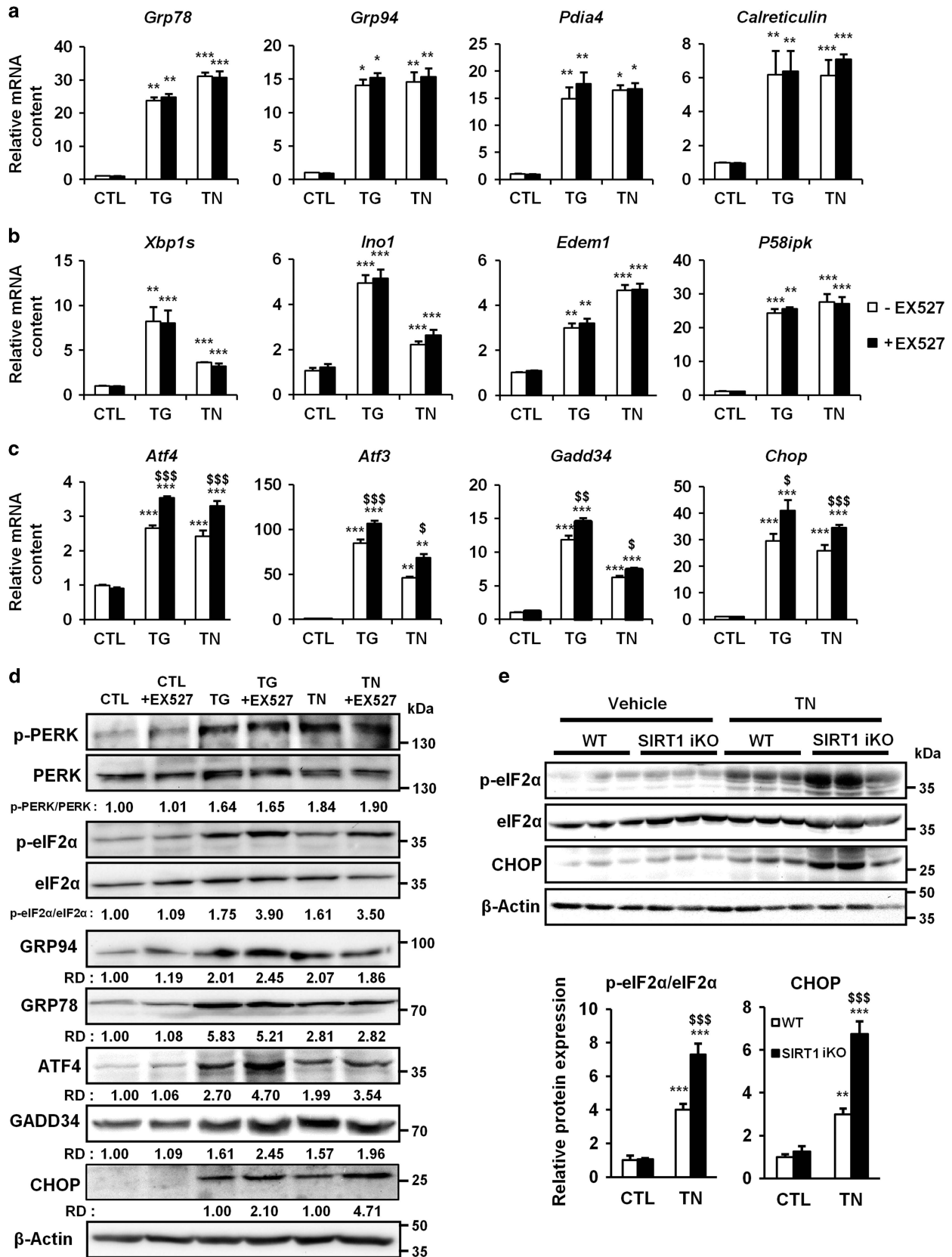
SIRT1 deficiency increases PERK/eIF2 α pathway activation and cardiac dysfunction induced by ISO. We next investigated whether SIRT1 also modulates the PERK/eIF2 α pathway in a pathophysiological model of cardiac injury. SIRT1 iKO mice were injected with ISO, to elicit a catecholaminergic stress, which has been well documented to induce cardiac dysfunction associated with ER stress.^{12,20–23} WT and SIRT1 iKO mice were subcutaneously injected with ISO (150 mg/kg body weight) and ER stress and heart function were analyzed. ISO injection triggered an ER stress, as demonstrated by the upregulation of GRP94 and GRP78. However, no difference in GRP protein levels were observed when comparing WT with SIRT1 iKO samples (Figure 4a), whereas eIF2 α phosphorylation and CHOP expression levels were increased. As the expression of the ER chaperones GRP78 and GRP94 are induced by the ATF6 pathway,²⁴ these results suggest that SIRT1 regulates the PERK/eIF2 α pathway but not the ATF6 pathway in response to ISO, as observed for TN-induced ER stress (Figures 1a and 3). Catecholaminergic stress was accompanied by a significant impairment of cardiac function as judged by decrease in EF (Figures 4b, c) and FS (Supplementary Table S3) induced by ISO. The heart rate (Supplementary Table S3), left ventricular internal diameters (Figures 4d and e) or wall thickness (Figures 4f and g) were not affected. After SIRT1 deletion, we observed a more important decrease in EF and FS (Figures 4b, c and Supplementary Table S3) and an increase of left ventricular internal diameters (Figures 4d and e), showing that SIRT1 deficiency exacerbates the cardiac dysfunction induced by ISO. Similarly to what we described above for TN-induced ER stress, the activation of SIRT1 is cardioprotective against ISO-induced cardiac injury at least in part by attenuating PERK/eIF2 α pathway activation.

SIRT1 interacts with and deacetylates eIF2 α . SIRT1 is known to regulate protein activity through deacetylation on lysine residues. To investigate the mechanism by which SIRT1 attenuates the PERK/eIF2 α pathway in response to

ER stress, proteins acetylated on lysine residues were pulled down from H9c2 cell lysates. eIF2 α was present in anti-acetyl lysine immunoprecipitates, whereas PERK, ATF4, GADD34 and CHOP were not detected, suggesting that among the members of the PERK/eIF2 α axis tested, eIF2 α is the only lysine-acetylated protein (Figure 5a). Reciprocal immunoprecipitation confirmed the acetylation of eIF2 α on lysine residues (Figure 5b). These data identify acetylation as a previously unknown post-translational modification of eIF2 α . The inhibition of SIRT1 greatly increased the acetylation of eIF2 α as shown in Figure 5c. The acetylation level of eIF2 α was also evaluated in heart tissue from WT or SIRT1 iKO mice, and we found a more pronounced acetylation of eIF2 α when SIRT1 was deleted (Figure 5d). To determine whether SIRT1 and eIF2 α physically interact with each other in cardiac cells, co-immunoprecipitation experiments were carried out. Immunoprecipitation of endogenous SIRT1 from H9c2 cell lysates co-precipitated eIF2 α (Figure 5e). The reverse experiment, immunoprecipitating endogenous eIF2 α and immunoblotting for SIRT1, confirmed their physical interaction. We next investigated whether acetylation of eIF2 α was modulated by SIRT1 in response to ER stress. ER stress induced by TN increased the level of eIF2 α acetylation (Figure 5f). This lysine acetylation was more important when SIRT1 was inhibited by EX527 or genetically deleted (Figures 5g and h), indicating that SIRT1 limits the acetylation level of eIF2 α in response to ER stress *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, in parallel to acetylation, the level of phosphorylation of eIF2 α was also increased upon ER stress when SIRT1 was inhibited or deleted, suggesting a dynamic interplay between these two post-translational modifications. Collectively, these results showed that eIF2 α is acetylated on one or more lysine residues and that this acetylation is regulated, at least in part, by SIRT1 during ER stress response.

SIRT1 deacetylates eIF2 α on lysine residues K141 and K143. To identify eIF2 α acetylation sites, eIF2 α was immunoprecipitated from H9c2 cell lysate and analyzed by nanoLC-MS/MS. Analysis revealed different trypsin-cleaved peptides near K141 (peptides TAWVFDDK and TAWVFDD-KYK, Figure 6a) and K143 (peptides RPYGAYDAFK and YKRPYGYGAYDAFK, Figure 6b) residues. Moreover, on each peptide an increase of 42 011 Dalton, corresponding to the addition of one acetyl group, was found in the mass of lysine K141 and K143 (Figures 6a and b). These results indicated that eIF2 α is acetylated at least on K141 and K143 residues. In addition, inhibition of SIRT1 by EX527 increased the quantity of acetylated peptides on K141 and K143 residues, suggesting that SIRT1 deacetylates these two residues (Figure 6c). As shown in Figure 6d, the protein sequence of eIF2 α is highly conserved among species and specifically the K141 and K143 residues.

Loss of eIF2 α acetylation at lysine K143 reduces ER stress-induced apoptosis. To investigate a causative role of eIF2 α acetylation in ER stress-induced apoptosis, we generated acetylation-defective mutants of eIF2 α in which either lysine 141 (K141R) or 143 (K143R) or both residues (K141R/K143R) were replaced with arginine. As shown in



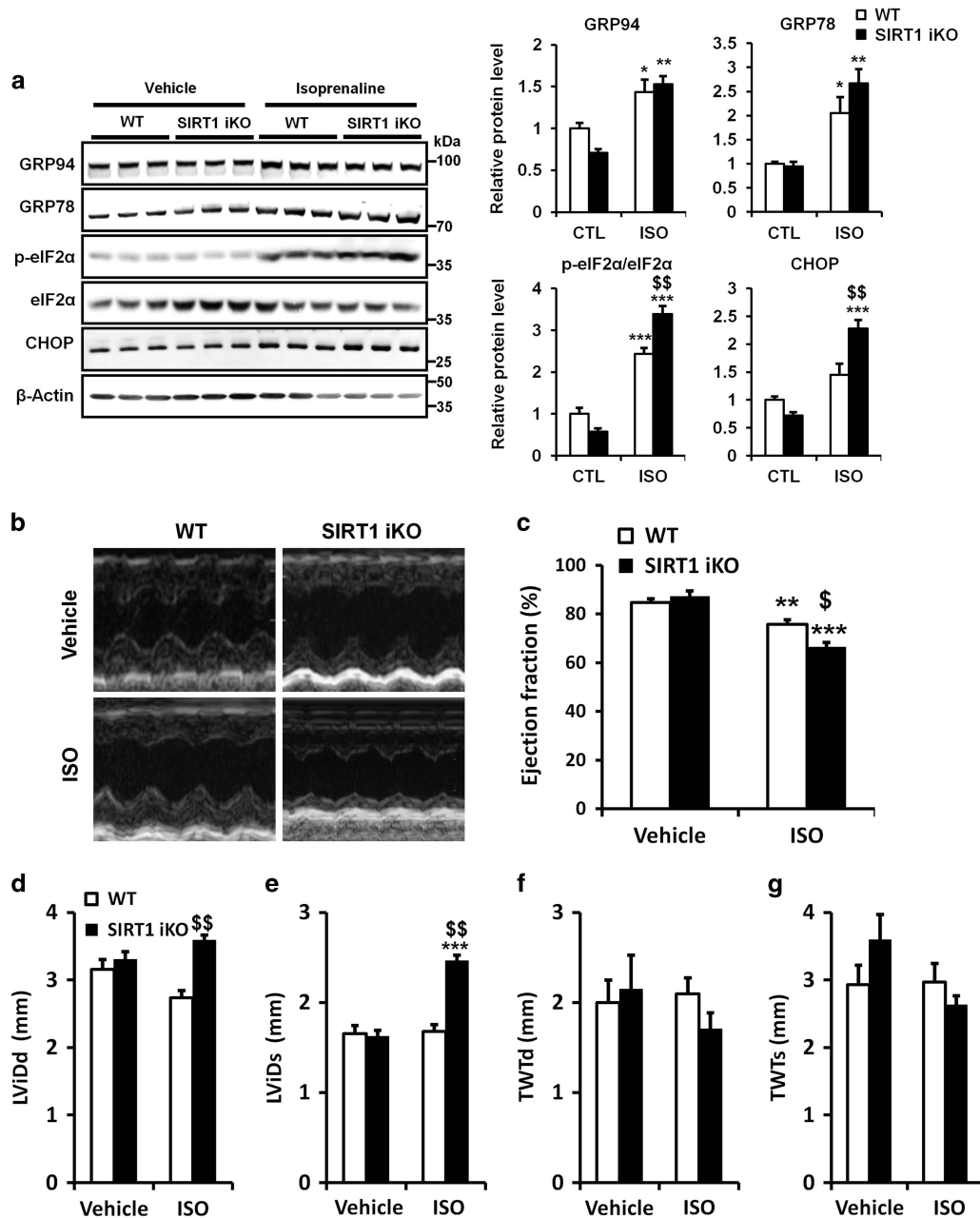
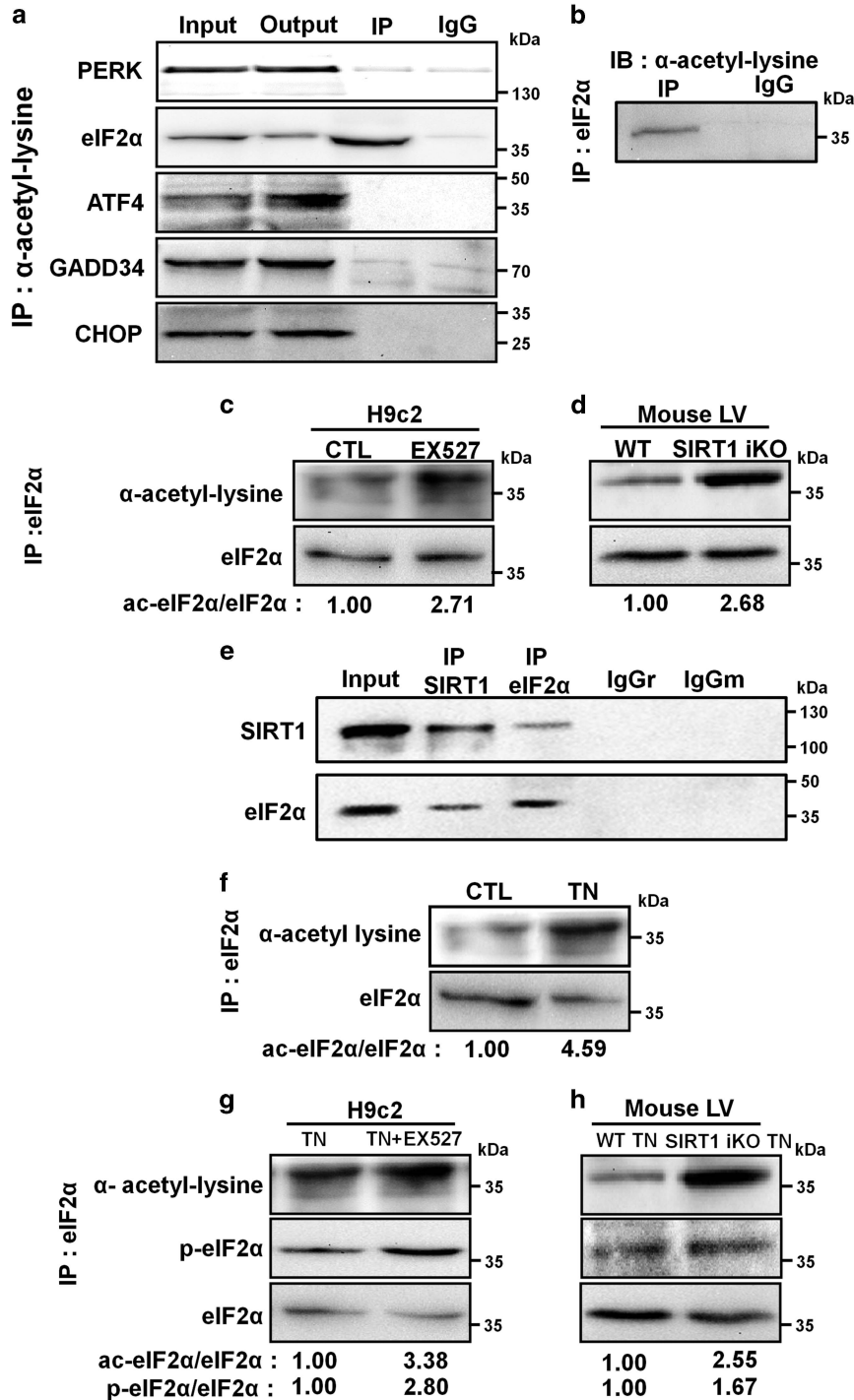


Figure 4 Knockout of SIRT1 exacerbates PERK/eIF2 α pathway activation and cardiac injury induced by ISO. (a) WT and SIRT1 iKO mice were injected subcutaneously with ISO (150 mg/kg) or vehicle (NaCl 0.9%) for 6 h and the levels of ER stress markers GRP94, GRP78, p-eIF2 α , eIF2 α and CHOP were analyzed by western blot in heart tissue. β -Actin was used as loading control. Relative expression of proteins (normalized to WT CTL) is presented in bar graphs. Error bars, S.E.M. ($n=3$). (b-g) Echocardiographic data were recorded 48 h after vehicle (NaCl 0.9%) or ISO treatment. (b) Representative images obtained by transthoracic echocardiography. (c) EF of WT and SIRT1 iKO mice after vehicle or ISO treatment. ($n=5$). (d) Left ventricular internal dimension (diastole), LVidD, in vehicle or ISO-treated mice ($n=5$). (e) Left ventricular internal dimension (systole), LViDs, in vehicle or ISO-treated mice ($n=5$). (f) Total wall thickness (diastole), TWTD, in vehicle or ISO-treated mice ($n=5$). (g) Total wall thickness (systole), TWTs, in vehicle or ISO-treated mice ($n=5$). Results are presented as mean \pm S.E.M. $**P < 0.01$, $***P < 0.005$ versus respective control. $^{\$}P < 0.05$, $^{\$\$}P < 0.01$ versus WT ISO

Figure 3 SIRT1 regulates UPR by modulating PERK/eIF2 α pathway activation. (a-c) H9c2 cells were left untreated or treated with TG (5 μ M) or TN (10 μ g/ml) \pm EX527 (10 μ M) and the relative mRNA levels of UPR target genes were quantified by qPCR and expressed as fold change over untreated controls. Values represent mean \pm S.E.M. ($n=6$). $**P < 0.01$, $***P < 0.005$ versus control. $^{\$}P < 0.05$, $^{\$\$}P < 0.01$, $^{\$$$}P < 0.005$ versus TG or TN alone. Members of the (a) ATF6 pathway, (b) IRE1 pathway and (c) PERK/eIF2 α pathway. (d) Cells were left untreated or treated with TG (5 μ M) or TN (10 μ g/ml) for 15 min (p-PERK and PERK), 90 min (p-eIF2 α and eIF2 α) or 24 h (GADD34, ATF4 and CHOP) \pm EX527 (10 μ M). Representative western blots of the level of members of the PERK/eIF2 α axis are presented. β -Actin was used as loading control. (e) WT and SIRT1 iKO mice were injected i.p. with TN (2 mg/kg) or with vehicle (150 mM dextrose) for 72 h, proteins from the left ventricle of the heart were analyzed. Representative western blot of the level of members of the PERK/eIF2 α axis are presented. Bar graphs summarize changes in protein expression from three independent measurements. Data are represented as fold change over untreated WT mice. $**P < 0.01$, $***P < 0.005$ versus WT CTL, $^{\$$$}P < 0.05$ versus WT TN. Error bars, S.E.M.

Figure 7, Flag-tagged eIF2 α wild-type or mutants were expressed at similar levels and showed no discernible effect on basal cell viability (Figures 7a and b). Mutation of lysines to deacetylation-mimic arginines reduced the level of TG- and TN-induced cell death when compared with wild-type eIF2 α (Figures 7c and d). However, only the K143R mutant significantly protected cells from ER stress-induced cell death. Interestingly, the level of protection conferred by the K143R mutation was remarkably similar to that provided by

the phosphorylation mutant S52A, suggesting a potential relationship between the level of eIF2 α phosphorylation at serine 52 and acetylation at lysine 143. This hypothesis is reinforced by the observation that co-transfection of acetylation mutants with the phosphorylation mutant S52A did not show any synergistic or adverse effects on cell death. Altogether, these data demonstrate that acetylation of eIF2 α on the K143 residue has a role in the regulation of ER stress-induced cell death in cardiac cells.



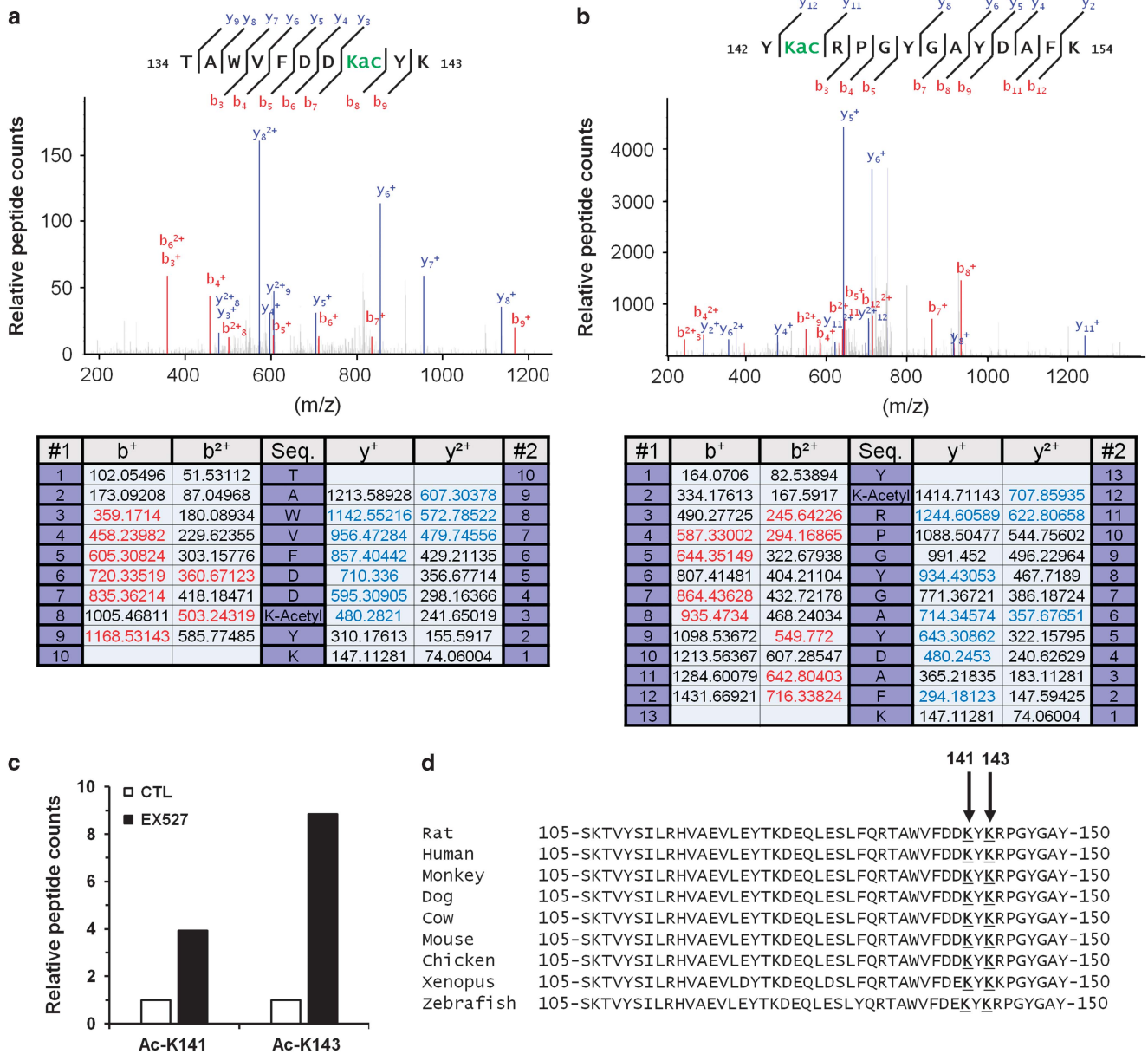
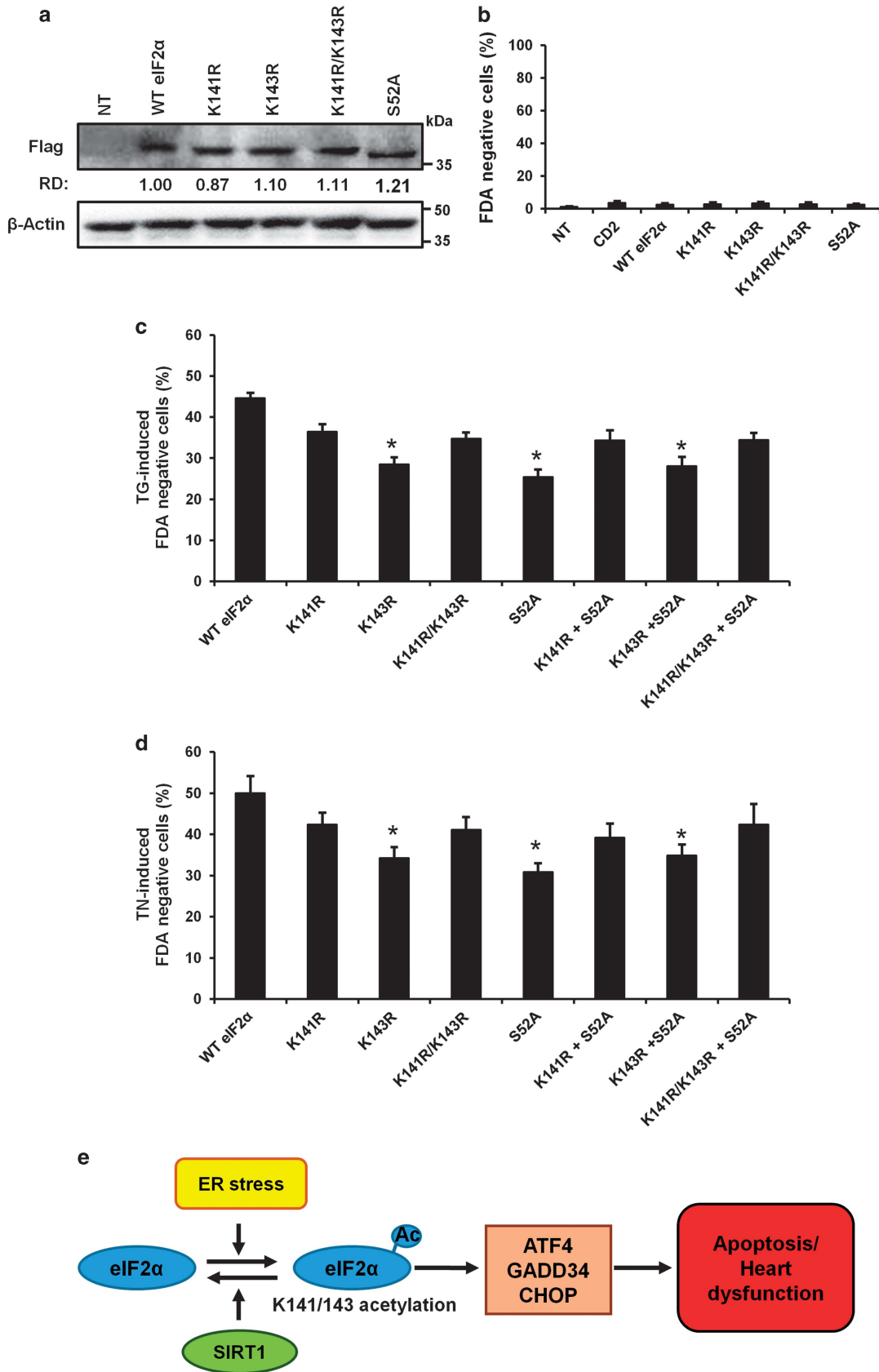


Figure 6 Lysines K141 and K143 are the acetylation sites on eIF2 α targeted by SIRT1. (a) NanoLC-MS/MS spectrum of acetylated eIF2 α peptides containing lysine K141. (b) NanoLC-MS/MS spectrum of acetylated eIF2 α peptides containing lysine K143. (c) Relative acetylated K141 or K143 peptide count in control or EX527 (10 μ M) treated cells. (d) Sequence alignment of the region surrounding K141 and K143 residues of eIF2 α

Figure 5 SIRT1 physically interacts with and deacetylates eIF2 α . (a) Immunoprecipitation of acetylated proteins from H9c2 lysate followed by immunoblotting with the indicated antibodies. Input, input fraction; Output, supernatant after immunoprecipitation; IP, immunoprecipitate; IgG, negative control. (b) eIF2 α was immunoprecipitated from H9c2 lysate and its level of acetylation was analyzed by immunoblotting with anti-acetyl-lysine antibody. (c) eIF2 α was immunoprecipitated from control or H9c2 cells treated with EX527 (10 μ M, 4 h) and its level of acetylation was determined by immunoblotting with anti-acetyl-lysine antibody. The ratio of acetylated versus total eIF2 α is presented relative to control. (d) The level of acetylation of eIF2 α was determined from immunoprecipitates of left ventricle extracts of WT or SIRT1 iKO mice. The ratio of acetylated versus total eIF2 α is presented relative to WT mice. (e) The physical interaction between endogenous SIRT1 and eIF2 α was demonstrated by co-immunoprecipitation. SIRT1 was precipitated from H9c2 lysate with anti-SIRT1 antibody and blotted with anti-eIF2 α antibody, and vice versa. Negative controls: IgG, rabbit IgG, mouse IgG. (f) eIF2 α was immunoprecipitated from H9c2 lysate with anti-SIRT1 antibody and blotted with anti-eIF2 α antibody, and vice versa. Negative controls: IgG, rabbit IgG, mouse IgG. (g) H9c2 cells were treated with TN (10 μ g/ml, 4 h) \pm EX527 (10 μ M), eIF2 α was immunoprecipitated and its levels of acetylation and phosphorylation were analyzed. Ratios of acetylated and phosphorylated versus total eIF2 α are presented relative to TN alone. (h) WT and SIRT1 iKO mice were injected with TN (2 mg/kg), eIF2 α was immunoprecipitated from left ventricle and its levels of acetylation and phosphorylation were analyzed. Ratios of acetylated or phosphorylated versus total eIF2 α are presented relative to WT mice



Discussion

Recent studies have demonstrated the importance of ER stress in the development of cardiac diseases and have suggested that modulation of ER stress response could be cardioprotective.^{11,12,25} Moreover, increasing evidence suggests that SIRT1, as a master regulator of cellular stress, may be a therapeutic target for the prevention of cardiovascular diseases.^{26,27} The main focus of this study was thus to investigate the possible role of SIRT1 as a regulator of ER stress in cardiac cells and the mechanisms by which it regulates ER stress response. We show that ER stress impairs heart function and that SIRT1 inhibition or deletion results in increased ER stress-induced apoptosis and cardiac dysfunction. Conversely, SIRT1 activation by the SIRT1-activating compound STAC-3 protects cardiomyocytes from ER stress-induced cell death. We also provide evidence that SIRT1 protects the heart by modulating the PERK/eIF2 α pathway of the UPR at least through deacetylation of eIF2 α on lysine K143 (Figure 7e).

It has been shown that a primary function of SIRT1 is to protect against different cardiac stresses.^{28–30} Our results show that SIRT1 also has a protective role against acute ER stress induced by TN or ISO in the heart. The increase in SIRT1 expression observed after TN treatment may help protect cardiac cells from excessive ER stress-induced cell death. It has been reported that overexpression of ATF4 increases SIRT1 expression in cancer cell lines,³¹ suggesting that the upregulation of ATF4 observed in our model in response to ER stress may increase SIRT1 expression.

SIRT1 was previously reported to regulate the IRE1 branch of the UPR through deacetylation of XBP1s in embryonic fibroblasts and its deficiency resulted in a decrease of ER stress-induced apoptosis. The authors proposed that SIRT1 exerts deleterious effects and sensitizes these cells to ER stress-induced apoptosis via repressing XBP1s signaling.³² In our experiments, we did not detect any effect of SIRT1 inhibition on the IRE1/XBP1s axis, but rather on the PERK/eIF2 α pathway. In addition, we demonstrated that inhibition, knockdown or genetic deletion of SIRT1 increases cell death triggered by ER stress, indicating that SIRT1 protects cardiomyocytes from severe ER stress. Such discrepancies may reflect cell-type specificities including differentiation state. However, to overcome the shortcomings often associated with cell culture models, we further confirmed the cardioprotective effect of SIRT1 activation against ER stress-induced cell death in ventricular adult cardiomyocytes and in *in vivo* mouse models of TN- and ISO-induced cardiac dysfunction. Very recently, Guo *et al.*³³ have observed that resveratrol-mediated activation of SIRT1 reduced cardiomyocyte apoptosis induced

in a diabetic cardiomyopathy model. They suggested that the protection conferred by SIRT1 may involve attenuation of the PERK, ATF6 and IRE1 pathways of ER stress, but no mechanistic insights were provided. Here, using specific pharmacological and genetics tools, we show in a model in which ER stress is specifically induced, that the protection afforded by SIRT1 occurs through regulation of the PERK/eIF2 α pathway of the UPR. Activation of PERK/eIF2 α pathway contributes to cell adaptation after initiation of ER stress, mostly by limiting protein translation through eIF2 α phosphorylation. Nevertheless, in cells with irrecoverable levels of ER stress, the PERK/eIF2 α pathway can induce apoptosis by sustaining the level of expression of the pro-apoptotic factor CHOP.⁵ This study indicates that inhibition or inactivation of SIRT1 results in hyperactivation of PERK/eIF2 α pathway, which is associated with increased expression of CHOP and cardiomyocyte apoptosis. In addition, pharmacological activation of SIRT1 by the selective activator STAC-3,¹⁹ provides effective protection against ER stress-induced cell death. These findings suggest that SIRT1, by attenuating PERK/eIF2 α pathway activation, reduces the initiation of apoptosis and promotes cell survival thus supporting the therapeutic potential of SIRT1 activators for the treatment of cardiac pathologies associated with ER stress.

The translation initiation factor eIF2 α has a critical role in translation and its phosphorylation on serine 51/52 by PERK is considered as a rate-limiting step in translation in response to ER stress.¹ Although eIF2 α phosphorylation inhibits general protein translation initiation, it is required for selective translation of several mRNAs of stress response proteins including ATF4, which in turn activates the expression of the pro-apoptotic factor CHOP.³⁴ Although phosphorylation of eIF2 α has been intensively studied, the understanding of the molecular events regulating its phosphorylation is poorly documented. Biochemical studies have highlighted the importance of the conformational state of eIF2 α for phosphorylation,³⁵ raising the hypothesis that an undescribed post-translational modification may regulate eIF2 α conformation and its subsequent phosphorylation.³⁶ We demonstrate that eIF2 α is acetylated on lysines K141 and K143, that eIF2 α physically interacts with SIRT1 and that SIRT1 deacetylates eIF2 α on these lysine residues. SIRT1 interaction with eIF2 α has been shown in HeLa cancer cells,³⁷ but no data on eIF2 α acetylation/deacetylation was reported. In response to ER stress, inhibition of SIRT1 promotes both hyperacetylation of eIF2 α and cardiomyocyte death, suggesting that eIF2 α acetylation on lysine K141 or K143 may regulate ER stress-induced apoptosis. We demonstrated that blocking lysine K143 acetylation by conservative mutation to arginine reduces ER stress-induced cell death, suggesting that deacetylation of

Figure 7 Acetylation of eIF2 α on lysine K143 regulates ER stress-induced cell death. (a–c) Wild-type and mutant eIF2 α expression plasmids were transfected into H9c2 cells for 24 h, ER stress was induced or not by TG (5 μ M) or TN (10 μ g/ml) and cell death was analyzed in transfected cells by flow cytometry after 48 h by FDA assay. For acetylation-defective mutants, either lysine 141 (K141R) or 143 (K143R) or both residues (K141R/K143R) were replaced with arginine. For eIF2 α phosphorylation-defective mutant, serine 52 (S52A) was replaced by alanine. (a) Expression levels of the Flag-tagged eIF2 α mutants. β -Actin was used as loading control. (b) Effect of wild-type and mutant eIF2 α expression on cell death. (c and d) Effect of wild-type and mutant eIF2 α on (c) TG-induced cell death (FDA-negative cells), (d) TN-induced cell death (FDA-negative cells). Results are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 6$). * $P < 0.05$, versus WT eIF2 α . (e) Model of SIRT1 protection against ER stress-induced injury in cardiac cells. Upon ER stress, eIF2 α is acetylated on K141/K143 residues leading to induction of cardiac injury through cardiomyocyte apoptosis. The deacetylation of eIF2 α by SIRT1 protects cardiomyocytes from ER stress-induced apoptosis and heart dysfunction

eIF2 α on lysine K143 by SIRT1 may be an important novel regulatory mechanism for protecting cardiac cells from severe ER stress.

The activity of numerous targets of SIRT1 is known to be regulated both by deacetylation and by phosphorylation (e.g., PGC-1 α , p53, FOXO and Beclin1),^{14,38} even if the interplay between these two post-translational modifications is not fully understood. Our observations that acetylation and phosphorylation of eIF2 α increase in parallel in response to ER stress when SIRT1 is inhibited or knocked out and that acetylation (K143R) and phosphorylation (S52A) mutants protect cells from ER stress-induced cell death at a similar level suggest that SIRT1, by regulating the level of acetylation of eIF2 α , may regulate its level of phosphorylation and thus its activity. Although additional studies are needed to clarify the relationship between acetylation and phosphorylation of eIF2 α , our data provide a clue as to how SIRT1 limits PERK/eIF2 α pathway activation and ER stress-induced apoptosis.

It has been demonstrated that ER stress and SIRT1 are involved in the development of numerous pathologies such as cardiovascular diseases, diabetes, cancer, neurodegenerative disorders and obesity.^{27,39–42} Hence, it will be interesting to test whether the regulation of ER stress response through SIRT1-mediated deacetylation of eIF2 α is also beneficial in these diseases. Finally, the demonstration that SIRT1 activation by STAC-3 protects cardiomyocytes from ER stress-induced cell death provides grounds for the development of therapies based on SIRT1-activating compounds in ER stress-associated cardiac diseases.

Materials and Methods

Animals. C57BL/6J mice carrying both the UBC-Cre-ER^{T2} and the SIRT1^{fllox Δ E4/fllox Δ E4} alleles (UBC-Cre-ER^{T2} \times SIRT1^{fllox Δ E4/fllox Δ E4}) called herein SIRT1 iKO mice were described previously.^{19,43} Excision of the exon 4 of SIRT1 was induced by tamoxifen administration at 2–4 months of age (25 mg/kg i.p. daily \times 4 days). To study ER stress *in vivo*, 4 weeks after tamoxifen treatment mice ($n = 9$) were given i.p. injection of TN 2 mg/kg body weight or the equivalent volume of vehicle (Dextrose 150 mM) and were killed 16 h after injection for molecular studies. Echocardiographic parameters were assessed 72 h after injection and mice were then killed for heart histochemical and molecular analysis. To study the role of SIRT1 in a myocardial injury model, mice ($n = 5$ for each group) were given subcutaneous injection of ISO 150 mg/kg body weight or the equivalent volume of vehicle (NaCl 0.9%) twice (at T0 and T5h30) and were killed after 6 h for molecular studies. Echocardiographic parameters were assessed after 2 days of treatment and mice were then killed for heart molecular analysis. All experiments were performed in conformity with the European Community guiding principles in the care and use of animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament). Authorizations to conduct animal experiments were obtained from the French Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation (no. 92-284, 27 June 2007).

Cell culture and reagents. H9c2 rat cardiomyoblast cell line was purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). Cells were cultured in DMEM medium supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 10% FBS (Lonza, Levallois, France), at 37 °C under 5% CO₂/95% air. ER stress was induced by treatment with TG (5 μ M) or TN (10 μ g/ml). EX527 was from Tocris (Bristol, UK), STAC-3 was from Santa Cruz (Dallas, TX, USA). Caspase inhibitors were from Bachem AG (Bubendorf, Switzerland). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France). DEVD-NucViewTM 488 caspase-3 substrate was from Interchim (Montluçon, France). All other fluorescent probes were from Fischer Scientific (Illkirch, France).

siRNA transfection. A mixture of five SIRT1 siRNA provided as a single reagent was purchased from Santa Cruz. H9c2 cells were plated overnight at

25 \times 10⁴ cells in 24-well plate and were transfected with 16 pg of SIRT1 siRNA oligonucleotides or non-target control oligonucleotides according to manufacturer's instructions. Twenty-four hours after transfection, medium was removed and cells were treated or not with TG or TN for 48 h.

Echocardiography. Transthoracic echocardiography was performed using a 15 MHz transducer (Vivid 9, General Electric Healthcare, GE Medical Systems, Buc, France) under 2.5% isoflurane gas anesthesia. Two-dimensional (2D)-guided M-mode echocardiography was used to determine wall thickness and left ventricular chamber volume at systole and diastole and contractile parameters, such as FS or EF.

Histochemical analysis. Hearts were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Apoptosis was detected in tissue sections (4 μ m) using the TUNEL assay (Apoptag Kit, peroxidase staining, Merck Millipore, Molsheim, France) according to the manufacturer's recommendations. The slides were counterstained with methyl green. Apoptotic cells were quantified using a computer-based morphogenic analysis software (TRIBVN ICS Framework, Chatillon, France) in a blinded manner. For each mouse, an entire heart cross section was analyzed. The surface of the positive area (stained in brown) was measured for each specimen and expressed as a percentage of the total tissue area.

Flow cytometry analysis. The fluorescent probe fluorescein diacetate (FDA) was used to assess cell viability. After treatment, cells were incubated for 5 min at 37 °C with 0.2 μ g/ml FDA and analyzed by flow cytometry. Mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi$ m) was analyzed by cell staining with 10 nM DiOC6(3) for 20 min at 37 °C. Necrosis was estimated by adding 10 μ g/ml of propidium iodide (PI) just before flow cytometric analysis. Caspase-3 activation was assessed using DEVD-NucView 488 caspase-3 substrate. After treatment, cells were incubated with 5 μ M DEVD-NucView 488 for 30 min at RT before cytometric analysis. Fluorescence of cells was analyzed on a Cell Lab Quanta MPL cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France).

Sample preparation for transmission electron microscopy. H9c2 cells were fixed with 2% glutaraldehyde/0.1 M sodium cacodylate for 1 h at RT, pelleted and rinsed with 0.1 M sodium cacodylate/0.2 M sucrose for 1 h. Samples were epon-embedded, sliced, mounted on slides and the images were obtained at the electron microscopy facility of INRA (Jouy-en-Josas, France).

Adult cardiomyocyte isolation and ER stress induction. Retrograde heart perfusion according to the Langendorff method was performed to isolate adult rat ventricle cardiomyocytes as previously described.⁴⁴ Cells were plated onto dishes coated with laminin and were kept at room temperature for 2 h. Cells were then treated with 10 μ g/ml TN with or without EX527 (20 μ M) or STAC-3 (1 μ M) for 24 h at 37 °C under 5% CO₂/95% air.

Evaluation of cell death by fluorescence microscopy. To detect apoptosis in H9c2 cells, nuclei were stained with 2.5 μ g/ml Hoechst 33348 for 5 min. Condensed or fragmented nuclei were considered as apoptotic. To analyze cell death, cardiomyocytes were stained with 0.2 μ g/ml of FDA for 5 min. FDA-negative cardiomyocytes were considered as dead cells. More than 1000 cells were counted for each condition and representative micrographs were taken on a Leica fluorescence microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France).

RNA isolation and quantitative RT-PCR. RNA was isolated from cultured cells using Zymo Research (Freiburg, Germany) Quick RNA MiniPrep according to the manufacturer's instructions or from the left ventricle of the heart using Trizol reagent (Fisher Scientific, Illkirch, France). Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed using BioRad iScript reverse transcription kit. For real-time PCR, cDNA was amplified by the 'two-step' SsoFast EvaGreen supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), heated at 95 °C for 30 s, followed by 50 cycles of denaturation at 95 °C during 2 s and hybridization/elongation at 60 °C during 5 s. The PCR primers were obtained from Eurofins (Les Ulis, France) and are listed in table EV4. The results were quantified according to the Cq value method, where Cq is defined as the quantification cycle of PCR at which the amplified product is detected. The ratio $(1 + E_{\text{target gene}})^{-Cq_{\text{sample}}} - (1 + E_{\text{reference gene}})^{-Cq_{\text{control}}}$ was calculated, where E

represents the efficiency of the quantitative PCR reaction. With this calculation, expression of control was equivalent to one (Supplementary Table 4).

Western blot analysis. Cells and tissues were lysed in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid) plus a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Roche, Boulogne-Billancourt, France), PMSF and a cocktail of deacetylase inhibitors (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) for 30 min at 4 °C. Proteins (50 μ g) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes (Merck Millipore, Molsheim, France). Membranes were incubated overnight at 4 °C with the following antibodies: anti-GRP94, anti-GRP78, anti-phospho-PERK, anti-PERK, anti-GAPDH, anti-phospho-eIF2 α , anti-eIF2 α , anti-acetylated lysine, anti-p53, anti-LC3-II and anti-CHOP from Cell Signaling (Leiden, The Netherlands), anti-Flag from Novus (Lille, France), anti- β -actin (sc-47778), anti-ATF4 (sc-200), anti-histone H1 (sc-10806) and anti-GADD34 (sc-8327) from Santa Cruz, anti-SIRT1 anti-acetylated p53 from Abcam (Paris, France), anti-acetylated histone H1 from Sigma-Aldrich (Lyon, France). Proteins were detected on a ChemiDoc XRS (Bio-Rad) by using the ECL method according to the manufacturer's instructions (Merck Millipore). To calculate the relative density (RD), ImageJ software was used and the intensity of each protein was normalized to β -actin or GAPDH. The data obtained were then expressed as the ratio of the intensity of the protein in treated cells or mice to that of the corresponding protein in untreated cells or vehicle-treated mice (RD). The level of protein phosphorylation/acetylation was expressed as the ratio of the phosphorylated/acetylated protein versus the total protein.

Native and denaturing immunoprecipitations. To analyze the level of eIF2 α acetylation, cells were lysed in a denaturing IP buffer (1% SDS, 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 15 U/ml DNase, pH 7.4) supplemented with a protease and phosphatase inhibitors cocktail (Roche) and a cocktail of deacetylase inhibitors (Santa Cruz). Lysate were heat at 90 °C for 5 min and then diluted in non-denaturing buffer to trap SDS (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 300 mM NaCl, 0.02% azide de sodium, 1 mM PMSF, pH 7.4) supplemented with a cocktail of protease and deacetylase inhibitors. Lysine-acetylated proteins or eIF2 α protein were immunoprecipitated using anti-acetylated lysine antibody or anti-eIF2 α antibody coated on A/G magnetic beads (Merck Millipore). Mouse anti-IgG (Santa Cruz) were used as control. To examine physical interaction between SIRT1 and eIF2 α , cell were lysed in non-denaturing lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, pH 8) supplemented with a protease and phosphatase inhibitors cocktail (Roche) for 30 min at 4 °C. SIRT1 or eIF2 α proteins were immunoprecipitated using anti-SIRT1 or anti-eIF2 α antibodies coated on A/G magnetic beads (Merck Millipore). Mouse and rabbit anti-IgG (Santa Cruz) were used as control. Immunoprecipitated proteins were run on SDS-PAGE and were revealed with anti-eIF2 α , anti-PERK, anti-ATF4, anti-CHOP, anti-GADD34, anti-acetylated lysine or anti-SIRT1 antibodies.

Mass spectrometry analysis. Immunoprecipitated eIF2 α protein was separated by SDS-PAGE and In-gel trypsin digestion was carried out as previously described.⁴⁵ The gel slices corresponding to the bands between 25 and 50 kDa from H9c2 cells treated or not with EX527 were excised. After reduction and alkylation, the proteins were digested with a modified sequencing grade trypsin (Sigma-Aldrich). The digestion was carried out overnight at 37 °C and the fragmented peptides were extracted from the gel with 5% formic acid/50% acetonitrile. Mass spectrometric analyses were performed using nano-flow liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). LC-MS/MS was carried out on an RSLC Ultimate-3000 nano-flow LC system (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) coupled to a Hybrid LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer instrument (ThermoScientific). A capillary peptide trap (1 mm 300 μ m ID) was used to desalt and concentrate the tryptic peptides before separation on a reverse-phase 15 cm 75 μ m ID pepMap column, packed with C18-resin (ThermoScientific). The column was directly mounted in the nanoelectrospray ion sources and the peptides were eluted by applying a linear gradient program (5–50% B 30 min, 50% B 30–35 min and 50–95% B 35–60 min where mobile phase B was 0.1% formic acid/95% HPLC grade acetonitrile/5% HPLC grade water and mobile phase A was 0.1% formic acid/5% HPLC grade acetonitrile/95% HPLC grade water) at a constant flow of 170 nl/ml. The analysis using the Hybrid LTQ-Orbitrap Velos type of instrument was performed as previously described.⁴⁶ The instrument was operated in data-dependent acquisition mode to automatically switch between MS and MS/MS. MS/MS spectra of these ions were obtained by fragmenting the ions using collision-induced dissociation with normalized collision energy of 30% in the ion trap. The data files

generated by the LC-MS/MS were converted to Sequest generic format files and were searched using Proteome Discoverer Search Engine (ThermoScientific) against the human NCBI non-redundant database. Peptides searches were performed using carbamidomethyl as fixed modification and oxidized methionine and acetylated lysine as variable modification.

Vectors and site-directed mutagenesis. Plasmids encoding human CD2 (pCDNA3-hCD2), WT eIF2 α (eIF2a 1) and eIF2 α S52A phosphorylation mutant (eIF2a 2) were a gift from D Ron (Addgene, Teddington, UK, plasmid #21810, #21807 and #21808, respectively). eIF2 α mutants of acetylation were generated by site directed mutagenesis (Genscript antibodies-online GmbH, Paris, France) by converting either lysine 141 or 143 or both lysines to an arginine residue (codon change from TCA to TTA). In addition, a FLAG-tag was added in the C-terminal domain of the mutants and WT eIF2 α . For transfection experiments, H9c2 cells were plated overnight at 75 \times 10⁴ cells in 24-well plate and were co-transfected using Turbofect (Life Technologies, Fisher Scientific, Illkirch, France) with a mix of 0.2 μ g tRFP-encoding vector/0.8 μ g vector of interest to allow cell death analysis only in transfected cells (tRFP-positive cells), according to manufacturer's instructions. Twenty-four hours post-transfection, cells were treated with TG or TN for 48 h and cell death was analyzed by FDA assay. The FDA fluorescence was determined by cytometric analysis of samples gated on tRFP-positive cells.

Statistical analysis. All data are presented as mean \pm S.E.M. Data were analyzed using Sigma Stat (Sigma Stat, version 3.0, Systat Software, San Jose, CA, USA). One-way ANOVA was used to assess differences among groups followed by Newman-Keuls or Dunn's *post hoc* test. When two groups were compared, differences were assessed by Student's *t*-test. Differences between groups were considered significant if the *P*-value was <0.05. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.005 versus CTL. ^{\$}*P*<0.05, ^{\$}*P*<0.01; ^{\$}*P*<0.005 versus EX527 or STAC-3 untreated cells or WT mice.

Conflict of Interest

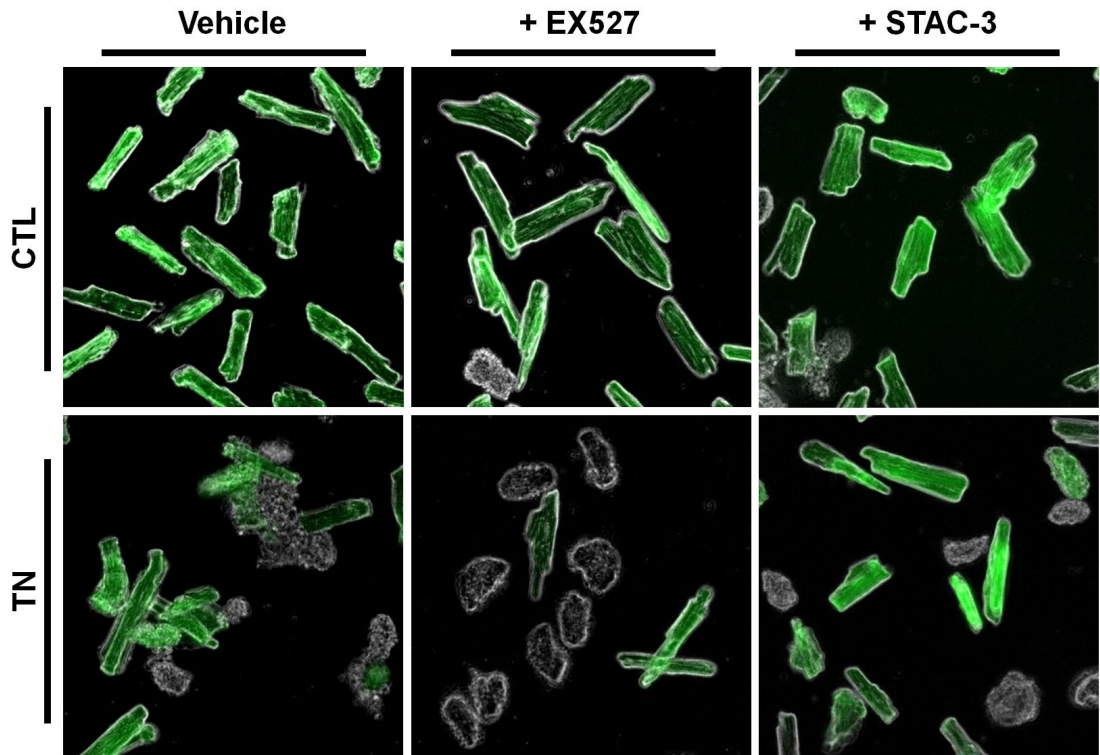
DAS consults for GlaxoSmithKline, Metrobiotech, Ovascience and BigDataBio. The remaining authors declare no conflict of interest.

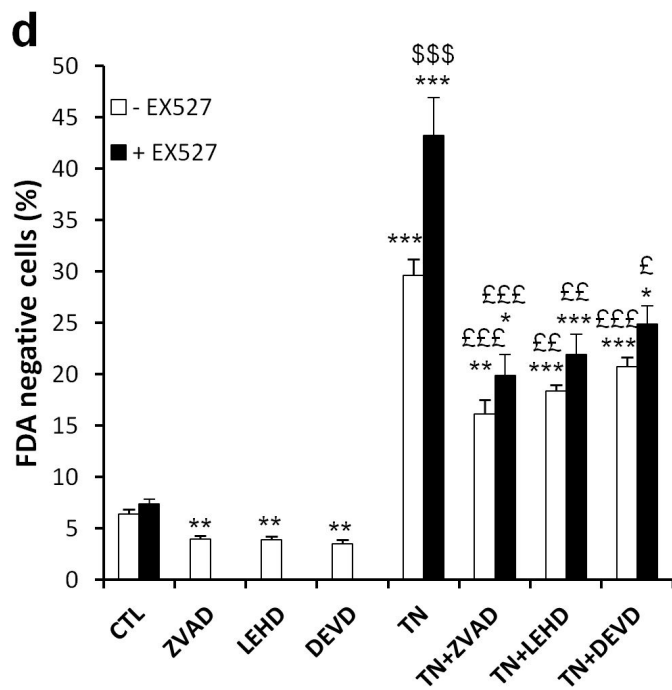
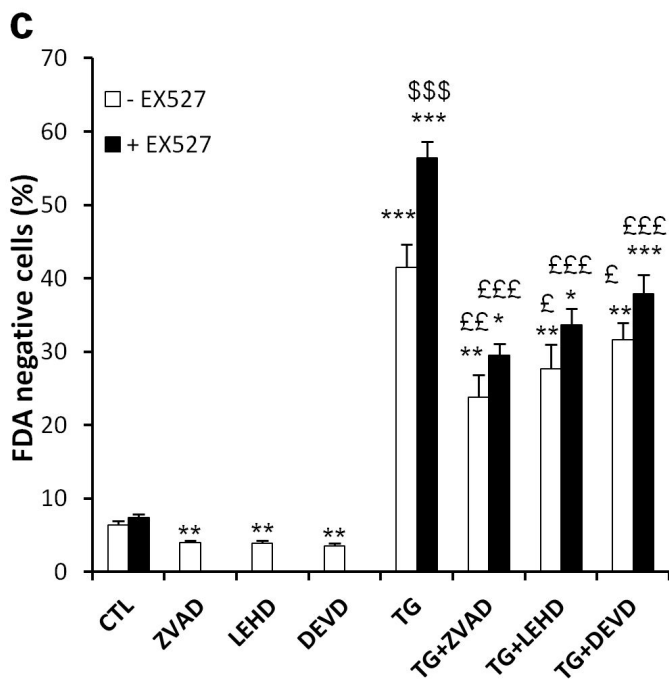
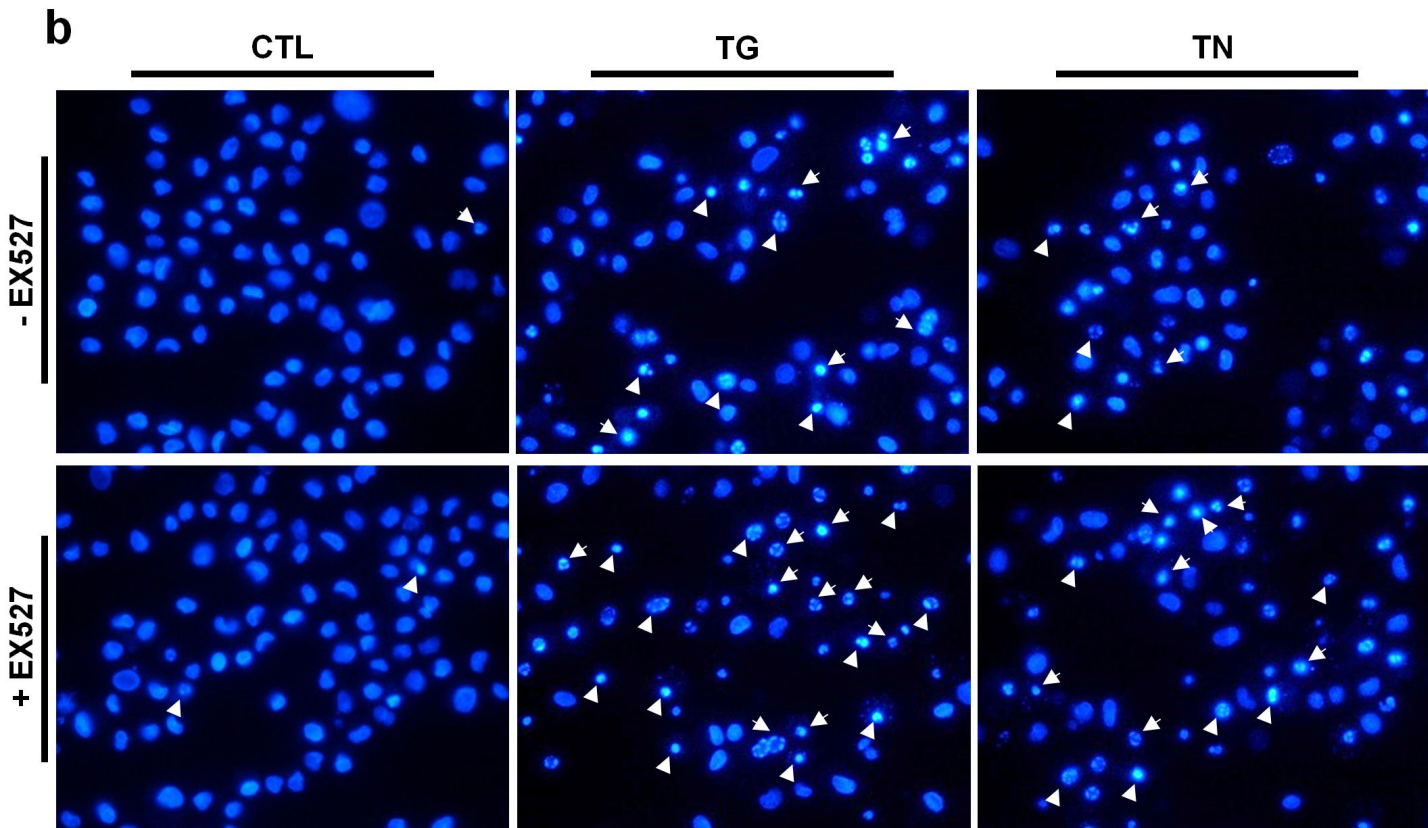
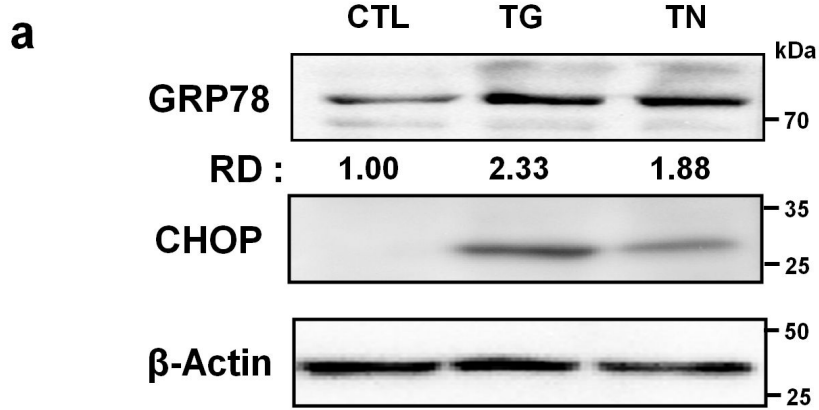
Acknowledgements. We thank N Viet Hung for Mass Spectrometry analysis (SFR A Lwoff Platform). We also thank F Lefebvre for helpful technical assistance and Valérie Domergue-Dupont and the animal core facility of IPSIT for efficient handling and preparation of the animals. We gratefully acknowledge C Longin and S Chat for electron microscopy work (TEM platform of INRA). We thank Dr R Fischmeister for continuous support and careful reading of the manuscript. WT and mutant (S52A) eIF2 α encoding plasmids were kindly provided by D Ron (University of Cambridge). This work was supported by grants from LabEx LERMIT, FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) to A Garnier (#DPM20121125546) and Région Ile de France CODDIM to R Ventura-Clapier (#cod110153). A Prola received a fellowship from Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRCC). A Guilbert received a fellowship from Région Ile de France CODDIM. D Sinclair is supported by the Glenn Foundation for Medical Research, a gift from the Schulak Family, the Juvenile Diabetes Foundation, and a MERIT award from the NIH/NIA.

1. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 519–529.
2. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**: 89–102.
3. Csordas G, Thomas AP, Hajnoczky G. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J* 1999; **18**: 96–108.
4. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND *et al*. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 2007; **129**: 1337–1349.
5. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 2011; **13**: 184–190.
6. Minamoto T, Kitakaze M. ER stress in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**: 1105–1110.
7. Martindale JJ, Fernandez R, Thuerauf D, Whittaker R, Gude N, Sussman MA *et al*. Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6. *Circ Res* 2006; **98**: 1186–1193.

8. Severino A, Campioni M, Straino S, Salloum FN, Schmidt N, Herbrand U et al. Identification of protein disulfide isomerase as a cardiomyocyte survival factor in ischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2007; **50**: 1029–1037.
9. Thuerauf DJ, Marcinko M, Gude N, Rubio M, Sussman MA, Glembotski CC. Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ Res* 2006; **99**: 275–282.
10. Shintani-Ishida K, Nakajima M, Uemura K, Yoshida K. Ischemic preconditioning protects cardiomyocytes against ischemic injury by inducing GRP78. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **345**: 1600–1605.
11. Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M et al. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation* 2010; **122**: 361–369.
12. Ayala P, Montenegro J, Vivar R, Letelier A, Urroz PA, Copaja M et al. Attenuation of endoplasmic reticulum stress using the chemical chaperone 4-phenylbutyric acid prevents cardiac fibrosis induced by isoproterenol. *Exp Mol Pathol* 2012; **92**: 97–104.
13. Ceylan-Isik AF, Sreejayan N, Ren J. Endoplasmic reticulum chaperon tauroursodeoxycholic acid alleviates obesity-induced myocardial contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 2011; **50**: 107–116.
14. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 2010; **5**: 253–295.
15. Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res* 2007; **100**: 1512–1521.
16. Hsu CP, Zhai P, Yamamoto T, Maejima Y, Matsushima S, Hariharan N et al. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion. *Circulation* 2010; **122**: 2170–2182.
17. Planavila A, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. Sirt1 acts in association with PPARalpha to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovasc Res* 2011; **90**: 276–284.
18. Zhang Y, Xia Z, La Cour KH, Ren J. Activation of Akt rescues endoplasmic reticulum stress-impaired murine cardiac contractile function via glycogen synthase kinase-3beta-mediated suppression of mitochondrial permeation pore opening. *Antioxid Redox Signal* 2011; **15**: 2407–2424.
19. Hubbard BP, Gomes AP, Dai H, Li J, Case AW, Considine T et al. Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science* 2013; **339**: 1216–1219.
20. Brooks WW, Conrad CH. Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates. *Comp Med* 2009; **59**: 339–343.
21. Dalal S, Foster CR, Das BC, Singh M, Singh K. Beta-adrenergic receptor stimulation induces endoplasmic reticulum stress in adult cardiac myocytes: role in apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2012; **364**: 59–70.
22. Nichtova Z, Novotova M, Kralova E, Stankovicova T. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol. *Gen Physiol Biophys* 2012; **31**: 141–151.
23. Wallner M, Duran JM, Mohsin S, Troupes CD, Vanhoutte D, Borghetti G et al. Acute catecholamine exposure causes reversible myocyte injury without cardiac regeneration. *Circ Res* 2016; **119**: 865–879.
24. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell* 2007; **13**: 365–376.
25. Castellero E, Akashi H, Pendrak K, Yerebakan H, Najjar M, Wang C et al. Attenuation of the unfolded protein response and endoplasmic reticulum stress after mechanical unloading in dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; **309**: H459–H470.
26. D'Onofrio N, Vitiello M, Casale R, Servillo L, Giovane A, Balestrieri ML. Sirtuins in vascular diseases: emerging roles and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 2015; **1852**: 1311–1322.
27. Winnik S, Auwerx J, Sinclair DA, Matter CM. Protective effects of sirtuins in cardiovascular diseases: from bench to bedside. *Eur Heart J* 2015; **36**: 3404–3412.
28. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 2005; **434**: 113–118.
29. Gerhart-Hines Z, Dominy JE Jr, Blattler SM, Jedrychowski MP, Banks AS, Lim JH et al. The cAMP/PKA pathway rapidly activates SIRT1 to promote fatty acid oxidation independently of changes in NAD(+). *Mol Cell* 2011; **44**: 851–863.
30. Nasrin N, Kaushik VK, Fortier E, Wall D, Pearson KJ, de Cabo R et al. JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PLoS One* 2009; **4**: e8414.
31. Zhu H, Xia L, Zhang Y, Wang H, Xu W, Hu H et al. Activating transcription factor 4 confers a multidrug resistance phenotype to gastric cancer cells through transactivation of SIRT1 expression. *PLoS one* 2012; **7**: e31431.
32. Wang FM, Chen YJ, Ouyang HJ. Regulation of unfolded protein response modulator XBP1s by acetylation and deacetylation. *Biochem J* 2011; **433**: 245–252.
33. Guo R, Liu W, Liu B, Zhang B, Li W, Xu Y. SIRT1 suppresses cardiomyocyte apoptosis in diabetic cardiomyopathy: an insight into endoplasmic reticulum stress response mechanism. *Int J Cardiol* 2015; **191**: 36–45.
34. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 2000; **6**: 1099–1108.
35. Dey M, Velyvis A, Li JJ, Chiu E, Chiovitti D, Kay LE et al. Requirement for kinase-induced conformational change in eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) restricts phosphorylation of Ser51. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 4316–4321.
36. Donnelly N, Gorman AM, Gupta S, Samali A. The eIF2alpha kinases: their structures and functions. *Cell Mol Life Sci* 2013; **70**: 3493–3511.
37. Ghosh HS, Reizis B, Robbins PD. SIRT1 associates with eIF2-alpha and regulates the cellular stress response. *Sci Rep* 2011; **1**: 150.
38. Sun T, Li X, Zhang P, Chen WD, Zhang HL, Li DD et al. Acetylation of beclin 1 inhibits autophagosome maturation and promotes tumour growth. *Nat Commun* 2015; **6**: 7215.
39. Hetz C, Chevet E, Harding HP. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov* 2013; **12**: 703–719.
40. Cominacini L, Mozzini C, Garbin U, Pasini A, Stranieri C, Solani E et al. Endoplasmic reticulum stress and Nrf2 signaling in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2015; **88** (Pt B): 233–242.
41. Giblin W, Skinner ME, Lombard DB. Sirtuins: guardians of mammalian healthspan. *Trends Genet* 2014; **30**: 271–286.
42. Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol* 2015; **10**: 173–194.
43. Mouchiroud L, Houtkooper RH, Moulan N, Katsyuba E, Ryu D, Canto C et al. The NAD (+)/sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling. *Cell* 2013; **154**: 430–441.
44. Verde I, Vandecasteele G, Lezoualc'h F, Fischmeister R. Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 1999; **127**: 65–74.
45. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996; **68**: 850–858.
46. Pachi F, Ruprecht B, Lemeer S, Kuster B. Characterization of a high field Orbitrap mass spectrometer for proteome analysis. *Proteomics* 2013; **13**: 2552–2562.

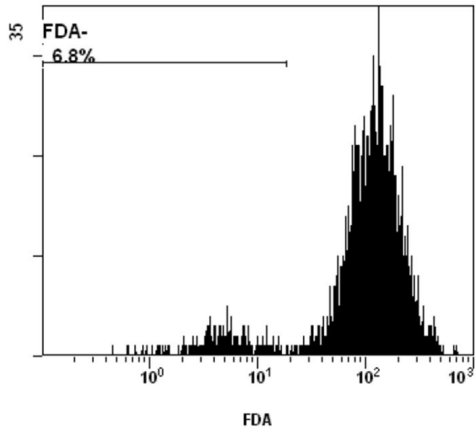
Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)



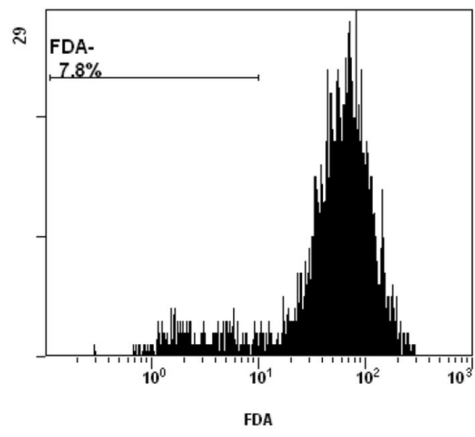


Cell number

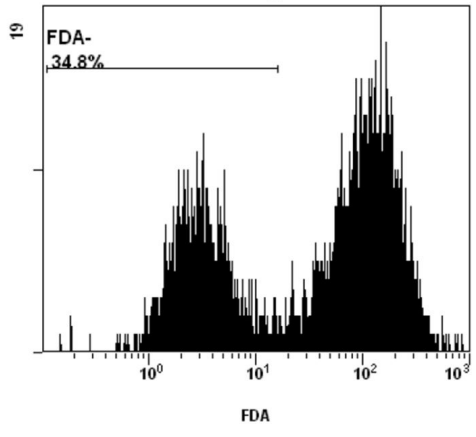
CTL



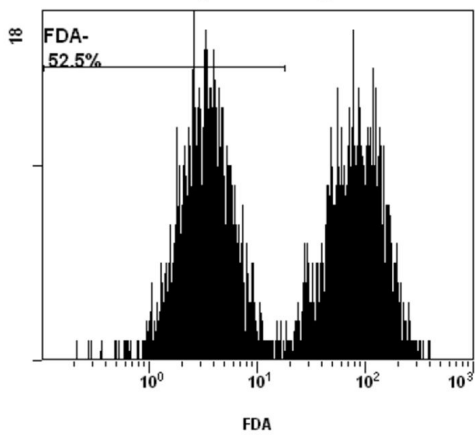
EX527



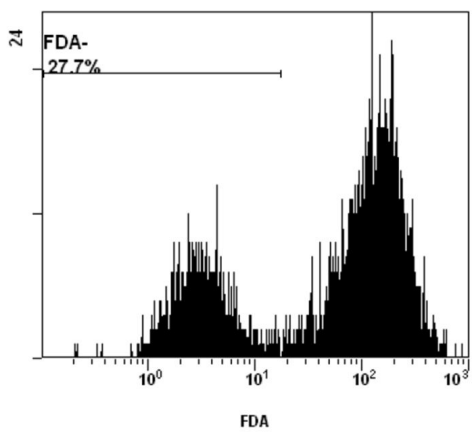
TG



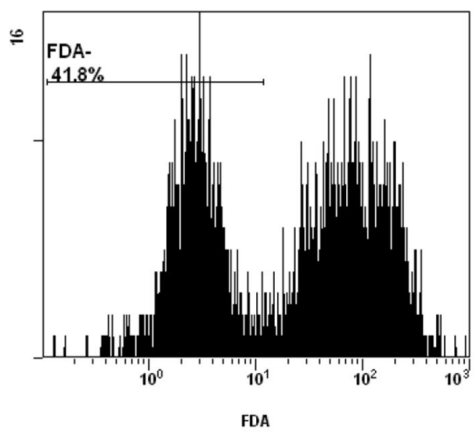
TG+EX527



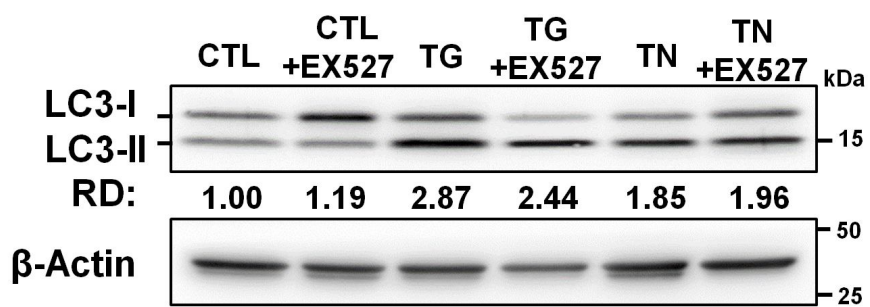
TN

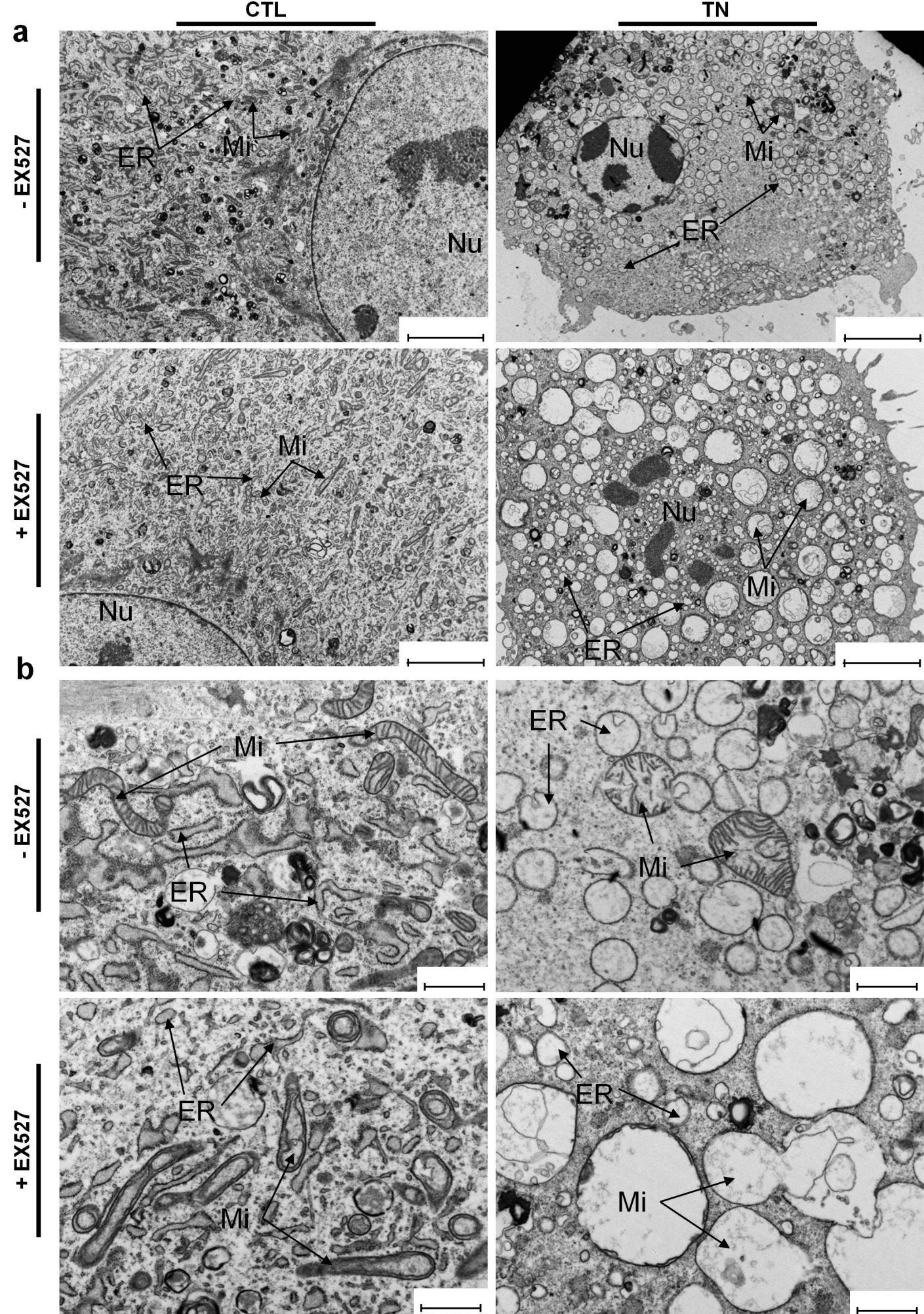


TN+EX527



FDA fluorescence





Supplementary Figure S5

Table S1 :Anatomical parameters of WT or SIRT1 iKO mice in response to ER stress

	WT CTL	SIRT1 iKO CTL	WT TN	SIRT1 iKO TN
Initial BW (g)	30 ± 0.45	28.55 ± 0.38	30.7 ± 0.54	29.5 ± 0.70
Final BW (g)	29.03 ± 0.52	27.94 ± 0.54	26.03 ± 0.61***	24.27 ± 0.75***
BW loss (g)	0.97 ± 0.25	0.61 ± 0.42	4.67 ± 0.55***	5.23 ± 0.31***
Tibial length (cm)	1.86 ± 0.04	1.86 ± 0.01	1.84 ± 0.02	1.85 ± 0.01
Heart weight (mg)	181.2 ± 6.0	177.5 ± 5.5	168.3 ± 6.4	159.4 ± 6.2
Lung weight (mg)	196.0 ± 5.7	215.0 ± 36.8	188.7 ± 8.6	176.9 ± 9.2
Liver weight (mg)	1591.7 ± 41.4	1437.4 ± 43.1#	1183.8 ± 48.3***	1071.0 ± 29.3***
Kidney weight (mg)	214.2 ± 5.4	196.5 ± 5.4	211.1 ± 8.5	187.2 ± 7.4\$
HW/BW	6.24 ± 0.19	6.35 ± 0.16	6.47 ± 0.18	6.57 ± 0.36
Lung/BW	6.75 ± 0.19	7.69 ± 1.52	7.25 ± 0.33	7.29 ± 0.21
Liver/BW	54.83 ± 0.87	51.44 ± 1.13#	45.48 ± 1.17***	44.13 ± 0.92***
Kidney/BW	7.38 ± 0.16	7.03 ± 0.20	8.11 ± 0.32	7.71 ± 0.34

WT and SIRT1 iKO mice were injected i.p. with TN (2mg/kg) or with vehicle (150 mM dextrose) for 72h and anatomical parameters were recorded. BW: body weight. Initial BW: body weight before TN treatment, final BW: body weight after TN treatment, BW loss: difference between initial and final body weight, HW: heart weight. HW/BW: heart weight to body weight ratio, Lung/BW: Lung weight to body weight ratio, Liver/BW: Liver weight to body weight ratio, Kidney/BW, Kidney weight to body weight ratio. Results are represented as mean±SEM. n=9. ***P<0.005 vs. respective control values. #P<0.05 vs. WT control. \$P<0.05 vs. WT TN

Table S2: Echocardiographic parameters of WT or SIRT1 iKO mice in response to ER stress

	WT CTL	SIRT1 iKO CTL	WT TN	SIRT1 iKO TN
EF (%)	84.5 ± 1.1	84.3 ± 1.9	72.4 ± 2.3***	62.3 ± 2.2***\$\$\$
FS (%)	47.6 ± 1.3	47.7 ± 1.9	36.1 ± 2.1**	29.7 ± 1.3***\$\$
HR (bpm)	487 ± 24	489 ± 13	467 ± 17	453 ± 23
LViDd (mm)	3.47 ± 0.09	3.59 ± 0.13	3.54 ± 0.15	3.60 ± 0.10
LViDs (mm)	1.82 ± 0.08	1.90 ± 0.14	2.18 ± 0.16	2.55 ± 0.09**\$
LVAWd (mm)	0.99 ± 0.05	0.99 ± 0.05	1.08 ± 0.04	0.96 ± 0.05
LVAWs (mm)	1.57 ± 0.04	1.57 ± 0.07	1.54 ± 0.06	1.33 ± 0.06*\$
LVPWd (mm)	0.99 ± 0.05	1.02 ± 0.05	0.95 ± 0.04	1.18 ± 0.10
LVPWs (mm)	1.39 ± 0.04	1.44 ± 0.08	1.24 ± 0.07	0.91 ± 0.07***\$\$
TWTd (mm)	1.98 ± 0.09	2.01 ± 0.08	1.97 ± 0.07	2.14 ± 0.14
TWTs (mm)	2.96 ± 0.07	3.01 ± 0.12	2.78 ± 0.1	2.24 ± 0.13***\$\$

WT and SIRT1 iKO mice were injected i.p. with TN (2mg/kg) or with vehicle (150 mM dextrose) for 72h and transthoracic echocardiography was performed. EF: ejection fraction; FS: fractional shortening; HR: heart rate; LViDd: left ventricular internal dimension (diastole); LViDs: left ventricular internal dimension (systole); LVAWd: left ventricular anterior wall thickness (diastole); LVAWs: left ventricular anterior wall thickness (systole); LVPWd: left ventricular posterior wall thickness (diastole); LVPWs: left ventricular posterior wall thickness (systole); TWTd: total wall thickness (diastole); TWTs: total wall thickness (systole). Results are represented as mean±SEM. n=9. **P<0.01, ***P<0.005 vs. respective control. \$P<0.05, \$\$P<0.01, \$\$\$P<0.005 vs. WT TN

Table S3: Echocardiographic parameters of WT or SIRT1 iKO mice in response to Isoproterenol

	WT CTL	SIRT1 iKO CTL	WT ISO	SIRT1 iKO ISO
EF (%)	84,76 ± 0,05	87,19 ± 0,01	75,65 ± 0,025 **	66,34 ± 0,015 *** \$
FS (%)	47,65 ± 0,03	50,77 ± 0,01	38,60 ± 0,02 ***	31,46 ± 0,01 *** \$
HR (bpm)	523,20 ± 12,82	513 ± 10,38	440,34 ± 22,13	357,92 ± 6,96
LViDd (mm)	3,15 ± 0,14	3,30 ± 0,27	2,73 ± 0,11	3,59 ± 0,07 \$\$
LVIDs (mm)	1,65 ± 0,09	1,62 ± 0,068	1,68 ± 0,073	2,46 ± 0,063 *** \$\$
LVAWd (mm)	0,96 ± 0,07	0,86 ± 0,13	1,02 ± 0,11	0,95 ± 0,05
LVAWs (mm)	1,5 ± 0,12	1,60 ± 0,09	1,55 ± 0,20	1,49 ± 0,05
LVPWd (mm)	1,03 ± 0,19	1,29 ± 0,26	1,08 ± 0,11	0,76 ± 0,16
LVPWs (mm)	1,42 ± 0,23	1,99 ± 0,32	1,41 ± 0,09	1,14 ± 0,18
TWTd (mm)	2,00 ± 0,25	2,15 ± 0,37	2,1 ± 0,18	1,71 ± 0,18
TWTs (mm)	2,93 ± 0,29	3,6 ± 0,28	2,97 ± 0,28	2,63 ± 0,14

WT and SIRT1 iKO mice were subcutaneously injected with ISO (150 mg/kg) or vehicle (NaCl 0,9%) for 48h and transthoracic echocardiography was performed. EF: ejection fraction; FS: fractional shortening; HR: heart rate; LViDd: left ventricular internal dimension (diastole); LVIDs: left ventricular internal dimension (systole); LVAWd: left ventricular anterior wall thickness (diastole); LVAWs: left ventricular anterior wall thickness (systole); LVPWd: left ventricular posterior wall thickness (diastole); LVPWs: left ventricular posterior wall thickness (systole); TWTd: total wall thickness (diastole); TWTs: total wall thickness (systole). Results are represented as mean±S.E.M. n=9. **P<0.01, ***P<0.005 vs. respective control. \$P<0.05, \$\$P<0.01 vs. WT ISO

Table S4 : Sequence of qPCR primers used in this study
Related to Methods

Gene	Species	Forward primer	Reverse primer
<i>Atf3</i>	mouse/rat	ATGTCCTCTGCGCTGGAGT	ACACTTGGCAGCAGCAATTT
<i>Atf4</i>	mouse/rat	AAACCTCATGGGTTCTCCAG	TCTCCAACATCCAAGTGTCC
<i>Calreticulin</i>	mouse/rat	CTGGGTCTGAATCCAAACATAA	GCGTAAAATCGGGCATCTT
<i>Chop</i>	mouse/rat	TATCTCATCCCCAGGAAACG	CAGGGTCAAGAGTAGTGAAGGTTT
<i>Edem1</i>	mouse/rat	TGGGCTGGATTCTTCTATG	GGTGGTCTCCTTCTCCTTC
<i>Gadd34</i>	mouse/rat	GGACCCTGAGATTCTCTGA	GCCCAGACAGCAAGGAAAT
<i>Grp78</i>	mouse/rat	TGCAGCAGGACATCAAGTTC	TTTCTTCTGGGGCAAATGTC
<i>Grp94</i>	mouse/rat	TGCTTCTGATGCTTTAGACAAGA	CTGTGACATGCAGCAGGTTT
<i>Ino1</i>	mouse/rat	GCTACGCGTTTCACCTTCC	CCATAATAGTTTGCCTCCTTGC
<i>P58ipk</i>	mouse/rat	CAGTTTCATGCTGCCGTAGA	GCTTTTGATTTGCCCATAGC
<i>Pdia4</i>	mouse/rat	CTGATTGGACACCTCCACCT	AGGGGCAAGTTTCTTGCAG
<i>Sirt1</i>	mouse/rat	AAAAGATAATAGTTCTGACTGGAGCTG	TGAAGAATGGTCTTGGGTCTTT
<i>Xbp1s</i>	mouse/rat	TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG	ACAGGGTCCAAGTGTCCAG

1 **Supplementary Figures and Tables**

2

3 **Supplementary Figure S1. Effects of SIRT1 inhibition or activation on cardiomyocyte cell**

4 **death.** Freshly isolated adult rat ventricular cardiomyocytes (ARVM) were treated with 10
5 $\mu\text{g/mL}$ TN for 24 hr with or without 10 μM EX527 or 1 μM STAC-3 pre-treatment and cell
6 viability was determined using FDA assay. Representative micrographs taken on a Leica
7 fluorescence microscope are presented. Green stained cardiomyocytes (FDA positive cells) are
8 alive. Scale bar = 50 μm

9

10 **Supplementary Figure S2. Involvement of caspases and nuclear fragmentation in SIRT1-**

11 **regulated ER stress-induced cell death. (a)** Induction of ER stress in H9c2 cells by TG and TN.

12 Representative western blot of the level of the ER stress markers GRP78 and CHOP in H9c2
13 cells after treatment with TG (5 μM) or TN (10 $\mu\text{g/mL}$) for 24h. β -actin was used as loading

14 control. RD: relative density. (b) H9c2 cells were left untreated or were treated with TG (5 μM)
15 or TN (10 $\mu\text{g/mL}$) with or without pre-incubation with EX527 (10 μM). After 48h, cells were

16 harvested, stained for 5 min with Hoechst 33348. Representative micrographs were taken on a
17 Leica fluorescence microscope. Condensed or fragmented nuclei were considered as apoptotic

18 (white arrows). Scale bar = 50 μm . To characterize the role of caspases, ER stress was induced in

19 H9c2 cells with or without pre-incubation with EX527 (10 μM) and caspases inhibitors. (a) The

20 percentage of dead cells (FDA negative cells) was assessed by flow cytometry after treatment of
21 H9c2 cells for 48h with TG (5 μM) +/- EX527 (10 μM) in the absence or presence of ZVAD-fmk

22 (general caspase inhibitor, 5 μM), Ac-LEHD-cmk (caspase-9 inhibitor, 10 μM) or Ac-DEVD-

23 cmk (caspase-3 inhibitor, 10 μM). (b) Same as (a) except that cells were treated with TN (10

24 $\mu\text{g/mL}$) for 48h. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ vs. control. \$\$ $P < 0.01$, \$\$\$ $P < 0.005$ vs.
25 respective control without EX527. £ $P < 0.05$, ££ $P < 0.01$, £££ $P < 0.005$ vs. respective control
26 without caspases inhibitors.

27

28 **Supplementary Figure S3. Representative histograms of flow cytometric analysis of cell**
29 **death.** The percentage of dead cells (FDA negative cells) was assessed by flow cytometry after
30 treatment of H9c2 cells for 48h with TG (5 μM) or TN (10 $\mu\text{g/mL}$) in the absence or presence of
31 SIRT1 inhibitor EX527 (10 μM). The percentage of FDA negative cells is specified on each
32 histogram.

33

34 **Supplementary Figure S4. Effect of SIRT1 inhibition on ER stress-induced autophagy.** To
35 determine the effect of SIRT1 inhibition on the autophagy flux, the autophagy inhibitor
36 chloroquine (20 μM) was added 2h before harvesting cells. Representative western blot of the
37 level of the autophagy marker LC3-II in H9c2 cells after treatment with TG (5 μM) or TN (10
38 $\mu\text{g/mL}$) +/- EX527 (10 μM) for 24h. β -actin was used as loading control. RD: relative density.

39

40 **Supplementary Figure S5. Inhibition of SIRT1 exacerbates morphological alterations induced by**
41 **ER stress. (a)** H9c2 cells were left untreated or treated with TN (10 $\mu\text{g/mL}$) +/- EX527 (10 μM)
42 for 36h and prepared for transmission electron microscopy studies as described in Methods.
43 Morphological alterations of nucleus, ER and mitochondria were analyzed and representative

44 micrographs are presented. Nu: Nucleus, Mi: mitochondrion, ER: endoplasmic reticulum (scale
45 bar = 5 μm). (b) Higher magnification (scale bar = 1 μm).

46

47 **Supplementary Table S1. Anatomical parameters of WT or SIRT1 iKO mice in response to**
48 **ER stress.** WT and SIRT1 iKO mice were injected i.p. with TN (2 mg/kg) or with vehicle (150
49 mM dextrose) for 72h and anatomical parameters were recorded. BW: body weight. Initial BW:
50 body weight before TN treatment, final BW: body weight after TN treatment, BW loss:
51 difference between initial and final body weight, HW: heart weight. HW/BW: heart weight to
52 body weight ratio, Lung/BW: Lung weight to body weight ratio, Liver/BW: Liver weight to body
53 weight ratio, Kidney/BW, Kidney weight to body weight ratio. Results are represented as
54 mean \pm S.E.M. (n=9). ***P<0.005 vs. respective control values. #P<0.05 vs. WT control. \$P<0.05
55 vs. WT TN

56

57 **Supplementary Table S2. Echocardiographic parameters of WT or SIRT1 iKO mice in**
58 **response to ER stress.** WT and SIRT1 iKO mice were injected i.p. with TN (2mg/kg) or with
59 vehicle (150 mM dextrose) for 72h and transthoracic echocardiography was performed. EF:
60 ejection fraction; FS: fractional shortening; HR: heart rate; LViDd: left ventricular internal
61 dimension (diastole); LViDs: left ventricular internal dimension (systole); LVAWd: left
62 ventricular anterior wall thickness (diastole); LVAWs: left ventricular anterior wall thickness
63 (systole); LVPWd: left ventricular posterior wall thickness (diastole); LVPWs: left ventricular
64 posterior wall thickness (systole); TWTd: total wall thickness (diastole); TWTs: total wall
65 thickness (systole). Results are represented as mean \pm S.E.M. n=9. **P<0.01, ***P<0.005 vs.
66 respective control. \$P<0.05, \$\$P<0.01, \$\$\$P<0.005 vs. WT TN

67

68 **Supplementary Table S3. Echocardiographic parameters of WT or SIRT1 iKO mice in**
69 **response to ISO.** WT and SIRT1 iKO mice were subcutaneously injected with ISO (150 mg/kg)
70 or vehicle (NaCl 0,9%) for 48h and transthoracic echocardiography was performed. EF: ejection
71 fraction; FS: fractional shortening; HR: heart rate; LVIDd: left ventricular internal dimension
72 (diastole); LVIDs: left ventricular internal dimension (systole); LVAWd: left ventricular anterior
73 wall thickness (diastole); LVAWs: left ventricular anterior wall thickness (systole); LVPWd: left
74 ventricular posterior wall thickness (diastole); LVPWs: left ventricular posterior wall thickness
75 (systole); TWTd: total wall thickness (diastole); TWTs: total wall thickness (systole). Results are
76 represented as mean±S.E.M. n=9. **P<0.01, ***P<0.005 vs. respective control. \$P<0.05,
77 \$\$P<0.01 vs. WT ISO

78

79 **Supplementary Table S4. Sequence of qPCR primers used in this study**

80

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATF6	Activating Transcription Factor 6
CHOP	C/EBP Homologous Protein
eIF2 α	eukaryotic initiation Factor 2a
ER	Endoplasmic Reticulum
GADD34	Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 34
GRP78	Glucose Related Protein 78
GRP94	Glucose Related Protein 94
IRE1	Inositol-Requiring Enzyme 1
PERK	PKR-like ER protein Kinase
SIRT1	Sirtuin 1
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling
UPR	Unfolded Protein Response
XBP1	X-box Binding Protein

Article 3

Pires Da Silva J, Monceaux K, Guilbert A, Piquereau J, Gressette M, Novotova M,
Ventura-Clapier R, Garnier A and Lemaire C

***SIRT1 protects the heart from ER stress-induced injury by promoting
eEF2K/eEF2-dependent mitophagy***

En préparation

Contexte scientifique :

L'autophagie est un processus catabolique lysosomal dont le rôle est de maintenir l'homéostasie cellulaire en dégradant et recyclant les constituants cellulaires et les organites dysfonctionnels. Le processus autophagique peut être très sélectif, permettant l'élimination spécifique des organites endommagés tels que le réticulum endoplasmique (réticulophagie) ou les mitochondries (mitophagie) (Bernales et al., 2006; Kim et al., 2007b). Le flux autophagique est généralement augmenté lorsque les ressources en nutriments sont limitées ou lorsque les cellules sont soumises à un stress. Même si l'activation de l'autophagie précède souvent le déclenchement de l'apoptose (Wirawan et al., 2010), ces processus sont étroitement liés et sont capables de se réguler mutuellement. Dans le cœur, l'autophagie est un processus fondamental pour maintenir l'homéostasie cellulaire et est plutôt considérée comme cardioprotectrice (Bravo-San Pedro et al., 2017). En effet, les différentes publications de la littérature suggèrent que l'autophagie régulée serait bénéfique lors du développement des pathologies cardiaques alors que l'autophagie anormale et l'apoptose aggraveraient ces pathologies (Li et al., 2016). Dans ce contexte et puisque nous avons montré précédemment que SIRT1 protège les cellules cardiaques d'un stress RE sévère en diminuant l'apoptose (Prola et al., 2017), nous nous sommes demandés si l'effet cardioprotecteur de SIRT1 impliquait le processus d'autophagie. Nous avons donc cherché à répondre à plusieurs questions : 1) Le processus autophagique est-il impliqué dans les cellules cardiaques en réponse au stress RE et est-il bénéfique ou délétère ? 2) Quelle est le type d'autophagie induite par le stress RE ? 3) SIRT1 régule-t-elle l'autophagie en réponse au stress RE ? 4) Si oui, quelles sont les voies de signalisations impliquées ?

Résultats :

Comme précédemment, nous avons combiné les modèles cellulaires *in vitro* (lignée cellulaire H9c2 et cardiomyocytes adultes isolés) et *in vivo* (souris invalidées de manière conditionnelle pour SIRT1) dans lesquels un stress RE a été induit par la tunicamycine (TN) ou par l'isoprotérénol (ISO). Nos résultats montrent que le stress RE induit une augmentation des marqueurs de l'autophagie en fonction du temps, avec un maximum observé après 36h. De manière intéressante, lorsque le niveau des marqueurs d'autophagie diminue, le pourcentage de cellules apoptotiques augmente. De plus, l'inhibition pharmacologique de l'autophagie (3-Méthyladenine, Chloroquine) augmente l'apoptose induite par le stress RE, indiquant que l'autophagie joue un rôle cardioprotecteur en réponse au stress RE. L'utilisation d'inhibiteur ou d'activateur pharmacologiques (EX527 et STAC-3, respectivement), de siRNA SIRT1, ou de souris invalidées pour SIRT1, nous a permis de mettre en évidence que cette

désacétylase favorise l'activation de l'autophagie en régulant les étapes précoces de ce processus. Par microscopie électronique et fractionnement cellulaire, nous avons montré que le processus autophagique induit par le stress RE et régulé par SIRT1 implique la clairance des mitochondries endommagées par mitophagie. Puisque la voie de signalisation eEF2K/eEF2 a été proposée comme pouvant jouer un rôle à l'interface des processus autophagique et apoptotique dans certains types cellulaires (Zhu et al., 2015), nous avons étudié l'implication de cette voie de signalisation dans les cardiomyocytes par des approches pharmacologique et génétique. Nous montrons que l'inhibition ou l'extinction de la kinase eEF2K et de sa cible eEF2 diminue l'autophagie et augmente l'apoptose induite par le stress RE. D'autre part, l'augmentation de la phosphorylation d'eEF2 induite par le stress RE est diminuée lorsque SIRT1 est inhibée.

Conclusions :

Cette étude montre qu'en réponse au stress RE, l'activation de l'autophagie/mitophagie est cardioprotectrice et limite la survenue de l'apoptose. SIRT1, en activant la voie eEF2K/eEF2, favorise l'autophagie/mitophagie, limite l'apoptose et protège le cœur du stress RE. La stimulation de l'activité pro-autophagique de SIRT1 apparait donc comme une stratégie thérapeutique potentielle pour limiter le développement de pathologies cardiaques associées au stress RE.

**SIRT1 protects the heart from ER stress-induced injury by promoting
eEF2K/eEF2-dependent mitophagy**

Julie Pires Da Silva¹, Kevin Monceaux¹, Arnaud Guilbert¹, Jérôme Piquereau¹, Mélanie Gressette¹, Marta Novotova², Renée Ventura-Clapier¹, Anne Garnier¹ and Christophe Lemaire^{1,3}

¹Signalisation et Physiopathologie Cardiovasculaire - UMR-S 1180, Univ. Paris-Sud, INSERM, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France

²Institute of Molecular Physiology and Genetics, Centre of Biosciences, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovak Republic

³Université Versailles St-Quentin, Signalisation et Physiopathologie Cardiovasculaire - UMR-S 1180, Univ. Paris-Sud, INSERM, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France

Corresponding author:

Christophe Lemaire

UMR-S 1180 – Laboratory of Signalling and Cardiovascular Pathophysiology

Laboratory of Excellence LERMIT

Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud

5, Rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry

Phone : (+33)(0)1 46 83 52 41, Fax : (+33)(0)1 46 83 54 75

christophe.lemaire@u-psud.fr

SUMMARY

Impairment of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis causes the accumulation of misfolded protein leading to ER stress and unfolded protein response (UPR) activation. Many studies have demonstrated the involvement of ER stress in the development and progression of cardiac diseases and have suggested that modulation of ER stress response could be cardioprotective. We have previously demonstrated that the deacetylase SIRT1 protects the heart from ER stress-induced apoptosis by regulating activation of the UPR. In the present study, we investigated whether and how autophagy plays a role in SIRT1-afforded cardioprotection against ER stress. Flow cytometry (Cyto-ID[®]) and western blot analysis (p62, LC3-II) revealed that autophagy was initiated before cell death in response to tunicamycin (TN)-induced ER stress. Inhibition of autophagy by 3-methyladenine or chloroquine increased ER stress-mediated cell death, indicating that autophagy induced by ER stress is protective in cardiac cells. Mitophagy, the selective subtype of autophagy, was induced by ER stress as evidenced by the presence of vacuoles containing damaged mitochondria and the translocation of Parkin to mitochondria. SIRT1 inhibition (EX527) or knockdown decreased ER stress-induced autophagy/mitophagy, whereas its activation by STAC-3 enhanced autophagy/mitophagy. In response to TN- or isoproterenol-induced ER stress, mice deficient for SIRT1 exhibited suppressed autophagy along with exacerbated cardiac dysfunction. We also found that, extinction of eEF2K or eEF2 expression not only reduced ER stress-induced autophagy but further activated cell death. Finally, the phosphorylation of eEF2 promoted by ER stress was returned to basal level when SIRT1 was inhibited by EX527. Our results collectively indicate that in response to ER stress, SIRT1 activation promotes cardiomyocyte survival by enhancing autophagy/mitophagy at least through activation of eEF2K/eEF2 pathway.

INTRODUCTION

The endoplasmic reticulum (ER) coordinates the synthesis, folding and quality control of almost all secreted and membrane proteins. Perturbations that alter ER homeostasis cause the accumulation of unfolded/misfolded proteins in the ER lumen leading to ER stress.¹ When ER stress occurs, the unfolded protein response (UPR) is triggered to restore normal ER function. The UPR is initiated by the activation of three proximal sensors, namely ATF6 (activating transcription factor 6), IRE1 (the inositol-requiring ER-to-nucleus signal kinase 1) and PERK (protein kinase-like ER kinase). Activation of these sensors leads to transcriptional and translational reprogramming to cope with the accumulation of unfolded or misfolded proteins by reducing the translation of non-UPR proteins and upregulating the expression of UPR-related proteins such as ER chaperones, proteins that participate in ER-associated protein degradation (ERAD) and proteins of the autophagy pathway. Nevertheless, in case of severe or chronic ER stress, if ER homeostasis fails to be reestablished, UPR assumes adverse role and triggers the intrinsic pathway of apoptosis to eliminate damaged cells.²⁻⁵

During the last decade, ER stress has emerged as an important mechanism involved in the development of various cardiac diseases including ischemia, dilated cardiomyopathy and heart failure.^{2,3} Deletion of the ER stress response protein GRP78 or XBP1 has been shown to exacerbate the cardiac injury induced by ischemia, indicating that ER stress is cardioprotective in this context.^{6,7} Besides, deficiency of the pro-apoptotic member of the UPR CHOP attenuates cardiac dysfunction induced by pressure overload⁸, suggesting that ER stress participates to cardiac disease development. Therefore, these results led to the notion that mild-to-moderate induction of ER stress triggers a restorative response that leads to cell adaptation, whereas severe or chronic ER stress by switching the protective signaling to the pro-apoptotic response contributes to the development of the cardiac disease.

Autophagy, a major cellular pathway for clearance and recycling of damaged proteins or organelles such as mitochondria (a.k.a. mitophagy), is essential to heart homeostasis and function, but when excessive can contribute to cardiovascular disorders.⁹ A complex interplay between autophagy and apoptosis is known to determine cell fate in response to ER stress, but the molecular events involved are still poorly understood.¹⁰ The calcium/calmodulin-dependent enzyme eEF2K (eukaryotic elongation factor-2 kinase), that slows down the rate of protein translation by phosphorylating and inhibiting the function of the eEF2 (eukaryotic elongation factor-2), has been proposed to control the switch between autophagy and

apoptosis in cancer cells in response to Akt inhibition.¹¹ However, little is known on the role of eEF2K/eEF2 pathway in cardiovascular health and diseases.

Sirtuin-1 (SIRT1), a NAD⁺-dependent lysine deacetylase, plays a cardioprotective role in response to various cardiac stress¹². Mechanistically, the cardioprotective effects of SIRT1 have been attributed partially to its ability to influence autophagy, at least by directly deacetylating components of the autophagy machinery including ATG5, ATG7 and LC3.¹³ However, whether and how SIRT1 modulates ER stress-induced autophagy in the heart has not been elucidated yet.

We have previously shown that SIRT1 protects cardiomyocytes against ER stress-induced apoptosis by regulating the activation of the PERK pathway of the UPR.¹⁴ In the present study, we hypothesized that SIRT1 might exerts its cardioprotective effects by improving autophagy induced by ER stress. The ability of SIRT1 to regulate autophagy/mitophagy and apoptosis was tested in response to ER stress by using *in vitro* (H9c2 cells and isolated adult rat ventricular myocytes) and *in vivo* (SIRT1 iKO mice) models. The involvement of the eEF2K/eEF2 pathway in SIRT1-mediated regulation of autophagy was also investigated.

METHODS

Animals and treatments

C57BL/6J mice carrying both the UBC-Cre-ERT2 and the SIRT1^{floxΔE4/floxΔE4} alleles (UBC-Cre-ERT2 × SIRT1^{floxΔE4/floxΔE4}) called herein SIRT1 iKO mice were described previously^{15,16}. Excision of the exon 4 of SIRT1 was induced by tamoxifen administration at 2 months of age (25 mg/kg i.p. daily × 4 days). To study ER stress *in vivo*, 4 weeks after tamoxifen treatment mice (n=12) were given i.p. injection of tunicamycin (TN) 2 mg/kg body weight or the equivalent volume of vehicle (PBS pH 7.4) and were killed 16 h after injection for molecular studies. Echocardiographic parameters were assessed 72 h after injection. To study the role of SIRT1 in a myocardial injury model, mice (n=5 for each group) were given subcutaneous injection of isoproterenol (ISO) 150 mg/kg body weight or the equivalent volume of vehicle (NaCl 0.9%) twice (at T0 and T6h) and were killed after 6 h for molecular studies. Echocardiographic parameters were assessed after 2 days of treatment. All experiments were performed in conformity with the European Community guiding principles in the care and use of animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament). Authorizations to conduct animal experiments were obtained from the French Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (n° B9201901, November 3rd, 2015).

Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed using a 15 MHz transducer under 2.5% isoflurane gas anesthesia. Two-dimensional-guided (2D) M-mode echocardiography was used to determine wall thickness and left ventricular chamber volume at systole and diastole and contractile parameters, such as fractional shortening (FS).

Cell culture and reagents

H9c2 rat cardiomyoblast cell line was purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). Cells were cultured in DMEM medium supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml

streptomycin and 10% FBS (10270, Gibco), at 37°C under 5% CO₂/95% air. ER stress was induced by treatment with TN (10 µg/ml). EX527 was from Tocris (Bristol, UK), STAC-3 and Endothall were from Santa Cruz (Dallas, TX, USA), A-484954 was from Merck Chemicals (Fontenay sous Bois, France). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France). CYTO-ID[®] Autophagy detection kit was from Enzo Life Sciences (Lyon, France).

siRNA transfection

SIRT1 siRNA, eEF2K siRNA and eEF2 siRNA were purchased from Santa Cruz. H9c2 cells were plated overnight at 30×10⁴ cells in 24-well plate and were transfected with either 16 pg of non-target control oligonucleotides or 16 pg of SIRT1 siRNA or 32 pg of eEF2K siRNA or 32 pg of eEF2 siRNA oligonucleotides according to manufacturer's instructions. Twenty-four hours after transfection, the medium was removed and cells were treated or not with TN for 24 h.

Flow cytometry analysis

The fluorescent probe fluorescein diacetate (FDA) was used to assess cell viability. After treatment, cells were incubated for 10 min at 37 °C with 0.2 µg/ml FDA and analyzed by flow cytometry. Autophagic flux was monitored in live cells using the Cyto-ID[®] Autophagy Detection Kit. Cells were incubated with 0.1 µl of Cyto-ID[®] reagent at 37°C for 30 min. Then, cells were washed three times in a phenol-red-free culture medium containing 5% FBS, trypsinized and resuspended in 0.3 ml of culture medium for flow cytometry analysis. Fluorescence of cells was analyzed on a FC500 cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France).

Adult cardiomyocytes isolation

Retrograde heart perfusion according to the Langendorff method was performed to isolate adult rat ventricle cardiomyocytes as previously described¹⁷. Cells were plated into dishes coated with laminin and were kept at 37°C under 5% CO₂/95% air for 24 h. Cells were then treated with 10 µg/ml TN with or without EX527 (20 µM), STAC-3 (1 µM), 3-MA (5 mM) or CQ (50 µM) for 24 h at 37 °C under 5% CO₂/95% air.

Evaluation of cardiomyocyte death by fluorescence microscopy

To analyze cell death, cardiomyocytes were stained with 0.2 µg/ml of FDA for 10 min. FDA-negative cardiomyocytes were considered as dead cells. More than 1000 cells were counted for each condition and representative micrographs were taken on a Leica fluorescence microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France).

Electron Microscopy

H9c2 cells were fixed with 2% glutaraldehyde/0.2 M sodium cacodylate for 1 h at RT, pelleted and rinsed with 0.2 M sodium cacodylate/0.4 M sucrose for 1 h. Samples were epon-embedded, sliced, mounted on slides and the images were obtained at the electron microscopy facility of INRA (Jouy-en-Josas, France).

Left ventricular papillary muscles were isolated from 3 control and 3 TN-treated mouse hearts, fixated with 2% glutaraldehyde in cacodylate buffer (mM: 150 Na-Cacodylate, 2CaCl₂, pH 7.3) for 1 h, postfixated by 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer for 30 min and stained with 1% aqueous solution of uranyl acetate. After dehydration in graded ethanol series and acetone, the tissue was embedded in Durcupan (ACM Fluka). Ultrathin (58-60nm) longitudinal sections were cut using an ultramicrotome (Power-Tome MTXL, RMC/Sorvall, Tucson, USA). The sections were mounted on formvar-coated copper grids, contrasted with lead citrate and examined with a JEM 1200 electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan) at 80 kV.

RNA isolation and quantitative RT-PCR

RNA was isolated from cultured cells using Zymo Research (Freiburg, Germany) Quick RNA MiniPrep according to the manufacturer's instructions. Total RNA (1 µg) was reverse transcribed using BioRad iScript reverse transcription kit. Real-time PCR was performed using the SYBR® green method on CFX96 Touch™ Real Time PCR Detection system (BioRad) from 2.5 ng cDNA. mRNA levels for all target genes were normalized to Ywhaz and Polr2a. The PCR primers were obtained from Eurofins (Les Ulis, France) and are listed in table S1. The results were quantified according to the Cq value method, where Cq is defined as the quantification cycle of PCR at which the amplified product is detected. The ratio $(1+E_{\text{targetgene}})^{-(Cq_{\text{sample}}-Cq_{\text{control}})}_{\text{targetgene}} / (1+E_{\text{referencegene}})^{-(Cq_{\text{sample}}-Cq_{\text{con}})}$

trol) gene was calculated, where E represents the efficiency of the quantitative PCR reaction. With this calculation, expression of control was equivalent to one.

Western blot analysis

Cells or tissues were lysed in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid) plus a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Roche, Boulogne-Billancourt, France), PMSF and a cocktail of deacetylase inhibitors (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) for 30 min at 4 °C. Proteins (25 µg) were separated by 4-20% Tris-Glycine ou 4-12% Bis-Tris gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes (Illkirch, France). Membranes were incubated overnight at 4°C with the following antibodies: anti-GRP94, anti-GRP78, anti-phospho-eEF2 and VDAC from Cell Signalling (Leiden, The Netherlands), anti-actin from Santa Cruz (Heidelberg, Germany), anti-LDH, anti-SIRT1, anti-CS from Abcam (Paris, France), anti-LC3, anti-Parkin from Sigma-Aldrich (Lyon, France), anti-p62 from Novus Biologicals (Lille, France), anti-eEF2 from ThermoFischer (Illkirch, France), anti-eEF2K from Proteintech (Manchester, United Kingdom). Proteins were detected on a iBright FL1000 Imager (Invitrogen) by using the ECL method according to the manufacturer's instructions (Fischer Scientific). To calculate the relative density (RD), ImageJ software was used and the intensity of each protein was normalized to actin. The data obtained were then expressed as the ratio of the intensity of the protein in treated cells or mice to that of the corresponding protein in untreated cells or vehicle-treated mice (RD). The level of protein phosphorylation/acetylation was expressed as the ratio of the phosphorylated/acetylated protein versus the total protein.

Native and denaturing immunoprecipitations

To analyze the level of eEF2 and eEF2K acetylation, cells were lysed in a denaturing IP buffer (1% SDS, 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 15 U/ml DNase, pH 7.4) supplemented with a protease and phosphatase inhibitors cocktail (Roche) and a cocktail of deacetylase inhibitors (Santa Cruz). Lysate were heat at 90°C for 5 min and then diluted in non-denaturing buffer to trap SDS (1% NP-40, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 137 mM NaCl, pH 8) supplemented with a cocktail of protease and deacetylase inhibitors. Lysine acetylated proteins, eEF2K and eEF2 proteins were immunoprecipitated using either anti-acetylated lysine or anti-eEF2K antibody or anti-eEF2 antibody coated on G magnetic beads

(Merck Millipore). Mouse or rabbit anti-IgG (Santa Cruz) were used as control. To examine the physical interaction between SIRT1 and eEF2K or eEF2, cells were lysed in non-denaturing lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, pH 8) supplemented with a protease and phosphatase inhibitors cocktail (Roche) for 30 min at 4°C. SIRT1, eEF2K or eEF2 proteins were immunoprecipitated using anti-SIRT1, anti-eEF2K or anti-eEF2 antibodies coated on G magnetic beads (Merck Millipore). Mouse and rabbit anti-IgG (Santa Cruz) were used as control. Immunoprecipitated proteins were run on SDS-PAGE and were revealed with anti-SIRT1, anti-eEF2K or anti-eEF2 antibodies.

Enzyme activity

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 and 0.1% Triton X-100. Citrate synthase activity was measured by detecting the increase in absorbance at 412 nm of 940 μ L reaction buffer (200 mM Tris HCl, pH 8) containing 0.3 mM acetyl-CoA, 0.1 mM 5,5'-dithiobis-(2 nitrobenzoic acid) (DTNB), 0.5 mM oxaloacetic acid at 30°C. A molar extinction coefficient of 13.6 L mol⁻¹ cm⁻¹ for DTNB was used. Cytochrome c oxidase activity was assayed from the decrease in absorbance at 550 nm caused by oxidation of ferrocytochrome c (reduced form) to ferricytochrome c (oxidised form) by cytochrome c oxidase in 1 mL of phosphate buffer (50 mM K₂HPO₄, pH 7.4). The difference in extinction coefficients between reduced and oxidised cytochrome c was taken as 18.5 mM⁻¹ cm⁻¹ at 550 nm.

Preparation of isolated mitochondria

Mitochondria from H9c2 cells were isolated using standard procedures. Briefly, H9c2 cells were incubated 10 min in 3 ml of IBC solution (in mM: 10 Tris-MOPS, 1 EGTA/Tris, 300 sucrose, 1% BSA, pH 7.4) then minced with a tissue grind pestle. Homogenates were centrifuged at 2500g for 10 min. The supernatant fraction was centrifuged at 10000g for 10 min. The pellet fraction was washed with 1 ml of IBC solution then centrifuged at 10000g for 10 min. The final pellet fraction was resuspended in 30 μ L of RIPA buffer with anti-proteases and anti-deacetylases and analyzed by western blot.

To isolate cardiac mitochondria, hearts were minced in 4 ml of IB1 solution (in mM: 225 mannitol, 75 sucrose, 0.5% BSA, 0.5 EGTA, 30 Tris-HCl, pH 7.4) with a tissue grind pestle. Homogenate was centrifuged at 800g for 5 min. The supernatant fraction was centrifuged at

9000g for 10 min. The pellet fraction obtained was resuspended in 2 ml of IB2 buffer (in mM: 225 mannitol, 75 sucrose, 0.5% BSA, 30 Tris-HCl, pH 7.4) and centrifuged at 10000g for 10 min. The pellet fraction was then resuspended in 2 ml of IB3 buffer (in mM: 225 mannitol, 75 sucrose, 30 Tris-HCl, pH 7.4) and centrifuged at 10000g for 10 min. The final pellet fraction was resuspended in 50 μ L of RIPA buffer with anti-proteases and anti-phosphates (1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 2 μ g/ml apoptinin, and 5 μ g/ml leupeptin), 1% Triton™ X-100 and anti-deubiquitinase (2 mM n-ethylmaleimide).

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm S.E.M. Data were analyzed using Sigma Stat (Sigma Stat, version 3.0, Systat Software, San Jose, CA, USA). One-way ANOVA was used to assess differences among groups followed by Newman-Keuls, Fisher LSD, Mann-Whitney or Dunn's post hoc test. When two groups were compared, differences were assessed by Student's t-test. Differences between groups were considered significant if the P-value was * $<$ P0.05, ** $<$ P 0.01, *** P $<$ 0.005 *versus* control or WT mice. #P $<$ 0.05, ## $<$ P0.01, ###P $<$ 0.005 *versus* TN or SIRT1 iKO mice.

RESULTS

ER stress induces protective autophagy in cardiac cells

To determine whether ER stress-induced autophagy is protective or detrimental in cardiac cells, we treated H9c2 cardiomyoblasts with the well-established ER stressor tunicamycin (TN, 10 $\mu\text{g/ml}$) and measured the level of ER stress and autophagy markers over time. As expected, exposure to TN elicited ER stress as demonstrated by the time-dependent upregulation of the ER chaperones GRP78 and GRP94 (Figure 1A). The expression of markers of ATF6 (*Grp78*, *Pdia4*, *Chop*), IRE1 (*Xbp1s*, *p58ipk*) and PERK (*Atf4*, *Gadd34*, *Chop*) pathways was increased, indicating that the three arms of the UPR were activated (Figure 1B). By immunoblot, we found that TN also induced autophagy as shown by the increase in the expression levels of the autophagy markers p62 and LC3-II. The amount of p62 and LC3-II initially increased and reached a maximum level at 36 h and then decreased. As shown in figure 1C, the expression of Atg5 and Parkin were also upregulated upon ER stress. To confirm these results by flow cytometry, cardiac cells were stained with the Cyto-ID[®] probe that allows analysis of the autophagic flux in live cells by selectively labeling autophagic compartment¹⁸. In parallel, cell death was assayed by FDA assay. Consistent with western blot data, the autophagic flux increased until 36 h post TN treatment and then decreased at 48 h (Figure 1D), whereas cell death was detectable only after 36 h. These results suggest that autophagy is initiated before cell death in response to ER stress. To investigate further the role of autophagy in the context of ER stress, H9c2 cells were treated with TN in the absence or the presence of the autophagy inhibitors chloroquine (CQ) or 3-methyladenine (3-MA) for 24 h (Figure 1F) and 48 h (Figure S1A). After 24 h, while treatment with TN alone did not result in cell death, the percentage of dead cells was substantially increased in response to TN when autophagy was inhibited by CQ or 3-MA (Figure 1F). Taken together, our results show that autophagy induced by ER stress is protective in cardiac cells.

SIRT1 regulates ER stress-induced autophagy in cardiac cells

Previously, we have reported that activation of the deacetylase SIRT1 protects the heart from ER stress-induced injury by decreasing apoptosis¹⁹. In agreement, cell death was increased in cardiac cells in response to ER stress when SIRT1 was pharmacologically inhibited by EX527 (Figure 2A and Figure S1B). We thus wondered whether the protective effect of SIRT1 involves regulation of autophagy. The role of SIRT1 was examined in H9c2 cells by

measuring Cyto-ID[®] fluorescence and LC3-II levels. Figure 2B shows representative results from flow cytometry analysis and images obtained by fluorescence microscopy after Cyto-ID[®] staining. As expected, inhibition of autophagy by 3-MA or CQ reduced Cyto-ID[®] staining (Figure 2C). Inhibition of SIRT1 by EX527 decreased Cyto-ID[®] fluorescence induced by TN to the same extent as did the autophagy inhibitors 3-MA and CQ. By contrast, activation of SIRT1 by STAC-3, a SIRT1-specific activator¹⁵, further increased the fluorescence of Cyto-ID[®] induced by ER stress. In agreement, the accumulation of LC3-II was more important in response to TN treatment when SIRT1 was activated by STAC-3 (Figure 2D). Moreover, depletion of SIRT1 with siRNA (Figure 2E) significantly decrease Cyto-ID[®] staining, corroborating the results obtained with EX527 (Figure 2F). Together, these results show that SIRT1 inhibition or knockdown decreases ER stress-induced autophagy, whereas activation of SIRT1 plays a protective role against ER stress by increasing autophagy.

SIRT1 protects cardiac cells from ER stress by activating an early stage of the autophagic process

To determine more precisely the step of the ER stress-induced autophagic process affected by SIRT1, we compared the effects of the SIRT1 inhibitor EX527 to those of the autophagy inhibitors 3-MA and CQ on autophagy. Indeed, 3-MA, acts at the early step of autophagy by blocking autophagosome formation and LC3 lipidation through inhibition of the type III PI3K, while CQ arrests the latter step of autophagy by interfering with the fusion of autophagosomes and lysosomes. H9c2 cells were treated with TN in the absence or the presence of EX527, 3-MA or CQ and the levels of p62 and LC3-II were analyzed by western blot. Figure 3A shows that the accumulation of both p62 and LC3-II induced by TN was decreased by SIRT1 inhibition as observed when initiation of autophagy was inhibited by 3-MA. To consolidate our results, the same experiments were conducted in adult rat ventricular cardiomyocytes (ARVMs). As seen in H9c2 cells, EX527 and 3-MA reduced p62 and LC3-II accumulation induced by TN (Figure 3B). The modulation of TN-induced cell death by EX527 or autophagy inhibitors was also examined in ARVMs (Figure 3C). After 24 h of treatment, TN did not affect cardiomyocytes viability. However, inhibition of autophagy (3-MA or CQ) or of SIRT1 (EX527) promoted cell death in response to TN, corroborating the protective roles of SIRT1 and autophagy observed in H9c2 cells. Altogether, these data suggest that SIRT1 inhibition interferes with autophagic flux upstream of LC3-II formation,

rather than by blocking lysosomal degradation events. SIRT1 thus appears to regulate an early stage of the autophagic process in response to ER stress in cardiomyocytes.

SIRT1 deficiency inhibits ER stress-induced autophagy and exacerbates cardiac injury

To investigate the role of SIRT1 in the regulation of ER stress-induced autophagy *in vivo*, adult-inducible SIRT1 knockout (SIRT1 iKO) and control mice were injected with TN (2 mg/kg body weight). TN impaired cardiac function as shown by the decrease in fractional shortening (FS; Figure 4A) and ejection fraction (EF; Figure S2). Heart rate (Figure 4A), left ventricular internal diameters or wall thickness (Figure S2) were not affected. SIRT1 deficiency significantly enhanced the diminution of FS (Figure 4A) and EF (Figure S2) induced by TN. The role of SIRT1 was also examined in a pathophysiological model of cardiac injury. To this end, SIRT1 iKO and WT mice were subcutaneously injected with isoproterenol (ISO; 150mg/kg body weight), a β -adrenergic agonist. ISO induces a catecholaminergic stress, which has been well documented to induce cardiac dysfunction associated with ER stress²⁰⁻²³. Following ISO challenge, heart rate, FS and EF were decreased in WT mice, while left ventricular internal diameters and wall thickness were not affected (Figure 4B and Figure S3). The diminution of heart rate, FS and EF induced by ISO were more important when SIRT1 was knocked out. Together, this data indicate that SIRT1 protects the heart from TN- and ISO-induced injury. To determine whether the cardioprotective effect of SIRT1 is mediated through regulation of autophagy *in vivo*, the level of p62 and LC3-II were evaluated in WT and SIRT1 iKO mice after TN or ISO injection. The accumulation of p62 and LC3-II promoted by TN or ISO was returned to basal level in SIRT1 iKO mice (Figures 4C and 4D), indicating that SIRT1 is required for autophagy induction in response to TN or ISO. These results corroborate those obtained in H9c2 cells and suggest that SIRT1 protect the heart from ER stress-induced injury by promoting protective autophagy.

ER stress-induced cardiac mitophagy is regulated by SIRT1

Mitophagy, the selective removal of damaged mitochondria by autophagy, has been shown to be a crucial line of defense against myocardial stress²⁴. We thus examined whether ER stress-induced autophagy involves mitophagy in cardiomyocytes. First, the effects of ER stress and

SIRT1 on mitochondrial function was analyzed by measuring the enzymatic activity of citrate synthase (CS) and cytochrome c oxidase (COX) in homogenates from WT of SIRT1 iKO mouse hearts. The activity of these two mitochondrial enzymes was decreased by TN (Figure 5A). This diminution was exacerbated by SIRT1 deficiency, indicating that SIRT1 reduces the impairment of the mitochondrial function caused by ER stress or increases the degradation of damaged mitochondria. To determine whether mitophagy is involved in ER stress-induced cardiac injury, ultrastructural analysis of cardiac tissues was carried out by transmission electron microscopy. The presence of autophagic vacuoles containing cellular materials was observed in heart tissues from WT mice (Figure 5B) or treated with TN (Figure 5C). In addition, some of these vacuoles contained damaged mitochondria as shown in Figures 5D and 5E. The E3 ligase Parkin is known to be translocated from cytosol to damaged mitochondria to trigger mitochondria-specific autophagy. To evaluate the translocation of Parkin to mitochondria in response to ER stress, subcellular fractionation experiments were performed. Mitochondria enriched fractions (Figure 5F) were prepared from hearts of WT or SIRT1 iKO mice treated or not with TN, and the presence of Parkin and LC3-II was analyzed by western blot (Figure 5G). In response to ER stress, the levels of mitochondrial Parkin and LC3-II were increased, showing an increase in mitophagy. The association of Parkin and LC3-II to mitochondria was reduced in heart from SIRT1 iKO mice. These experiments were also conducted in H9c2 cells (Figures 5H-I and Figure S4). The occurrence of autophagic vacuoles was increased in cells treated with TN (Figure S4). In addition, the pharmacological inhibition of SIRT1 by EX527 decreased the relocation of Parkin to mitochondria induced by TN. The level of mitochondrial LC3-II was also reduced (Figure 5I). Therefore, inhibition or deletion of SIRT1 impaired the association of Parkin and LC3-II with mitochondria. These results demonstrate that ER stress-induced mitophagy is regulated by SIRT1 in the heart.

eEF2K/eEF2 pathway regulates autophagy and cell death in response to ER stress

The calcium/calmodulin-dependent kinase eEF2K phosphorylates and inhibits the eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) under stressful conditions. In addition, eEF2K/eEF2 pathway has been shown to control stress-induced autophagy and apoptosis in cancer cells²⁵. Given that we demonstrated that SIRT1 regulates autophagy/mitophagy and cell death in cardiac cells in response to ER stress, we hypothesized that this regulation might involve the eEF2K/eEF2 pathway. To study the role of eEF2K in the regulation of ER stress-induced autophagy and cell death, H9c2 cells were pre-treated for 2 h with A484954, a specific inhibitor of this

kinase, before TN treatment. The phosphorylation of eEF2 was reduced by about 70% in the presence of A484954 (Figure 6A), demonstrating that eEF2K is effectively inhibited in cardiac cells. The inhibition of eEF2K by A484954 increased the percentage of FDA negative cells induced by ER stress (Figure 6B). Conversely, this percentage was lowered by endothall, an inhibitor of the PP2A phosphatase that dephosphorylates eEF2 (Figure S5). A484954 also decreased the fluorescence of Cyto-ID[®] and the accumulation of LC3-II triggered by TN (Figure 6C and 6D, respectively). When the expression of eEF2K was reduced by more than 70% in the presence of specific siRNA (Figure 6E), TN-induced cell death was enhanced (Figure 6F), whereas TN-induced autophagy was suppressed (Figure 6G). Similar results were obtained by silencing the expression of eEF2 (Figures 6H-J). These results indicate that eEF2K/eEF2 pathway promotes autophagy and inhibits cell death in cardiac cells in response to ER stress. The effect of SIRT1 inhibition on the level of phosphorylation of eEF2 was then examined. As shown in Figure 6K, the phosphorylation of eEF2 promoted by TN was returned to basal level when SIRT1 was inhibited by EX527. Together, these results suggest that SIRT1 activates eEF2K/eEF2 pathway to promote cardioprotective autophagy in response to ER stress.

The mechanism of activation of eEF2K/eEF2 pathway by SIRT1 does not involve direct interaction between these proteins

The observation that SIRT1 regulates eEF2 phosphorylation, prompted us to assess whether eEF2K and/or eEF2 are acetylated on lysine and whether SIRT1 physically interacts with these proteins. To evaluate level of acetylation eEF2K and eEF2, proteins acetylated on lysine residues were pulled down from H9c2 cell lysates treated or not with EX527. Neither eEF2K nor eEF2 was detected in anti-acetyl lysine immunoprecipitates (Figure 7A and 7B, respectively). Immunoprecipitations of eEF2K or eEF2 followed by western blotting with anti-acetyl lysine antibodies confirmed that eEF2K and eEF2 are not acetylated on lysine residues in H9c2 cells. The presence of eEF2K in eEF2 immunoprecipitates and vice-versa, indicated, as expected, that eEF2K and eEF2 physically interact with each other. However, neither eEF2K nor eEF2 were found in the immunoprecipitate of endogenous SIRT1 (Figure 7C). The reverse experiment, immunoprecipitating eEF2K or eEF2 and immunoblotting with anti-SIRT1 antibodies, confirmed that SIRT1 is not associated physically with eEF2K or eEF2 in H9c2 cells.

DISCUSSION

Many recent studies have highlighted the importance of ER stress in the development and progression of cardiac disorders and have suggested that modulation of ER stress response could be cardioprotective.^{8,20,26} Autophagy, that is activated in response to multiple cellular stresses including ER stress¹⁰, is predominantly considered as a protective mechanism in the heart.²⁷ Moreover, we have previously demonstrated that SIRT1 protects cardiomyocytes against ER stress-induced apoptosis by modulating the activation of the PERK pathway of the UPR.¹⁹ The main focus of this study was thus to investigate whether the cardioprotective effects of SIRT1 is related to the modulation of ER stress-induced autophagy in cardiac cells and to determine the mechanisms involved. We show that ER stress-induced autophagy/mitophagy is protective in cardiac cells. We also provide evidence that SIRT1 protects the heart by promoting autophagy/mitophagy through indirect activation of eEF2K/eEF2 pathway.

Autophagy, as a major housekeeping process that allows recycling and clearance of damaged proteins and organelles, has been reported to play beneficial or detrimental role in the myocardium depending on the context and the disease studied. Under normal physiological conditions, basal levels of autophagy have been demonstrated to be essential for maintaining cardiac homeostasis because cardiomyocytes are terminally differentiated and cannot decrease their cellular waste by replication. For instance, heart failure, associated with disorganized sarcomeres and accumulation of ubiquitinated proteins and damaged mitochondria, was reported in mice with cardiac-specific inactivation of the core autophagy protein Atg5.²⁸ Under conditions of stress such as ischemia, starvation, and β -adrenergic stimulation, autophagy mainly acts as a pro-survival mechanism by removing toxic protein aggregates and damaged organelles²⁹⁻³³. On the other hand, other studies recognized excessive autophagy as a detrimental mechanism in heart failure induced by pressure overload³⁴ or during reperfusion injury³⁵. Here, we report that autophagy occurred before the onset of cell death in response to ER stress in cardiac cells. In addition, we found that inhibition of ER stress-induced autophagy by 3-MA or CQ triggers cell death, suggesting that activation of autophagy may counteract cell death and serve as a cardioprotective mechanism against ER stress. The impairment of the mitochondrial function associated to ER stress-induced heart injury, led us to investigate the involvement of mitophagy, a form of autophagy that selectively eliminates damaged mitochondria. By electron microscopy and subcellular fractionation, we demonstrated that autophagic vacuoles can contain damaged mitochondria and that Parkin is

translocated to mitochondria under ER stress. Parkin is a cytosolic E3 ubiquitin ligase that is recruited to damaged mitochondria in a PINK1-dependent manner, to promote their degradation by the autophagy machinery through ubiquitination of mitochondrial substrates.³⁶ Therefore, our observations suggest that ER stress-induced autophagy involves mitophagy in the heart. Several studies have reported that mitophagy deficiency exacerbates cardiac dysfunction, leading to the proposal that mitophagy plays an essential role in adapting to myocardial stress.^{29,37,38} However, the role of mitophagy in response to ER stress in heart is poorly characterized. On the basis of our findings, we propose that autophagy/mitophagy plays a protective role and is essential for survival of cardiac cells undergoing ER stress.

SIRT1 is a deacetylase that has been shown to protect cardiomyocytes against various cardiac stresses, at least by suppressing cell death or promoting autophagy.^{12,19,39-41} Our previous work has also shown that SIRT1 protects cardiomyocytes from ER stress-induced apoptosis by regulating the PERK arm of the UPR.¹⁹ In the present study, we thus investigated whether SIRT1 can activate autophagic clearance to help to cope with ER stress and counteract cell death. We found that when SIRT1 was inhibited, the percentage of dead cardiomyocytes was more important whereas autophagy/mitophagy was reduced under ER stress. In *in vivo* models of cardiac injury induced by TN or ISO, SIRT1 deficiency led to defective autophagy and aggravation of the cardiac dysfunction. In addition, the accumulation of p62 and LC3-II, the lipidated form of LC3, induced by ER stress were significantly decreased by SIRT1 inhibition, to the same extent as did 3-MA which blocks the early stages of autophagy. These observations suggest that SIRT1 protects the heart from ER stress-induced cell death by enhancing initiation of the autophagic process. We also demonstrated that the autophagic process induced by ER stress involves mitophagy that is regulated by SIRT1. The first connection between SIRT1 and mitophagy was shown in human fibroblasts by Hwang's group.^{42,43} In the cardiovascular system, it was recently established in infarcted heart that liraglutide, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, elevated SIRT1 expression which in turn increased Parkin, leading to activation of protective mitophagy.⁴⁴ However, to the best of our knowledge, our findings provide the first demonstration that SIRT1 regulates ER stress-induced autophagy/mitophagy in the heart.

Many lines of evidence demonstrate that autophagy and apoptosis either cooperate or antagonize each other and thus determine cell fate. SIRT1 was reported to protect against apoptosis by promoting autophagy in different cells but the underlying mechanisms were not always identified. Among the mechanisms protecting cells, regulation of FOXO-mediated autophagy by SIRT1 appeared to be particularly important. Indeed, SIRT1 has been shown to

promote cell survival through FOXO-dependent activation of autophagy in different cells including renal⁴⁵, osteoblastic⁴⁶ and cardiac³⁰ cells.

Besides, it was shown that eEF2K controls the switch between autophagy and apoptosis in cancer cells.¹¹ Moreover, Py et al. identified eEF2K/eEF2 pathway as an important effector of ER stress signaling in PC12 cells.^{47,48} These results prompted us to examine the possibility that eEF2K/eEF2 pathway could play a role in the regulation of ER stress-induced autophagy by SIRT1. We demonstrated (i) that ER stress induced an increase in the phosphorylation of eEF2, and (ii) that knockdown of eEF2 decreased ER stress-induced autophagy while increasing cell death. In addition, pharmacological inhibition or extinction of eEF2K led to the same outcome. These results indicate that eEF2K/eEF2 pathway is involved in the regulation of switch between autophagy and cell death in cardiac cells in response to ER stress. The observation that ER stress-induced phosphorylation of eEF2 was decreased when SIRT1 was inhibited, suggest that SIRT1 is able to modulate the eEF2K/eEF2 pathway in our model of ER stress. Therefore, we propose that SIRT1 protects cardiomyocytes from ER stress by promoting autophagy/mitophagy through activation of eEF2K/eEF2 pathway.

We next examined whether SIRT1 directly activates eEF2K and/or eEF2 through regulation of their acetylation levels. To study the level of lysine acetylation of eEF2 and eEF2K and to determine whether these factors physically interact with SIRT1, immunoprecipitation experiments were performed. We were not able to detect any acetylation of eEF2 or eEF2K on lysine in H9c2 cells. In addition, in co-immunoprecipitation assays, eEF2K was found to interact with eEF2, whereas no physical association between SIRT1 and eEF2K or eEF2 was detected. These results imply that SIRT1 does not directly activates eEF2K/eEF2 pathway in cardiac cells, suggesting that another factor regulated by SIRT1 is required for eEF2K/eEF2 pathway activation in response to ER stress. The PERK/eIF2 α /ATF4 pathway has been shown to regulate ER stress-induced activation of autophagy^{10,49}. In addition, in cancer cells, ER stress-induced activation of ATF4 downstream of eIF2 α phosphorylation was reported to promote autophagy by activating REDD1/DDIT4, which in turn increases eEF2K activity through mTOR inhibition.^{50,51} This suggest that in response to ER stress PERK-mediated phosphorylation of eIF2 α can regulate the activity of eEF2K, and thus the phosphorylation state of eEF2, through ATF4. In a previous study, we have shown that SIRT1 specifically regulates the PERK pathway of the UPR through deacetylation of eIF2 α on lysine K143.¹⁹ Moreover, we found that the level of acetylation of eIF2 α is correlated to its level of phosphorylation. Taking into account all the above results, it is tempting to assume that in cardiac cells, SIRT1 activates eEF2K/eEF2-dependent autophagy/mitophagy through

regulation of the acetylation/phosphorylation state of eIF2 α . However, further studies are required to validate this hypothesis.

In conclusion, we demonstrated for the first time that activation SIRT1 protects cardiomyocytes against ER stress-induced cell death by enhancing autophagy/mitophagy at least through activation of the eEF2K/eEF2 pathway. Therefore, SIRT1 activation, by enhancing protective autophagy and reducing detrimental apoptosis, could constitute a promising therapeutic strategy to limit the development and progression of cardiac diseases associated with ER.

FUNDING

This work was funded by the grant ANR-10-LABX-33 as members of the Laboratory of Excellence LERMIT, FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) to A. Garnier (#DPM20121125546), Région Ile de France CODDIM to R. Ventura-Clapier (#cod110153) and by grant VEGA 2/0110/15, APVV-15-0302 and SK-FR-2015-0007 to M. Novotova. A. Guilbert received a fellowship from Région Ile de France CORDDIM.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank F. Lefebvre for helpful technical assistance and V. Domergue-Dupont and the animal core facility of IPSIT for efficient handling and preparation of the animals. We thank L. Novota for skillful technical assistance and preparation sections for electron microscopy. We gratefully acknowledge Dr AM. Gomez and Dr R. Fischmeister for continuous support.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflicts of interest were disclosed by the authors.

REFERENCES

1. Hetz, C. & Papa, F. R. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol. Cell* **69**, 169–181 (2018).
2. Wang, S. *et al.* Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets. *Br. J. Pharmacol.* **175**, 1293–1304 (2018).
3. Minamino, T. & Kitakaze, M. ER stress in cardiovascular disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48**, 1105–1110 (2010).
4. Deniaud, A. *et al.* Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* **27**, 285–299 (2008).
5. Iurlaro, R. & Muñoz-Pinedo, C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J.* **283**, 2640–2652 (2016).
6. Wang, Z. V. *et al.* Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway. *Cell* **156**, 1179–1192 (2014).
7. Shintani-Ishida, K., Nakajima, M., Uemura, K. & Yoshida, K. Ischemic preconditioning protects cardiomyocytes against ischemic injury by inducing GRP78. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 1600–1605 (2006).
8. Fu, H. Y. *et al.* Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation* **122**, 361–369 (2010).
9. Mialet-Perez, J. & Vindis, C. Autophagy in health and disease: focus on the cardiovascular system. *Essays Biochem.* **61**, 721–732 (2017).
10. Song, S., Tan, J., Miao, Y., Li, M. & Zhang, Q. Crosstalk of Autophagy and Apoptosis: Involvement of the Dual Role of Autophagy Under ER Stress. *J. Cell. Physiol.* n/a-n/a (2017). doi:10.1002/jcp.25785
11. Cheng, Y. *et al.* eEF-2 Kinase Dictates Crosstalk between Autophagy and Apoptosis Induced by Akt Inhibition, thereby Modulating Cytotoxicity of Novel Akt Inhibitor MK-2206. *Cancer Res.* **71**, 2654 (2011).
12. Ma, L. & Li, Y. SIRT1: Role in cardiovascular biology. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **440C**, 8–15 (2014).
13. Lee, I. H. *et al.* A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3374–3379 (2008).
14. Prola, A. *et al.* SIRT1 protects the heart from ER stress-induced cell death through eIF2 α deacetylation. *Cell Death Differ.* (2016). doi:10.1038/cdd.2016.138
15. Hubbard, B. P. *et al.* Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science* **339**, 1216–1219 (2013).
16. Mouchiroud, L. *et al.* The NAD(+)/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. *Cell* **154**, 430–441 (2013).
17. Verde, I., Vandecasteele, G., Lezoualc'h, F. & Fischmeister, R. Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes. *Br. J. Pharmacol.* **127**, 65–74 (1999).
18. Chan, L. L.-Y. *et al.* A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells. *Autophagy* **8**, 1371–1382 (2012).
19. Prola, A. *et al.* SIRT1 protects the heart from ER stress-induced cell death through eIF2 α deacetylation. *Cell Death Differ.* **24**, 343–356 (2017).
20. Ayala, P. *et al.* Attenuation of endoplasmic reticulum stress using the chemical chaperone 4-phenylbutyric acid prevents cardiac fibrosis induced by isoproterenol. *Exp. Mol. Pathol.* **92**, 97–104 (2012).

21. Brooks, W. W. & Conrad, C. H. Isoproterenol-Induced Myocardial Injury and Diastolic Dysfunction in Mice: Structural and Functional Correlates. *Comp. Med.* **59**, 339–343 (2009).
22. Dalal, S., Foster, C. R., Das, B. C., Singh, M. & Singh, K. B-adrenergic receptor stimulation induces endoplasmic reticulum stress in adult cardiac myocytes: role in apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* **364**, 59–70 (2012).
23. Nichtova Z. , et, N. Z., et. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/?term=Morphological+and+functional+characteristics+of+models+of+experimental+myocardial+injury+induced+by+isoproterenol>. (Accessed: 26th January 2018)
24. Nah, J., Miyamoto, S. & Sadoshima, J. Mitophagy as a Protective Mechanism against Myocardial Stress. *Compr. Physiol.* **7**, 1407–1424 (2017).
25. Zhu, H. *et al.* Eukaryotic elongation factor 2 kinase confers tolerance to stress conditions in cancer cells. *Cell Stress Chaperones* **20**, 217 (2015).
26. Castillero, E. *et al.* Attenuation of the Unfolded Protein Response and Endoplasmic Reticulum Stress after Mechanical Unloading in Dilated Cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *ajpheart.00056.2015* (2015). doi:10.1152/ajpheart.00056.2015
27. Orogo, A. M. & Gustafsson, Å. B. Therapeutic Targeting of Autophagy: Potential and Concerns in Treating Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **116**, 489–503 (2015).
28. Nakai, A. *et al.* The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat. Med.* **13**, 619–624 (2007).
29. Hoshino, A. *et al.* Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart. *Nat. Commun.* **4**, 2308 (2013).
30. Hariharan, N. *et al.* Deacetylation of FoxO by Sirt1 Plays an Essential Role in Mediating Starvation-Induced Autophagy in Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* **107**, 1470–1482 (2010).
31. Hamacher-Brady, A., Brady, N. R. & Gottlieb, R. A. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **281**, 29776–29787 (2006).
32. Nakaoka, M. *et al.* An alpha-adrenergic agonist protects hearts by inducing Akt1-mediated autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **456**, 250–256 (2015).
33. Laurent, A.-C. *et al.* Exchange protein directly activated by cAMP 1 promotes autophagy during cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **105**, 55–64 (2015).
34. Zhu, H. *et al.* Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *J. Clin. Invest.* **117**, 1782–1793 (2007).
35. Matsui, Y. *et al.* Distinct Roles of Autophagy in the Heart During Ischemia and Reperfusion: Roles of AMP-Activated Protein Kinase and Beclin 1 in Mediating Autophagy. *Circ. Res.* **100**, 914–922 (2007).
36. Matsuda, N. *et al.* PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J. Cell Biol.* **189**, 211–221 (2010).
37. Kubli, D. A. *et al.* Parkin protein deficiency exacerbates cardiac injury and reduces survival following myocardial infarction. *J. Biol. Chem.* **288**, 915–926 (2013).
38. Shirakabe, A. *et al.* Drp1-Dependent Mitochondrial Autophagy Plays a Protective Role Against Pressure Overload-Induced Mitochondrial Dysfunction and Heart Failure. *Circulation* **133**, 1249–1263 (2016).
39. Alcendor, R. R. *et al.* Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ. Res.* **100**, 1512–1521 (2007).

40. Hsu, C.-P., Odewale, I., Alcendor, R. R. & Sadoshima, J. Sirt1 protects the heart from aging and stress. *Biol. Chem.* **389**, 221–231 (2008).
41. Ben Salem, I. *et al.* SIRT1 protects cardiac cells against apoptosis induced by zearalenone or its metabolites α - and β -zearalenol through an autophagy-dependent pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **314**, 82–90 (2017).
42. Kang, H. T. & Hwang, E. S. Nicotinamide enhances mitochondria quality through autophagy activation in human cells. *Aging Cell* **8**, 426–438 (2009).
43. Jang, S., Kang, H. T. & Hwang, E. S. Nicotinamide-induced mitophagy: event mediated by high NAD⁺/NADH ratio and SIRT1 protein activation. *J. Biol. Chem.* **287**, 19304–19314 (2012).
44. Qiao, H. *et al.* Liraglutide repairs the infarcted heart: The role of the SIRT1/Parkin/mitophagy pathway. *Mol. Med. Rep.* **17**, 3722–3734 (2018).
45. Kume, S. *et al.* Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *J. Clin. Invest.* **120**, 1043–1055 (2010).
46. Gu, X. *et al.* SIRT1-mediated FoxOs pathways protect against apoptosis by promoting autophagy in osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to sodium fluoride. *Oncotarget* **7**, 65218–65230 (2016).
47. Boyce, M. *et al.* A pharmacoproteomic approach implicates eukaryotic elongation factor 2 kinase in ER stress-induced cell death. *Cell Death Differ.* **15**, 589–599 (2008).
48. Py, B. F., Boyce, M. & Yuan, J. A critical role of eEF-2K in mediating autophagy in response to multiple cellular stresses. *Autophagy* **5**, 393–396 (2009).
49. Kouroku, Y. *et al.* ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* **14**, 230–239 (2006).
50. Cheng, Y. *et al.* Integrated regulation of autophagy and apoptosis by EEF2K controls cellular fate and modulates the efficacy of curcumin and velcade against tumor cells. *Autophagy* **9**, 208–219 (2013).
51. Jin, H.-O. *et al.* Activating transcription factor 4 and CCAAT/enhancer-binding protein- β negatively regulate the mammalian target of rapamycin via Redd1 expression in response to oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 1158–1167 (2009).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. ER stress induces protective autophagy in cardiac cells.

(A) H9c2 cells were treated with TN (10 $\mu\text{g/ml}$) for 1, 3, 6, 24, 36 and 48 h and the levels of ER stress (GRP94 and GRP78) and autophagic (p62 and LC3-II) markers were analyzed by western blot. Actin was used as loading control. Relative protein levels are presented in graphs as mean \pm S.E.M (n=5). (B-C) Cells were left untreated or treated with TN (10 $\mu\text{g/ml}$) for 16 h and the relative mRNA content of UPR target genes (B) or autophagy genes (C) were quantified by RT-qPCR and expressed as fold change over untreated controls. Values represent mean \pm S.E.M. (n=5). (D) Autophagic flux was monitored in H9c2 cells treated or not with TN (10 $\mu\text{g/ml}$) for 1, 2, 3, 6, 16, 24, 36 and 48h. Autophagy was detected by flow cytometry after cell staining with Cyto-ID[®]. Mean fluorescence intensity \pm S.E.M is presented (n=4). (E) The percentage of cell death was assessed by flow cytometry after treatment with 10 $\mu\text{g/ml}$ TN for 1, 2, 3, 6, 16, 24, 36 and 48 h. Results presented in graph are expressed as the percentage of dead cells (FDA-negative cells) (mean \pm S.E.M., n=5). (F) H9c2 cells were left untreated or treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ TN for 24 h \pm 5 mM 3-MA or 50 μM CQ pretreatment and cell viability was determined. Results presented in bar graph are expressed as mean \pm S.E.M. of percentages of dead cells (FDA-negative cells, n=5). * $<P0.05$, ** $<P 0.01$, *** $P<0.005$ versus control. ## $<P0.01$, ### $<P0.005$ versus TN.

Figure 2. SIRT1 protects cardiac cells from ER stress by promoting autophagy.

(A) H9c2 cells were left untreated or treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ TN for 24 h or 48 h \pm 50 μM EX527 pretreatment and cell viability was assessed. Results presented in bar graph are expressed as the percentage of dead cells (FDA-negative cells) (mean \pm S.E.M., n=5). (B-C) Cells were left untreated or treated for 24h with 10 $\mu\text{g/ml}$ TN for 24 h \pm 50 μM EX527, 5 mM 3-MA, 50 μM CQ or 1 μM STAC-3 pretreatment and autophagic flux was monitored by flow cytometry after staining with Cyto-ID[®] probe. (B) A representative flow cytometry overlay histogram showing the mean fluorescence intensity of Cyto-ID[®] (MFI) in response to TN \pm 50 μM EX527 is presented. Typical staining of cells by Cyto-ID[®] is also shown. (C) Quantification of autophagy expressed as mean MFI \pm S.E.M. (n=7). (D) Cells were left untreated or treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ TN for 24 h \pm 1 μM STAC-3 pretreatment and the levels of LC3-II were analyzed by western blot. Actin was used as loading control. Relative expression of proteins is presented in bar graph as mean \pm S.E.M (n=7). (E) H9c2 cells were transfected with control or SIRT1 siRNA and SIRT1 expression was assessed after 24 h by western blot

(n=3). **(F)** H9c2 cells were transfected with control or SIRT1 siRNA for 24 h then treated for 24 h with TN and Cyto-ID[®] fluorescence was measured by flow cytometry. Data in the bar graph represent mean \pm S.E.M. (n=3). * $<P<0.05$, ** $<P<0.01$, *** $P<0.005$ versus control. # $<P<0.05$, ## $<P<0.01$ versus TN.

Figure 3. SIRT1 regulates an early stage of the autophagic process induced by ER stress.

(A-B) The levels of the autophagic markers p62 and LC3-II were analyzed by western blot in H9c2 cells **(A)** or ARVMs **(B)** untreated or treated with TN (10 μ g/ml) for 24h \pm 50 μ M EX527, 5mM 3-MA or 50 μ M CQ pretreatment. Actin was used as loading control. Relative expression of proteins is presented in bar graphs as mean \pm S.E.M. (n=4). **(C)** ARVMs were left untreated or treated with 10 μ g/ml TN for 24 h \pm 50 μ M EX527, 5 mM 3-MA or 50 μ M CQ pretreatment and cell viability was determined by FDA assay. Results presented in bar graph are expressed as mean \pm S.E.M. of percentages of dead cells (FDA-negative cells, n=3). * $<P<0.05$, *** $P<0.005$ versus control. # $<P<0.05$, ## $<P<0.01$, ### $<P<0.005$ versus TN.

Figure 4. SIRT1 deficiency exacerbates cardiac dysfunction induced by ER stress.

(A-B) WT and SIRT1 iKO mice were injected i.p. with TN (2 mg/kg) or vehicle (PBS) **(A)** or subcutaneously with ISO (150 mg/kg) or vehicle (NaCl 0,9%) **(B)** for 72 h and heart rate and fractional shortening were recorded. Results are presented as mean \pm S.E.M. (n=10). *** $P<0.005$ versus respective control. # $P<0.05$ versus WT TN or WT ISO. **(C-D)** The levels of SIRT1, p62 and LC3-II were analyzed by western blot in WT or SIRT1 iKO mice after TN **(C)** or ISO **(D)** treatment. Actin was used as loading control. Relative expression of proteins is presented in bar graphs as mean \pm S.E.M (n=8).

Figure 5. SIRT1 activates mitophagy in response to ER stress.

(A) Activity of citrate synthase (CS) and cytochrome oxydase (COX) in WT or SIRT1 iKO cardiac homogenates after vehicle or TN treatment. Enzymatic activities measured in UI/g protein are presented in bar graphs as mean \pm S.E.M. (n=10). **(B-E)** Electron micrographs of control **(B)** and TN-treated **(C-E)** cardiomyocytes showing autophagic/mitophagic vacuoles are presented. **(F-G)** Immunoblots of mitochondrial fractions isolated from WT and SIRT1 iKO heart homogenates 16 h after TN injection (n=5). **(F)** Purity of the mitochondrial fraction relative to the cell lysate was verified by detection of citrated synthase (CS) and lactate dehydrogenase (LDH). **(G)** Western blot analysis of the amount of Parkin and LC3-II in the mitochondrial fraction isolated from WT and SIRT1 iKO mouse hearts after administration of

vehicle or TN. CS was used as a loading control. RD: relative density. **(H-I)** Immunoblots of mitochondrial fractions isolated from H9c2 cells 16 h after TN treatment (n=3). **(H)** Purity of the mitochondrial fraction relative to the cell lysate was verified by detection of CS and LDH. VDAC was used as a loading control. RD: relative density **(I)** Western blot analysis of the amount of Parkin and LC3-II in the mitochondrial fraction of H9c2 cells treated or not with 10 µg/ml TN ± 50µM EX527.

Figure 6. SIRT1 activates eEF2K/eEF2-dependent autophagy in response to ER stress.

(A) H9c2 cells were treated with 10 µM A484954 (eEF2K inhibitor) and the level of phospho-eEF2 was analyzed by western blot (n=7). The ratio of p-eEF2 vs total eEF2 is presented (RD: Relative density). **(B)** H9c2 cells were left untreated or treated with 10 µg/ml TN for 48 h ± 10µM A484954 pretreatment and cell viability was determined by FDA assay. Results presented in bar graph are expressed as mean ± S.E.M. of percentages of dead cells (FDA-negative cells, n=11). **(C)** Autophagy was monitored by flow cytometry after Cyto-ID[®] staining of H9c2 cells untreated or treated with 10 µg/ml TN for 24 h ± 10µM A484954 pretreatment (n=11). **(D)** Cells were left untreated or treated with 10 µg/ml TN for 24 h ± 10 µM A484954 pretreatment and the levels of LC3-II were analyzed by western blot. Actin was used as loading control. Relative mean expression level of proteins is presented in bar graphs. Error bars, S.E.M. (n=5). **(E, H)** H9c2 cells were transfected with control, eEF2K or eEF2 siRNA and eEF2K **(E)** or eEF2 **(H)** expression was assessed after 24 h by western blot. **(F, I)** H9c2 cells were transfected with control, eEF2K **(F)** or eEF2 **(I)** siRNA for 24 h then treated for 48 h with TN and cell death (FDA-negative cells) was measured by flow cytometry. Data in the bar graphs represent mean ± S.E.M. (n=3). **(G, J)** H9c2 cells were transfected with control, eEF2K **(G)** or eEF2 **(J)** siRNA for 24 h then treated for 24 h with TN and autophagy (MFI of Cyto-ID[®]) was measured by flow cytometry. Data in the bar graphs represent mean ± S.E.M. (n=3). **(K)** phospho-eEF2 expression level was measured by western blot in H9c2 cells after 4 hours of 10 µg/ml TN ± 50µM EX527 treatment. The ratio of p-eEF2 vs total eEF2 is presented in bar graphs. Error bars, S.E.M. (n=9).

Figure 7. eEF2K and eEF2 are not acetylated on lysine and do not physically interact with SIRT in H9c2 cells.

(A) Immunoprecipitation of lysine acetylated proteins or of eEF2K from lysates of H9c2 cells treated or not with 50 µM EX527 followed by immunoblotting with anti-eEF2K or anti-acetyl lysine antibodies (n=3). **(B)** eEF2 was immunoprecipitated from lysates of H9c2 cells treated

or not with 50 μ M EX527 and its level of acetylation was analyzed by immunoblotting with anti-acetyl lysine antibodies (n=3). (C) The physical interaction between endogenous SIRT1 and eEF2K or eEF2 was analyzed by co-immunoprecipitation. Either SIRT1 or eEF2K or eEF2 was immunoprecipitated from H9c2 lysates and the presence of SIRT1, eEF2K and eEF2 was analyzed by western blot in each precipitate. Input: input fraction; Output: supernatant after immunoprecipitation; IP: immunoprecipitate. Negative controls: IgGr : rabbit IgG; IgGm : mouse IgG (n=3).

SUPPLEMENTAL FIGURES

Figure S1. Effects of SIRT1 and autophagy inhibitors on ER stress-induced cell death.

Cell viability of H9c2 cells after TN treatment \pm 50 μ M EX5275 or 5 mM 3-MA or 50 μ M CQ pretreatment for 48 hours. Percentage of cell death (FDA negative cells) was assessed by flow cytometry. Results presented in graphs are expressed as mean \pm S.E.M. of percentages of dead cells (FDA-negative cells, n=5).

Figure S2. Echocardiographic parameters of WT and SIRT1 iKO mice in response to ER stress.

WT and SIRT1 iKO mice were injected i.p. with TN (2 mg/kg) or vehicle (PBS) for 72 h and transthoracic echocardiography was performed. LViDd: left ventricular internal dimension (diastole); LViDs: left ventricular internal dimension (systole); TWTd: total wall thickness (diastole); TWTs: total wall thickness (systole). Results are presented as mean \pm S.E.M. ***P<0.005 versus respective control. #P<0.05, ###P<0.005 versus WT TN. (n=10).

Figure S3. Echocardiographic parameters of WT and SIRT1 iKO mice in response to isoproterenol (ISO).

WT and SIRT1 iKO mice were injected subcutaneously with ISO (150 mg/kg) or vehicle (NaCl 0,9%) for 72 h and transthoracic echocardiography was performed. LViDd: left ventricular internal dimension (diastole); LViDs: left ventricular internal dimension (systole); TWTd: total wall thickness (diastole); TWTs: total wall thickness (systole). Results are presented as mean \pm S.E.M. *<P0.05, **<P 0.01, *** P<0.005 versus respective control. ###P<0.005 versus WT ISO. (n=10).

Figure S4. Analysis of ER stress-induced autophagy in H9c2 cells by electron microscopy.

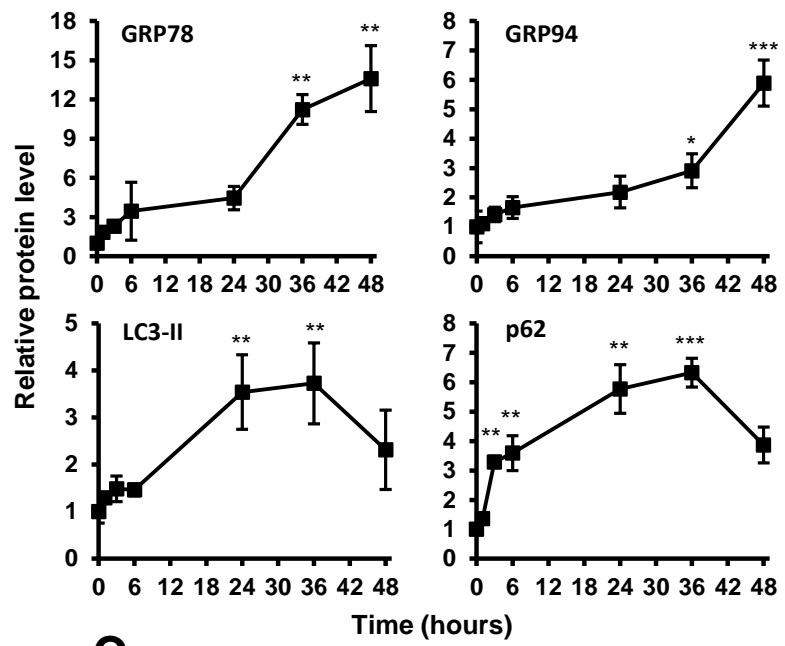
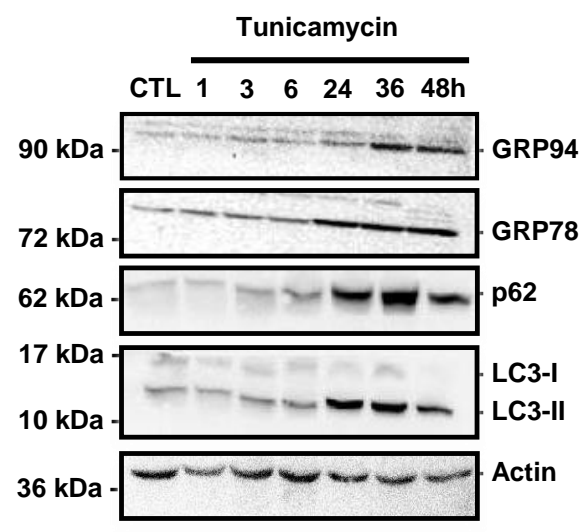
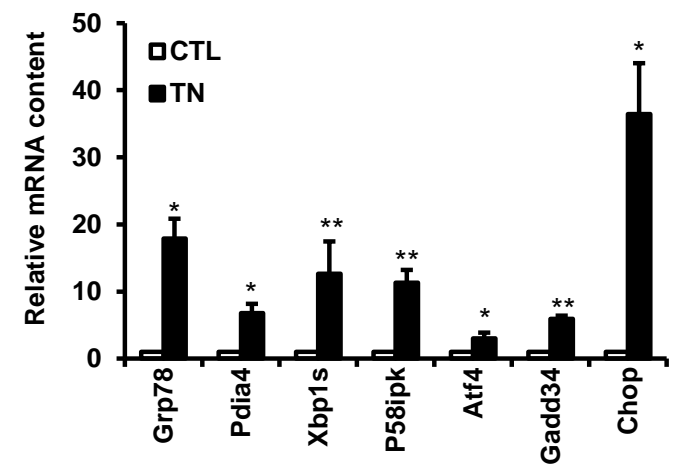
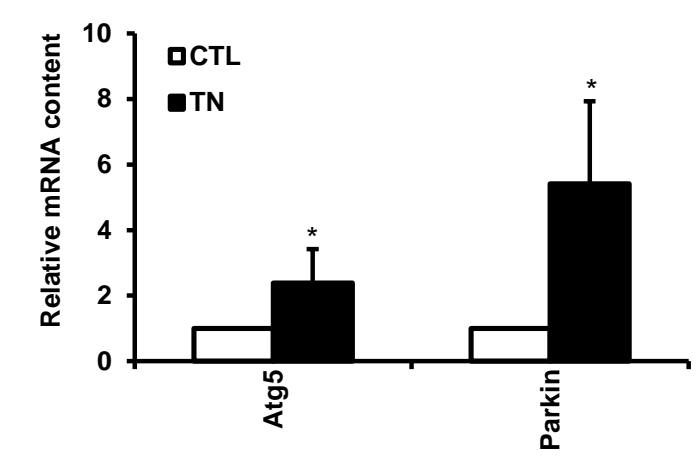
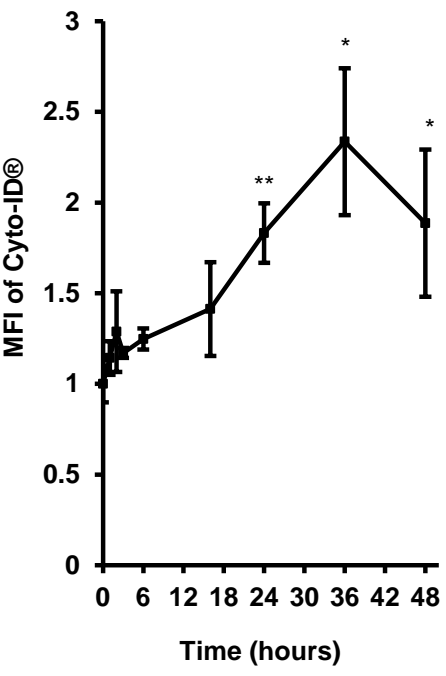
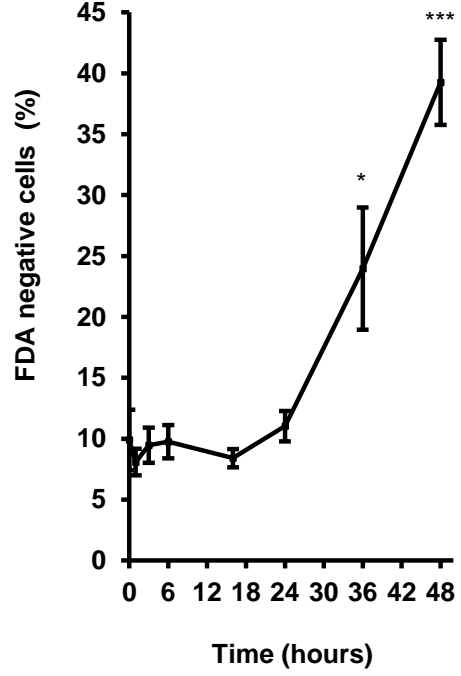
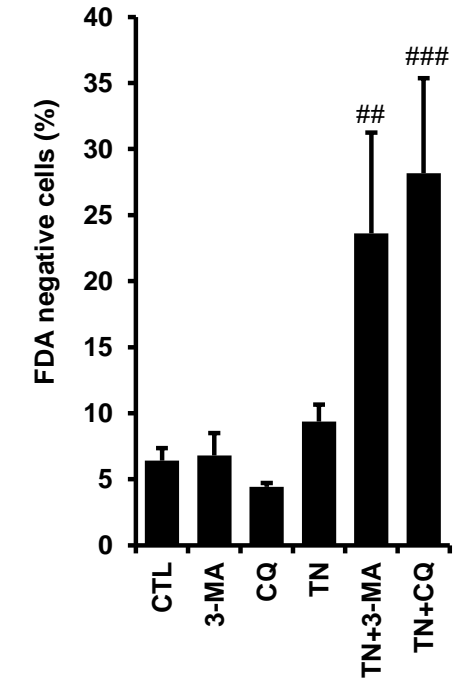
H9c2 cells were treated with TN (10 µg/ml) for 8 h, fixed and prepared as described in Material and Methods and analyzed by electron microscopy.

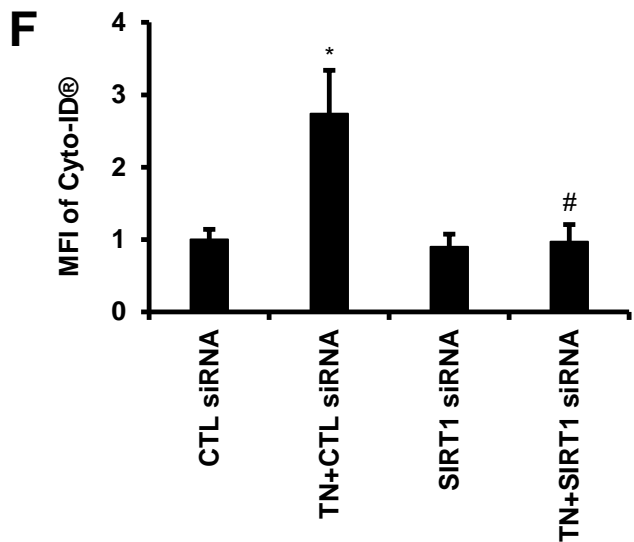
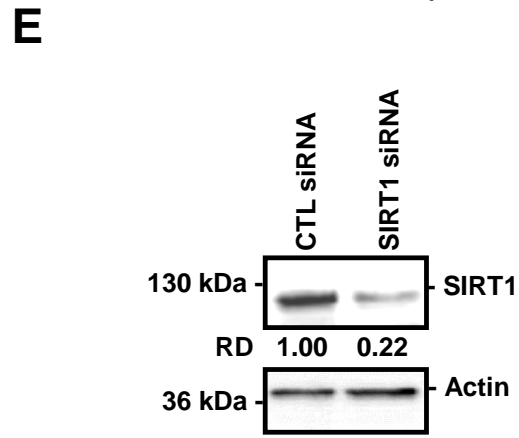
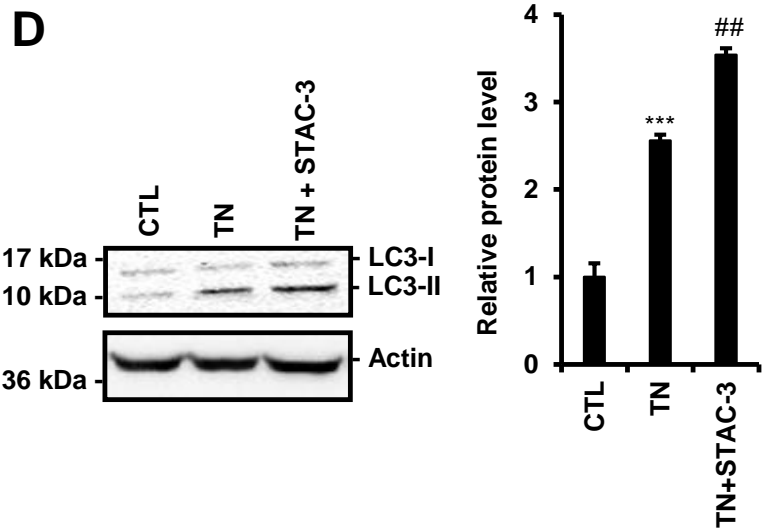
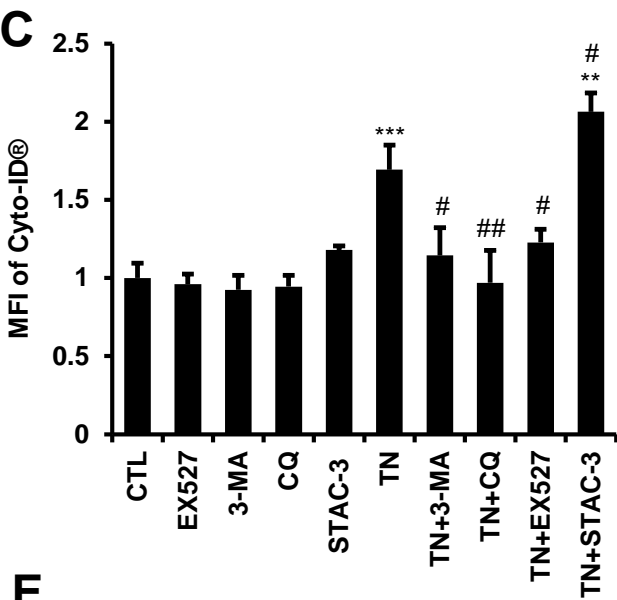
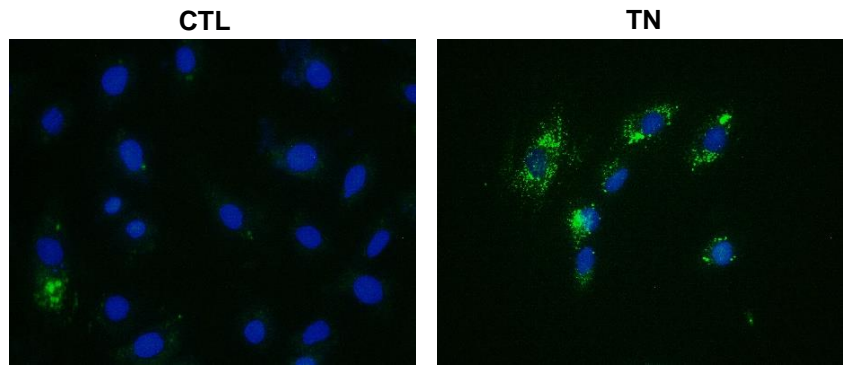
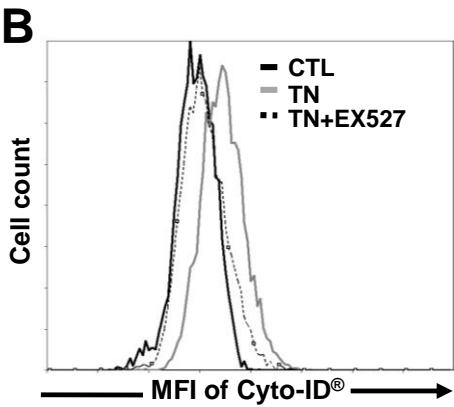
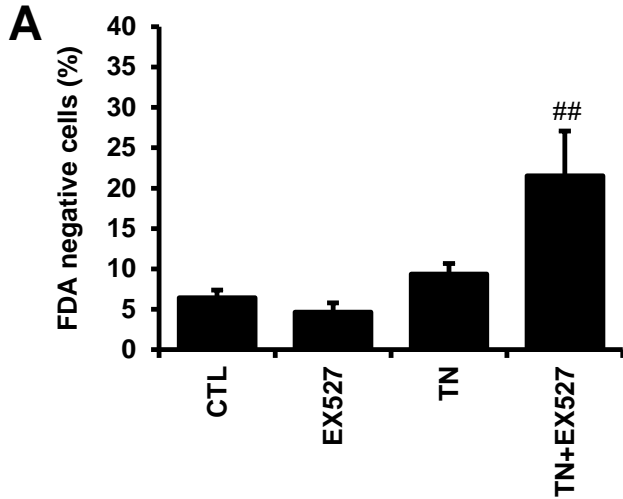
Figure S5. Effects of PP2A inhibition by endothall on ER stress-induced cell death.

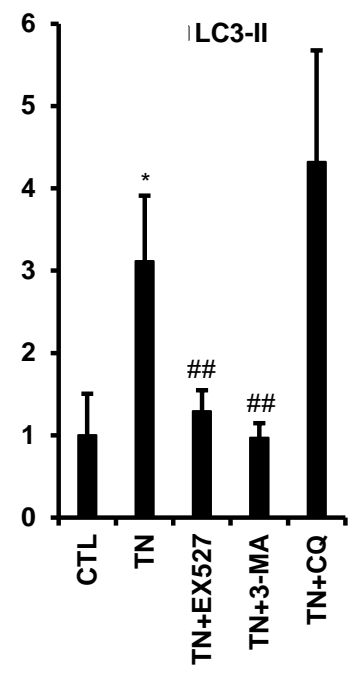
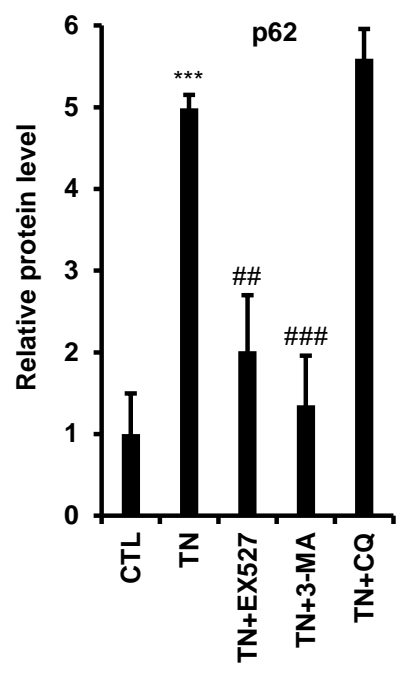
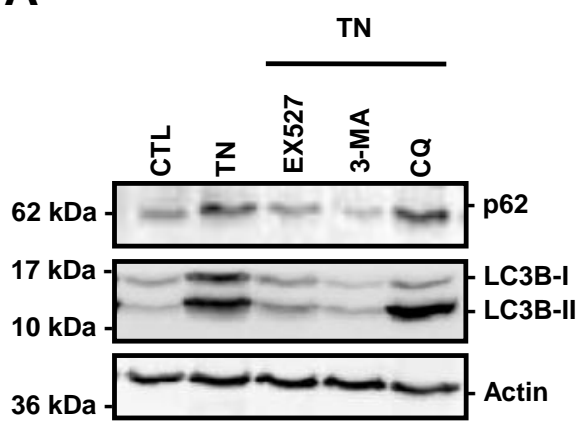
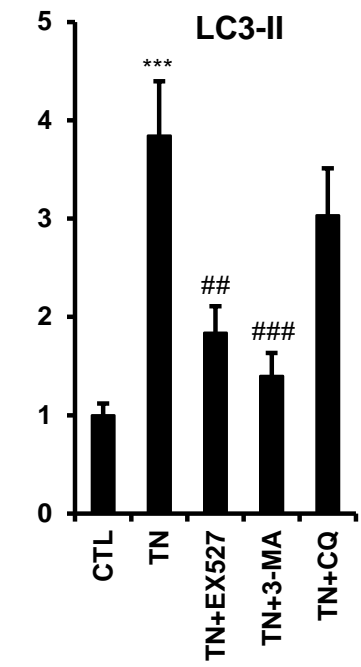
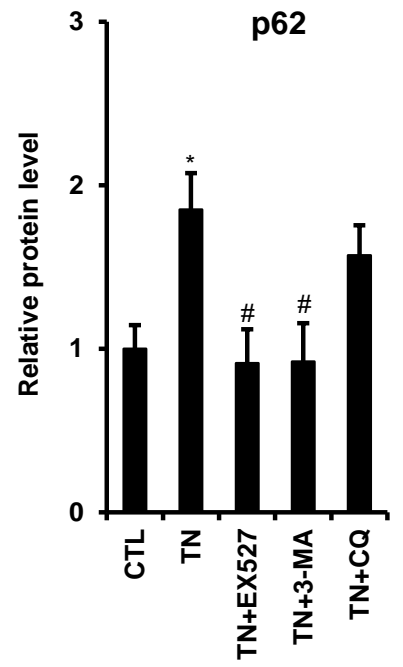
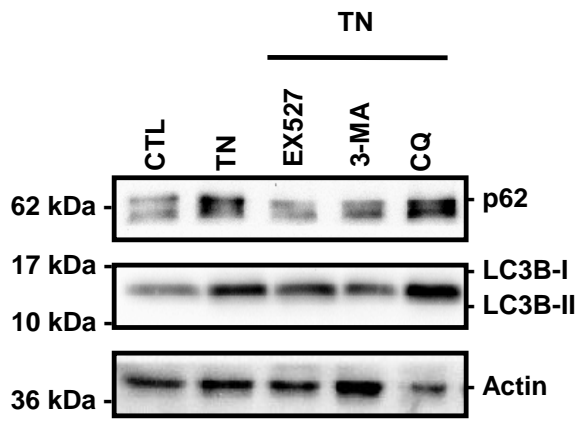
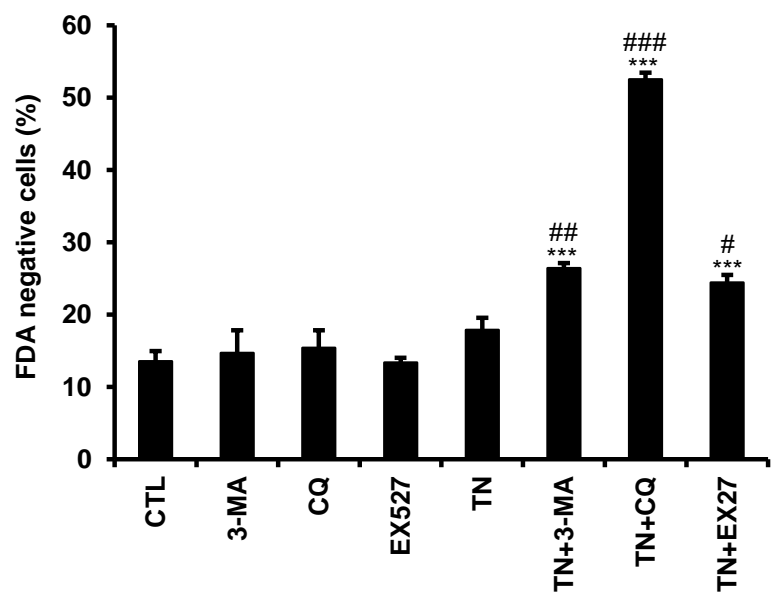
Percentage of cell death (FDA negative cells) was assessed by flow cytometry after TN (10 µg/ml) ± 10 µM Endothall treatment of cells for 48h. Results presented in graph are expressed as mean ± S.E.M. of percentages of dead cells (FDA-negative cells, n=4).

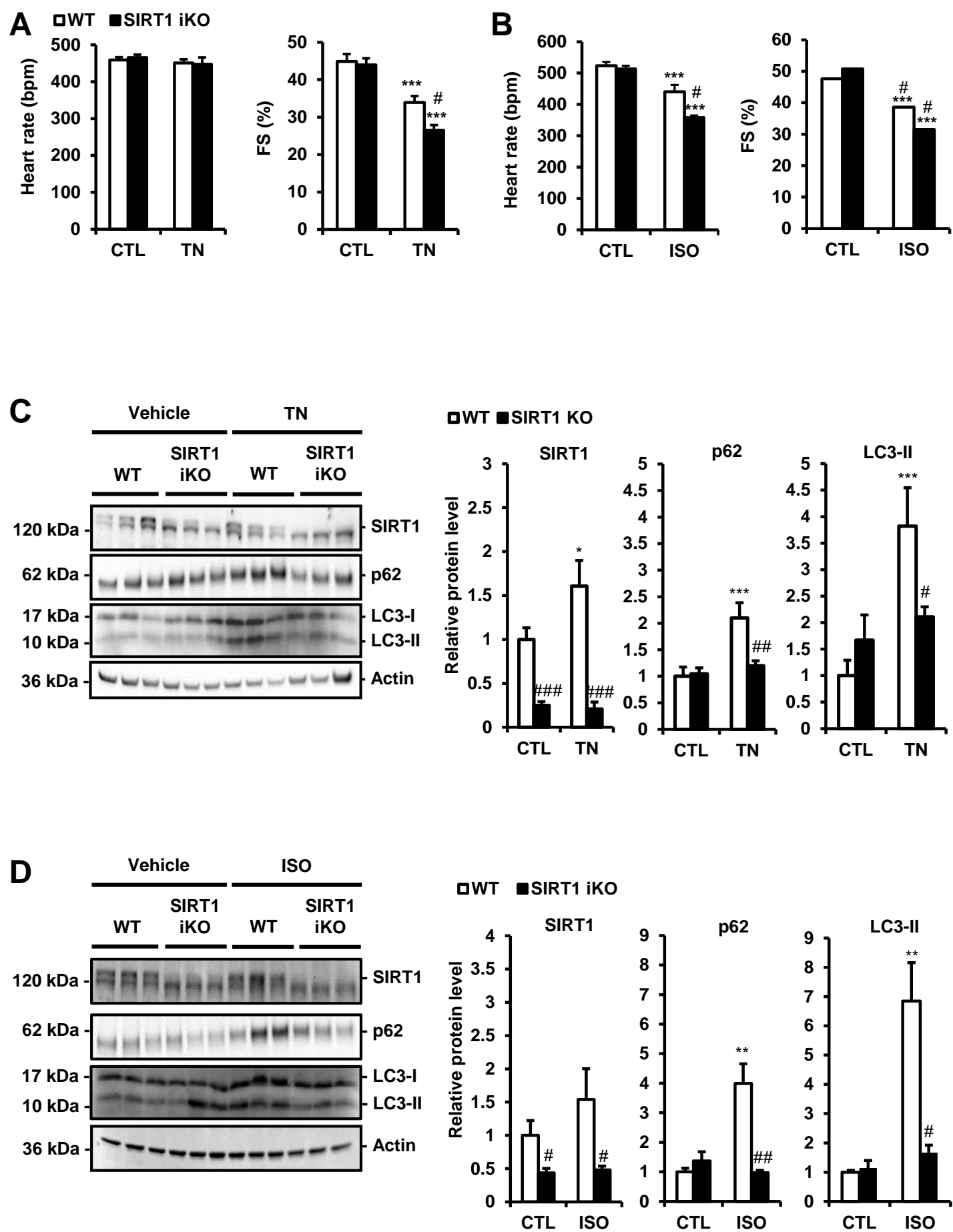
SUPPLEMENTAL TABLES

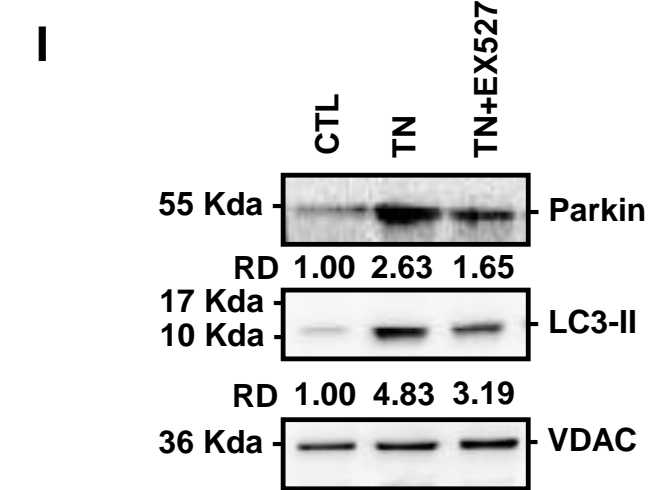
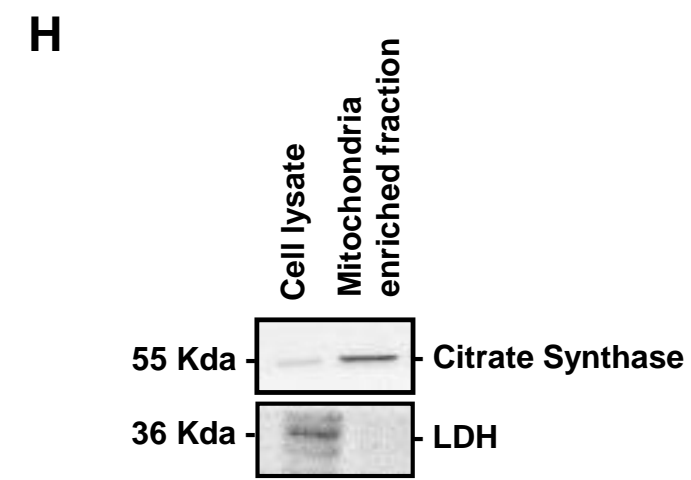
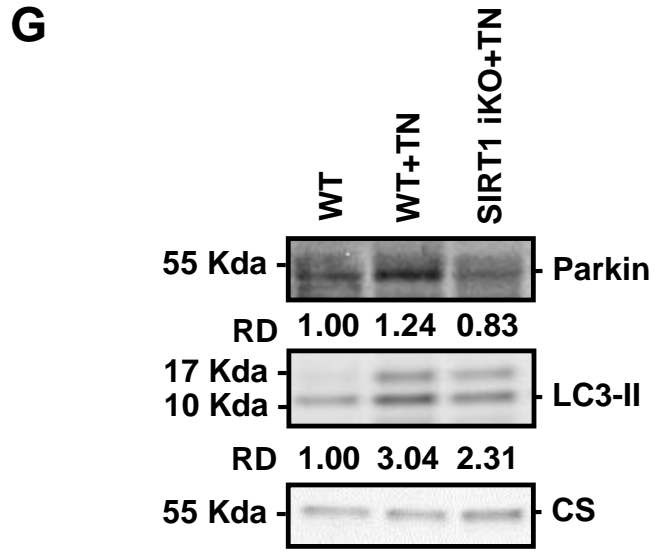
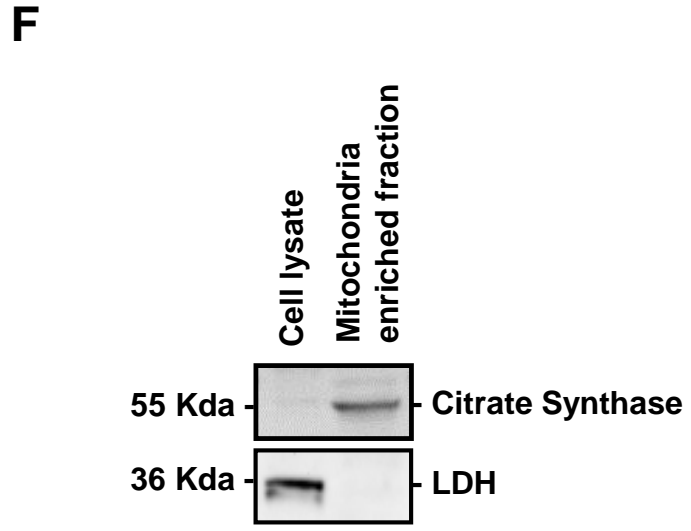
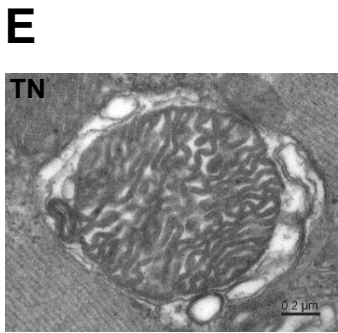
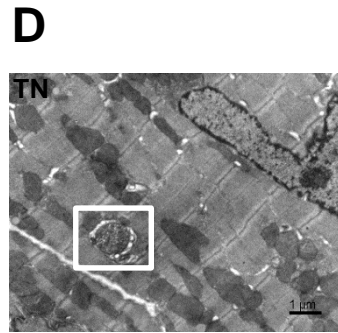
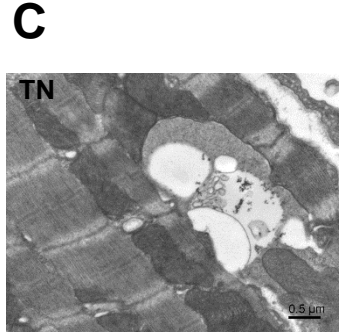
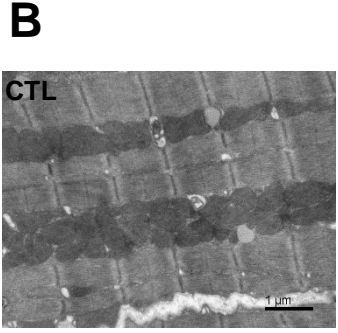
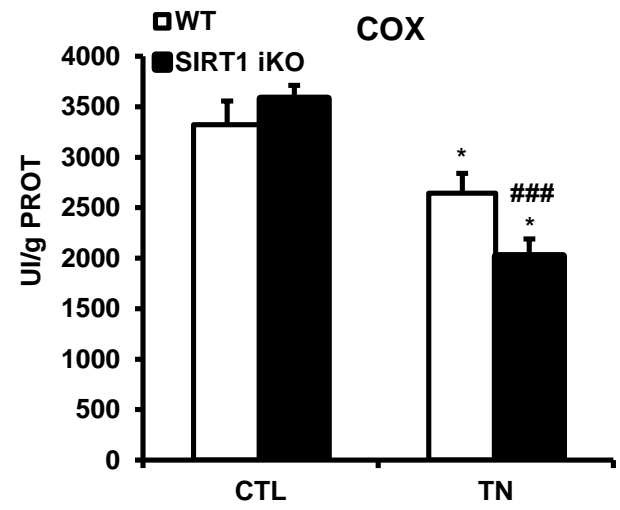
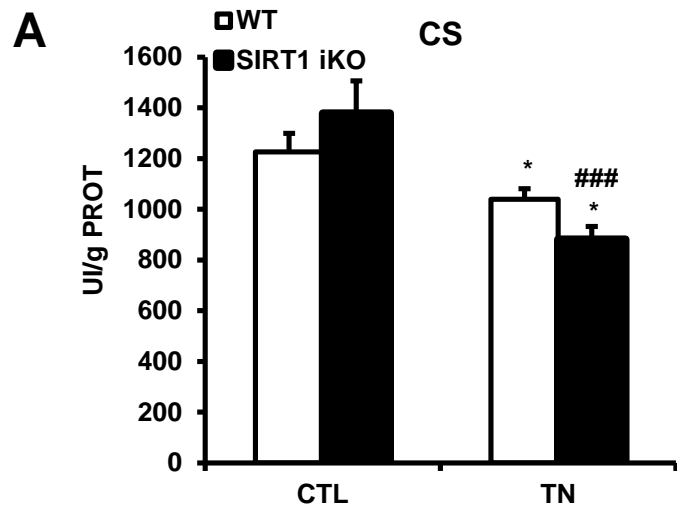
Table S1. Sequence of qPCR primers used in this study

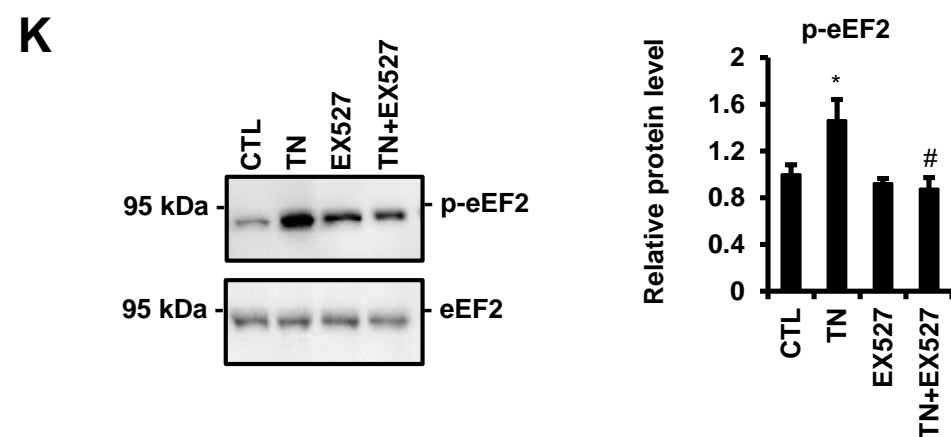
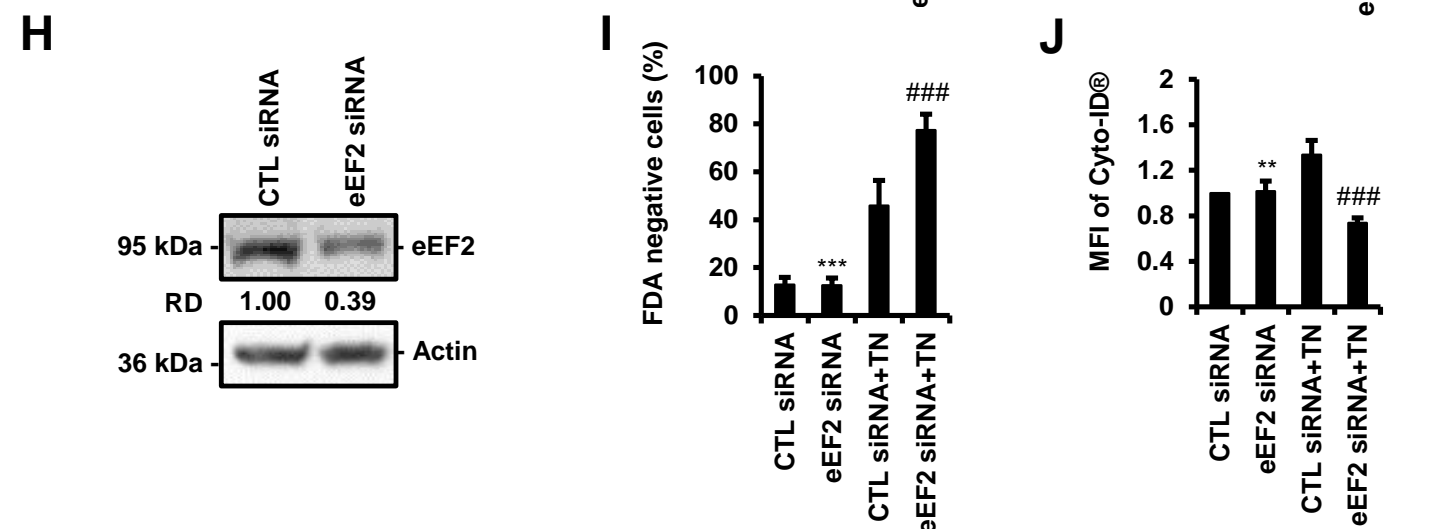
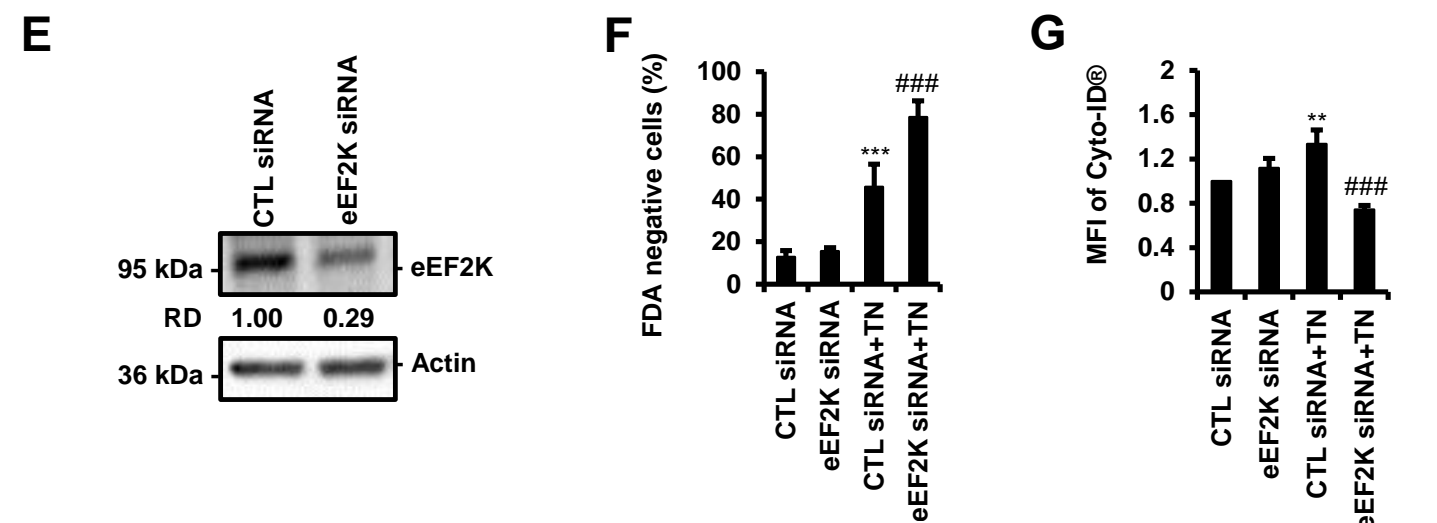
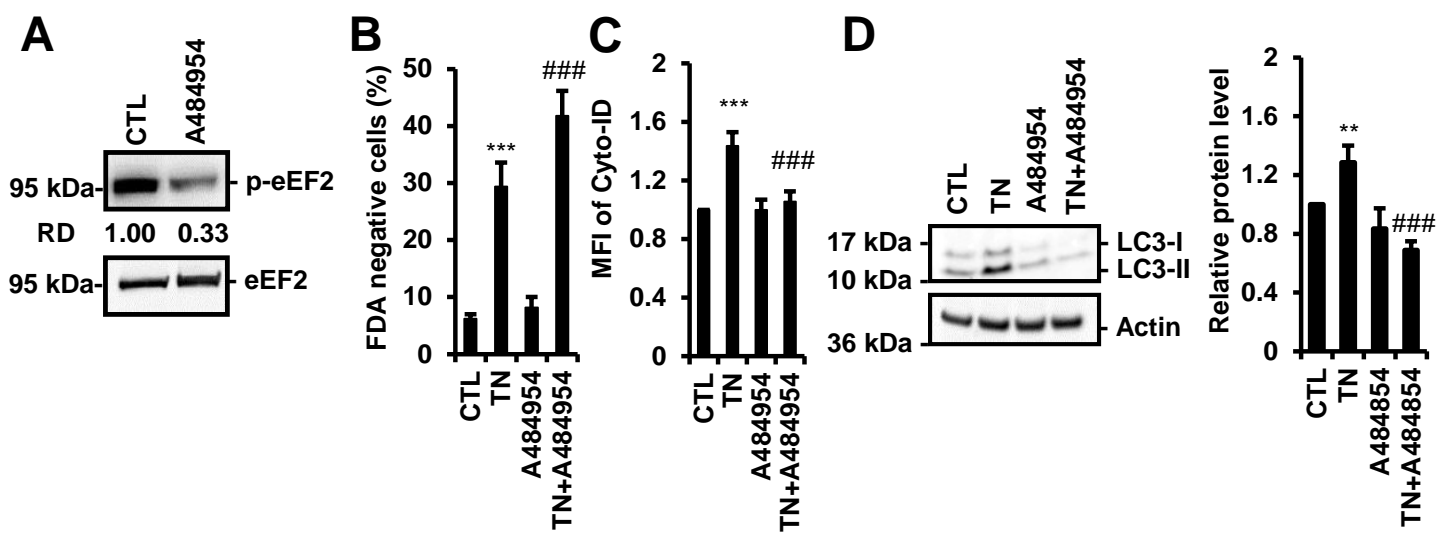
A**B****C****D****E****F**

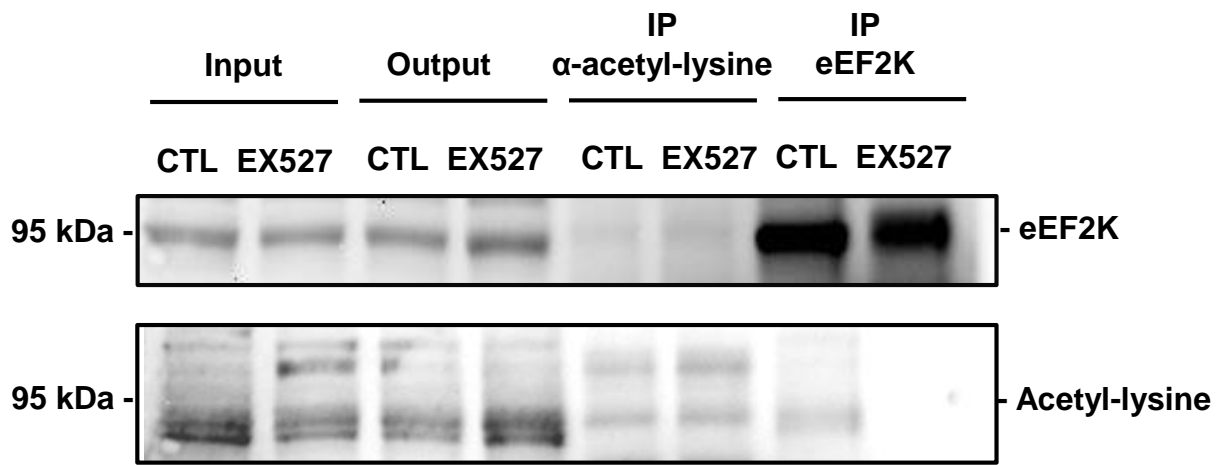
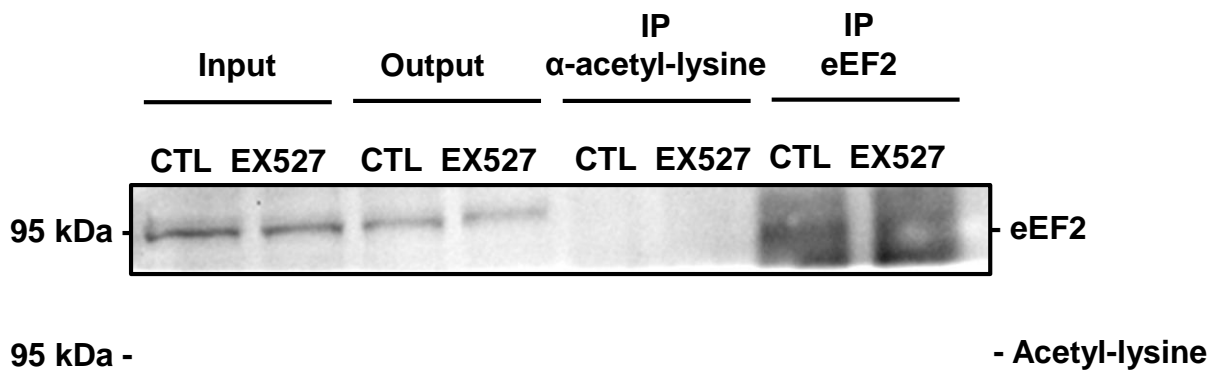
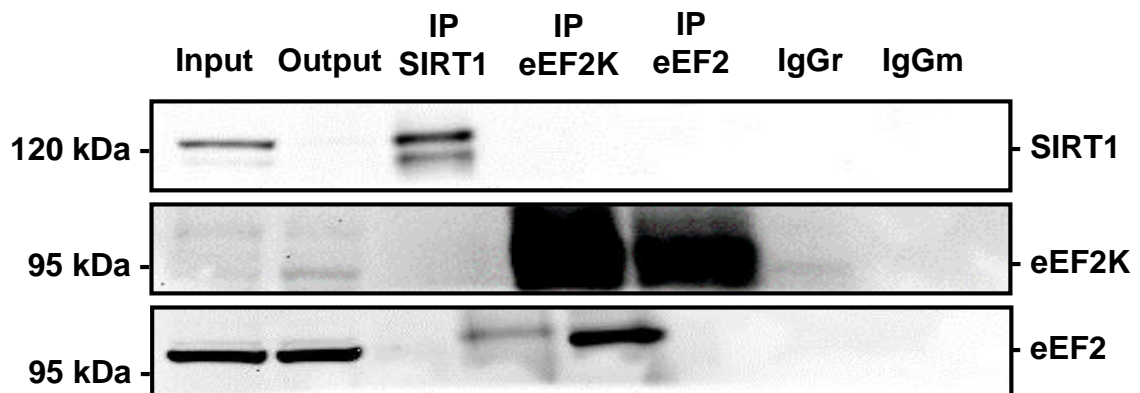


A**B****C**

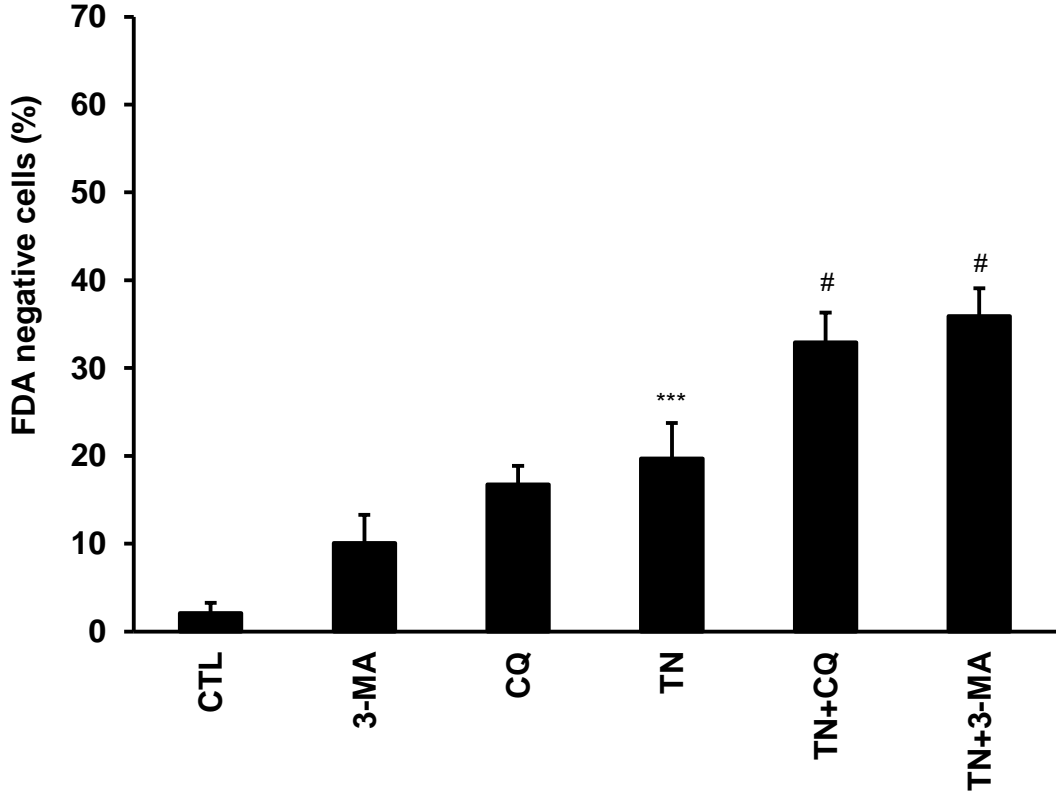
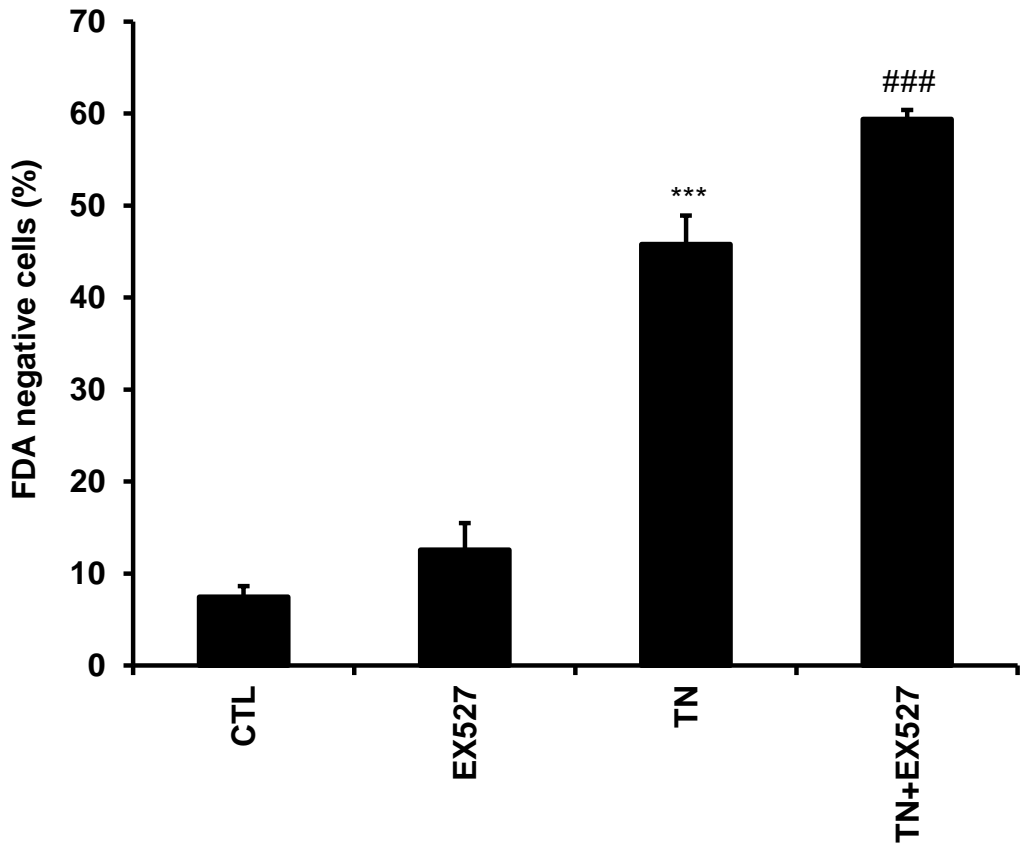


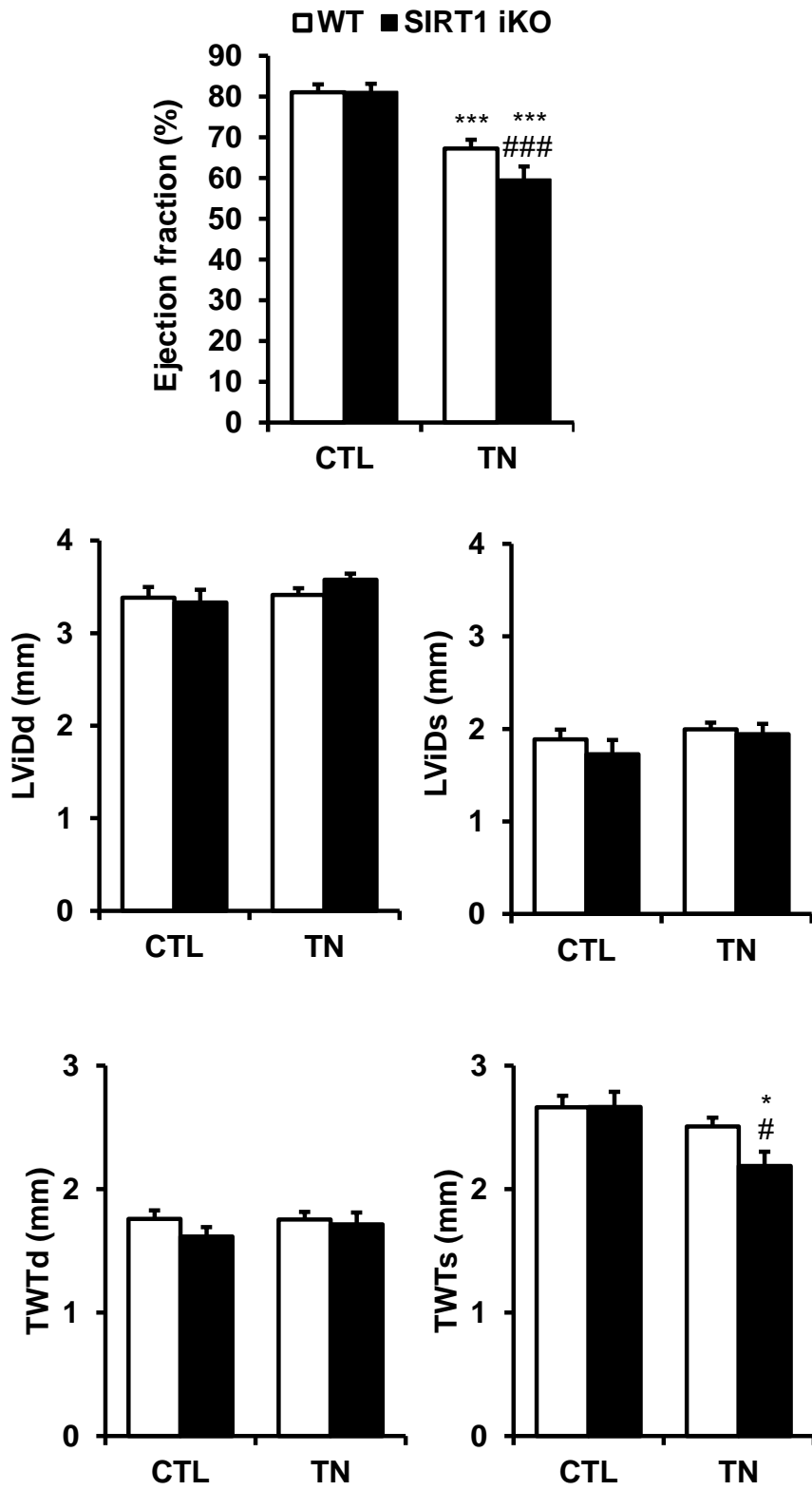


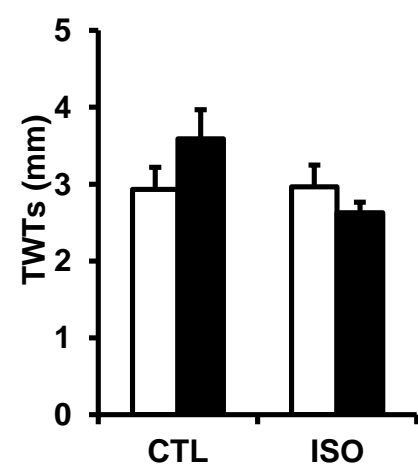
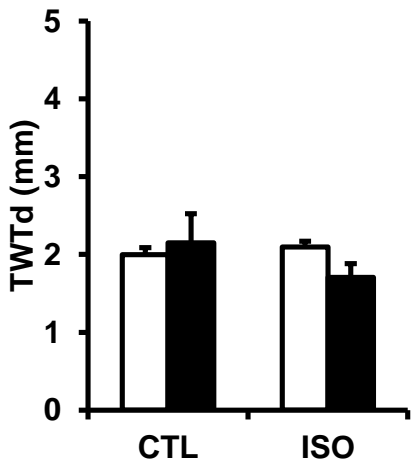
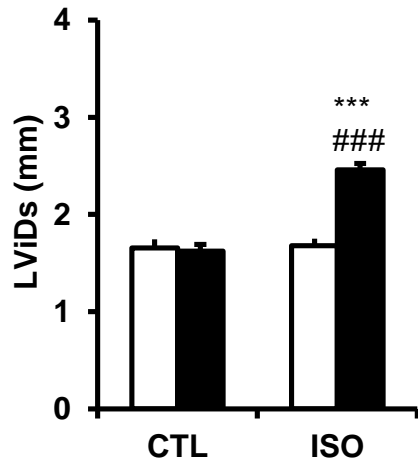
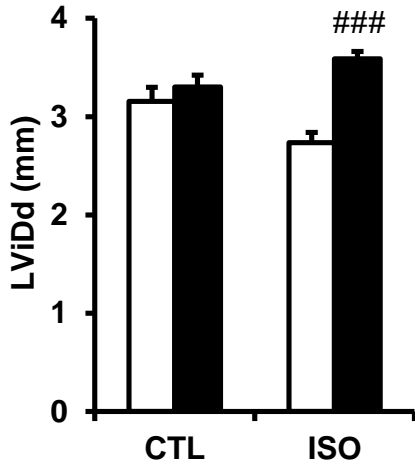
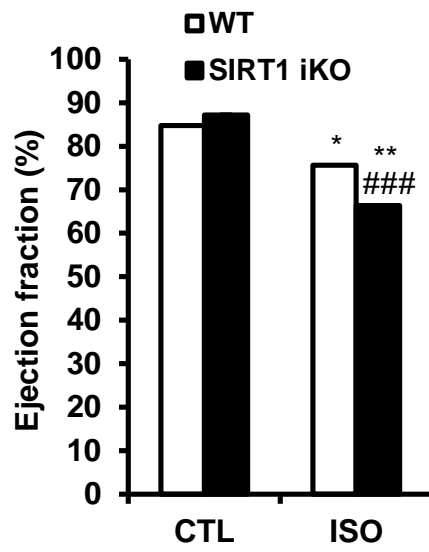


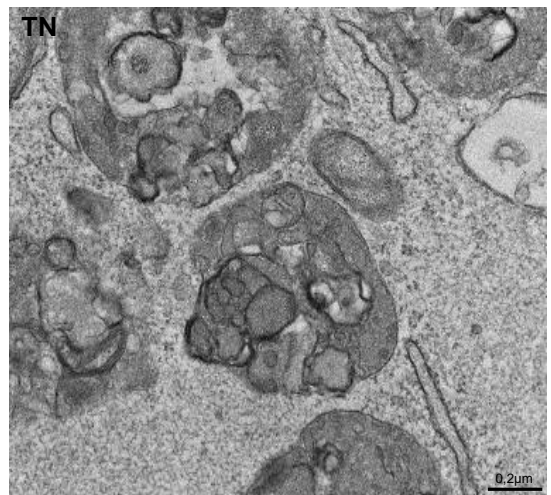
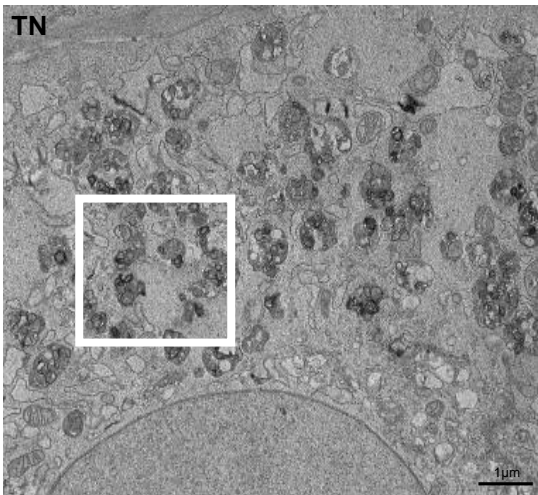
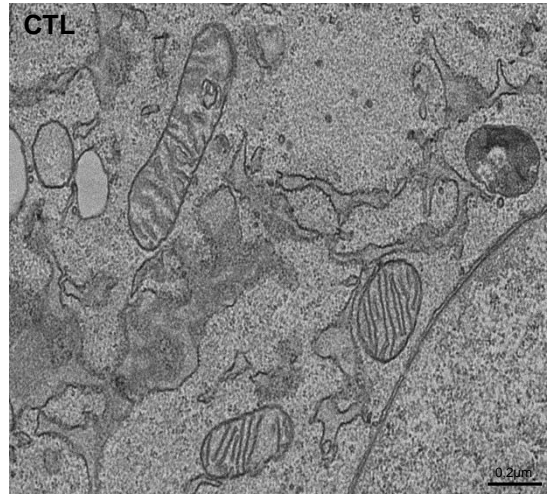
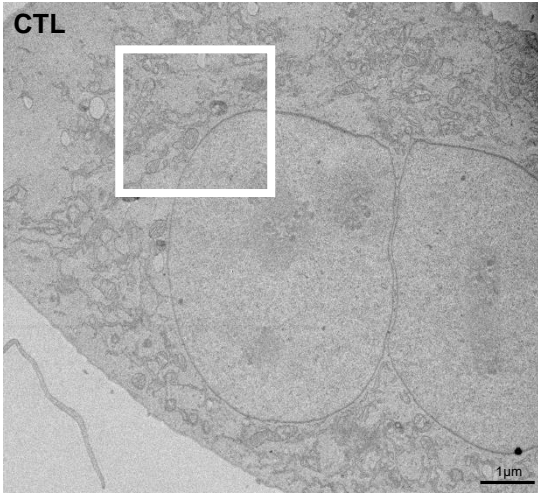
A**B****C**

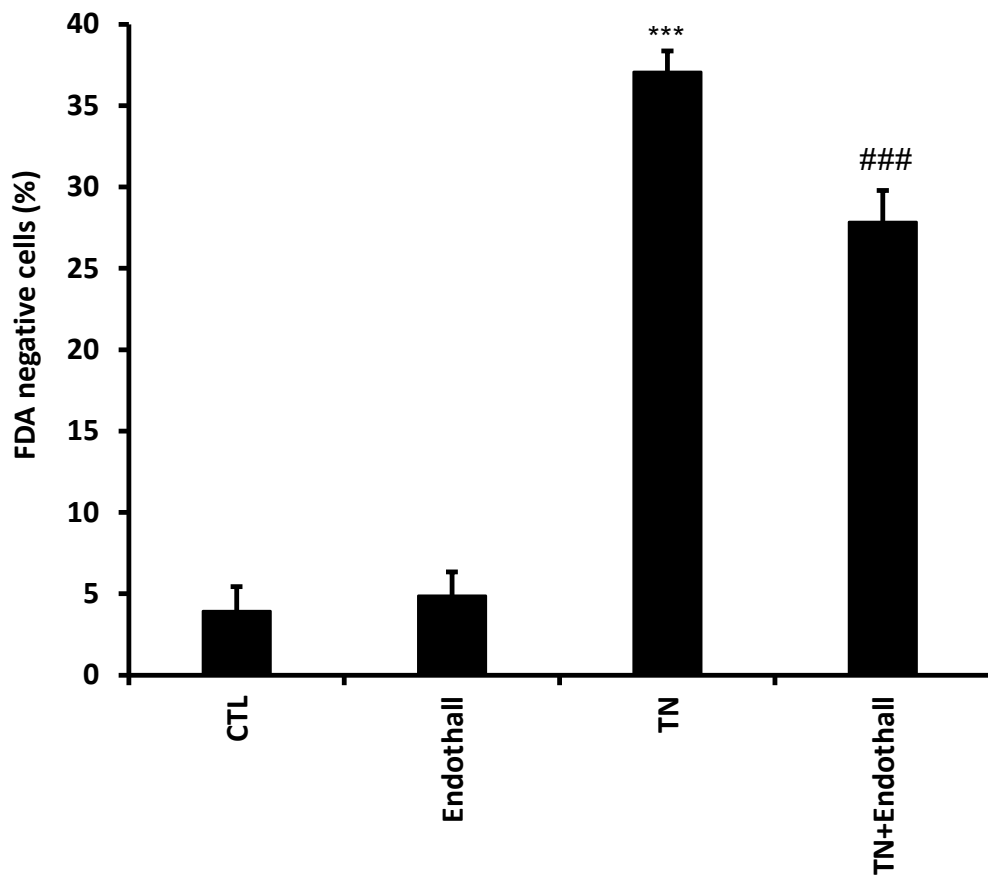
Gene	Species	Forward primer	Reverse primer
Atf4	Rat mouse	AAACCTCATGGGTTCTCCAG	TCTCCAACATCCAAGTGTCC
Atg5	Rat mouse	TTAGGGCAAGCTTTTTAGATGG	GCGGAAGGACAGACTTCTC
BiP/Grp78	Rat mouse	TGCAGCAGGACATCAAGTTC	TTTCTTCTGGGGCAAATGTC
Chop	Rat mouse	TATCTCATCCCCAGGAAACG	CAGGGTCAAGAGTAGTGAAGGTTT
Gadd34	Rat mouse	GGACCCTGAGATTCCTCTGA	GCCAGACAGCAAGGAAAT
Lc3-II	Rat mouse	CCTGGACAAGACCAAGTTCC	CCATTCACCAGGAGGAAGAA
P58ipk	Rat mouse	CAGTTTCATGCTGCCGTAGA	GCTTTTGATTTGCCCATAGC
p62	Rat mouse	TGACATCTTCCGCATCTACATT	ATAGCGAGTTCCCACCACAG
Parkin	Rat mouse	AACTCCAGCCATGGTTTCC	AAATCACACGCAACTGGTCA
Pdia4	Rat mouse	CTG ATT GGA CAC CTC CAC CT	AGG GGC AAG TTT CTT GCA G
Xbp1s	Rat mouse	TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG	ACAGGGTCCAAGTGTCCAG

A**B**









Article 4

Ben Salem I, Boussabbeh M, Pires Da Silva J, Guilbert A, Bacha H, Abid-Essefi S and Lemaire C.

SIRT1 protects cardiac cells against apoptosis induced by zearalenone or its metabolites α - and β -zearalenol through an autophagy-dependent pathway

Toxicology and Applied Pharmacology (2017) 1;314:82-90. doi: 10.1016/j.taap.2016.11.012

Contexte scientifique :

Dans le cadre d'une collaboration de longue date avec le Laboratoire de Recherche sur les Substances Biologiquement Compatibles (LRSBC), de la faculté de Monastir en Tunisie, nous avons étudié la toxicité cardiaque de mycotoxines. Les mycotoxines sont produites par les champignons qui se développent sur de nombreux substrats (fourrages, céréales, ensilages) lors du stockage des récoltes dans de mauvaises conditions (notamment en cas d'humidité excessive). La majorité des mycotoxines sont très résistantes à la chaleur et aux traitements chimiques et ne sont pas éliminées lors de la cuisson des aliments, ni lors de leur pasteurisation. L'ingestion de nourriture contenant des mycotoxines peut donc provoquer des intoxications appelées mycotoxicoses, qui peuvent avoir des effets graves, voir mortels tant chez l'homme que chez l'animal (Alshannaq and Yu, 2017). Nous nous sommes particulièrement intéressés ici à la zéaraléone et à ses métabolites α - et β -zéaralénol qui sont produits par certains champignons du genre *Fusarium* (incluant *F. graminearum*, *F. culmonorum*, *F. equiseti*, *F. cerealis*). En plus de ses effets toxiques rapportés sur le foie, les systèmes immunitaire, intestinal et rénal, nos collaborateurs ont montré que la zéaraléone induit également une cardiotoxicité *in vivo* (Salem et al., 2016).

Afin de mieux comprendre les mécanismes de la toxicité cardiaque de la zéaraléone et de ses métabolites, nous avons mené une étude dans laquelle nous avons cherché : 1) à mieux comprendre les mécanismes cellulaires de la toxicité cardiaque de ces mycotoxines en analysant plus particulièrement l'autophagie et l'apoptose, et 2) à déterminer si l'activation de SIRT1 peut protéger les cellules cardiaques de la toxicité de ces mycotoxines.

Résultats :

Par des expériences de cytométrie en flux et de Western Blot, nous avons mis en évidence dans les cardiomyoblastes de rat H9c2 et des cardiomyocytes adultes, que la zéaraléone et ses métabolites induisent l'apoptose de manière dose dépendante via l'activation de la voie mitochondriale (production de ROS, chute du potentiel de membrane mitochondrial, activation des caspases). De manière intéressante, l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose est précédée par l'activation du processus autophagique. Cette autophagie apparaît cardioprotectrice car son inhibition par la chloroquine augmente significativement la mort des cellules cardiaques en réponse à la zéaraléone ou à ses métabolites. Nous montrons également que l'inhibition (EX527) ou l'inactivation de SIRT1 (siRNA SIRT1) augmente l'apoptose induite par la zéaraléone et ses métabolites, alors que son activation par le resvératrol est protectrice. De plus, lorsque l'autophagie est inhibée par la chloroquine, l'activation de SIRT1 par le resvératrol ne permet plus de protéger les cellules

cardiaques contre la toxicité des mycotoxines, suggérant que SIRT1 protège les cellules cardiaques de la cardiotoxicité de la zéaralénone et de ses métabolites en activant l'autophagie.

Conclusions :

Cette étude a montré que la mycotoxine zéaralénone et ses métabolites sont toxiques pour les cellules cardiaques et entraînent l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. De plus, l'activation pharmacologique de SIRT1 limite la cardiotoxicité de ces mycotoxines en activant le processus autophagique. De manière intéressante, si l'on rapproche cette étude de celle présentée précédemment utilisant la TN ou l'ISO, nous observons que la cardiotoxicité des différentes molécules étudiées est diminuée lorsque l'autophagie est favorisée par SIRT1, confirmant que l'activation du processus autophagique médiée par SIRT1 est une approche très intéressante pour protéger les cardiomyocytes de l'apoptose induite par différents stress.



SIRT1 protects cardiac cells against apoptosis induced by zearalenone or its metabolites α - and β -zearalenol through an autophagy-dependent pathway



Intidhar Ben Salem^{a,b}, Manel Boussabeh^{a,b}, Julie Pires Da Silva^c, Arnaud Guilbert^c, Hassen Bacha^a, Salwa Abid-Essefi^{a,*}, Christophe Lemaire^d

^a Laboratory for Research on Biologically Compatible Compounds, Faculty of Dentistry, Rue Avicenne, 5019 Monastir, Tunisia

^b Faculty of Sciences of Bizerte, Carthage University, Tunisia

^c Inserm UMR-S 1180, Univ Paris-Sud, Université Paris Saclay, 92296 Chatenay-Malabry, France

^d Université Versailles St-Quentin, Inserm UMR-S 1180, Univ Paris-Sud, Université Paris Saclay, 92296 Chatenay-Malabry, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2016

Revised 17 November 2016

Accepted 22 November 2016

Available online 23 November 2016

Keywords:

ZEN

α -ZOL

β -ZOL

Apoptosis

Autophagy

SIRT1

ABSTRACT

Zearalenone (ZEN) is a non-steroidal estrogenic mycotoxin produced by several species of *Fusarium* in cereals and agricultural products. The major ZEN metabolites are α -zearalenol (α -ZOL) and β -zearalenol (β -ZOL).

In the present study, we investigated the underlying mechanism of the toxicity induced by ZEN, α -ZOL and β -ZOL in cardiac cells (H9c2). We show that treatment with ZEN or its metabolites induces the activation of the mitochondrial pathway of apoptosis as characterized by an increase in ROS generation, a loss of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) and an activation of caspases. Besides, we demonstrate that these mycotoxins promote the activation of autophagy before the onset of apoptosis. Indeed, we observed that a short-time (6 h) treatment with ZEN, α -ZOL or β -ZOL, increased the level of Beclin-1 and LC3-II and induced the accumulation of the CytolD® autophagy detection probe. Moreover, the inhibition of autophagy by Chloroquine significantly increased cell death induced by ZEN, α -ZOL or β -ZOL, suggesting that the activation of autophagy serves as a cardioprotective mechanism against these mycotoxins.

In addition, we found that the inhibition (EX527) or the knockdown of SIRT1 (siRNA) significantly increased apoptosis induced by ZEN or its derivatives, whereas SIRT1 activation with RSV greatly prevents the cytotoxic effects of these mycotoxins. By contrast, when autophagy was inhibited by CQ, the activation of SIRT1 by RSV had no protection against the cardiotoxicity of ZEN or its metabolites, suggesting that SIRT1 protects cardiac cells by an autophagy-dependent pathway.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Zearalenone (ZEN) is a non-steroid estrogen mycotoxin that is frequently found in many crops and foods at a high incidence (Scudamore and Patel, 2000; Zinedine et al., 2007). ZEN is produced by several *Fusarium* species via a polyketide mechanism (Zinedine et al., 2007). Upon uptake, ZEN is metabolized in intestines and liver to different intermediates including α - and β -zearalenol (α - and β -ZOL), α - and β -zearalanol (α - and β -ZAL), and zearalanone (ZAN) (Kiessling and Petterson, 1978; Palyusik et al., 1980). Among these, α -ZOL and β -ZOL are considered as the most predominant metabolites (Mirocha et al.,

1981). ZEN and its metabolites are known to induce toxicity by competitive binding to estrogen receptors and by modifying steroid metabolism and causing functional and morphological changes in reproductive organs (Zinedine et al., 2007). Indeed, α -ZOL and β -ZOL may have the potential to cause reproductive dysfunctions as well as to affect the maturation of porcine and bovine oocytes (Diekman and Green, 1992; Alm et al., 2002).

Independently of their binding affinity to estrogen receptor, ZEN and its metabolites have also been demonstrated to exert cytotoxic and genotoxic effects. For instance, ZEN, α -ZOL and β -ZOL have been shown to be immunotoxic, hepatotoxic and nephrotoxic (Marin et al., 2010). Different reports have shown *in vitro* and *in vivo* that ZEN and its derivatives induce cytotoxicity through reactive oxygen species (ROS) production leading to lipid peroxidation, DNA damages and apoptosis by the mitochondrial pathway (Abid-Essefi et al., 2004; Hassen et al., 2007; Ben Salem et al., 2015a, 2015b). Recently, ZEN, α -ZOL and β -ZOL were also shown to induce endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated apoptosis in HCT116 cells (Ben Salem et al., 2015a, 2015b).

Abbreviations: ZEN, zearalenone; α -ZOL, α -zearalenol; β -ZOL, β -zearalenol; SIRT1, silent mating type information regulator 2 homolog 1; RSV, resveratrol; CQ, chloroquine.

* Corresponding author at: Laboratory for Research on Biologically Compatible Compounds (LRSBC), Faculty of Dentistry, Rue Avicenne, 5019 Monastir, Tunisia.

E-mail address: salwaabid@yahoo.fr (S. Abid-Essefi).

While numerous reports focused on elucidating the mechanisms by which ZEN and its derivatives induce dysfunctions of their target organs in the reproductive system, few studies have showed their effects in the cardiovascular system. Recently, we found that ZEN induces cardiotoxicity in mice through the activation of oxidative stress and cell death (Ben Salem et al., 2015c). However, the detailed mechanisms by which ZEN and its metabolites exert their cytotoxic effects in cardiac cells remain unclear. Therefore, we investigated the cellular mechanisms involved in the cardiotoxicity of ZEN, α -ZOL and β -ZOL and we examined whether activation of the NAD⁺-dependent lysine deacetylase SIRT1, which is activated in response to various cellular stress (Haigis and Sinclair, 2010), is protective.

In our study, we chose to deeply examine the pathways involved in response to Zearalenone and its derivative using H9c2 cells and to validate our findings in adult cardiomyocytes. In fact, H9c2 cells are potential surrogates for primary cardiac cells since they express specific cardiac markers including N-cadherin and the L-type calcium channel and they were characterized as embryonic cardiomyocytes with electrical and hormonal signaling pathways preserved as in adult cardiac cells (Sipido and Marban, 1991; Wu et al., 1996; Petrovski et al., 2011). Indeed, by contrast to adult cardiomyocytes isolated from rat hearts, H9c2 cells are in sufficient number to allow deep investigation, they can be analyzed by flow cytometry and they can be efficiently transfected with siRNA.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Zearalenone, α -, β -Zearalenol, EX527, Resveratrol and Chloroquine were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate buffer saline (PBS), trypsin–EDTA, penicillin and streptomycin mixture, propidium iodide (PI), Fluorescein diacetate (FDA), MitoSOX™ Red and Hanks' balanced salt solution (HBSS) were supplied by Invitrogen (Saint Aubin, France). All others compounds were purchased from Sigma–Aldrich and all the used chemicals were of analytical grade.

2.2. Cell culture and treatment

Cardiomyoblast H9c2 cell line derived from embryonic rat heart (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France), were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml of penicillin and 100 μ g/ml of streptomycin in 175 cm² tissue culture flasks at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. ZEN, α - and β -ZOL were dissolved in pure DMSO. To obtain the studied concentrations in cell culture media, the mycotoxin treatment volume was negligible and represented about 0.025% of the total medium volume. In these conditions, untreated cells and cells receiving this low vehicle volume responded in the same manner. For this reason, we have chosen untreated cells as control. For the experiments performed in the presence of Chloroquine (CQ), EX527 and Resveratrol (RSV), the compounds were added to the cells, 2 h prior to mycotoxin treatment, respectively at concentrations of 50 μ M, 50 μ M and 20 μ M.

2.3. Flow cytometry analysis

The fluorescent probe fluorescein diacetate (FDA) was used to assess cell viability. After treatment, cells were incubated for 5 min at 37 °C with FDA at 0.2 μ g/ml. To measure the relative levels of mitochondrial superoxide anion, O₂^{•-}, the probe MitoSOX™ Red was used. Once in the mitochondria, MitoSOX™ Red reagent is oxidized by superoxide anion and exhibits red fluorescence. Cells with red fluorescence were recorded by flow cytometry and correspond to the population of MitoSOX high cells presented in figures. Cells were centrifuged, washed with PBS and incubated with 2 μ M of MitoSOX™ Red for 10 min at 37 °C.

MitoSOX™ Red fluorescence was immediately analyzed by flow cytometry (at least 10,000 cells). Caspase-3 activation was assessed using DEVD–NucView 488 caspase-3 substrate. After treatment, cells were incubated with 5 μ M DEVD–NucView 488 for 30 min at RT before cytometric analysis. Fluorescence of cells was analyzed on a FC500 cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France). The percentage of small cells was obtained by gating the cell population with decreased forward-angle light scatter (FSC) and increased side-angle light scatter (SSC) signals on cytograms.

2.4. Measurement of mitochondrial membrane potential

The uptake of the cationic fluorescent dye rhodamine-123, a positively charged molecule which accumulates within mitochondria in inverse proportion to $\Delta\psi_m$ according to the Nernst equation, was used for the estimation of mitochondrial membrane potential (Debbasch et al., 2001). In a typical experiment, the seeded cells in 96-well culture plates were treated with ZEN or its metabolites for 24 h, then cells were carefully rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), and 100 μ l of rhodamine-123 (1 μ M) in PBS was replaced on the plates. Cells were returned to the incubator (37 °C, 5% CO₂) for 15 min. Next, the supernatant PBS (containing unuptaken rhodamine-123) was removed and replaced by fresh PBS. The uptake rhodamine-123 was measured by fluorimetric detection, on a fluorimeter (Biotek FL 800 \times) with an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 522 nm. The fluorescence intensity is proportional to the rhodamine-123 uptake.

2.5. Isolation of adult rat ventricle cardiomyocytes

All experiments were carried out according to the European Community guiding principles in the care and use of animals (2010/63/EU). Authorizations to perform animal experiments according to this decree were obtained from the Ministère Français de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation (n°92-283, June 27, 2007).

Male Wistar rats (250–300 g) were anaesthetized by sodium thiopental injection (100 mg/kg) and the depth of anaesthesia was checked by toe pinch. Adult rat ventricular myocytes (ARVMs) were obtained by retrograde perfusion as previously described (Verde, 1999). Isolated cardiomyocytes were plated onto dishes coated with laminin and were kept at room temperature for 2 h before treatment for 24 h at 37 °C under 5% CO₂/95% air. After treatment, ARVM viability was assessed by FDA assay. >1000 cells were counted for each condition and representative micrographs were taken on a Leica fluorescence microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France).

2.6. Western blot analysis

Cells were lysed in RIPA lysis buffer (50 mM Tris–HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid) plus a cocktail of protease inhibitors (Roche) and PMSF for 30 min at 4 °C. Proteins (30 μ g) were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes (Merck Millipore). Membranes were incubated overnight at 4 °C with the following antibodies: anti-LC3A/B (NB100/2220H) from Novus and anti-Becn-1 (Img/5423/1) from IMGEX. Proteins were detected on a ChemiDoc XRS (BioRad) by using the ECL method according to the manufacturer's instructions (Merck Millipore). To calculate the relative density (RD), ImageJ software was used and the intensity of each protein was normalized to β -actin. The data obtained were then expressed as the ratio of the intensity of the protein in treated cells to that of the corresponding protein in untreated cells.

2.7. siRNA transfection

A mixture of five SIRT1 siRNA provided as a single reagent was purchased from Santa Cruz. H9c2 cells were plated overnight at

25×10^3 cells in 24-well plate and were transfected with 16pg of SIRT1 siRNA oligonucleotides or non-target control oligonucleotides according to manufacturer's instructions. 24 h after transfection, the medium was removed and cells were treated or not with the mycotoxins for 24 h.

2.8. Statistical analysis

Each experiment was done at least three times separately. Values were presented as means \pm S.D. One-way ANOVA was used to assess differences among groups followed by Dunnett's post hoc test. When two groups were compared, differences were assessed by Student's *t*-test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. ZEN and its major metabolites induce cell death in cardiac cells

To determine the cytotoxicity of Zearalenone and its metabolites in cardiac cells, H9c2 cells were exposed to increasing concentrations of ZEN, α -ZOL or β -ZOL ranging from 20 to 100 μ M for 24 h and cell death was determined by flow cytometry using FDA assay. Our results indicate that ZEN and its derivatives induced a marked increase in cell death in a dose-dependent manner (Fig. 1A). The LD₅₀ values, determined after 24 h of cell treatment, were about 50, 75 and 80 μ M for ZEN, α -ZOL and β -ZOL, respectively. The cardiotoxicity of these mycotoxins was also evaluated in isolated adult rat ventricular cardiomyocytes. After 24 h of treatment, a dose-dependent cell death

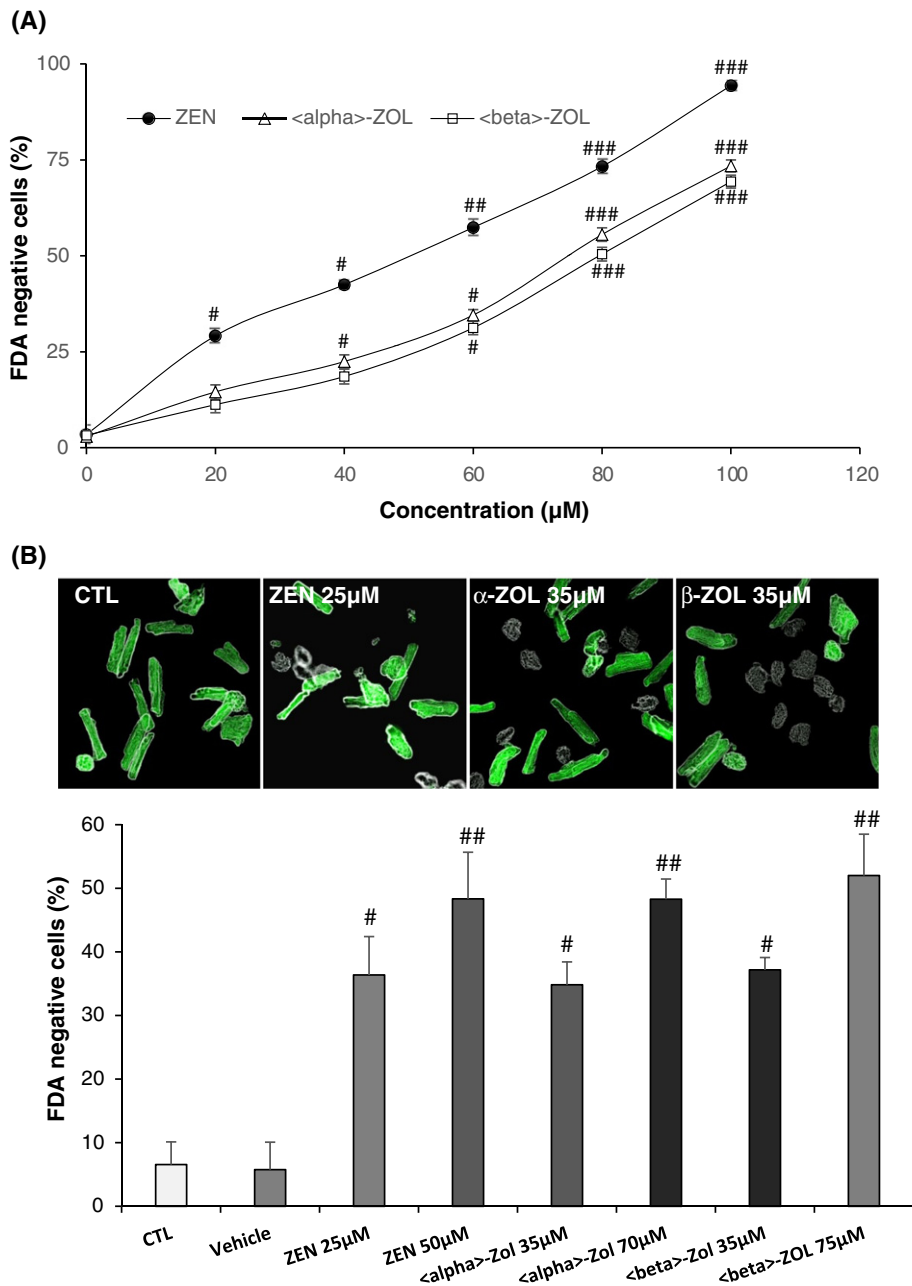


Fig. 1. ZEN and its major metabolites induce cell death in H9c2 cardiomyblasts and in adult cardiomyocytes (A) H9c2 cells were treated with ZEN, α -ZOL or β -ZOL at the indicated concentrations for 24 h (B) Adult cardiomyocytes were treated with ZEN, α -ZOL or β -ZOL at the indicated concentrations for 24 h. Cell viability was determined using the FDA assay and expressed as percentages of FDA negative cells (dead cells). Data are expressed as the mean \pm S.D. of three independent experiments. Values are significantly different ($p < 0.05$) from control # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ vs. control.

was observed in adult cardiomyocytes in response to ZEN, α -ZOL and β -ZOL (Fig. 1B), as in H9c2 cell line. These results indicate that ZEN and its major metabolites are cytotoxic to cardiac cells.

3.2. ZEN, α -ZOL and β -ZOL induce apoptosis via a mitochondria-mediated caspase-dependent pathway in H9c2 cells

To determine the mode of cell death (apoptosis/necrosis) induced by ZEN and its metabolites in cardiac cells and the mechanisms involved, H9c2 cells were stained with propidium iodide (PI) to estimate necrosis, Rhodamine 123 (Rhod123) to evaluate the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$), and DEVD-NucView 488 caspase-3 substrate to monitor caspase-3 activation. Average cell size was also recorded by flow cytometry. After 24 h of treatment with ZEN, α -ZOL or β -ZOL, a very low percentage of PI-positive cells (necrotic cells) was

observed (Fig. 2A, <10%), while the percentage of small cells, a feature of apoptotic cells, was increased significantly (Fig. 2B). In addition, the decrease in the uptake of Rhod123 demonstrated that these mycotoxins promote a decrease in the mitochondrial membrane potential (Fig. 2C). The percentage of cells with active caspases-3 (NucView 488 positive cells) was augmented in response to ZEN, α -ZOL and β -ZOL, indicating that caspases are activated (Fig. 2D). Besides an increase in the expression of the pro-apoptotic protein BAX was noticed (Fig. 2E). Therefore, the cardiotoxicity of ZEN and its metabolites occurs at least through an activation of the mitochondrial pathway of apoptosis.

3.3. ZEN and its metabolites induce ROS generation in H9c2 cardiac cells

To evaluate the role of ROS in the mitochondrial apoptosis promoted by ZEN and its derivatives, we analyzed the production of fluorescent

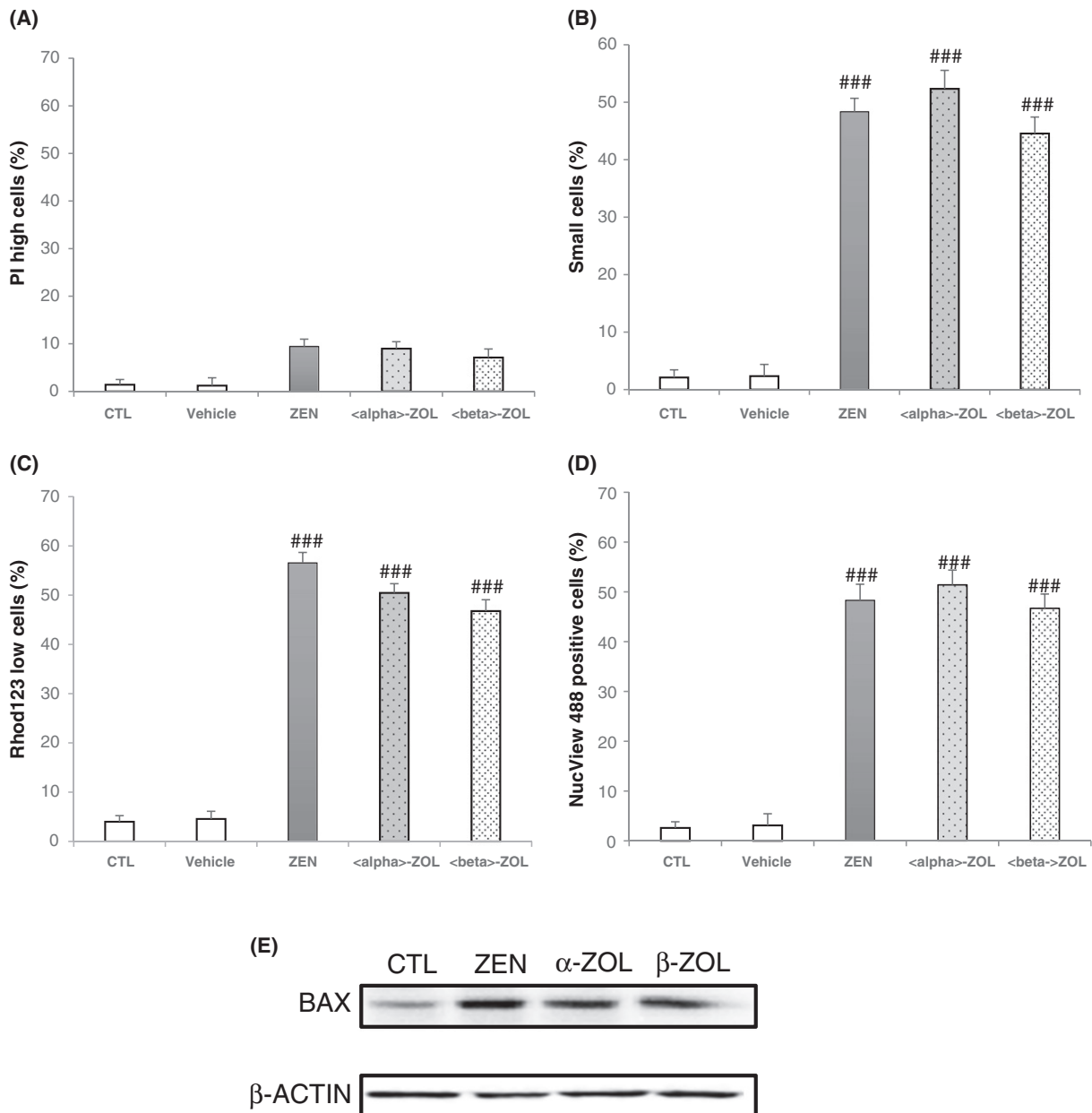


Fig. 2. ZEN, α -ZOL and β -ZOL activate the mitochondrial pathway of apoptosis in H9c2 cells. **(A)** Cells were treated with ZEN (50 μ M), α -ZOL (75 μ M) or β -ZOL (80 μ M) for 24 h, then stained with the necrosis/late apoptosis probe propidium iodide (PI). **(B)** The percentages of small cells were determined by flow cytometry. **(C)** Treated cells were stained with the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$)-sensitive dye Rhod123. **(D)** The levels of active caspase-3 were determined after treatment with ZEN, α -ZOL or β -ZOL by flow cytometry analysis using the NucView 488 caspase-3 substrate. **(E)** The protein level of BAX was determined after treatment with ZEN, α -ZOL or β -ZOL by Western Blot. Data are expressed as the mean \pm S.D. of three independent experiments. ### P < 0.001 vs. control.

DCF (resulting from DCFH oxidation, mainly by H_2O_2) in response to these mycotoxins. As shown in Fig. 3A, ZEN, α -ZOL and β -ZOL increased significantly the level of ROS after 6 h and 24 h of exposure. Similarly, mitochondrial superoxide anion levels (assessed by staining cells with the MitoSOX probe) increased in H9c2 cells from $6.5 \pm 1.54\%$ in control to 70.2 ± 2.34 , 63.9 ± 3.45 and $58.5 \pm 2.87\%$ after 24 h of exposure to ZEN (50 μ M), α -ZOL (75 μ M) and β -ZOL (80 μ M), respectively (Fig. 3B). Thus, ZEN and its metabolites induce an oxidative stress through ROS generation in cardiac cells.

3.4. ZEN, α -ZOL and β -ZOL induce autophagy in cardiac cells

Different reports have presented evidence in support of a functional link between oxidative stress, autophagy and cell death (Martin and Barrett, 2002; Cuervo, 2008; Chen and Klionsky, 2011). Therefore, we investigated whether autophagic pathway takes part in the toxicity of ZEN and its derivatives in H9c2 cells. We first investigated the conversion of LC3-I into the active, autophagosomal membrane-bound form, LC3-II by western blotting, a reliable method for monitoring autophagic activity. As shown in Fig. 4A, the level of LC3-II increased after 6 h of exposure to ZEN (50 μ M), α -ZOL (75 μ M) or β -ZOL (80 μ M). Consistently, the protein level of the autophagy effector Beclin-1 was also increased (Fig. 4A). Furthermore, the increase of the mean fluorescence intensity of the CytoID® probe, that selectively labels autophagic vacuoles, confirms that ZEN and its metabolites induce autophagy in H9c2 cells (Fig. 4B). By contrast, after 6 h of treatment the apoptotic cell death did not occur as demonstrated by flow cytometry (Fig. 4C), suggesting

that autophagy occurs in cardiac cells before the onset of apoptosis. To investigate the relationship between autophagy and cell death, adult cardiomyocytes and H9c2 cells were pretreated for 2 h with the well-known autophagic inhibitor, chloroquine (CQ), before treatment with the mycotoxins for 24 h. As shown in Fig. 4D and E, the percentage of cell death significantly increased when cells were pretreated with CQ compared to those treated with the mycotoxins alone. These results suggest that autophagy acts primarily as a protective response against the toxicity of ZEN, α -ZOL and β -ZOL in cardiac cells.

3.5. Activation of SIRT1 protects cardiac cells from cell death induced by ZEN or its metabolites through an autophagy dependent pathway

Sirtuin 1 (SIRT1) is a NAD^+ -dependent deacetylase that involves in the regulation of a number of cellular processes including transcription, aging, stress resistance, apoptosis and autophagy (Haigis and Sinclair, 2010; Alcendor et al., 2007). SIRT1 is known to regulate autophagy through the deacetylation of several autophagy components, such as ATG5, ATG7 and ATG8 (Lee et al., 2008). Here, we investigated whether SIRT1 could protect cardiac cells from apoptosis induced by ZEN or its derivatives through autophagy. To this end, adult cardiomyocytes and H9c2 cells were pretreated 2 h with the selective SIRT1 inhibitor, EX527 or with the SIRT1 activator, Resveratrol (RSV), before treatment with the mycotoxins for 24 h. The percentages of cell death (Fig. 5A and C) and caspase-3 induction (Fig. 5B) induced by ZEN, α -ZOL or β -ZOL were significantly increased when cells were pretreated with EX527 (50 μ M), whereas RSV (20 μ M) greatly reduced the apoptosis induced by these mycotoxins. Similarly, cell death was significantly increased when the expression of SIRT1 was reduced by transient transfection with SIRT1 siRNA (Fig. 5E). Taken together, these results demonstrate the role of SIRT1 in the protection of cardiac cells against the toxicity of ZEN and its metabolites. To study whether SIRT1 counteracts the cytotoxicity of ZEN, α -ZOL and β -ZOL by an autophagy dependent pathway, the protective effect of RSV was assessed in the presence of the autophagy inhibitor CQ by FDA assay. Our results indicate that when autophagy was inhibited by CQ, the activation of SIRT1 by RSV did not protect cardiac cells from the toxicity induced by the mycotoxins (Fig. 6). These findings support the hypothesis that SIRT1 protects cardiac cells through an autophagy-dependent pathway.

4. Discussion

Zearalenone (ZEN) is a mycotoxin produced by various *Fusarium* fungi, including *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* and *F. cerealis* and found in grains and animal feeds (Zinedine et al., 2007).

Following uptake, ZEN is transformed via intestinal and hepatic metabolisms to α -zearalenol (α -ZOL) and β -zearalenol (β -ZOL), which are also produced by *Fusarium* in lower levels than ZEN (Kuiper-Goodman et al., 1987; Olsen et al., 1981) and these metabolites can be even reduced to form α -zearalanol (α -ZAL) and β -zearalanol (β -ZAL).

The main focus of this study was to explore the mechanism underlying the toxicity induced by ZEN and its main metabolites α -ZOL and β -ZOL in cardiac cells and to determine whether activation of SIRT1 is protective. Our results show that ZEN and its metabolites are toxic to cardiac cells through activation of the mitochondrial pathway of apoptosis. In addition, we demonstrate that autophagy occurs before the onset of apoptosis and that activation of SIRT1 protects cardiac cells from these mycotoxins through an autophagy-dependent pathway.

We and others have previously shown that ZEN and its metabolites are toxic to different cells including intestinal, hepatic, renal or ovarian cells (Bouaziz et al., 2009; Tatay et al., 2014; Ben Salem et al., 2015a, 2015b), through apoptosis induction. Here, we demonstrate for the first time that ZEN, α -ZOL or β -ZOL also induce cell death in cardiomyocytes. This cell death is characterized by a relative persistence of the plasma membrane integrity, a dissipation of the mitochondrial membrane potential, an activation of caspases, and a reduction of cell

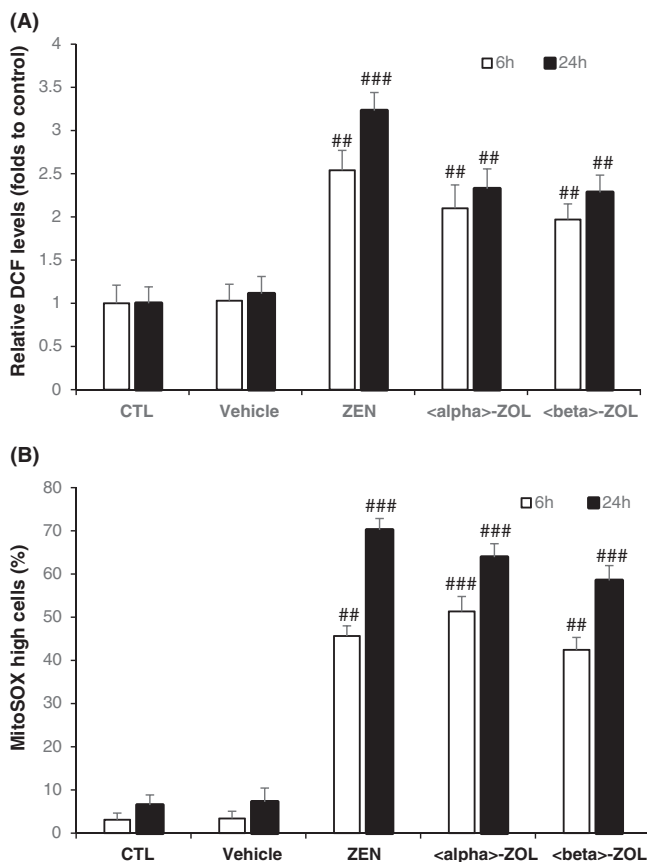


Fig. 3. ZEN, α -ZOL and β -ZOL induce ROS generation in H9c2 cells. Cells were treated for 6 h or 24 h with ZEN (50 μ M), α -ZOL (75 μ M) or β -ZOL (80 μ M). (A) Intracellular ROS generation was measured by analyzing DCF fluorescence. (B) Mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ production was evaluated by recording MitoSOX™ Red fluorescence. Data are expressed as the mean \pm S.D. of three independent experiments. ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ vs. control

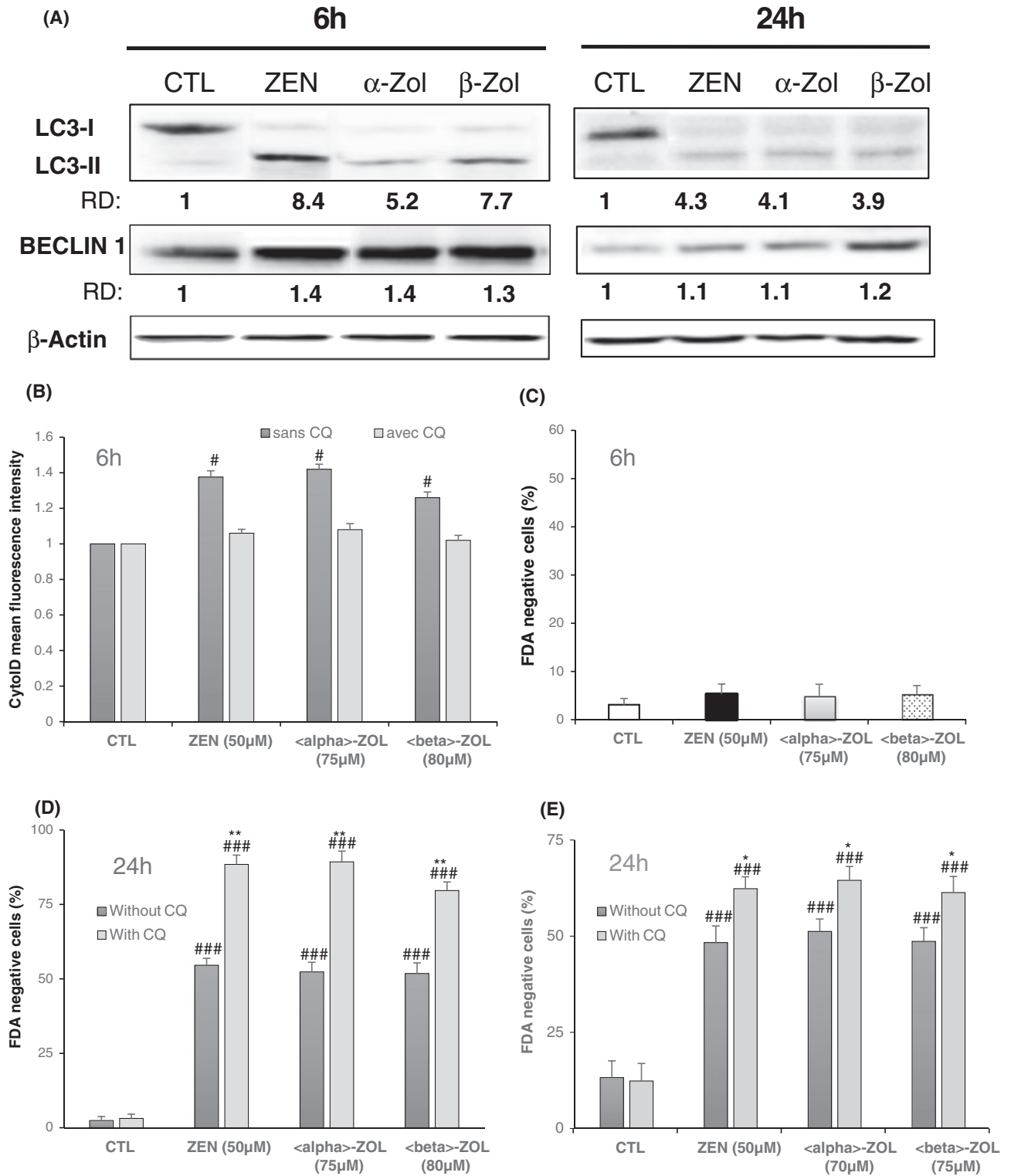


Fig. 4. ZEN and its major metabolites induce autophagy in H9c2 cells (A) H9c2 cells were incubated for 6 h and 24 h with ZEN (50 μ M), α -ZOL (75 μ M) or β -ZOL (80 μ M) and protein levels of the autophagy markers LC3-I, LC3-II and Beclin-1 were analyzed by western blot. β -Actin was used as a loading control. (B) Cells were treated with ZEN (50 μ M), α -ZOL (75 μ M) or β -ZOL (80 μ M), stained with the Cytold® probe for the detection of autophagy and analyzed by flow cytometry. (C) Cells were treated for 6 h with ZEN (50 μ M), α -ZOL (75 μ M) or β -ZOL (80 μ M) and cell death was measured using FDA assay. (D) H9c2 cells were pre-treated for 2 h with Chloroquine (CQ) before treatment with ZEN (50 μ M), α -ZOL (75 μ M) or β -ZOL (80 μ M) for 24 h (E) Adult cardiomyocytes were pre-treated for 2 h with Chloroquine (CQ) before treatment with ZEN (50 μ M), α -ZOL (70 μ M) or β -ZOL (75 μ M) for 24 h. cell death was measured using FDA assay. Data are expressed as the mean \pm SD of three separate experiments. # P < 0.05 and ### P < 0.001 vs. control, * P < 0.05 and ** P < 0.01 vs. mycotoxins alone.

size, indicating that ZEN, α -ZOL and β -ZOL induce apoptosis through a mitochondria-mediated caspase-dependent pathway.

ZEN and its derivatives are known to be potent inducers of ROS in mammalian systems (Bouaziz et al., 2009; Jia et al., 2014; Zhou et al.,

2015; Ben Salem et al., 2015a, 2015b). In this study, we also demonstrate that ZEN, α -ZOL and β -ZOL trigger oxidative stress in cardiac cells as evidenced by the over-production of intracellular and mitochondrial ROS. These findings provide mechanistic explanation for our recent

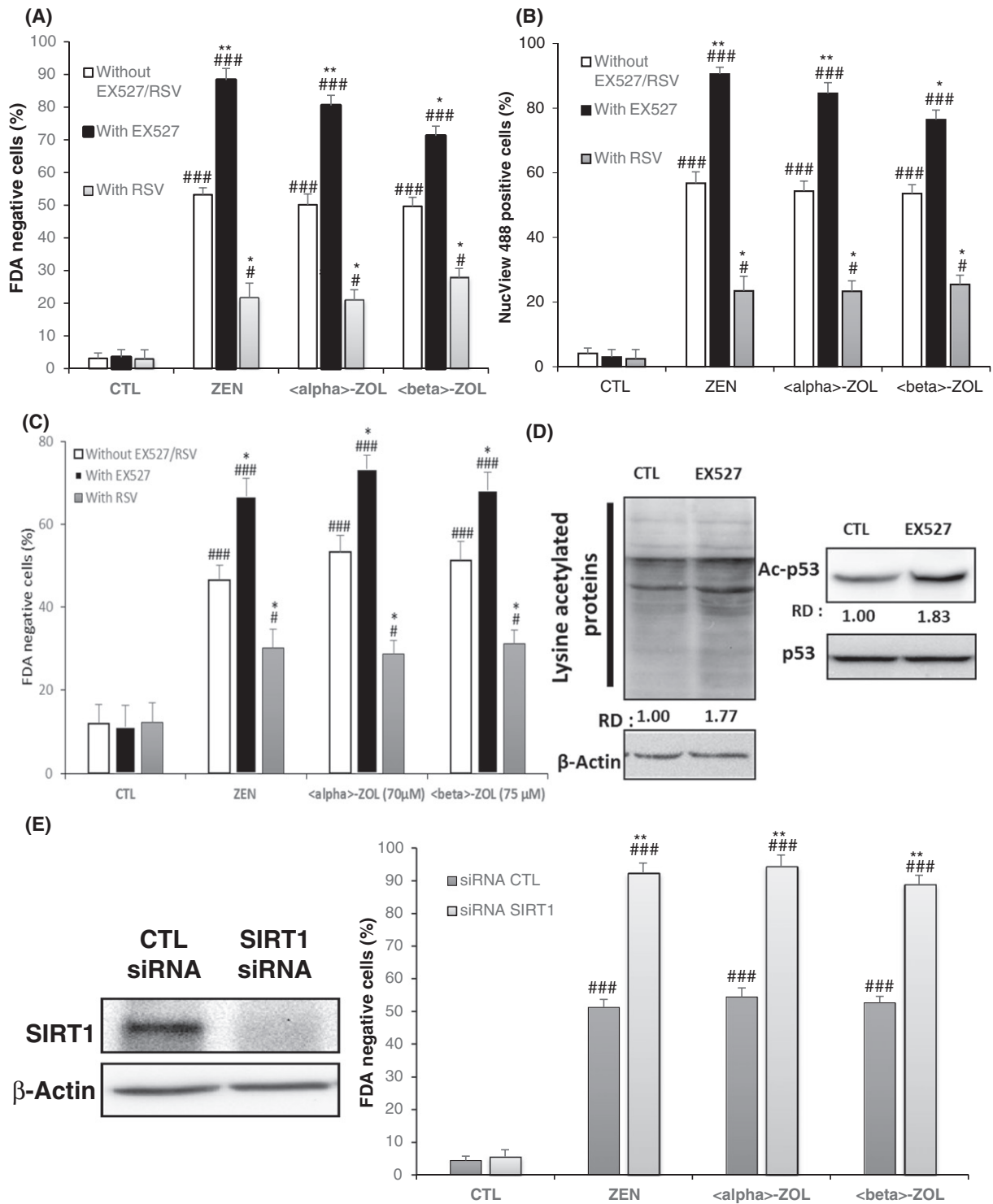


Fig. 5. SIRT1 mediates the toxicity induced by ZEN and its metabolites. **(A,B)** H9c2 cells were pre-treated for 2 h with SIRT1 inhibitor, EX-527 (50 μM), or SIRT1 activator, RSV (20 μM) before treatment with ZEN (50 μM), α -ZOL (75 μM) or β -ZOL (80 μM) for 24 h. **(C)** Adult cardiomyocytes were pre-treated for 2 h with SIRT1 inhibitor, EX-527 (50 μM), or SIRT1 activator, RSV (20 μM) before treatment with ZEN (50 μM), α -ZOL (70 μM) or β -ZOL (75 μM) for 24 h. **(D)** EX-527 inhibits SIRT1 in cardiac cells: inhibition of the lysine acetylation and of the transcription factor p53, a well-known target of SIRT1. **(E)** Cells were transfected by SIRT1 siRNA or control siRNA, then treated with ZEN (50 μM), α -ZOL (75 μM) or β -ZOL (80 μM) for 24 h. Cell death was measured using FDA assay and the levels of active caspase-3 were determined by flow cytometry analysis using the NucView 488 caspase-3 substrate. Data are expressed as the mean \pm SD of three separate experiments. # $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ vs. control, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. mycotoxins alone.

in vivo report that ZEN induces cardiotoxicity in mice through the activation of oxidative stress and cell death (Ben Salem et al., 2015c).

Autophagy is a key catabolic process that allows the recycling and the degradation of proteins and organelles through lysosome machinery under physiological or pathological conditions such as

neurodegenerative disorders, infectious diseases, cancer and other disorders (Levine and Kroemer, 2008; Choi et al., 2013). Several lines of evidence support an essential role for ROS generation in the induction of autophagy by directly controlling the enzymatic activity of ATG4 needed for maturation of LC3-family members and formation of LC3-II-

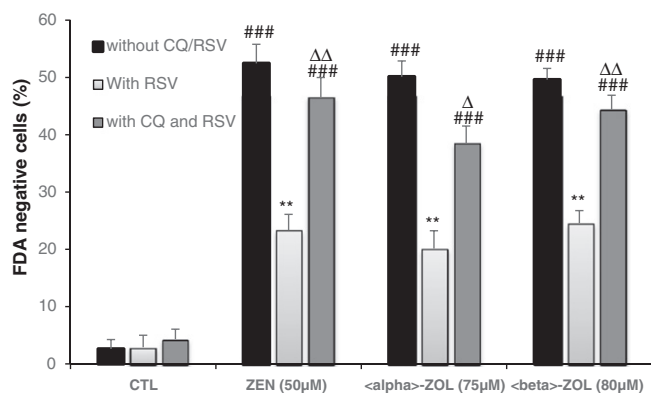


Fig. 6. SIRT1 protects cardiac cells by activating autophagy. H9c2 cells were pre-treated for 2 h with Chloroquine followed by the SIRT1 activator, RSV (20 μ M) before treatment with ZEN (50 μ M), α -ZOL (75 μ M) or β -ZOL (80 μ M) for 24 h. Cell death was measured using FDA assay. Data are expressed as the mean \pm SD of three separate experiments. ^{###} $P < 0.001$ vs. control, ^{**} $P < 0.01$ vs. mycotoxins alone, $\Delta P < 0.05$ and $\Delta\Delta P < 0.01$ vs. cells treated with RSV.

positive autophagosomes (Scherz-Shouval et al., 2007). In addition, it was recently reported that ROS cause an AMP-dependent activation of AMPK (Hawley et al., 2010), which plays a central role in the control of autophagy. Upon induction of autophagy, LC3 is proteolytically cleaved by ATG4 to generate cytosolic LC3-I, which is then converted by lipidation into the active, autophagosome membrane-bound form, LC3-II, making it a specific biochemical marker of autophagy in cells (Barth et al., 2010). Beclin-1 is an essential autophagy protein that regulates the initiation of autophagy and autophagosome-lysosome fusion (Matsunaga et al., 2009). Here, we observed that a short-time (6 h) treatment with ZEN, α -ZOL or β -ZOL, increased the level of Beclin-1 and LC3-II. Furthermore, ZEN and its metabolites induce the accumulation of the CytoldD® probe, an excitable fluorescent reagent which allows convenient quantification of autophagic cells by flow cytometry. By contrast, after 6 h of treatment no cell death was observed in response to the mycotoxins. These data suggest that ZEN and its metabolites promote activation of autophagy in cardiac cells before the onset of apoptosis. We then used the autophagy inhibitor Chloroquine to determine whether this activation of autophagy is beneficial or deleterious (Gatica et al., 2015). Our results show that CQ significantly increases cell death induced by ZEN, α -ZOL or β -ZOL, suggesting that activation of autophagy may counteract apoptosis and serve as a cardioprotective mechanism against these mycotoxins.

Growing evidence suggests that the NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 can be regarded as a new therapeutic target for the prevention of several diseases such as cancer, Alzheimer's, diabetes and atherosclerosis (Milne et al., 2007; Taylor et al., 2008). It has been also reported that SIRT1 suppresses cell death to protect cardiovascular function (Alcendor et al., 2007). Besides, recent studies reported that SIRT1 activates autophagy and protects neuronal cells, cardiomyocytes and embryonic fibroblasts (Lee et al., 2008; Hariharan et al., 2010; Puissant et al., 2010; Guo et al., 2013; Ou et al., 2014). Therefore, we investigated whether SIRT1 protects cardiac cells from the toxicity of ZEN and its metabolites through an autophagy-dependent pathway. We show that the inhibition (EX527) or the knockdown of SIRT1 (siRNA) significantly increased apoptosis induced by ZEN, α -ZOL or β -ZOL, whereas SIRT1 activation with RSV greatly prevents the cytotoxic effects of these mycotoxins. Thus, it can be assumed that SIRT1 plays a cardioprotective role against ZEN and its metabolites toxicity.

Although other studies suggest that higher dose of Resveratrol (50 μ M) markedly inhibits the starvation-induced autophagic response and show that this effect does not require SIRT1 as a target of resveratrol but p70 S6 kinase (S6K1) which is responsible for the inhibition of autophagy (Armour et al., 2009), here we demonstrate that, when autophagy was inhibited by CQ, activation of SIRT1 by RSV (20 μ M) showed no

protection against the cardiotoxicity of ZEN or its metabolites, suggesting that SIRT1 protects cardiac cells by activating autophagy which, in turn, blocks apoptosis.

Taken together, our results suggest that acute exposure (6 h) to ZEN and its metabolites increases oxidative stress, which activates autophagy through a SIRT1 dependent pathway. The induced SIRT1-mediated autophagy was efficient to maintain homeostasis and no toxic effect was observed at this time point (6 h). However, the chronic exposure (24 h) to ZEN and its derivatives induces a higher level of ROS. Thus, the activation of autophagy by SIRT1 seems to be insufficient to totally protect the cardiac cells and an apoptotic process occurs.

In conclusion, this study provides insights into the mechanism underlying the toxicity of ZEN and its two major metabolites α -ZOL and β -ZOL in cardiac cells and suggest that activation of SIRT1 is a promising strategy to limit the cardiotoxicity of these mycotoxins.

Conflict of interest statement

Authors declare no conflicts of interest.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgments

This study was supported by “Le Ministère Tunisien de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Technologie” and by grants from LabEx LERMIT. A. Guilbert received a fellowship from Région Ile de France CORDDIM.

References

- Abid-Essefi, S., Ouane, Z., Hassen, W., Baudrimont, I., Creppy, E.E., Bacha, H., 2004. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicol. in Vitro* 4, 467–474.
- Alcendor, R.R., Gao, S.M., Zhai, P.Y., Zablocki, D., Holle, E., Yu, X.Z., Tian, B., Wagner, T., Vatner, S.F., Sadoshima, J., 2007. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ. Res.* 100, 1512–1521.
- Alm, H., Greising, T., Brüßow, K.P., Torner, H., Tiemann, U., 2002. The influence of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol on in vitro maturation of pig oocytes and in vitro culture of pig zygotes. *Toxicol. in Vitro* 16, 643–648.
- Armour, S.M., Baur, J.A., Hsieh, S.N., Land-Bracha, A., Thomas, S.M., Sinclair, D.A., 2009. Inhibition of mammalian S6 kinase by resveratrol suppresses autophagy. *Aging* 1 (6), 515–528.
- Barth, S., Glick, D., Macleod, K.F., 2010. Autophagy: assays and artifacts. *J. Pathol.* 221, 117–124.
- Ben Salem, I., Prola, A., Boussabbeh, M., Guilbert, A., Bacha, H., Abid-Essefi, S., Lemaire, C., 2015a. Crocin and quercetin protect HCT116 and HEK293 cells from zearalenone-induced apoptosis by reducing endoplasmic reticulum stress. *Cell. Stress Chap. http://dx.doi.org/10.1007/s12192-015-0613-0*.
- Ben Salem, I., Prola, A., Boussabbeh, M., Guilbert, A., Bacha, H., Lemaire, C., Abid-Essefi, S., 2015b. Activation of ER stress and apoptosis by a- and b-zearalenol in HCT116 cells, protective role of Quercetin. *NeuroToxicology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2015.11.004>.
- Ben Salem, I., Boussabbeh, M., Neffati, F., Najjar, M.F., Abid-Essefi, S., Bacha, H., 2015c. Zearalenone-induced changes in biochemical parameters, oxidative stress and apoptosis in cardiac tissue: protective role of crocin. *Hum. Exp. Toxicol.* <http://dx.doi.org/10.1177/0960327115597467>.
- Bouaziz, C., Martel, C., Sharaf, O.D., Abid-Essefi, S., Brenner, C., Lemaire, C., Bacha, H., 2009. Fusarial toxin-induced toxicity in cultured cells and in isolated mitochondria involves PTPC-dependent activation of the mitochondrial pathway of apoptosis. *Toxicol. Sci.* 110, 363–375.
- Chen, Y., Klionsky, D.J., 2011. The regulation of autophagy—unanswered questions. *J. Cell Sci.* 124, 161–170.
- Choi, A.M., Ryter, S.W., Levine, B., 2013. Autophagy in human health and disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 651–662.
- Cuervo, A.M., 2008. Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends Genet.* 24, 604–612.
- Debbasch, C., Brignole, F., Pisella, P.J., Wamet, J.M., Rat, P., Baudouin, C., 2001. Quaternary ammoniums and other preservatives' contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 42, 642–652.
- Diekmann, M.A., Green, M.L., 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J. Anim. Sci.* 70, 1615–1627.

- Gatica, D., Chiong, M., Lavandero, S., Klionsky, D.J., 2015. Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system. *Circ. Res.* 116, 456–467.
- Guo, H., Chen, Y., Liao, L., Wu, W., 2013. Resveratrol protects HUVECs from oxidized-LDL induced oxidative damage by autophagy upregulation via the AMPK/SIRT1 pathway. *Cardiovasc Drugs Ther.* 27, 189–198.
- Haigis, M.C., Sinclair, D.A., 2010. *Annu. Rev. Pathol.* 5, 253–295.
- Hariharan, N., Maejima, Y., Nakae, J., et al., 2010. Deacetylation of FoxO by Sirt1 plays an essential role in mediating starvation-induced autophagy in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 107, 1470–1482.
- Hassen, W., Ayed-Boussema, I., Oscoz, A.A., De Cerain Lopez, A., Bacha, H., 2007. The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction. *Toxicology* 232, 294–302.
- Hawley, S.A., Ross, F.A., Chevtzoff, C., Green, K.A., Evans, A., Fogarty, S., Towler, M.C., Brown, L.J., Ogunbayo, O.A., Evans, A.M., Hardie, D.G., 2010. Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab.* 11, 554–565.
- Jia, Z., Liu, M., Qu, Z., Zhang, Y., Yin, S., Shan, A., 2014. Toxic effects of zearalenone on oxidative stress, inflammatory cytokines, biochemical and pathological changes induced by this toxin in the kidney of pregnant rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 580–591.
- Kiessling, K.H., Pettersson, H., 1978. Metabolism of zearalenone in rat liver. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 43, 285–290 (Copenh).
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 7, 253–306.
- Lee, I.H., Cao, L., Mostoslavsky, R., Lombard, D.B., Liu, J., Bruns, N.E., Tsokos, M., Alt, F.W., Finkel, T., 2008. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 3374–3379.
- Levine, B., Kroemer, G., 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27–42.
- Marin, D.E., Taranu, I., Burlacu, R., Tudor, D.S., 2010. Effects of zearalenone and its derivatives on the innate immune response of swine. *Toxicol.* 56, 956–963.
- Martin, K.R., Barrett, J.C., 2002. Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* 21, 71–75.
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., 2009. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.* 11, 385–396.
- Milne, J.C., Lambert, P.D., Schenk, S., Carney, D.P., Smith, J.J., Gagne, D.J., Jin, L., Boss, O., Perni, R.B., Vu, C.B., Bemis, J.E., Xie, R., Disch, J.S., Ng, P.Y., Nunes, J.J., Lynch, A.V., Yang, H., Galonek, H., Israelian, K., Choy, W., Iffland, A., Lavu, S., Medvedik, O., Sinclair, D.A., Olefsky, J.M., Jirousek, M.R., Elliott, P.J., Westphal, C.H., 2007. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 450, 712–716.
- Mirocha, C.J., Pathre, S.V., Robison, T.S., 1981. Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food Cosmet. Toxicol.* 19, 25–30.
- Olsen, M., Pettersson, H., Kiessling, K.H., 1981. Reduction of zearalenone to zearalenol in female rat liver by 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 48, 157–161.
- Ou, X., Lee, M.R., Huang, X., Messina-Graham, S., Broxmeyer, H.E., 2014. SIRT1 positively regulates autophagy and mitochondria function in embryonic stem cells under oxidative stress. *Stem Cells* 32, 1183–1194.
- Palyusik, M., Hagler, W.M., Horváth, L., Mirocha, C.J., 1980. Biotransformation of zearalenone to zearalenol by *Candida tropicalis*. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28, 159–166.
- Petrovski, G., Das, S., Juhasz, B., Kertesz, A., Tosaki, A., Das, D.K., 2011. Cardioprotection by endoplasmic reticulum stress-induced autophagy. *Antioxid. Redox Signal.* 14 (11), 2191–2200.
- Puissant, A., Robert, G., Fenouille, N., et al., 2010. Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Res.* 70, 1042–1052.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., Elazar, Z., 2007. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 26, 1749–1760.
- Scudamore, K.A., Patel, S., 2000. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. *Food Addit. Contam.* 17, 407–416.
- Sipido, K.R., Marban, E., 1991. L-Type calcium channels, potassium channels, and novel nonspecific cation channels in a clonal muscle cell line derived from embryonic rat ventricle. *Circ. Res.* 69 (6), 1487–1499.
- Tatay, E., Meca, G., Font, G., Ruiz, M.J., 2014. Interactive effects of zearalenone and its metabolites on cytotoxicity and metabolization in ovarian CHO-K1 cells. *Toxicol. in Vitro.* 28, 95–103.
- Taylor, D.M., Maxwell, M.M., Luthi-Carter, R., Aleksey, Kazantsev, S., 2008. Biological and potential therapeutic roles of sirtuin deacetylases. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 4000–4018.
- Verde, I., 1999. *Br. J. Pharmacol.* 127, 65–67.
- Wu, M.L., Tsai, K.L., Wang, S.M., Wu, J.C., Wang, B.S., Lee, Y.T., 1996. Mechanism of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced intracellular acidification in cultured rat cardiac myoblasts. *Circ. Res.* 78 (4), 564–572.
- Zhou, C., Zhang, Y., Yin, S., Jia, Z., Shan, A., 2015. Biochemical changes and oxidative stress induced by zearalenone in the liver of pregnant rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 34, 65–73.
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1–18.

Discussion

Même si le stress du réticulum endoplasmique (RE) est associé depuis plus de 20 ans à différentes pathologies telles que le diabète, certains cancers, ou encore les maladies neurodégénératives, son étude dans le domaine des maladies cardiovasculaires est relativement récente puisque la première publication date de 2004 (Okada et al., 2004). Depuis, différentes études ont démontré que le stress RE est impliqué dans les processus physiologiques, mais également dans les processus pathologiques du système cardiovasculaire, comme par exemple l'hypertrophie, l'infarctus du myocarde, l'ischémie, la cardiomyopathie dilatée, ou encore l'insuffisance cardiaque (Hong et al., 2017; Wang et al., 2018b). Cependant, il est encore difficile de déterminer si le stress RE est une des causes ou une des conséquences de la pathologie. En effet, dans les différents modèles de pathologie cardiaque démontrant l'induction d'un stress RE, de nombreux autres processus délétères ont été décrits comme participant au développement de la dysfonction cardiaque, parmi lesquels on peut citer de manière non exhaustive, la production de ROS, l'altération du couplage E-C, les altérations métaboliques ou encore l'inflammation. Afin de déterminer plus précisément le rôle joué par le stress RE dans le développement des pathologies cardiaques, il était donc important de développer des modèles permettant d'étudier l'effet du stress RE *per se*, tout en s'affranchissant au maximum des effets multiples induits dans des modèles physiopathologiques classiquement utilisés dans le domaine cardiovasculaire. A ce jour, plusieurs molécules sont connues pour induire un stress RE telles que l'agent réducteur dithiothréitol (DTT) qui rompt les ponts disulfures créés lors du repliement des protéines dans le RE, la bréfeldine A (BFA) qui bloque le transport des protéines du RE vers l'appareil de Golgi, ou la thapsigargine (TG) qui inhibe la pompe SERCA (Breckenridge et al., 2003; Kaufman, 1999; Lee, 1992). Ces molécules induisent toutes une accumulation de protéines mal repliées dans le RE et donc provoquent un stress RE. Néanmoins, ces molécules sont connues pour induire des effets cellulaires secondaires autres que l'accumulation de protéines mal repliées, à savoir une altération du statut redox cellulaire (DTT), des perturbations de la voie de sécrétion des protéines (BFA) et des altérations de l'homéostasie calcique (TG). En revanche, la tunicamycine, en inhibant l'enzyme GlcNAc phosphotransferase (GPT, (Heifetz et al., 1979)), inhibe la N-glycosylation des protéines qui n'a lieu que dans la lumière du RE et est donc considérée comme un inducteur de stress RE plus spécifique. TN est ainsi la molécule disponible la plus adaptée pour étudier les effets directs du stress RE dans le cœur. Toutefois, dans nos études, il nous a semblé très important de comparer les effets obtenus *in vivo* avec TN, à ceux obtenus dans un modèle plus physiopathologique d'induction de la dysfonction cardiaque suite à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques par l'isoprotérénol.

I. Stress RE, architecture du cardiomyocyte et énergétique mitochondriale

Lorsque nous avons débuté ce travail de recherche, il n'y avait pas de données publiées concernant les effets précoces du stress RE sur le développement de la dysfonction cardiaque. Basé sur les quelques publications de la littérature disponibles, nous avons donc développé un modèle d'induction de stress RE *in vivo*, par injection intra-péritonéale de TN (2 mg/kg). Nous avons ensuite étudié les modifications précoces (72h) induites par le stress RE sur la fonction cardiaque, l'ultrastructure des cardiomyocytes et la fonction mitochondriale.

Nous avons mis en évidence que le stress RE induit des modifications importantes de l'architecture du cardiomyocyte avec une désorganisation spatiale des sarcomères, une augmentation de la quantité de RE et des sites de contact RE/mitochondries, ainsi qu'une perturbation de la structure du réseau mitochondrial. Cette désorganisation du cardiomyocyte est associée à des altérations de la biogénèse et de la fonction énergétique mitochondriale, à une accumulation de gouttelettes lipidiques corrélée à une inhibition de l'utilisation relative des acides gras et à une augmentation de l'utilisation relative des substrats glycolytiques par les mitochondries, ainsi qu'à une diminution de l'expression des enzymes impliquées dans le système de transferts énergétiques des créatines kinases.

Nos études stéréologiques et l'analyse des images obtenues en microscopie électronique ont mis en évidence de nombreux exemples de connexions physiques entre le RE et le RS avec partage de leur lumen en réponse au stress RE, ainsi que la présence assez inattendue de RE à la place du RS au niveau des tubules T. Nous pensons que dans le cardiomyocyte, il existe une grande plasticité du réseau réticulaire et qu'il ne faut pas voir le RE et le RS comme deux organites distincts mais plutôt comme un grand réseau connecté dans lequel des compartiments réticulaires sont dédiés à la régulation de l'homéostasie calcique et d'autres sont dédiés à la synthèse des protéines. Ainsi, l'augmentation de la quantité de RE observée suite à un stress RE, pourrait être due non seulement à une synthèse *de novo* de membranes de RE, mais également au recrutement rapide de ribosomes au niveau du RS afin de lutter plus efficacement contre le stress RE.

L'augmentation de la quantité de RE pourrait expliquer au moins en partie l'augmentation des sites de contact RE/mitochondries (MAM) induite par le stress RE. Ces sites de contacts favorisent les échanges, et notamment les flux calciques, entre le RE et les mitochondries (Hayashi et al., 2009). En accord avec ceci, nous avons montré que le traitement aigu de fibres cardiaques par TN induisait une accumulation rapide de calcium dans les mitochondries. En revanche, après 72h de traitement avec TN, les transferts calciques entre le RE et les mitochondries sont diminués. Différents travaux ont montré que la surcharge

I. Stress RE, architecture du cardiomyocyte et énergétique mitochondriale

mitochondriale de Ca^{2+} découple la phosphorylation oxydative, induit une ouverture du PTP conduisant à une chute du potentiel de membrane mitochondrial, et peut déclencher l'apoptose de la cellule (Filadi et al., 2017). Dans notre modèle, le stress RE en provoquant une accumulation mitochondriale rapide de Ca^{2+} pourrait conduire à une diminution du potentiel de membrane mitochondrial qui réduirait alors la capacité de la mitochondrie à internaliser le Ca^{2+} provenant du RE. La diminution du potentiel membranaire mitochondrial et de la concentration matricielle de Ca^{2+} pourrait ainsi expliquer la diminution de la fonction énergétique mitochondriale observée en réponse au stress RE. Un autre mécanisme que nous avons mis en évidence en réponse au stress RE et qui pourrait participer à la diminution de la production d'ATP, est la diminution de l'expression de PGC-1 α et de ses cibles. En effet, PGC-1 α est un co-activateur transcriptionnel jouant un rôle central dans la régulation de la biogénèse mitochondriale, qui en contrôlant le contenu mitochondrial, contrôle la production d'énergie. En diminuant l'expression de PGC-1 α et de ses cibles, le stress RE diminue la biogénèse mitochondriale et favorise le déséquilibre entre la demande énergétique du muscle cardiaque et la production d'énergie. Or, il est aujourd'hui admis que ce déséquilibre joue un rôle majeur dans la dysfonction cardiaque et le développement de l'insuffisance cardiaque (Rimbaud et al., 2009).

En plus de diminuer la respiration mitochondriale et la production d'ATP, le stress RE entraîne une transition de l'utilisation préférentielle des substrats énergétiques de type acide gras, vers une utilisation des substrats glycolytiques. Ces résultats sont corrélés à la diminution de l'activité de l'HADHA (hydroxyacyl-CoA dehydrogenase), considérée comme l'enzyme limitante de la β -oxydation, et à une augmentation de l'activité de la LDH (lactate déshydrogénase), impliquée dans la glycolyse. Ceci suggère que le stress RE pourrait être un facteur important contribuant au shift métabolique couramment retrouvé lors de la dysfonction cardiaque (Ventura-Clapier et al., 2004). Cette hypothèse est en accord avec une étude menée chez la drosophile, montrant qu'en réponse au stress RE, le facteur de transcription ATF4 de la réponse UPR augmente la transcription de gènes glycolytiques tels que *pfk* (*phosphofructokinase*), *tpi* (*triosephosphate isomerase*) et *ldh* (Lee et al., 2015). Il faudrait néanmoins confirmer que cette voie de régulation existe également chez les mammifères.

A la vue de l'ensemble de ces résultats, il apparaît raisonnable de proposer que le stress RE pourrait être une des causes des dysfonctions mitochondriales couramment observées dans les pathologies cardiaques telles que l'insuffisance cardiaque (Neubauer, 2007; Ventura-Clapier et al., 2011).

II. Rôle de la sirtuine 1 dans la régulation de l'apoptose induite par le stress RE

Dans le but d'identifier de nouveaux régulateurs du stress RE et de la réponse UPR, nous nous sommes intéressés à la désacétylase sirtuine 1, connue pour être activée en réponse à différents stress (Haigis and Sinclair, 2010) et présentant une activité considérée comme cardioprotectrice (Alcendor et al., 2007; Hsu et al., 2010; Planavila et al., 2011), mais dont le rôle dans la réponse au stress RE n'était pas décrit. Nous avons montré que l'inhibition pharmacologique, l'extinction ou l'invalidation de SIRT1 augmente l'apoptose des cardiomyocytes *in vitro* et *in vivo*. A l'inverse, son activation par le STAC-3 protège les cardiomyocytes de la mort cellulaire induite par le stress RE. De plus, SIRT1 régule spécifiquement l'activation de la branche PERK/eIF2 α de la réponse UPR et protège du stress RE en désacétylant eIF2 α sur les résidus lysine K141 et K143. Ces résultats démontrent donc que SIRT1 joue un rôle cardioprotecteur en réponse au stress RE en modulant la réponse UPR.

Plusieurs de nos résultats ont été obtenus en utilisant l'inhibiteur pharmacologique EX527. Son mécanisme d'action n'a été découvert que récemment grâce à une étude par cristallographie qui a permis de révéler que l'EX527 perturbe la fixation du NAD⁺, cofacteur de SIRT1, ce qui limite le recrutement des substrats de cette sirtuine et bloque leur désacétylation (Zhao et al., 2013). Néanmoins, toute utilisation de molécules pharmacologiques soulève la question de sa spécificité d'action. Un grand nombre d'inhibiteurs de SIRT1 ont été mis en évidence au cours de ces dernières années (EX527, Sirtinol, Salermide, Tenovin-6, Cambinol, Nicotinamide...) (Qin et al., 2017). Cependant, l'EX527 est le plus spécifique et est décrit comme le seul à avoir une affinité beaucoup plus importante pour SIRT1 (IC₅₀ de 38 nM) que pour les autres sirtuines (Peck et al., 2010). Récemment, un nouvel inhibiteur de SIRT1, appelé 4bb, a été découvert mais il présente une IC₅₀ plus forte que celle de l'EX527 (32,92 μ M) et aucune information sur sa spécificité pour SIRT1 n'a été démontrée, faisant de l'EX527 l'inhibiteur le plus spécifique de SIRT1 encore à ce jour (Ghosh et al., 2017). En ce qui concerne les autres inhibiteurs de SIRT1, il a été montré qu'ils inhibent également d'autres sirtuines (notamment SIRT2 en ce qui concerne le Sirtinol et le Salermide ou SIRT3 en ce qui concerne le Nicotinamide). La modulation de la mort cellulaire induite par les inhibiteurs autres qu'EX527 pourrait donc être due à l'inhibition non spécifique de sirtuines autres que SIRT1 (Peck et al., 2010). Dans notre étude, les résultats que nous avons obtenus avec l'EX527 sont cohérents avec ceux obtenus par extinction de SIRT1 par siRNA *in cellulo* ou dans notre modèle de souris invalidées pour SIRT1. Dans chacun de ces cas, l'apoptose induite par le

II. Rôle de la sirtuine 1 dans la régulation de l'apoptose induite par le stress RE

stress RE est augmentée après la perte de l'activité. Il apparaît donc que l'EX527 a une bonne spécificité d'action dans nos conditions expérimentales.

L'apoptose est connue pour être très délétère dans le cœur car même à faible taux, cette apoptose peut induire une altération importante de la fonction cardiaque. En effet, une étude a montré que chez des souris exprimant de manière cardiospécifique une forme active de la caspase 8, une faible augmentation de l'apoptose induite dans le cœur (23 cellules en apoptose pour 10^5 cellules contre 1.5 cellules en apoptose pour 10^5 cellules chez les souris sauvages), suffisait à induire une cardiomyopathie dilatée létale en seulement 9 semaines (Wencker et al., 2003). De manière intéressante, les auteurs rapportent que non seulement ce faible pourcentage d'apoptose suffit à induire une dysfonction cardiaque chez les souris, mais qu'en plus il est 10 fois plus faible que celui observé dans les cœurs humains défailants. Il paraît donc raisonnable de penser que le taux d'apoptose élevé que nous avons observé dans les cellules cardiaques en réponse au stress RE pourrait contribuer de manière conséquente aux altérations de la fonction cardiaque.

Nos expériences indiquent que SIRT1 protège les cellules cardiaques en limitant l'activation des voies de signalisation apoptotique induites par le stress RE. En effet, nous avons observé en réponse au stress RE, que l'augmentation de l'apoptose induite par l'inhibition de SIRT1 est associée à une hyperactivation de la voie PERK qui se traduit par à une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α et de l'expression du facteur pro-apoptotique CHOP. Ces résultats indiquent qu'une des fonctions de SIRT1 est de limiter l'activation de la voie PERK de la réponse UPR. La diminution de l'expression du facteur pro-apoptotique CHOP via la diminution de l'acétylation/phosphorylation d'eIF2 α apparaît donc comme un des mécanismes permettant à SIRT1 de limiter l'apoptose induite par le stress RE.

eIF2 α est un facteur clé de la voie PERK de la réponse UPR connu pour jouer un rôle aussi bien dans les mécanismes adaptatifs de la réponse au stress RE en réduisant la synthèse globale des protéines, que dans les mécanismes délétères en activant l'expression du facteur pro-apoptotique CHOP via ATF4. Il a été montré que l'utilisation du salubrinal, un inhibiteur de la phosphatase déphosphorylant eIF2 α , protège le cœur de l'infarctus du myocarde ou d'une surcharge de pression (Liu et al., 2016b; Rani et al., 2017). Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique (GSK2606414) ou l'extinction (siRNA) de PERK, qui se traduit par une diminution de la phosphorylation d'eIF2 α , protège de l'apoptose induite par un stress RE (Hu et al., 2017; Márton et al., 2017; Mercado et al., 2018). Ces résultats pourraient paraître contradictoires, mais certains auteurs ont proposés que la phosphorylation modérée d'eIF2 α jouerait un rôle protecteur, alors que son hyperphosphorylation serait délétère (Donnelly et al., 2013). Des analyses par cristallographie ont permis de démontrer que le site de phosphorylation d'eIF2 α sur la sérine 51/52 n'est pas accessible à une kinase dans un état

II. Rôle de la sirtuine 1 dans la régulation de l'apoptose induite par le stress RE

basal, permettant aux auteurs de suggérer que la conformation d'eIF2 α joue un rôle clé dans la régulation de sa phosphorylation (Dey et al., 2011). D'autre part, il a été proposé qu'une régulation post-traductionnelle encore inconnue d'eIF2 α pourrait modifier sa conformation afin de permettre sa phosphorylation (Donnelly et al., 2013). Nous avons mis en évidence que l'augmentation de l'acétylation d'eIF2 α induite par l'inhibition de SIRT1 est associée à une augmentation de sa phosphorylation lors d'un stress RE, suggérant que l'acétylation d'eIF2 α pourrait être la modification post-traductionnelle responsable du changement de conformation d'eIF2 α permettant sa phosphorylation. Pour étudier la relation entre ces deux modifications post-traductionnelles d'eIF2 α , nous avons généré des vecteurs non acétylable pour les résidus K141, K143 ou pour ces deux résidus et un vecteur non phosphorylable pour la serine 52. Néanmoins, même si le faible taux de transfection de ces vecteurs dans les H9c2 nous a permis d'étudier l'effet de ces mutants sur la mort cellulaire par cytométrie en flux, il ne nous a pas permis d'étudier le lien entre les deux modifications post-traductionnelles d'eIF2 α . Nous avons donc décidé de construire des vecteurs adénoviraux de ces mutants et sommes entrain de finaliser leur production.

Suite à nos résultats, il est raisonnable de penser qu'une acétyltransférase serait activée en réponse au stress RE et acétylerait eIF2 α favorisant ainsi sa phosphorylation. Dans ce contexte, SIRT1 permettrait un rétrocontrôle négatif en désacétylant eIF2 α afin de limiter sa phosphorylation et ainsi de diminuer l'activation de la branche PERK de la voie UPR. Basé sur la littérature, nous avons sélectionnés deux acétyltransférases, GCN5 et p300, qui pourraient être impliquées dans l'acétylation d'eIF2 α , car elles sont connues pour être activée en réponse au stress RE (Kikuchi et al., 2015; Luo et al., 2017) et être impliquées dans l'acétylation de protéines régulées par SIRT1, telles que PGC-1 α et TORC2. Nos observations montrant que l'inhibition de SIRT1 augmente à la fois l'acétylation d'eIF2 α et l'apoptose induite par le stress RE, suggèrent que l'inhibition pharmacologique des acétyltransférases (via le butyrolactone pour GCN5 et C646 pour p300) devraient favoriser l'apoptose induite par le stress RE. Ces expériences sont actuellement en cours.

III. Rôle de la sirtuine 1 dans la régulation de l'autophagie/mitophagie induite par le stress RE

L'autophagie, lorsqu'elle est régulée, est un processus plutôt bénéfique dans le coeur qui peut limiter le déclenchement du processus apoptotique en restaurant l'homéostasie cellulaire. Puisque nous avons montré que SIRT1 protège les cellules cardiaques de l'apoptose en régulant la voie PERK, nous avons mené une nouvelle étude afin de déterminer

III. Rôle de la sirtuine 1 dans la régulation de l'autophagie/mitophagie induite par le stress RE

si l'effet cardioprotecteur de SIRT1 était associé à une régulation du processus autophagique cardiaque en réponse au stress RE.

A la différence du processus d'apoptose qui aboutit à une étape terminale irréversible, l'autophagie est un processus dynamique au cours duquel des autophagosomes sont générés puis fusionnent avec des lysosomes pour permettre la dégradation de leur contenu. Il est donc plus difficile de mesurer ce flux autophagique au cours du temps et les marqueurs utilisés doivent être choisis avec soin. La mesure des niveaux protéiques de la protéine LC3 lipidée (LC3-II) est le marqueur le plus utilisé pour démontrer l'activation de l'autophagie car cette protéine reste liée à la membrane interne de l'autophagosome jusqu'à sa fusion avec le lysosome, contrairement aux protéines ATG. Dans notre étude, en plus de la mesure des niveaux de LC3-II par western blot, nous avons choisi d'utiliser un deuxième marqueur d'autophagie, la sonde fluorescente Cyto-ID[®], qui marque les vacuoles autophagiques et permet la mesure de l'autophagie par cytométrie en flux. Afin de déterminer les concentrations de Cyto-ID[®] permettant un marquage spécifique des vacuoles autophagiques dans les cellules H9c2 et de valider l'utilisation de cette sonde, nous avons réalisé des expériences de co-marquage des cellules avec le Cyto-ID[®] (fluorescence verte) et le LysoTracker[®] Red (une sonde fluorescente spécifique des lysosomes). Dans nos conditions expérimentales, nous avons observé que le Cyto-ID[®] est spécifique et marque les vacuoles autophagiques telles que les autophagosomes et les autophagolysosomes, mais pas les lysosomes.

Il est aujourd'hui admis que le stress RE induit un processus d'autophagie. Néanmoins, le rôle de cette autophagie est sujet à controverse puisque certaines publications montrent qu'une autophagie protectrice est activée en réponse au stress RE, alors que d'autres études indiquent que l'autophagie peut aggraver les effets délétères du stress RE (Song et al., 2017b). Nos résultats montrent que dans les cellules cardiaques, l'autophagie est induite avant l'apoptose en réponse au stress RE et que l'inhibition pharmacologique de l'autophagie augmente l'apoptose induite par le stress RE. Il apparaît donc que l'autophagie est un processus adaptatif bénéfique pour le cardiomyocyte, activée en réponse au stress RE dans le but d'éliminer les agrégats protéiques ou les organelles endommagés et de limiter les dommages cellulaires.

Pour aller plus loin, nous avons cherché à savoir si l'autophagie sélective de type mitophagie était induite dans les cellules cardiaques en réponse au stress RE. En condition basale, la protéine Parkin est localisée dans le cytoplasme. Lorsque les mitochondries sont endommagées, Parkin est rapidement transloquée à la mitochondrie et activée par PINK1 pour favoriser la clairance des mitochondries par mitophagie (Narendra et al., 2010). Les expériences de fractionnement cellulaire que nous avons réalisées à partir de lysats cellulaires ou de coeur de souris mettent en évidence une relocalisation mitochondriale de Parkin en

III. Rôle de la sirtuine 1 dans la régulation de l'autophagie/mitophagie induite par le stress RE

réponse au stress RE induit par TN. De plus, nous avons montré dans la première étude présentée dans ce manuscrit que le stress RE s'accompagne d'une diminution de la fonction énergétique et de la masse mitochondriale (diminution de l'activité de la citrate synthase). L'ensemble des résultats de nos deux études suggère donc qu'en réponse au stress RE, l'activation du processus de mitophagie permettrait l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles pour favoriser un retour à l'homéostasie cellulaire et éviter l'élimination de la cellule par apoptose.

Notre étude du rôle de SIRT1 dans la régulation du processus autophagique dans le coeur a montré *in vitro* et *in vivo* que l'inhibition, l'extinction ou l'invalidation de SIRT1 diminue le flux autophagique et la mitophagie induite par le stress RE. Le rôle cardioprotecteur de SIRT1 contre le stress RE délétère que nous avons démontré précédemment semble donc lié à sa capacité à favoriser l'activation des étapes précoces de l'autophagie/mitophagie dans le coeur. Une augmentation de la mitophagie induite par SIRT1 a également été observé dans d'autres systèmes cellulaires et n'est donc pas spécifique du système cardiovasculaire (Jang et al., 2012; Kang and Hwang, 2009; Qiao et al., 2018). Au niveau mécanistique, nous montrons que SIRT1 favorise l'autophagie/mitophagie, limite l'apoptose et protège le coeur du stress RE en activant la voie eEF2K/eEF2.

A ce jour, seule la kinase eEF2K est connue pour phosphoryler le facteur d'élongation de la traduction eEF2. La phosphorylation d'eEF2 sur la thréonine 56 par eEF2K empêche sa liaison avec le ribosome et par conséquent réduit les synthèses protéiques. En plus de contrôler la traduction des protéines, il a été démontré dans différents types cellulaires, que la voie de signalisation eEF2K/eEF2 régule d'autres processus cellulaires incluant la différenciation, l'autophagie et l'apoptose (Kenney et al., 2014). Dans le système cardiovasculaire, à notre connaissance, aucune donnée sur le rôle d'eEF2K/eEF2 dans la régulation du processus autophagique n'est publiée. Nous montrons ici que l'inhibition pharmacologique ou l'extinction d'eEF2K ou d'eEF2 diminue l'autophagie et augmente la mort cellulaire en réponse au stress RE, indiquant que l'activation de la voie eEF2K/eEF2 est bénéfique et permet de lutter contre les effets délétères du stress RE en favorisant l'autophagie. D'autre part, l'inhibition pharmacologique de SIRT1 diminue la phosphorylation d'eEF2 induite par TN. Nous pouvons donc proposer qu'en réponse au stress RE, l'activation de SIRT1 permettrait un switch de la réponse apoptotique délétère vers la réponse autophagique adaptative en activant la voie eEF2K/eEF2. De manière intéressante, le rôle d'eEF2K dans le contrôle du switch autophagie/apoptose a également été observé dans des cellules de glioblastome (Cheng et al., 2011). Les résultats que nous avons obtenus par immunoprécipitation montrant que ni eEF2, ni eEF2K ne sont acétylées et qu'il n'existe pas de complexe physique entre ces protéines et SIRT1, suggèrent que l'activation de la voie

III. Rôle de la sirtuine 1 dans la régulation de l'autophagie/mitophagie induite par le stress RE

eEF2K/eEF2 par SIRT1 ne serait pas directe mais impliquerait un autre facteur dont le niveau d'acétylation serait régulé par SIRT1 et permettrait l'activation d'eEF2K en réponse au stress RE.

Une piste permettant de comprendre comment SIRT1 pourrait réguler la voie eEF2K/eEF2 provient d'études montrant que suite à un stress RE, la phosphorylation d'eIF2 α par PERK entraîne l'activation d'ATF4 qui permet l'expression de la protéine REDD1/DDIT4 (regulated in development and DNA damage response 1/DNA-damage-inducible transcript 4) (Cheng et al., 2013; Jin et al., 2009). Or, les auteurs montrent dans les cellules cancéreuses que REDD1/DDIT4 est essentielle pour activer eEF2K et induire l'autophagie en réponse au stress RE (Cheng et al., 2013). Sachant que nous avons montré que SIRT1 régule le niveau d'activation de la voie PERK en régulant le niveau d'acétylation et de phosphorylation d'eIF2 α , nous pouvons avancer l'hypothèse qu'eIF2 α serait le lien manquant dans notre modèle entre SIRT1 et eEF2K/eEF2. En effet, les résultats obtenus dans les différentes études que nous avons menées indiquent que la réponse de la cellule cardiaque au stress RE évolue en fonction du temps. Tout d'abord, le processus autophagique est activé pour tenter de rétablir l'homéostasie cellulaire, mais ensuite le processus apoptotique est déclenché pour éliminer la cellule dont l'homéostasie n'a pu être rétablie. Au niveau moléculaire, cela se traduit dans un premier temps par une activation modérée de la voie PERK qui conduit à l'acétylation/phosphorylation d'eIF2 α qui à son tour via ATF4 permet l'activation de la voie eEF2K/eEF2 pour induire l'autophagie. Dans un deuxième temps, l'hyperactivation de la voie PERK/eIF2 α /ATF4 induite par le stress RE prolongé augmente la transcription du facteur pro-apoptotique CHOP, ce qui favorise l'apoptose. Dans ce contexte, SIRT1 en désacétylant eIF2 α diminue son niveau de phosphorylation et limite l'activation de la voie PERK favorisant ainsi le processus d'autophagie médiée par eEF2K/eEF2.

L'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit de thèse montre (i) que le stress RE sévère est très délétère pour le cœur notamment en diminuant la fonction énergétique mitochondriale, et (ii) que l'activation de SIRT1 favorise l'aspect adaptatif et bénéfique de la réponse UPR en limitant l'activation de la voie PERK afin de favoriser l'autophagie et de limiter l'apoptose. Des approches thérapeutiques utilisant des molécules capables d'activer SIRT1 pourraient donc permettre de limiter le développement de pathologies cardiaques associées au stress RE.

Perspectives

Nous avons mis en évidence que les niveaux d'acétylation et de phosphorylation d'eIF2 α jouent un rôle clé dans la régulation du devenir des cardiomyocytes en réponse au stress RE. Il est donc important d'étudier le lien entre ces deux modifications post-traductionnelles. Pour cela, nous avons généré des mutants adénoviraux non acétylable d'eIF2 α pour la lysine K141, K143 ou ces deux lysines K141/143 et non phosphorylable pour la sérine S52A. Ces mutants portent un tag FLAG qui nous permettra par des expériences d'immunoprécipitation/western blot de déterminer l'impact de l'acétylation d'eIF2 α sur sa phosphorylation et vice-versa. Ces mutants permettront également d'étudier au niveau cellulaire l'effet de l'expression de formes d'eIF2 α non acétylée ou non phosphorylée sur les processus autophagique et apoptotique induits par le stress RE et de déterminer si la régulation de ces voies par SIRT1 est toujours effective.

Par des approches pharmacologiques et en utilisant des siRNA, il sera également important d'identifier les acétyltransférases responsables de l'acétylation d'eIF2 α (GNC5, p300, ...) et d'étudier leur rôle dans la réponse au stress RE.

Comme le montrent nos études, l'activation de SIRT1 est cardioprotectrice dans la réponse au stress RE. Il est donc important de proposer différentes stratégies permettant d'activer cette désacétylase et d'étudier l'impact de cette activation sur la réponse au stress RE dans le cœur. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la phosphorylation de SIRT1 permet son activation. A ce jour, onze kinases ont été mises en évidence comme impliquées dans la phosphorylation de SIRT1. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de ces kinases permettra d'évaluer leur rôle dans la réponse au stress RE en lien avec la phosphorylation de SIRT1 et d'identifier la(les) kinase(s) cible(s) permettant de favoriser l'activation de SIRT1 et de limiter les effets délétères du stress RE.

A ce jour, plusieurs molécules naturelles retrouvées dans notre alimentation ont été proposées comme activateurs de SIRT1 et pourraient donc avoir un effet protecteur contre le stress RE dans le cœur. Par exemple, le resvératrol, un polyphénol retrouvé notamment dans le raisin ou les mûres, est décrit comme un puissant activateur de SIRT1, et a permis d'obtenir des effets bénéfiques dans de nombreux modèles de pathologies chez l'animal. Néanmoins, il présente une spécificité très relative pour SIRT1 et de nombreux effets pléiotropes ont été rapportés (Pirola and Fröjdö, 2008). L'effet d'autres activateurs naturels de SIRT1 comme le ptérostilbène qui est un analogue naturel du resvératrol, mais qui présente une demi-vie plus longue et une biodisponibilité plus élevée que ce dernier sera donc testé (Peng et al., 2018). Basé sur la littérature, onze autres molécules décrites comme activatrices de SIRT1 ont été retenues (tableau 8). L'effet cardioprotecteur de ces molécules en réponse au stress RE devra être testé dans les différents modèles d'étude qui ont été développés par notre équipe.

Molécules	Famille	Source	Modèle	Références
Acide félorique	Phénylpropanoïde	Lignocellulose (riz, avoine,...)	Adipocytes et myotubes	(Bruckbauer and Zemel, 2014)
Berberine	Isoquinoline alkaloïde	Racine et écorce (curcuma,...)	Ischémie/réperfusion H9c2 et rat	(Yu et al., 2016b)
Butéine	Chalconoïde	Vernie du Japon, fèves	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Howitz et al., 2003)
Catechine	Flavonols	Thé vert, fève de cacao,...	Gavage chez le rat	(Cueno et al., 2015)
Fiséine	Flavonoïdes	Mangue, fraises,...	ER stress	(Yen et al., 2017)
Isoquiritigénine	Isoflavonoïde chalcone	Réglisse	Diabète	(Yerra et al., 2017)
Malvidine	Flavonoïde anthocyanidols	Pigment végétal, raisin,...	Ischémie/reperfusion	(Quintieri et al., 2013)
Picéatanole	Stylbène	Vin rouge, thé blanc,...	Lignée cellulaire de monocytes	(Kawakami et al., 2014)
Ptérostylbène	Stylbène	Raisin, myrtille	Ischémie/reperfusion Hypoxie/réoxygénation	(Cheng et al., 2016b; Guo et al., 2016)
Quercétine	Flavonol	Câpre, chocolat,...	Maladie de Duchenne	(Ballmann et al., 2017)
Tyrosol	Tyrosols	Huile d'olive, vin blanc	Infarctus du myocarde	(Samuel et al., 2008)

Tableau 8 : Liste des molécules activatrices de SIRT1 dont l'effet cardioprotecteur en réponse au stress RE sera testé.

Bibliographie

Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Jr, Lal, A., Kim, H.H., Galban, S., Yang, X., Blethrow, J., Walker, M., Shubert, J., et al. (2007). Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol. Cell* 25, 543.

Abdelmohsen, K., Srikantan, S., Kuwano, Y., and Gorospe, M. (2008). miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20297.

Abderrazak, A., Couchie, D., Mahmood, D.F.D., Elhage, R., Vindis, C., Laffargue, M., Matéo, V., Büchele, B., Ayala, M.R., El Gaafary, M., et al. (2015). Anti-inflammatory and antiatherogenic effects of the NLRP3 inflammasome inhibitor arglabin in ApoE2.Ki mice fed a high-fat diet. *Circulation* 131, 1061–1070.

Abrahamsen, H., Stenmark, H., and Platta, H.W. (2012). Ubiquitination and phosphorylation of Beclin 1 and its binding partners: Tuning class III phosphatidylinositol 3-kinase activity and tumor suppression. *FEBS Lett.* 586, 1584–1591.

Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N.H., Arias, C., Lennon, C.J., Kluger, Y., and Dynlacht, B.D. (2007). XBP1 Controls Diverse Cell Type- and Condition-Specific Transcriptional Regulatory Networks. *Mol. Cell* 27, 53–66.

Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2008). ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct. Funct.* 33, 75–89.

Aksoy, P., Escande, C., White, T.A., Thompson, M., Soares, S., Benech, J.C., and Chini, E.N. (2006). Regulation of SIRT 1 mediated NAD dependent deacetylation: a novel role for the multifunctional enzyme CD38. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 353–359.

Alcendor, R.R., Gao, S., Zhai, P., Zablocki, D., Holle, E., Yu, X., Tian, B., Wagner, T., Vatner, S.F., and Sadoshima, J. (2007). Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ. Res.* 100, 1512–1521.

Alcoléa, S., Théveniau-Ruissy, M., Jarry-Guichard, T., Marics, I., Tzouanacou, E., Chauvin, J.-P., Briand, J.-P., Moorman, A.F.M., Lamers, W.H., and Gros, D.B. (1999). Downregulation of Connexin 45 Gene Products During Mouse Heart Development. *Circ. Res.* 84, 1365–1379.

Alshannaq, A., and Yu, J.-H. (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 14.

Anderson, R.M., Bitterman, K.J., Wood, J.G., Medvedik, O., and Sinclair, D.A. (2003). Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 423, 181–185.

Ansari, A., Rahman, M.S., Saha, S.K., Saikot, F.K., Deep, A., and Kim, K.-H. (2017). Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease. *Aging Cell* 16, 4.

Antoniali, G., Lirussi, L., D'Ambrosio, C., Dal Piaz, F., Vascotto, C., Casarano, E., Marasco, D., Scaloni, A., Fogolari, F., and Tell, G. (2014). SIRT1 gene expression upon genotoxic damage is regulated by APE1 through nCaRE-promoter elements. *Mol. Biol. Cell* 25, 532–547.

Antonsson, B. (2004). Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol. Cell. Biochem.* 256–257, 141–155.

Aquilano, K., Vigilanza, P., Baldelli, S., Pagliei, B., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. (2010). Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Co-activator 1 α (PGC-1 α) and Sirtuin 1 (SIRT1) Reside in Mitochondria: POSSIBLE DIRECT FUNCTION IN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS*. *J. Biol. Chem.* *285*, 21590.

Aquilano, K., Baldelli, S., Pagliei, B., and Ciriolo, M.R. (2013). Extranuclear localization of SIRT1 and PGC-1 α : an insight into possible roles in diseases associated with mitochondrial dysfunction. *Curr. Mol. Med.* *13*, 140–154.

Arms, K., and Camp, P.S. (1989). *Biologie. tome 2* (Montréal; Paris: Etudes vivantes ; Editions Universitaires).

Ayala, P., Montenegro, J., Vivar, R., Letelier, A., Urroz, P.A., Copaja, M., Pivet, D., Humeres, C., Troncoso, R., Vicencio, J.M., et al. (2012). Attenuation of endoplasmic reticulum stress using the chemical chaperone 4-phenylbutyric acid prevents cardiac fibrosis induced by isoproterenol. *Exp. Mol. Pathol.* *92*, 97–104.

Back, J.H., Rezvani, H.R., Zhu, Y., Guyonnet-Duperat, V., Athar, M., Ratner, D., and Kim, A.L. (2011). Cancer Cell Survival Following DNA Damage-mediated Premature Senescence Is Regulated by Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-dependent Inhibition of Sirtuin 1. *J. Biol. Chem.* *286*, 19100–19108.

Bai, B., Liang, Y., Xu, C., Lee, M.Y.K., Xu, A., Wu, D., Vanhoutte, P.M., and Wang, Y. (2012). Cyclin-dependent kinase 5-mediated hyperphosphorylation of sirtuin-1 contributes to the development of endothelial senescence and atherosclerosis. *Circulation* *126*, 729–740.

Bai, P., Canto, C., Brunyánszki, A., Huber, A., Szántó, M., Cen, Y., Yamamoto, H., Houten, S.M., Kiss, B., Oudart, H., et al. (2011a). PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure. *Cell Metab.* *13*, 450–460.

Bai, P., Cantó, C., Oudart, H., Brunyánszki, A., Cen, Y., Thomas, C., Yamamoto, H., Huber, A., Kiss, B., Houtkooper, R.H., et al. (2011b). PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell Metab.* *13*, 461–468.

Ballmann, C., Denney, T.S., Beyers, R.J., Quindry, T., Romero, M., Amin, R., Selsby, J.T., and Quindry, J.C. (2017). Lifelong quercetin enrichment and cardioprotection in Mdx/Utrn \pm mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *312*, H128–H140.

Barth, E., Stämmli, G., Speiser, B., and Schaper, J. (1992). Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *24*, 669–681.

Bartolome, A., Guillen, C., and Benito, M. (2012). Autophagy plays a protective role in endoplasmic reticulum stress-mediated pancreatic β cell death. *Autophagy* *8*, 1757–1768.

Baumann, O., and Walz, B. (2001). Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int. Rev. Cytol.* *205*, 149–214.

B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2013). The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* *41*, 7683–7699.

Belaidi, E., Decors, J., Augeul, L., Durand, A., and Ovize, M. (2013). Endoplasmic reticulum stress contributes to heart protection induced by cyclophilin D inhibition. *Basic Res. Cardiol.* *108*, 363.

- Ben Salem, I., Boussabbeh, M., Da Silva, J.P., Guilbert, A., Bacha, H., Abid-Essefi, S., and Lemaire, C. (2017). SIRT1 protects cardiac cells against apoptosis induced by zearalenone or its metabolites α - and β -zearalenol through an autophagy-dependent pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *314*, 82–90.
- Benyair, R., Ron, E., and Lederkremer, G.Z. (2011). Chapter Five - Protein Quality Control, Retention, and Degradation at the Endoplasmic Reticulum. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, K.W. Jeon, ed. (Academic Press), pp. 197–280.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabé-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., et al. (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* *324*, 98–102.
- Bernales, S., McDonald, K.L., and Walter, P. (2006). Autophagy Counterbalances Endoplasmic Reticulum Expansion during the Unfolded Protein Response. *PLoS Biol.* *4*.
- Berridge, M.J. (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* *32*, 235–249.
- Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* *415*, 198–205.
- Bersell, K., Arab, S., Haring, B., and Kühn, B. (2009). Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell* *138*, 257–270.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* *2*, 326–332.
- Bieganowski, P., and Brenner, C. (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*, 495–502.
- Bindu, S., Pillai, V.B., and Gupta, M.P. (2016). Role of Sirtuins in Regulating Pathophysiology of the Heart. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *27*, 563–573.
- Bitterman, K.J., Anderson, R.M., Cohen, H.Y., Latorre-Esteves, M., and Sinclair, D.A. (2002). Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J. Biol. Chem.* *277*, 45099–45107.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., and Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.* *452*, 181–197.
- Borodkina, A.V., Shatrova, A.N., Deryabin, P.I., Griukova, A.A., Abushik, P.A., Antonov, S.M., Nikolsky, N.N., and Burova, E.B. (2016). Calcium alterations signal either to senescence or to autophagy induction in stem cells upon oxidative stress. *Aging* *8*, 3400–3418.
- Boya, P., Reggiori, F., and Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat. Cell Biol.* *15*, 713–720.
- Braakman, I., and Balleid, N.J. (2011). Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* *80*, 71–99.
- Braunwald, E. (1971). Structure and function of the normal myocardium. *Heart* *33*, 3–8.
- Bravo, R., Vicencio, J.M., Parra, V., Troncoso, R., Munoz, J.P., Bui, M., Quiroga, C., Rodriguez, A.E., Verdejo, H.E., Ferreira, J., et al. (2011). Increased ER–mitochondrial coupling

promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci* 124, 2143–2152.

Bravo-San Pedro, J.M., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2017). Autophagy and Mitophagy in Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* 120, 1812–1824.

Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., and Shore, G.C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22, 8608–8618.

Brink, D. (2018). Heart failure treatment: Keeping up with best practices. *J. Fam. Pract.* 67, 18–26.

Bruckbauer, A., and Zemel, M.B. (2014). Synergistic effects of polyphenols and methylxanthines with Leucine on AMPK/Sirtuin-mediated metabolism in muscle cells and adipocytes. *PLoS One* 9, e89166.

Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., et al. (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011–2015.

Brush, M.H., Weiser, D.C., and Shenolikar, S. (2003). Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Targets Protein Phosphatase 1 α to the Endoplasmic Reticulum and Promotes Dephosphorylation of the α Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1292–1303.

Buler, M., Andersson, U., and Hakkola, J. (2016). Who watches the watchmen? Regulation of the expression and activity of sirtuins. *FASEB J.* fj.201600410RR.

Burda, P., Jakob, C.A., Beinhauer, J., Hegemann, J.H., and Aebi, M. (1999). Ordered assembly of the asymmetrically branched lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum is ensured by the substrate specificity of the individual glycosyltransferases. *Glycobiology* 9, 617–625.

Burman, C., and Ktistakis, N.T. (2010). Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett.* 584, 1302–1312.

Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J.N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J.C., Elliott, P.J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056–1060.

Cantó, C., Houtkooper, R.H., Pirinen, E., Youn, D.Y., Oosterveer, M.H., Cen, Y., Fernandez-Marcos, P.J., Yamamoto, H., Andreux, P.A., Cettour-Rose, P., et al. (2012). The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab.* 15, 838–847.

Cao, Y., Jiang, X., Ma, H., Wang, Y., Xue, P., and Liu, Y. (2016). SIRT1 and insulin resistance. *J. Diabetes Complications* 30, 178–183.

Castillero, E., Akashi, H., Pendrak, K., Yerebakan, H., Najjar, M., Wang, C., Naka, Y., Mancini, D.M., Sweeney, H.L., D'Armiento, J.M., et al. (2015). Attenuation of the Unfolded Protein Response and Endoplasmic Reticulum Stress after Mechanical Unloading in Dilated Cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* ajpheart.00056.2015.

Cazanave, S.C., Elmi, N.A., Akazawa, Y., Bronk, S.F., Mott, J.L., and Gores, G.J. (2010). CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G236.

Celik, A., Kervestin, S., and Jacobson, A. (2015). NMD: at the crossroads between translation termination and ribosome recycling. *Biochimie* 114, 2.

Ceylan-Isik, A.F., Sreejayan, N., and Ren, J. (2011). Endoplasmic reticulum Chaperon Tauroursodeoxycholic Acid Alleviates Obesity-Induced Myocardial Contractile Dysfunction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 107.

Chan, D.C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 79–99.

Chan, N.C., Salazar, A.M., Pham, A.H., Sweredoski, M.J., Kolawa, N.J., Graham, R.L.J., Hess, S., and Chan, D.C. (2011). Broad activation of the ubiquitin–proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1726.

Cheang, W.S., Tian, X.Y., Wong, W.T., Lau, C.W., Lee, S.S.-T., Chen, Z.Y., Yao, X., Wang, N., and Huang, Y. (2014). Metformin protects endothelial function in diet-induced obese mice by inhibition of endoplasmic reticulum stress through 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase-peroxisome proliferator-activated receptor δ pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 830–836.

Chen, H., and Chan, D.C. (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum. Mol. Genet.* 14, R283–R289.

Chen, P.-S., Joung, B., Shinohara, T., Das, M., Chen, Z., and Lin, S.-F. (2010). The Initiation of the Heart Beat. *Circ. J.* 74, 221–225.

Chen, W.Y., Wang, D.H., Yen, R.C., Luo, J., Gu, W., and Baylin, S.B. (2005). Tumor Suppressor HIC1 Directly Regulates SIRT1 to Modulate p53-Dependent DNA-Damage Responses. *Cell* 123, 437–448.

Cheng, J., Liu, C., Liu, L., Chen, X., Shan, J., Shen, J., Zhu, W., and Qian, C. (2016a). MEK1 signaling promotes self-renewal and tumorigenicity of liver cancer stem cells via maintaining SIRT1 protein stabilization. *Oncotarget* 7, 20597.

Cheng, Y., Ren, X., Zhang, Y., Patel, R., Sharma, A., Wu, H., Robertson, G.P., Yan, L., Rubin, E., and Yang, J.-M. (2011). eEF-2 kinase dictates cross-talk between autophagy and apoptosis induced by Akt inhibition, thereby modulating cytotoxicity of novel Akt inhibitor MK-2206. *Cancer Res.* 71, 2654–2663.

Cheng, Y., Ren, X., Zhang, Y., Shan, Y., Huber-Keener, K.J., Zhang, L., Kimball, S.R., Harvey, H., Jefferson, L.S., and Yang, J.-M. (2013). Integrated regulation of autophagy and apoptosis by EEF2K controls cellular fate and modulates the efficacy of curcumin and velcade against tumor cells. *Autophagy* 9, 208–219.

Cheng, Y., Di, S., Fan, C., Cai, L., Gao, C., Jiang, P., Hu, W., Ma, Z., Jiang, S., Dong, Y., et al. (2016b). SIRT1 activation by pterostilbene attenuates the skeletal muscle oxidative stress injury and mitochondrial dysfunction induced by ischemia reperfusion injury. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 21, 905–916.

Chernorudskiy, A.L., and Zito, E. (2017). Regulation of Calcium Homeostasis by ER Redox: A Close-Up of the ER/Mitochondria Connection. *J. Mol. Biol.* 429, 620–632.

Chiong, M., Wang, Z.V., Pedrozo, Z., Cao, D.J., Troncoso, R., Ibacache, M., Criollo, A., Nemchenko, A., Hill, J.A., and Lavandero, S. (2011). Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis.* 2, e244.

- Chipuk, J.E., Fisher, J.C., Dillon, C.P., Kriwacki, R.W., Kuwana, T., and Green, D.R. (2008). Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 20327–20332.
- Choi, S.-E., Fu, T., Seok, S., Kim, D.-H., Yu, E., Lee, K.-W., Kang, Y., Li, X., Kemper, B., and Kemper, J.K. (2013). Elevated microRNA-34a in obesity reduces NAD⁺ levels and SIRT1 activity by directly targeting NAMPT. *Aging Cell* *12*, 1062–1072.
- Chou, H.-C., and Chan, H.-L. (2014). 5-Methoxytryptophan-dependent protection of cardiomyocytes from heart ischemia reperfusion injury. *Arch. Biochem. Biophys.* *543*, 15–22.
- Chouchani, E.T., Kazak, L., and Spiegelman, B.M. (2017). Mitochondrial reactive oxygen species and adipose tissue thermogenesis: Bridging physiology and mechanisms. *J. Biol. Chem.* *292*, 16810–16816.
- Chowdhury, S., Sinha, K., Banerjee, S., and Sil, P.C. (2016). Taurine protects cisplatin induced cardiotoxicity by modulating inflammatory and endoplasmic reticulum stress responses. *BioFactors Oxf. Engl.* *42*, 647–664.
- Chung, J.H., Choi, H.J., Kim, S.Y., Hong, K.S., Min, S.K., Nam, M.H., Kim, C.W., Koh, Y.H., and Seo, J.B. (2011). Proteomic and biochemical analyses reveal the activation of unfolded protein response, ERK-1/2 and ribosomal protein S6 signaling in experimental autoimmune myocarditis rat model. *BMC Genomics* *12*, 520.
- Cody, R.J. (1997). The sympathetic nervous system and the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* *80*, 9J-14J.
- Conrad, E., Polonio-Vallon, T., Meister, M., Matt, S., Bitomsky, N., Herbel, C., Liebl, M., Greiner, V., Kriznik, B., Schumacher, S., et al. (2016). HIPK2 restricts SIRT1 activity upon severe DNA damage by a phosphorylation-controlled mechanism. *Cell Death Differ.* *23*, 110.
- Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A., and Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J. Cell Biol.* *174*, 915–921.
- Cueno, M.E., Tamura, M., and Ochiai, K. (2015). Middle-aged rats orally supplemented with gel-encapsulated catechin favorably increases blood cytosolic NADPH levels. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* *22*, 425–430.
- Cullinan, S.B., and Diehl, J.A. (2006). Coordination of ER and oxidative stress signaling: The PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*, 317–332.
- Dai, J.M., Wang, Z.Y., Sun, D.C., Lin, R.X., and Wang, S.Q. (2007). SIRT1 interacts with p73 and suppresses p73-dependent transcriptional activity. *J. Cell. Physiol.* *210*, 161–166.
- Dalal, S., Foster, C.R., Das, B.C., Singh, M., and Singh, K. (2012). B-adrenergic receptor stimulation induces endoplasmic reticulum stress in adult cardiac myocytes: role in apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* *364*, 59–70.
- Dayalan Naidu, S., and Dinkova-Kostova, A.T. (2017). Regulation of the mammalian heat shock factor 1. *FEBS J.* *284*, 1606–1627.
- Deegan, S., Saveljeva, S., Gorman, A.M., and Samali, A. (2013). Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 2425–2441.

- Delorme, B., Dahl, E., Jarry-Guichard, T., Briand, J.-P., Willecke, K., Gros, D., and Théveniau-Ruissy, M. (1997). Expression Pattern of Connexin Gene Products at the Early Developmental Stages of the Mouse Cardiovascular System. *Circ. Res.* *81*, 423–437.
- Dey, M., Velyvis, A., Li, J.J., Chiu, E., Chiovitti, D., Kay, L.E., Sicheri, F., and Dever, T.E. (2011). Requirement for kinase-induced conformational change in eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) restricts phosphorylation of Ser51. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4316–4321.
- Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L., et al. (2010). The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J. Cell Biol.* *191*, 155–168.
- Ding, W., Zhang, X., Huang, H., Ding, N., Zhang, S., Hutchinson, S.Z., and Zhang, X. (2014). Adiponectin Protects Rat Myocardium against Chronic Intermittent Hypoxia-Induced Injury via Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress. *PLoS ONE* *9*.
- Ding, W.-X., Ni, H.-M., Gao, W., Hou, Y.-F., Melan, M.A., Chen, X., Stolz, D.B., Shao, Z.-M., and Yin, X.-M. (2007a). Differential Effects of Endoplasmic Reticulum Stress-induced Autophagy on Cell Survival. *J. Biol. Chem.* *282*, 4702–4710.
- Ding, W.-X., Ni, H.-M., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D.B., Ron, D., and Yin, X.-M. (2007b). Linking of Autophagy to Ubiquitin-Proteasome System Is Important for the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Viability. *Am. J. Pathol.* *171*, 513–524.
- Dioum, E.M., Chen, R., Alexander, M.S., Zhang, Q., Hogg, R.T., Gerard, R.D., and Garcia, J.A. (2009). Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science* *324*, 1289–1293.
- Donnelly, N., Gorman, A.M., Gupta, S., and Samali, A. (2013). The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *70*, 3493–3511.
- Duan, Q., Chen, C., Yang, L., Li, N., Gong, W., Li, S., and Wang, D.W. (2015). MicroRNA regulation of unfolded protein response transcription factor XBP1 in the progression of cardiac hypertrophy and heart failure in vivo. *J. Transl. Med.* *13*.
- Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* *331*, 456–461.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *148*, 2207–2216.
- Fan, W., and Luo, J. (2010). SIRT1 regulates UV-induced DNA repair through deacetylating XPA. *Mol. Cell* *39*, 247–258.
- Fang, S.-J., Li, P.-Y., Wang, C.-M., Xin, Y., Lu, W.-W., Zhang, X.-X., Zuo, S., Ma, C.-S., Tang, C.-S., Nie, S.-P., et al. (2016). Inhibition of endoplasmic reticulum stress by neuregulin-1 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Peptides*.
- Filadi, R., Theurey, P., and Pizzo, P. (2017). The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. *Cell Calcium* *62*, 1–15.

- Finck, B.N., and Kelly, D.P. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation* 115, 2540–2548.
- Forbes, M.S., and Sperelakis, N. (1985). Intercalated discs of mammalian heart: A review of structure and function. *Tissue Cell* 17, 605–648.
- Ford, J., Ahmed, S., Allison, S., Jiang, M., and Milner, J. (2008). JNK2-dependent regulation of SIRT1 protein stability. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 3091–3097.
- Fu, H.Y., Okada, K., Liao, Y., Tsukamoto, O., Isomura, T., Asai, M., Sawada, T., Okuda, K., Asano, Y., Sanada, S., et al. (2010). Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation* 122, 361–369.
- Fu, H.Y., Sanada, S., Matsuzaki, T., Liao, Y., Okuda, K., Yamato, M., Tsuchida, S., Araki, R., Asano, Y., Asanuma, H., et al. (2016). Chemical Endoplasmic Reticulum Chaperone Alleviates Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction. *Circ. Res.* 118, 798–809.
- Fu, M., Xu, S., Zhang, J., Pang, Y., Liu, N., Su, J., and Tang, C. (1999). Involvement of calcineurin in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibroblast hyperplasia of rats. *Heart Vessels* 14, 283–288.
- Fulco, M., Cen, Y., Zhao, P., Hoffman, E.P., McBurney, M.W., Sauve, A.A., and Sartorelli, V. (2008). Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev. Cell* 14, 661–673.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25, 486–541.
- Ganley, I.G., Lam, D.H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* 284, 12297–12305.
- Gao, Z., Zhang, J., Kheterpal, I., Kennedy, N., Davis, R.J., and Ye, J. (2011). Sirtuin 1 (SIRT1) protein degradation in response to persistent c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation contributes to hepatic steatosis in obesity. *J. Biol. Chem.* 286, 22227–22234.
- Gardner, B.M., and Walter, P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* 333, 1891–1894.
- Geng, J., Nair, U., Yasumura-Yorimitsu, K., and Klionsky, D.J. (2010). Post-Golgi Sec Proteins Are Required for Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 21, 2257.
- George, I., Sabbah, H.N., Xu, K., Wang, N., and Wang, J. (2011). β -adrenergic receptor blockade reduces endoplasmic reticulum stress and normalizes calcium handling in a coronary embolization model of heart failure in canines. *Cardiovasc. Res.* 91, 447–455.
- Gerhart-Hines, Z., Dominy, J.E., Jr, Blättler, S.M., Jedrychowski, M.P., Banks, A.S., Lim, J.-H., Chim, H., Gygi, S.P., and Puigserver, P. (2011). The cAMP/PKA pathway rapidly activates SIRT1 to promote fatty acid oxidation independently of changes in NAD(+). *Mol. Cell* 44, 851–863.

- Gertz, M., and Steegborn, C. (2010). Function and regulation of the mitochondrial Sirtuin isoform Sirt5 in Mammalia. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1804, 1658–1665.
- Gething, M.J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10, 465–472.
- Ghosh, A., Sengupta, A., Seerapu, G.P.K., Nakhi, A., Shivaji Ramarao, E.V.V., Bung, N., Bulusu, G., Pal, M., and Haldar, D. (2017). A novel SIRT1 inhibitor, 4bb induces apoptosis in HCT116 human colon carcinoma cells partially by activating p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 488, 562–569.
- Ghosh, H.S., McBurney, M., and Robbins, P.D. (2010). SIRT1 Negatively Regulates the Mammalian Target of Rapamycin. *PLoS ONE* 5, e9199.
- Glembotski, C.C. (2008). The Role of the Unfolded Protein Response in the Heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44, 453–459.
- Gordon, P.B., Holen, I., Fosse, M., Røtnes, J.S., and Seglen, P.O. (1993). Dependence of hepatocytic autophagy on intracellularly sequestered calcium. *J. Biol. Chem.* 268, 26107–26112.
- Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B.F. (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol.* 2, reviews1018.1.
- Groenendyk, J., Sreenivasaiah, P.K., Kim, D.H., Agellon, L.B., and Michalak, M. (2010). Biology of Endoplasmic Reticulum Stress in the Heart. *Circ. Res.* 107, 1185–1197.
- Groenendyk, J., Agellon, L.B., and Michalak, M. (2013). Coping with endoplasmic reticulum stress in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 49–67.
- Gu, C., Xing, Y., Jiang, L., Chen, M., Xu, M., Yin, Y., Li, C., Yang, Z., Yu, L., and Ma, H. (2013). Impaired cardiac SIRT1 activity by carbonyl stress contributes to aging-related ischemic intolerance. *PloS One* 8, e74050.
- Gu, X.S., Wang, Z.B., Ye, Z., Lei, J.P., Li, L., Su, D.F., and Zheng, X. (2014). Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates AMPK and improves cardiac function in heart failure. *Genet. Mol. Res. GMR* 13, 323–335.
- Guan, H.-S., Shangguan, H.-J., Shang, Z., Yang, L., Meng, X.-M., and Qiao, S.-B. (2011). Endoplasmic reticulum stress caused by left ventricular hypertrophy in rats: effects of telmisartan. *Am. J. Med. Sci.* 342, 318–323.
- Guerra, S., Leri, A., Wang, X., Finato, N., Di Loreto, C., Beltrami, C.A., Kajstura, J., and Anversa, P. (1999). Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ. Res.* 85, 856–866.
- Guo, F.-J., Xiong, Z., Lu, X., Ye, M., Han, X., and Jiang, R. (2014). ATF6 upregulates XBP1S and inhibits ER stress-mediated apoptosis in osteoarthritis cartilage. *Cell. Signal.* 26, 332–342.
- Guo, R., Liu, W., Liu, B., Zhang, B., Li, W., and Xu, Y. (2015). SIRT1 suppresses cardiomyocyte apoptosis in diabetic cardiomyopathy: An insight into endoplasmic reticulum stress response mechanism. *Int. J. Cardiol.* 191, 36–45.
- Guo, X., Williams, J.G., Schug, T.T., and Li, X. (2010). DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1. *J. Biol. Chem.* 285, 13223–13232.

Guo, Y., Zhang, L., Li, F., Hu, C.-P., and Zhang, Z. (2016). Restoration of sirt1 function by pterostilbene attenuates hypoxia-reoxygenation injury in cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* *776*, 26–33.

Gupta, A., Hossain, M.M., Read, D.E., Hetz, C., Samali, A., and Gupta, S. (2015). PERK regulated miR-424(322)-503 cluster fine-tunes activation of IRE1 and ATF6 during Unfolded Protein Response. *Sci. Rep.* *5*.

Gurusamy, N., Lekli, I., Gorbunov, N.V., Gherghiceanu, M., Popescu, L.M., and Das, D.K. (2009). Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in association with BAG-1 protein. *J. Cell. Mol. Med.* *13*, 373–387.

Gurusamy, N., Lekli, I., Mukherjee, S., Ray, D., Ahsan, M.K., Gherghiceanu, M., Popescu, L.M., and Das, D.K. (2010). Cardioprotection by resveratrol: a novel mechanism via autophagy involving the mTORC2 pathway. *Cardiovasc. Res.* *86*, 103–112.

Haigis, M.C., and Sinclair, D.A. (2010). Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu. Rev. Pathol.* *5*, 253–295.

Hailey, D.W., Kim, P.K., Satpute-Krishnan, P., Rambold, A.S., Mitra, K., Sougrat, R., and Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* *141*, 656.

Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., and Gottlieb, R.A. (2006). Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* *281*, 29776–29787.

Hamada, H., Suzuki, M., Yuasa, S., Mimura, N., Shinozuka, N., Takada, Y., Suzuki, M., Nishino, T., Nakaya, H., Koseki, H., et al. (2004). Dilated Cardiomyopathy Caused by Aberrant Endoplasmic Reticulum Quality Control in Mutant KDEL Receptor Transgenic Mice. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 8007.

Hammond, C., Braakman, I., and Helenius, A. (1994). Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 913–917.

Han, L., Zhou, R., Niu, J., McNutt, M.A., Wang, P., and Tong, T. (2010). SIRT1 is regulated by a PPAR γ -SIRT1 negative feedback loop associated with senescence. *Nucleic Acids Res.* *38*, 7458–7471.

Han, L., Zhao, G., Wang, H., Tong, T., and Chen, J. (2014). Calorie restriction upregulated sirtuin 1 by attenuating its ubiquitin degradation in cancer cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *41*, 165–168.

Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* *11*, 619–633.

Hariharan, N., Maejima, Y., Nakae, J., Paik, J., Depinho, R.A., and Sadoshima, J. (2010). Deacetylation of FoxO by Sirt1 Plays an Essential Role in Mediating Starvation-Induced Autophagy in Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* *107*, 1470–1482.

Hasegawa, K., Yasuda, T., Shiraishi, C., Fujiwara, K., Przedborski, S., Mochizuki, H., and Yoshikawa, K. (2016). Promotion of mitochondrial biogenesis by necdin protects neurons against mitochondrial insults. *Nat. Commun.* *7*, 10943.

- Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., and Su, T.-P. (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol.* 19, 81–88.
- Hayashida, S., Arimoto, A., Kuramoto, Y., Kozako, T., Honda, S.-I., Shimeno, H., and Soeda, S. (2010). Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD⁺-dependent protein deacetylase, via activation of PPAR α in mice. *Mol. Cell. Biochem.* 339, 285–292.
- He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67–93.
- He, Q., Pu, J., Yuan, A., Lau, W.B., Gao, E., Koch, W.J., Ma, X.-L., and He, B. (2014). Activation of liver-X-receptor α but not liver-X-receptor β protects against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ. Heart Fail.* 7, 1032–1041.
- Heifetz, A., Keenan, R.W., and Elbein, A.D. (1979). Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase. *Biochemistry (Mosc.)* 18, 2186–2192.
- Hetz, C., Thielen, P., Matus, S., Nassif, M., Court, F., Kiffin, R., Martinez, G., Cuervo, A.M., Brown, R.H., and Glimcher, L.H. (2009). XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev.* 23, 2294–2306.
- Hirsch, I., Weiwad, M., Prell, E., and Ferrari, D.M. (2014). ERp29 deficiency affects sensitivity to apoptosis via impairment of the ATF6-CHOP pathway of stress response. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 19, 801–815.
- Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., et al. (2004). Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J. Cell Biol.* 165, 347–356.
- Hong, J., Kim, K., Kim, J.-H., and Park, Y. (2017). The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Cardiovascular Disease and Exercise. *Int. J. Vasc. Med.* 2017.
- Hong, S., Moreno-Navarrete, J.M., Wei, X., Kikukawa, Y., Tzamelis, I., Prasad, D., Lee, Y., Asara, J.M., Fernandez-Real, J.M., Maratos-Flier, E., et al. (2015). Nicotinamide N-methyltransferase regulates hepatic nutrient metabolism through Sirt1 protein stabilization. *Nat. Med.* 21, 887–894.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20, 1981.
- Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L.A., and Rabinowich, H. (2010). Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* 6, 891–900.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.-L., et al. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191–196.
- Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., et al. (2007). Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase- β , and Bcl-2. *Mol. Cell* 25, 193–205.

- Hsu, C.-P., Zhai, P., Yamamoto, T., Maejima, Y., Matsushima, S., Hariharan, N., Shao, D., Takagi, H., Oka, S., and Sadoshima, J. (2010). Sirt1 Protects the Heart from Ischemia/Reperfusion. *Circulation* 122, 2170.
- Hu, Y.-Q., Chen, W., Yan, M.-H., Lai, J.-J., Tang, N., and Wu, L. (2017). Ischemic preconditioning protects brain from ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through PERK pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 21, 5736–5744.
- Huang, C., Yitzhaki, S., Perry, C.N., Liu, W., Giricz, Z., Mentzer, R.M., and Gottlieb, R.A. (2010). Autophagy induced by ischemic preconditioning is essential for cardioprotection. *J Cardiovasc. Transl. Res.* 3, 365–373.
- Huang, J., Wan, L., Lu, H., and Li, X. (2018). High expression of active ATF6 aggravates endoplasmic reticulum stress-induced vascular endothelial cell apoptosis through the mitochondrial apoptotic pathway. *Mol. Med. Rep.* 17, 6483–6489.
- Huang, M., Xu, A., Wu, X., Zhang, Y., Guo, Y., Guo, F., Pan, Z., and Kong, L. (2016). Japanese encephalitis virus induces apoptosis by the IRE1/JNK pathway of ER stress response in BHK-21 cells. *Arch. Virol.* 161, 699–703.
- Huang, R., Xu, Y., Wan, W., Shou, X., Qian, J., You, Z., Liu, B., Chang, C., Zhou, T., Lippincott-Schwartz, J., et al. Deacetylation of Nuclear LC3 Drives Autophagy Initiation under Starvation. *Mol. Cell.*
- Huss, J.M., Torra, I.P., Staels, B., Giguère, V., and Kelly, D.P. (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, 9079–9091.
- Huxley, A.F. (1957). Muscle structure and theories of contraction. *Prog. Biophys. Biophys. Chem.* 7, 255–318.
- Huynh, K.K., Eskelinen, E.-L., Scott, C.C., Malevanets, A., Saftig, P., and Grinstein, S. (2007). LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J.* 26, 313.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795–800.
- Ireland, B.S., Niggemann, M., and Williams, D.B. (2006). In vitro assays of the functions of calnexin and calreticulin, lectin chaperones of the endoplasmic reticulum. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 347, 331–342.
- Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S., and Yamamoto, M. (2000). Transcription Factor Nrf2 Coordinately Regulates a Group of Oxidative Stress-inducible Genes in Macrophages. *J. Biol. Chem.* 275, 16023–16029.
- Iurlaro, R., and Muñoz-Pinedo, C. (2016). Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J.* 283, 2640–2652.
- Iwahara, N., Hisahara, S., Hayashi, T., and Horio, Y. (2009). Transcriptional activation of NAD⁺-dependent protein deacetylase SIRT1 by nuclear receptor TLX. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386, 671–675.

- Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J., and Spiegelman, B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 12017–12022.
- Jang, S., Kang, H.T., and Hwang, E.S. (2012). Nicotinamide-induced mitophagy: event mediated by high NAD⁺/NADH ratio and SIRT1 protein activation. *J. Biol. Chem.* *287*, 19304–19314.
- Jarosch, E., Lenk, U., and Sommer, T. (2003). Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Int. Rev. Cytol.* *223*, 39–81.
- Javadov, S., and Karmazyn, M. (2007). Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening as an Endpoint to Initiate Cell Death and as a Putative Target for Cardioprotection. *Cell. Physiol. Biochem.* *20*, 1–22.
- Jeong, J., Juhn, K., Lee, H., Kim, S.-H., Min, B.-H., Lee, K.-M., Cho, M.-H., Park, G.-H., and Lee, K.-H. (2007). SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Exp. Mol. Med.* *39*, 8–13.
- Jeong, J.-K., Moon, M.-H., Lee, Y.-J., Seol, J.-W., and Park, S.-Y. (2013). Autophagy induced by the class III histone deacetylase Sirt1 prevents prion peptide neurotoxicity. *Neurobiol. Aging* *34*, 146–156.
- Ježek, J., Cooper, K.F., and Strich, R. (2018). Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxid. Basel Switz.* *7*.
- Jimbo, A., Fujita, E., Kouroku, Y., Ohnishi, J., Inohara, N., Kuida, K., Sakamaki, K., Yonehara, S., and Momoi, T. (2003). ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp. Cell Res.* *283*, 156–166.
- Jin, H.-O., Seo, S.-K., Woo, S.-H., Kim, E.-S., Lee, H.-C., Yoo, D.-H., An, S., Choe, T.-B., Lee, S.-J., Hong, S.-I., et al. (2009). Activating transcription factor 4 and CCAAT/enhancer-binding protein- β negatively regulate the mammalian target of rapamycin via Redd1 expression in response to oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Free Radic. Biol. Med.* *46*, 1158–1167.
- Jin, J., Iakova, P., Jiang, Y., Medrano, E.E., and Timchenko, N.A. (2011). The reduction of SIRT1 in livers of old mice leads to impaired body homeostasis and to inhibition of liver proliferation. *Hepatology* *54*, 989–998.
- Johansen, T., and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* *7*, 279.
- Jornayvaz, F.R., and Shulman, G.I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* *47*, 69–84.
- Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1992–2003.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* *19*, 5720–5728.

- Kaisto, T., and Metsikkö, K. (2003). Distribution of the endoplasmic reticulum and its relationship with the sarcoplasmic reticulum in skeletal myofibers. *Exp. Cell Res.* *289*, 47–57.
- Kajstura, J., Gurusamy, N., Ogórek, B., Goichberg, P., Clavo-Rondon, C., Hosoda, T., D'Amario, D., Bardelli, S., Beltrami, A.P., Cesselli, D., et al. (2010). Myocyte turnover in the aging human heart. *Circ. Res.* *107*, 1374–1386.
- Kalai, M., Lamkanfi, M., Denecker, G., Boogmans, M., Lippens, S., Meeus, A., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2003). Regulation of the expression and processing of caspase-12. *J. Cell Biol.* *162*, 457.
- Kalous, K.S., Wynia-Smith, S.L., Olp, M.D., and Smith, B.C. (2016). Mechanism of Sirt1 NAD⁺-dependent Deacetylase Inhibition by Cysteine S-nitrosation. *J. Biol. Chem.* jbc.M116.754655.
- Kanamori, H., Takemura, G., Goto, K., Tsujimoto, A., Ogino, A., Takeyama, T., Kawaguchi, T., Watanabe, T., Morishita, K., Kawasaki, M., et al. (2013). Resveratrol reverses remodeling in hearts with large, old myocardial infarctions through enhanced autophagy-activating AMP kinase pathway. *Am. J. Pathol.* *182*, 701–713.
- Kang, H.T., and Hwang, E.S. (2009). Nicotinamide enhances mitochondria quality through autophagy activation in human cells. *Aging Cell* *8*, 426–438.
- Kang, H., Jung, J.-W., Kim, M.K., and Chung, J.H. (2009). CK2 is the regulator of SIRT1 substrate-binding affinity, deacetylase activity and cellular response to DNA-damage. *PLoS One* *4*, e6611.
- Kang, H., Suh, J.-Y., Jung, Y.-S., Jung, J.-W., Kim, M.K., and Chung, J.H. (2011). Peptide switch is essential for Sirt1 deacetylase activity. *Mol. Cell* *44*, 203–213.
- Katto, J., Engel, N., Abbas, W., Herbein, G., and Mahlknecht, U. (2013). Transcription factor NFκB regulates the expression of the histone deacetylase SIRT1. *Clin. Epigenetics* *5*, 11.
- Kaufman, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* *13*, 1211–1233.
- Kawakami, S., Kinoshita, Y., Maruki-Uchida, H., Yanae, K., Sai, M., and Ito, T. (2014). Piceatannol and its metabolite, isorhapontigenin, induce SIRT1 expression in THP-1 human monocytic cell line. *Nutrients* *6*, 4794–4804.
- Kawashima, T., Inuzuka, Y., Okuda, J., Kato, T., Niizuma, S., Tamaki, Y., Iwanaga, Y., Kawamoto, A., Narazaki, M., Matsuda, T., et al. (2011). Constitutive SIRT1 overexpression impairs mitochondria and reduces cardiac function in mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *51*, 1026–1036.
- Kazlauskaitė, A., Martínez-Torres, R.J., Wilkie, S., Kumar, A., Peltier, J., Gonzalez, A., Johnson, C., Zhang, J., Hope, A.G., Pegg, M., et al. (2015). Binding to serine 65-phosphorylated ubiquitin primes Parkin for optimal PINK1-dependent phosphorylation and activation. *EMBO Rep.* *16*, 939–954.
- Kelekar, A., and Thompson, C.B. (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.* *8*, 324–330.
- Kenney, J.W., Moore, C.E., Wang, X., and Proud, C.G. (2014). Eukaryotic elongation factor 2 kinase, an unusual enzyme with multiple roles. *Adv. Biol. Regul.* *55*, 15–27.

- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Kikuchi, H., Kuribayashi, F., Mimuro, H., Imajoh-Ohmi, S., Nakayama, M., Takami, Y., Nishitoh, H., and Nakayama, T. (2015). Lack of GCN5 remarkably enhances the resistance against prolonged endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through up-regulation of Bcl-2 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463, 870–875.
- Kim, D.-S., Ha, K.-C., Kwon, D.-Y., Kim, M.-S., Kim, H.-R., Chae, S.-W., and Chae, H.-J. (2008a). Kaempferol protects ischemia/reperfusion-induced cardiac damage through the regulation of endoplasmic reticulum stress. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 30, 257–270.
- Kim, E.-J., Kho, J.-H., Kang, M.-R., and Um, S.-J. (2007a). Active Regulator of SIRT1 Cooperates with SIRT1 and Facilitates Suppression of p53 Activity. *Mol. Cell* 28, 277–290.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J.J. (2007b). Minireview: Selective Degradation of Mitochondria by Mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 245–253.
- Kim, J.-E., Chen, J., and Lou, Z. (2008b). DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature* 451, 583–586.
- Kiran, S., Anwar, T., Kiran, M., and Ramakrishna, G. (2015). Sirtuin 7 in cell proliferation, stress and disease: Rise of the Seventh Sirtuin! *Cell. Signal.* 27, 673–682.
- Klar, A.J.S., Fogel, S., and Macleod, K. (1979). MAR1—a Regulator of the HMa and HMα Loci in SACCHAROMYCES CEREVISIAE. *Genetics* 93, 37–50.
- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1–222.
- Kornberg, M.D., Sen, N., Hara, M.R., Juluri, K.R., Nguyen, J.V.K., Snowman, A.M., Law, L., Hester, L.D., and Snyder, S.H. (2010). GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. *Nat. Cell Biol.* 12, 1094–1100.
- Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., and Peter, M. (2008). Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat. Cell Biol.* 10, 602–610.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol. Rev.* 87, 99–163.
- Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* 40, 280–293.
- Kubli, D.A., and Gustafsson, Å.B. (2012). Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ. Res.* 111, 1208–1221.
- Kugel, S., and Mostoslavsky, R. (2014). Chromatin and beyond: the multitasking roles for SIRT6. *Trends Biochem. Sci.* 39, 72.
- Kume, S., Uzu, T., Horiike, K., Chin-Kanasaki, M., Isshiki, K., Araki, S.-I., Sugimoto, T., Haneda, M., Kashiwagi, A., and Koya, D. (2010). Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *J. Clin. Invest.* 120, 1043–1055.

- Kusumoto, F.M., Calkins, H., Boehmer, J., Buxton, A.E., Chung, M.K., Gold, M.R., Hohnloser, S.H., Indik, J., Lee, R., Mehra, M.R., et al. (2014). HRS/ACC/AHA expert consensus statement on the use of implantable cardioverter-defibrillator therapy in patients who are not included or not well represented in clinical trials. *Circulation* 130, 94–125.
- Lakowski, B., and Hekimi, S. (1998). The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13091–13096.
- Lampert, M.A., and Gustafsson, Å.B. (2018). Balancing Autophagy for a Healthy Heart. *Curr. Opin. Physiol.* 1, 21–26.
- Lan, F., Cacicedo, J.M., Ruderman, N., and Ido, Y. (2008). SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 283, 27628–27635.
- Landry, J., Slama, J.T., and Sternglanz, R. (2000). Role of NAD(+) in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 685–690.
- Larsen, B.D., and Sørensen, C.S. (2017). The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *FEBS J.* 284, 1160–1170.
- Latrémouille, C., Carpentier, A., Leprince, P., Roussel, J.-C., Cholley, B., Boissier, E., Epailly, E., Capel, A., Jansen, P., and Smadja, D.M. (2018). A bioprosthetic total artificial heart for end-stage heart failure: Results from a pilot study. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 37, 33–37.
- Lau, A.W., Liu, P., Inuzuka, H., and Gao, D. (2014). SIRT1 phosphorylation by AMP-activated protein kinase regulates p53 acetylation. *Am. J. Cancer Res.* 4, 245.
- Lavandero, S., Chiong, M., Rothermel, B.A., and Hill, J.A. (2015). Autophagy in cardiovascular biology. *J. Clin. Invest.* 125, 55–64.
- Lee, A.S. (1992). Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 267–273.
- Lee, H., and Yoon, Y. (2016). Mitochondrial fission and fusion. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 1725–1735.
- Lee, Y.-K., and Lee, J.-A. (2016). Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Rep.* 49, 424–430.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., and Glimcher, L.H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol. Cell Biol.* 23, 7448–7459.
- Lee, I.H., Cao, L., Mostoslavsky, R., Lombard, D.B., Liu, J., Bruns, N.E., Tsokos, M., Alt, F.W., and Finkel, T. (2008a). A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3374–3379.
- Lee, J.-A., Beigneux, A., Ahmad, S.T., Young, S.G., and Gao, F.-B. (2007). ESCRT-III Dysfunction Causes Autophagosome Accumulation and Neurodegeneration. *Curr. Biol.* 17, 1561–1567.

- Lee, J.E., Oney, M., Frizzell, K., Phadnis, N., and Hollien, J. (2015). *Drosophila melanogaster* Activating Transcription Factor 4 Regulates Glycolysis During Endoplasmic Reticulum Stress. *G3 GenesGenomesGenetics* 5, 667–675.
- Lee, K.P.K., Dey, M., Neculai, D., Cao, C., Dever, T.E., and Sicheri, F. (2008b). Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. *Cell* 132, 89–100.
- Lekes, D., Szadvari, I., Krizanova, O., Lopusna, K., Rezuchova, I., Novakova, M., Novakova, Z., Parak, T., and Babula, P. (2016). Nilotinib induces ER stress and cell death in H9c2 cells. *Physiol. Res.* 65, S505–S514.
- Leng, S., Iwanowycz, S., Saaoud, F., Wang, J., Wang, Y., Sergin, I., Razani, B., and Fan, D. (2016). Ursolic acid enhances macrophage autophagy and attenuates atherogenesis. *J. Lipid Res.* 57, 1006–1016.
- Leu, M., Ehler, E., and Perriard, J.C. (2001). Characterisation of postnatal growth of the murine heart. *Anat. Embryol. (Berl.)* 204, 217–224.
- Leyva, F., Nisam, S., and Auricchio, A. (2014). 20 years of cardiac resynchronization therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64, 1047–1058.
- Li, D., Bi, F.-F., Chen, N.-N., Cao, J.-M., Sun, W.-P., Zhou, Y.-M., Li, C.-Y., and Yang, Q. (2014). A novel crosstalk between BRCA1 and sirtuin 1 in ovarian cancer. *Sci. Rep.* 4, srep06666.
- Li, G., Mongillo, M., Chin, K.-T., Harding, H., Ron, D., Marks, A.R., and Tabas, I. (2009). Role of ERO1- α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 186, 783–792.
- Li, K., Casta, A., Wang, R., Lozada, E., Fan, W., Kane, S., Ge, Q., Gu, W., Orren, D., and Luo, J. (2008). Regulation of WRN protein cellular localization and enzymatic activities by SIRT1-mediated deacetylation. *J. Biol. Chem.* 283, 7590–7598.
- Li, M., Gao, P., and Zhang, J. (2016). Crosstalk between Autophagy and Apoptosis: Potential and Emerging Therapeutic Targets for Cardiac Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 332.
- Li, R.-J., He, K.-L., Li, X., Wang, L.-L., Liu, C.-L., and He, Y.-Y. (2015). Salubrinal protects cardiomyocytes against apoptosis in a rat myocardial infarction model via suppressing the dephosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α . *Mol. Med. Rep.* 12, 1043–1049.
- Li, W., Yang, Q., and Mao, Z. (2010). Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 749–763.
- Li, W., Li, J., and Bao, J. (2011). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1125–1136.
- Li, X.-H., Chen, C., Tu, Y., Sun, H.-T., Zhao, M.-L., Cheng, S.-X., Qu, Y., and Zhang, S. (2013). Sirt1 promotes axonogenesis by deacetylation of Akt and inactivation of GSK3. *Mol. Neurobiol.* 48, 490–499.
- Li, Y., Zhu, W., Tao, J., Xin, P., Liu, M., Li, J., and Wei, M. (2012). Fasudil protects the heart against ischemia-reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress and modulating SERCA activity: the differential role for PI3K/Akt and JAK2/STAT3 signaling pathways. *PLoS One* 7, e48115.

- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.-H., and Jung, J.U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.* 8, 688–699.
- Liao, C., Ashley, N., Diot, A., Morten, K., Phadwal, K., Williams, A., Fearnley, I., Rosser, L., Lowndes, J., Fratter, C., et al. (2017). Dysregulated mitophagy and mitochondrial organization in optic atrophy due to OPA1 mutations. *Neurology* 88, 131.
- Liao, J., Sun, A., Xie, Y., Isse, T., Kawamoto, T., Zou, Y., and Ge, J. (2012). Aldehyde dehydrogenase-2 deficiency aggravates cardiac dysfunction elicited by endoplasmic reticulum stress induction. *Mol. Med. Camb. Mass* 18, 785–793.
- Lim, J.-H., Lee, Y.-M., Chun, Y.-S., Chen, J., Kim, J.-E., and Park, J.-W. (2010). Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol. Cell* 38, 864–878.
- Lin, M.G., and Hurley, J.H. (2016). Structure and function of the ULK1 complex in autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 39, 61–68.
- Lin, Z., and Fang, D. (2013). The Roles of SIRT1 in Cancer. *Genes Cancer* 4, 97–104.
- Lin, H.-S., Yue, B.-D., and Ho, P.C. (2009). Determination of pterostilbene in rat plasma by a simple HPLC-UV method and its application in pre-clinical pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr. BMC* 23, 1308–1315.
- Lin, S.J., Defossez, P.A., and Guarente, L. (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126–2128.
- Liu, M., and Dudley, S.C. (2015). Role for the Unfolded Protein Response in Heart Disease and Cardiac Arrhythmias. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
- Liu, T.F., and McCall, C.E. (2013). Deacetylation by SIRT1 Reprograms Inflammation and Cancer. *Genes Cancer* 4, 135–147.
- Liu, Y., and Levine, B. (2015). Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ.* 22, 367–376.
- Liu, L., Liu, J., Huang, Z., Yu, X., Zhang, X., Dou, D., and Huang, Y. (2015). Berberine improves endothelial function by inhibiting endoplasmic reticulum stress in the carotid arteries of spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458, 796–801.
- Liu, X., Wang, D., Zhao, Y., Tu, B., Zheng, Z., Wang, L., Wang, H., Gu, W., Roeder, R.G., and Zhu, W.-G. (2011). Methyltransferase Set7/9 regulates p53 activity by interacting with Sirtuin 1 (SIRT1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1925–1930.
- Liu, X., Kwak, D., Lu, Z., Xu, X., Fassett, J., Wang, H., Wei, Y., Cavener, D.R., Hu, X., Hall, J., et al. (2014). Endoplasmic reticulum stress sensor protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) protects against pressure overload-induced heart failure and lung remodeling. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 64, 738–744.
- Liu, X., Ehmed, E., Li, B., Dou, J., Qiao, X., Jiang, W., Yang, X., Qiao, S., and Wu, Y. (2016a). Breast cancer metastasis suppressor 1 modulates SIRT1-dependent p53 deacetylation through interacting with DBC1. *Am. J. Cancer Res.* 6, 1441.

- Liu, Y., Adachi, M., Zhao, S., Hareyama, M., Koong, A., Luo, D., Rando, T., Imai, K., and Shinomura, Y. (2009). Preventing oxidative stress: a new role for XBP1. *Cell Death Differ.* *16*, 847–857.
- Liu, Y., Qi, S.Y., Ru, L.S., Ding, C., Wang, H.J., Li, A.Y., Xu, B.Y., Zhang, G.H., and Wang, D.M. (2016b). [Salubrinal improves cardiac function in rats with heart failure post myocardial infarction through reducing endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* *44*, 494–500.
- Lucken-Ardjomande, S., and Martinou, J.-C. (2005). Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization. *J. Cell Sci.* *118*, 473–483.
- Luo, J., Xia, Y., Luo, J., Li, J., Zhang, C., Zhang, H., Ma, T., Yang, L., and Kong, L. (2017). GRP78 inhibition enhances ATF4-induced cell death by the deubiquitination and stabilization of CHOP in human osteosarcoma. *Cancer Lett.* *410*, 112–123.
- Mair, W., Goymer, P., Pletcher, S.D., and Partridge, L. (2003). Demography of dietary restriction and death in *Drosophila*. *Science* *301*, 1731–1733.
- Majeski, A.E., and Dice, J.F. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 2435–2444.
- Mannherz, H.G., and Goody, R.S. (1976). Proteins of contractile systems. *Annu. Rev. Biochem.* *45*, 427–465.
- Mao, W., Iwai, C., Liu, J., Sheu, S.-S., Fu, M., and Liang, C.-S. (2008). Darbeopetin alfa exerts a cardioprotective effect in autoimmune cardiomyopathy via reduction of ER stress and activation of the PI3K/Akt and STAT3 pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *45*, 250–260.
- Marchi, S., Patergnani, S., Missiroli, S., Morciano, G., Rimessi, A., Wieckowski, M.R., Giorgi, C., and Pinton, P. (2018). Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium* *69*, 62–72.
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* *18*, 3066–3077.
- Marciniak, S.J., Garcia-Bonilla, L., Hu, J., Harding, H.P., and Ron, D. (2006). Activation-dependent substrate recruitment by the eukaryotic translation initiation factor 2 kinase PERK. *J. Cell Biol.* *172*, 201–209.
- Margariti, A., Li, H., Chen, T., Martin, D., Vizcay-Barrena, G., Alam, S., Karamariti, E., Xiao, Q., Zampetaki, A., Zhang, Z., et al. (2013). XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* *288*, 859–872.
- Marquez, R.T., and Xu, L. (2012). Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am. J. Cancer Res.* *2*, 214–221.
- Marsboom, G., Toth, P.T., Ryan, J.J., Hong, Z., Wu, X., Fang, Y.-H., Thenappan, T., Piao, L., Zhang, H.J., Pogoriler, J., et al. (2012). Dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial mitotic fission permits hyperproliferation of vascular smooth muscle cells and offers a novel therapeutic target in pulmonary hypertension. *Circ. Res.* *110*, 1484–1497.
- Martindale, J.J., Fernandez, R., Thuerauf, D., Whittaker, R., Gude, N., Sussman, M.A., and Glembotski, C.C. (2006). Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from

ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6. *Circ. Res.* 98, 1186–1193.

Márton, M., Kurucz, A., Lizák, B., Margittai, É., Bánhegyi, G., and Kapuy, O. (2017). A Systems Biological View of Life-and-Death Decision with Respect to Endoplasmic Reticulum Stress-The Role of PERK Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 18.

Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., Asano, T., Levine, B., and Sadoshima, J. (2007). Distinct Roles of Autophagy in the Heart During Ischemia and Reperfusion: Roles of AMP-Activated Protein Kinase and Beclin 1 in Mediating Autophagy. *Circ. Res.* 100, 914–922.

Matsushima, S., and Sadoshima, J. (2015). The role of sirtuins in cardiac disease. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 309, H1375.

Mattison, J.A., Roth, G.S., Lane, M.A., and Ingram, D.K. (2007). Dietary restriction in aging nonhuman primates. *Interdiscip. Top. Gerontol.* 35, 137–158.

Mattison, J.A., Colman, R.J., Beasley, T.M., Allison, D.B., Kemnitz, J.W., Roth, G.S., Ingram, D.K., Weindruch, R., Cabo, R. de, and Anderson, R.M. (2017). Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nat. Commun.* 8.

Maurel, M., and Chevet, E. (2013). Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 304, C1117-1126.

McCracken, A.A., and Brodsky, J.L. (2005). Recognition and delivery of ERAD substrates to the proteasome and alternative paths for cell survival. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 300, 17–40.

McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., and Holbrook, N.J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1249–1259.

McIlwain, D.R., Berger, T., and Mak, T.W. (2013). Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008656.

Meirhaeghe, A., Crowley, V., Lenaghan, C., Lelliott, C., Green, K., Stewart, A., Hart, K., Schinner, S., Sethi, J.K., Yeo, G., et al. (2003). Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem. J.* 373, 155–165.

Melnick, J., Dul, J.L., and Argon, Y. (1994). Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 370, 373–375.

Menssen, A., Hydrbring, P., Kapelle, K., Vervoorts, J., Diebold, J., Lüscher, B., Larsson, L.-G., and Hermeking, H. (2012). The c-MYC oncoprotein, the NAMPT enzyme, the SIRT1-inhibitor DBC1, and the SIRT1 deacetylase form a positive feedback loop. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E187–E196.

Mercado, G., Castillo, V., Soto, P., López, N., Axtén, J.M., Sardi, S.P., Hoozemans, J.J.M., and Hetz, C. (2018). Targeting PERK signaling with the small molecule GSK2606414 prevents neurodegeneration in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 112, 136–148.

Mialet-Perez, J., and Vindis, C. (2017). Autophagy in health and disease: focus on the cardiovascular system. *Essays Biochem.* 61, 721–732.

- Michalak, M., and Opas, M. (2009). Endoplasmic and sarcoplasmic reticulum in the heart. *Trends Cell Biol.* *19*, 253–259.
- Michan, S., and Sinclair, D. (2007). Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem. J.* *404*, 1–13.
- Minamino, T., and Kitakaze, M. (2010). ER stress in cardiovascular disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *48*, 1105–1110.
- Mito, S., Thandavarayan, R.A., Ma, M., Lakshmanan, A., Suzuki, K., Kodama, M., and Watanabe, K. (2011). Inhibition of cardiac oxidative and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis by curcumin treatment contributes to protection against acute myocarditis. *Free Radic. Res.* *45*, 1223–1231.
- Miyazaki, Y., Kaikita, K., Endo, M., Horio, E., Miura, M., Tsujita, K., Hokimoto, S., Yamamuro, M., Iwawaki, T., Gotoh, T., et al. (2011). C/EBP homologous protein deficiency attenuates myocardial reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 1124–1132.
- Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* *3*, 542–545.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2003). Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *35*, 553–561.
- Mohacsi, P., and LePrince, P. (2014). The CARMAT total artificial heart. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* *46*, 933–934.
- Mootha, V.K., Handschin, C., Arlow, D., Xie, X., St Pierre, J., Sihag, S., Yang, W., Altshuler, D., Puigserver, P., Patterson, N., et al. (2004). ERR α and GABPA/b specify PGC-1 α -dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 6570–6575.
- Morishima, N., Nakanishi, K., and Nakano, A. (2011). Activating transcription factor-6 (ATF6) mediates apoptosis with reduction of myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) protein via induction of WW domain binding protein 1. *J. Biol. Chem.* *286*, 35227–35235.
- Nair, U., Jotwani, A., Geng, J., Gammoh, N., Richerson, D., Yen, W.-L., Griffith, J., Nag, S., Wang, K., Moss, T., et al. (2011). SNARE proteins are required for macroautophagy. *Cell* *146*, 290.
- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.-F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., and Youle, R.J. (2010). PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin. *PLOS Biol.* *8*, e1000298.
- Nasrin, N., Kaushik, V.K., Fortier, E., Wall, D., Pearson, K.J., de Cabo, R., and Bordone, L. (2009). JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PLoS One* *4*, e8414.
- Nemoto, S., Fergusson, M.M., and Finkel, T. (2004). Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* *306*, 2105–2108.
- Neubauer, S. (2007). The failing heart--an engine out of fuel. *N. Engl. J. Med.* *356*, 1140–1151.
- Neuber, C., Uebeler, J., Schulze, T., Sotoud, H., El-Armouche, A., and Eschenhagen, T. (2014). Guanabenz interferes with ER stress and exerts protective effects in cardiac myocytes. *PLoS One* *9*, e98893.

- Ng, F., and Tang, B.L. (2013). Sirtuins' modulation of autophagy. *J. Cell. Physiol.* 228, 2262–2270.
- Ngoh, G.A., Hamid, T., Prabhu, S.D., and Jones, S.P. (2009). O-GlcNAc signaling attenuates ER stress-induced cardiomyocyte death. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H1711-1719.
- Ni, L., Zhou, C., Duan, Q., Lv, J., Fu, X., Xia, Y., and Wang, D.W. (2011). β -AR blockers suppresses ER stress in cardiac hypertrophy and heart failure. *PloS One* 6, e27294.
- Nika, J., Rippel, S., and Hannig, E.M. (2001). Biochemical Analysis of the eIF2 $\beta\gamma$ Complex Reveals a Structural Function for eIF2 α in Catalyzed Nucleotide Exchange. *J. Biol. Chem.* 276, 1051–1056.
- Nin, V., Escande, C., Chini, C.C., Giri, S., Camacho-Pereira, J., Matalonga, J., Lou, Z., and Chini, E.N. (2012). Role of Deleted in Breast Cancer 1 (DBC1) Protein in SIRT1 Deacetylase Activation Induced by Protein Kinase A and AMP-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 287, 23489.
- Noriega, L.G., Feige, J.N., Canto, C., Yamamoto, H., Yu, J., Herman, M.A., Matak, C., Kahn, B.B., and Auwerx, J. (2011). CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability. *EMBO Rep.* 12, 1069–1076.
- O Farrell, F., Rusten, T.E., and Stenmark, H. (2013). Phosphoinositide 3-kinases as accelerators and brakes of autophagy. *FEBS J.* 280, 6322–6337.
- Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., and Hayashi, H. (2005). TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J.* 24, 1243–1255.
- Okada, K., Minamino, T., Tsukamoto, Y., Liao, Y., Tsukamoto, O., Takashima, S., Hirata, A., Fujita, M., Nagamachi, Y., Nakatani, T., et al. (2004). Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* 110, 705–712.
- Okazaki, M., Iwasaki, Y., Nishiyama, M., Taguchi, T., Tsugita, M., Nakayama, S., Kambayashi, M., Hashimoto, K., and Terada, Y. (2010). PPAR β/δ regulates the human SIRT1 gene transcription via Sp1. *Endocr. J.* 57, 403–413.
- Oliveira, R.M. de, Sarkander, J., Kazantsev, A.G., and Outeiro, T.F. (2012). SIRT2 as a Therapeutic Target for Age-Related Disorders. *Front. Pharmacol.* 3.
- Olivetti, G., Abbi, R., Quaini, F., Kajstura, J., Cheng, W., Nitahara, J.A., Quaini, E., Di Loreto, C., Beltrami, C.A., Krajewski, S., et al. (1997). Apoptosis in the failing human heart. *N. Engl. J. Med.* 336, 1131–1141.
- Osborne, B., Bentley, N.L., Montgomery, M.K., and Turner, N. (2016). The role of mitochondrial sirtuins in health and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 100, 164–174.
- Oyadomari, S., and Mori, M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 11, 381–389.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 24131–24145.

- Papp, S., Zhang, X., Szabo, E., Michalak, M., and Opas, M. (2008). Expression of endoplasmic reticulum chaperones in cardiac development. *Open Cardiovasc. Med. J.* 2, 31–35.
- Park, C.S., Cha, H., Kwon, E.J., Sreenivasaiah, P.K., and Kim, D.H. (2012). The chemical chaperone 4-phenylbutyric acid attenuates pressure-overload cardiac hypertrophy by alleviating endoplasmic reticulum stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421, 578–584.
- Parrish, A.B., Freel, C.D., and Kornbluth, S. (2013). Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008672.
- Patterson, J.H., Adams, K.F., Applefeld, M.M., Corder, C.N., Masse, B.R., and The Torsemide Investigators Group (1994). Oral Torsemide in Patients With Chronic Congestive Heart Failure: Effects on Body Weight, Edema, and Electrolyte Excretion. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* 14, 514–521.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927–939.
- Peck, B., Chen, C.-Y., Ho, K.-K., Di Fruscia, P., Myatt, S.S., Coombes, R.C., Fuchter, M.J., Hsiao, C.-D., and Lam, E.W.-F. (2010). SIRT inhibitors induce cell death and p53 acetylation through targeting both SIRT1 and SIRT2. *Mol. Cancer Ther.* 9, 844–855.
- Peng, L., Yuan, Z., Li, Y., Ling, H., Izumi, V., Fang, B., Fukasawa, K., Koomen, J., Chen, J., and Seto, E. (2015). Ubiquitinated Sirtuin 1 (SIRT1) Function Is Modulated during DNA Damage-Induced Cell Death and Survival. *J. Biol. Chem.* jbc.M114.612796.
- Peng, R.-M., Lin, G.-R., Ting, Y., and Hu, J.-Y. (2018). Oral delivery system enhanced the bioavailability of stilbenes: Resveratrol and pterostilbene. *BioFactors Oxf. Engl.* 44, 5–15.
- Perry, C.N., Kyoji, S., Hariharan, N., Takagi, H., Sadoshima, J., and Gottlieb, R.A. (2009). Novel Methods for Measuring Cardiac Autophagy In vivo. *Methods Enzymol.* 453, 325.
- Petrovski, G., Das, S., Juhasz, B., Kertesz, A., Tosaki, A., and Das, D.K. (2011). Cardioprotection by endoplasmic reticulum stress-induced autophagy. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 2191–2200.
- Philchenkov, A. (2004). Caspases: potential targets for regulating cell death. *J. Cell. Mol. Med.* 8, 432–444.
- Pillai, J.B., Isbatan, A., Imai, S., and Gupta, M.P. (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, 43121–43130.
- Piquereau, J., Caffin, F., Novotova, M., Prola, A., Garnier, A., Mateo, P., Fortin, D., Huynh, L.H., Nicolas, V., Alavi, M.V., et al. (2012). Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload. *Cardiovasc. Res.* 94, 408–417.
- Piquereau, J., Caffin, F., Novotova, M., Lemaire, C., Veksler, V., Garnier, A., Ventura-Clapier, R., and Joubert, F. (2013). Mitochondrial dynamics in the adult cardiomyocytes: which roles for a highly specialized cell? *Front. Physiol.* 4, 102.
- Pirola, L., and Fröjdö, S. (2008). Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life* 60, 323–332.

- Planavila, A., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. (2011). Sirt1 acts in association with PPAR α to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovasc. Res.* *90*, 276–284.
- Ploumi, C., Daskalaki, I., and Tavernarakis, N. (2016). Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. *FEBS J.* n/a-n/a.
- Price, N.L., Gomes, A.P., Ling, A.J.Y., Duarte, F.V., Martin-Montalvo, A., North, B.J., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J.S., et al. (2012). SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab.* *15*, 675–690.
- Prola, A., Silva, J.P.D., Guilbert, A., Lecru, L., Piquereau, J., Ribeiro, M., Mateo, P., Gressette, M., Fortin, D., Boursier, C., et al. (2016). SIRT1 protects the heart from ER stress-induced cell death through eIF2 α deacetylation. *Cell Death Differ.*
- Prola, A., Pires Da Silva, J., Guilbert, A., Lecru, L., Piquereau, J., Ribeiro, M., Mateo, P., Gressette, M., Fortin, D., Boursier, C., et al. (2017). SIRT1 protects the heart from ER stress-induced cell death through eIF2 α deacetylation. *Cell Death Differ.* *24*, 343–356.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., et al. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* *129*, 1337–1349.
- Pyo, J.-O., Nah, J., and Jung, Y.-K. (2012). Molecules and their functions in autophagy. *Exp. Mol. Med.* *44*, 73.
- Qi, X., Vallentin, A., Churchill, E., and Mochly-Rosen, D. (2007). δ PKC participates in the endoplasmic reticulum stress-induced response in cultured cardiac myocytes and ischemic heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *43*, 420–428.
- Qiao, H., Ren, H., Du, H., Zhang, M., Xiong, X., and Lv, R. (2018). Liraglutide repairs the infarcted heart: The role of the SIRT1/Parkin/mitophagy pathway. *Mol. Med. Rep.* *17*, 3722–3734.
- Qin, H.-T., Li, H.-Q., and Liu, F. (2017). Selective histone deacetylase small molecule inhibitors: recent progress and perspectives. *Expert Opin. Ther. Pat.* *27*, 621–636.
- Quintieri, A.M., Baldino, N., Filice, E., Seta, L., Vitetti, A., Tota, B., De Cindio, B., Cerra, M.C., and Angelone, T. (2013). Malvidin, a red wine polyphenol, modulates mammalian myocardial and coronary performance and protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *J. Nutr. Biochem.* *24*, 1221–1231.
- Rane, S., He, M., Sayed, D., Vashistha, H., Malhotra, A., Sadoshima, J., Vatner, D.E., Vatner, S.F., and Abdellatif, M. (2009). Downregulation of MiR-199a Derepresses Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Sirtuin 1 and Recapitulates Hypoxia Preconditioning in Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* *104*, 879.
- Rani, S., Sreenivasaiah, P.K., Cho, C., and Kim, D.H. (2017). Salubrinal Alleviates Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *Molecules Cells* *40*, 66–72.
- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., and Rubinsztein, D.C. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* *12*, 747–757.

- Raynes, R., Pombier, K.M., Nguyen, K., Brunquell, J., Mendez, J.E., and Westerheide, S.D. (2013). The SIRT1 modulators AROS and DBC1 regulate HSF1 activity and the heat shock response. *PLoS One* 8, e54364.
- Rimbaud, S., Garnier, A., and Ventura-Clapier, R. (2009). Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. *Pharmacol. Rep. PR* 61, 131–138.
- Rine, J., and Herskowitz, I. (1987). Four Genes Responsible for a Position Effect on Expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 116, 9.
- Rocha, R., and Stier, C.T. (2001). Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. *Trends Endocrinol. Metab.* 12, 308–314.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* 434, 113–118.
- Ron, D., and Hubbard, S.R. (2008). How IRE1 reacts to ER stress. *Cell* 132, 24–26.
- Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A., and Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* 15, 741–750.
- Rusten, T.E., and Stenmark, H. (2009). How do ESCRT proteins control autophagy? *J. Cell Sci.* 122, 2179–2183.
- Rutkowski, D.T., Kang, S.-W., Goodman, A.G., Garrison, J.L., Taunton, J., Katze, M.G., Kaufman, R.J., and Hegde, R.S. (2007). The role of p58IPK in protecting the stressed endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 18, 3681–3691.
- Saleh, M., Vaillancourt, J.P., Graham, R.K., Huyck, M., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Steinberg, M.H., Nolan, V., Baldwin, C.T., Hotchkiss, R.S., et al. (2004). Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature* 429, 75–79.
- Salem, I.B., Boussabbeh, M., Neffati, F., Najjar, M.F., Abid-Essefi, S., and Bacha, H. (2016). Zearalenone-induced changes in biochemical parameters, oxidative stress and apoptosis in cardiac tissue: Protective role of crocin. *Hum. Exp. Toxicol.* 35, 623–634.
- Samuel, S.M., Thirunavukkarasu, M., Penumathsa, S.V., Paul, D., and Maulik, N. (2008). Akt/FOXO3a/SIRT1-mediated cardioprotection by n-tyrosol against ischemic stress in rat in vivo model of myocardial infarction: switching gears toward survival and longevity. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9692–9698.
- San Cheang, W., Yuen Ngai, C., Yen Tam, Y., Yu Tian, X., Tak Wong, W., Zhang, Y., Wai Lau, C., Chen, Z.Y., Bian, Z.-X., Huang, Y., et al. (2015). Black tea protects against hypertension-associated endothelial dysfunction through alleviation of endoplasmic reticulum stress. *Sci. Rep.* 5, 10340.
- Santos, L., Escande, C., and Denicola, A. (2015). Potential Modulation of Sirtuins by Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016.
- Saraste, A., Pulkki, K., Kallajoki, M., Heikkilä, P., Laine, P., Mattila, S., Nieminen, M.S., Parvinen, M., and Voipio-Pulkki, L.M. (1999). Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur. J. Clin. Invest.* 29, 380–386.

- Sasaki, T., Maier, B., Koclega, K.D., Chruszcz, M., Gluba, W., Stukenberg, P.T., Minor, W., and Scrable, H. (2008). Phosphorylation regulates SIRT1 function. *PLoS One* 3, e4020.
- Sawada, T., Minamino, T., Fu, H.Y., Asai, M., Okuda, K., Isomura, T., Yamazaki, S., Asano, Y., Okada, K., Tsukamoto, O., et al. (2010). X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 1280–1289.
- Scarpulla, R.C. (2006). Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J. Cell. Biochem.* 97, 673–683.
- Scarpulla, R.C., Vega, R.B., and Kelly, D.P. (2012). Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 23, 459–466.
- Schaper, J., Meiser, E., and Stämmler, G. (1985). Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts. *Circ. Res.* 56, 377–391.
- Schatz, G. (1996). The Protein Import System of Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 271, 31763–31766.
- Scher, M.B., Vaquero, A., and Reinberg, D. (2007). SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev.* 21, 920–928.
- Schröder, M., and Kaufman, R.J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res.* 569, 29–63.
- Ségal-Bendirdjian, E. (1999). Mort cellulaire : signalisation et exécution de l'apoptose. *Hématologie* 5, 376–387.
- Sengupta, A., Molkentin, J.D., and Yutzey, K.E. (2009). FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 284, 28319–28331.
- Sengupta, A., Molkentin, J.D., Paik, J.-H., DePinho, R.A., and Yutzey, K.E. (2011). FoxO transcription factors promote cardiomyocyte survival upon induction of oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 286, 7468–7478.
- Senyo, S.E., Steinhauser, M.L., Pizzimenti, C.L., Yang, V.K., Cai, L., Wang, M., Wu, T.-D., Guerin-Kern, J.-L., Lechene, C.P., and Lee, R.T. (2013). Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 493, 433–436.
- Severino, A., Campioni, M., Straino, S., Salloum, F.N., Schmidt, N., Herbrand, U., Frede, S., Toietta, G., Di Rocco, G., Bussani, R., et al. (2007). Identification of protein disulfide isomerase as a cardiomyocyte survival factor in ischemic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 50, 1029–1037.
- Shalwala, M., Zhu, S.-G., Das, A., Salloum, F.N., Xi, L., and Kukreja, R.C. (2014). Sirtuin 1 (SIRT1) activation mediates sildenafil induced delayed cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in mice. *PLoS One* 9, e86977.
- Shanware, N.P., Bray, K., and Abraham, R.T. (2013). The PI3K, metabolic, and autophagy networks: interactive partners in cellular health and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 89–106.

- Sharaf El Dein, O., Gallerne, C., Deniaud, A., Brenner, C., and Lemaire, C. (2009). Role of the permeability transition pore complex in lethal inter-organelle crosstalk. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 3465–3482.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3, 99–111.
- Shen, M., Wang, L., Yang, G., Gao, L., Wang, B., Guo, X., Zeng, C., Xu, Y., Shen, L., Cheng, K., et al. (2014). Baicalin protects the cardiomyocytes from ER stress-induced apoptosis: inhibition of CHOP through induction of endothelial nitric oxide synthase. *PLoS One* 9, e88389.
- Shi, F.H., Cheng, Y.S., Dai, D.Z., Peng, H.J., Cong, X.D., and Dai, Y. (2013). Depressed calcium-handling proteins due to endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the diabetic heart are attenuated by argirein. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 386, 521–531.
- Shintani-Ishida, K., Nakajima, M., Uemura, K., and Yoshida, K. (2006). Ischemic preconditioning protects cardiomyocytes against ischemic injury by inducing GRP78. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 1600–1605.
- Silvestre, J.-S., and Menasché, P. (2015). The Evolution of the Stem Cell Theory for Heart Failure. *EBioMedicine* 2, 1871–1879.
- Simon, B., Huart, A.-S., Temmerman, K., Vahokoski, J., Mertens, H.D.T., Komadina, D., Hoffmann, J.-E., Yumerefendi, H., Svergun, D.I., Kursula, P., et al. (2016). Death-Associated Protein Kinase Activity Is Regulated by Coupled Calcium/Calmodulin Binding to Two Distinct Sites. *Struct. Lond. Engl.* 1993 24, 851–861.
- Song, S., Gao, P., Xiao, H., Xu, Y., Si, L.Y., and Si, L.Y. (2013). Klotho suppresses cardiomyocyte apoptosis in mice with stress-induced cardiac injury via downregulation of endoplasmic reticulum stress. *PLoS One* 8, e82968.
- Song, S., Tan, J., Miao, Y., and Zhang, Q. (2017a). Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: involvement of UPR and the core autophagy machinery. *J. Cell. Physiol.*
- Song, S., Tan, J., Miao, Y., Li, M., and Zhang, Q. (2017b). Crosstalk of Autophagy and Apoptosis: Involvement of the Dual Role of Autophagy Under ER Stress. *J. Cell. Physiol.* n/a-n/a.
- Song, X.J., Yang, C.Y., Liu, B., Wei, Q., Korkor, M.T., Liu, J.Y., and Yang, P. (2011). Atorvastatin inhibits myocardial cell apoptosis in a rat model with post-myocardial infarction heart failure by downregulating ER stress response. *Int. J. Med. Sci.* 8, 564–572.
- Sousa, M.C., Ferrero-Garcia, M.A., and Parodi, A.J. (1992). Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry (Mosc.)* 31, 97–105.
- Sozen, E., Karademir, B., and Ozer, N.K. (2014). Basic mechanisms in endoplasmic reticulum stress and relation to cardiovascular diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 78C, 30–41.
- Stennicke, H.R., and Salvesen, G.S. (1999). Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ.* 6, 1054–1059.
- Suen, D.-F., Norris, K.L., and Youle, R.J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* 22, 1577–1590.

- Sukumaran, V., Watanabe, K., Veeraveedu, P.T., Gurusamy, N., Ma, M., Thandavarayan, R.A., Lakshmanan, A.P., Yamaguchi, K., Suzuki, K., and Kodama, M. (2011). Olmesartan, an AT1 antagonist, attenuates oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and cardiac inflammatory mediators in rats with heart failure induced by experimental autoimmune myocarditis. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 154–167.
- Sulaiman, M., Matta, M.J., Sunderesan, N.R., Gupta, M.P., Periasamy, M., and Gupta, M. (2010). Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298, H833-843.
- Sun, Q., Fan, W., and Zhong, Q. (2009). Regulation of Beclin 1 in autophagy. *Autophagy* 5, 713–716.
- Sundaresan, N.R., Pillai, V.B., and Gupta, M.P. (2011a). Emerging roles of SIRT1 deacetylase in regulating cardiomyocyte survival and hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51, 614–618.
- Sundaresan, N.R., Pillai, V.B., Wolfgeher, D., Samant, S., Vasudevan, P., Parekh, V., Raghuraman, H., Cunningham, J.M., Gupta, M., and Gupta, M.P. (2011b). The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy. *Sci. Signal.* 4, ra46.
- Swenson, E.R. (2018). Does Aerobic Respiration Produce Carbon Dioxide or Hydrogen Ion and Bicarbonate? *Anesthesiology*.
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., and Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 7, 880–885.
- Sztark, F., Payen, J.F., Piriou, V., Rigoulet, M., Ventura-Clapier, R., Mazat, J.P., Leverve, X., and Janvier, G. (1999). [Cellular energy metabolism: physiologic and pathologic aspects]. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 18, 261–269.
- Tai, C., Gan, T., Zou, L., Sun, Y., Zhang, Y., Chen, W., Li, J., Zhang, J., Xu, Y., Lu, H., et al. (2017). Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers on cardiovascular events in patients with heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Cardiovasc. Disord.* 17.
- Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., and Horio, Y. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J. Biol. Chem.* 282, 6823–6832.
- Tanno, M., Kuno, A., Yano, T., Miura, T., Hisahara, S., Ishikawa, S., Shimamoto, K., and Horio, Y. (2010). Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *J. Biol. Chem.* 285, 8375–8382.
- Tao, J., Zhu, W., Li, Y., Xin, P., Li, J., Liu, M., Li, J., Redington, A.N., and Wei, M. (2011). Apelin-13 protects the heart against ischemia-reperfusion injury through inhibition of ER-dependent apoptotic pathways in a time-dependent fashion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301, H1471-1486.
- Taylor, S.C., Ferguson, A.D., Bergeron, J.J.M., and Thomas, D.Y. (2004). The ER protein folding sensor UDP-glucose glycoprotein-glucosyltransferase modifies substrates distant to local changes in glycoprotein conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 128–134.
- Teske, B.F., Wek, S.A., Bunpo, P., Cundiff, J.K., McClintick, J.N., Anthony, T.G., and Wek, R.C. (2011). A Highlights from MBoC Selection: The eIF2 kinase PERK and the integrated

stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* 22, 4390.

Teyssier, C., Ma, H., Emter, R., Kralli, A., and Stallcup, M.R. (2005). Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1 α by arginine methylation. *Genes Dev.* 19, 1466–1473.

Thuerauf, D.J., Marcinko, M., Gude, N., Rubio, M., Sussman, M.A., and Glembotski, C.C. (2006). Activation of the Unfolded Protein Response in Infarcted Mouse Heart and Hypoxic Cultured Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* 99, 275–282.

Timmins, J.M., Ozcan, L., Seimon, T.A., Li, G., Malagelada, C., Backs, J., Backs, T., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., Anderson, M.E., et al. (2009). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J. Clin. Invest.* 119, 2925.

Tong, Q., Wu, L., Jiang, T., Ou, Z., Zhang, Y., and Zhu, D. (2016). Inhibition of endoplasmic reticulum stress-activated IRE1 α -TRAF2-caspase-12 apoptotic pathway is involved in the neuroprotective effects of telmisartan in the rotenone rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 776, 106–115.

Tong, Z., Xie, Y., He, M., Ma, W., Zhou, Y., Lai, S., Meng, Y., and Liao, Z. (2017). VDAC1 deacetylation is involved in the protective effects of resveratrol against mitochondria-mediated apoptosis in cardiomyocytes subjected to anoxia/reoxygenation injury. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 95, 77–83.

Trammell, S.A.J., Schmidt, M.S., Weidemann, B.J., Redpath, P., Jaksch, F., Dellinger, R.W., Li, Z., Abel, E.D., Migaud, M.E., and Brenner, C. (2016). Nicotinamide riboside is uniquely and orally bioavailable in mice and humans. *Nat. Commun.* 7, 12948.

Trifunović, S.L., and Pavlović, K. (1992). [Beta-adrenergic blockers in congestive heart failure: pro et contra?]. *Srp. Arh. Celok. Lek.* 120 Suppl 4, 44–50.

Tseng, R.-C., Lee, C.-C., Hsu, H.-S., Tzao, C., and Wang, Y.-C. (2009). Distinct HIC1-SIRT1-p53 loop deregulation in lung squamous carcinoma and adenocarcinoma patients. *Neoplasia N. Y.* N 11, 763–770.

Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333, 169–174.

Turdi, S., Hu, N., and Ren, J. (2013). Tauroursodeoxycholic acid mitigates high fat diet-induced cardiomyocyte contractile and intracellular Ca²⁺ anomalies. *PloS One* 8, e63615.

Turdi, S., Hu, N., and Ren, J. (2016). Correction: Tauroursodeoxycholic Acid Mitigates High Fat Diet-Induced Cardiomyocyte Contractile and Intracellular Ca²⁺ Anomalies. *PloS One* 11, e0154907.

Upshaw, J.N., van Klaveren, D., Konstam, M.A., and Kent, D.M. (2017). Digoxin Benefit Varies by Risk of Heart Failure Hospitalization: Applying the Tufts MC HF Risk Model. *Am. J. Med.*

Upton, J.-P., Wang, L., Han, D., Wang, E.S., Huskey, N.E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M.T., Ruggero, D., Goga, A., et al. (2012). IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science* 338, 818–822.

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664–666.

- Vásquez-Trincado, C., García-Carvajal, I., Pennanen, C., Parra, V., Hill, J.A., Rothermel, B.A., and Lavandro, S. (2016). Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. *J. Physiol.* *594*, 509–525.
- Vaziri, H., Dessain, S.K., Ng Eaton, E., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L., and Weinberg, R.A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* *107*, 149–159.
- Vazquez, B.N., Thackray, J.K., and Serrano, L. (2017). Sirtuins and DNA damage repair: SIRT7 comes to play. *Nucl. Austin Tex* *8*, 107–115.
- Vega, R.B., Huss, J.M., and Kelly, D.P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1868–1876.
- Veksler, V.I., Kuznetsov, A.V., Sharov, V.G., Kapelko, V.I., and Saks, V.A. (1987). Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim. Biophys. Acta* *892*, 191–196.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., and Veksler, V. (2004). Energy metabolism in heart failure. *J. Physiol.* *555*, 1–13.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., and Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc. Res.* *79*, 208–217.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Veksler, V., and Joubert, F. (2011). Bioenergetics of the failing heart. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1813*, 1360–1372.
- Vitadello, M., Penzo, D., Petronilli, V., Michieli, G., Gomirato, S., Menabò, R., Di Lisa, F., and Gorza, L. (2003). Overexpression of the stress protein Grp94 reduces cardiomyocyte necrosis due to calcium overload and simulated ischemia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 923–925.
- Vitaglione, P., Sforza, S., Galaverna, G., Ghidini, C., Caporaso, N., Vescovi, P.P., Fogliano, V., and Marchelli, R. (2005). Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* *49*, 495–504.
- Vliegen, H.W., van der Laarse, A., Cornelisse, C.J., and Eulerink, F. (1991). Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur. Heart J.* *12*, 488–494.
- Voeltz, G.K., Rolls, M.M., and Rapoport, T.A. (2002). Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* *3*, 944–950.
- Wang, C., Chen, L., Hou, X., Li, Z., Kabra, N., Ma, Y., Nemoto, S., Finkel, T., Gu, W., Cress, W.D., et al. (2006). Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1025–1031.
- Wang, G., Wang, Y., Xiong, Y., Chen, X.-C., Ma, M., Cai, R., Gao, Y., Sun, Y., Yang, G.-S., and Pang, W.-J. (2016a). Sirt1 AS lncRNA interacts with its mRNA to inhibit muscle formation by attenuating function of miR-34a. *Sci. Rep.* *6*.
- Wang, J., Wang, Y., Shan, S., Hu, T., Chen, H., Tian, J., Ren, A., Zhou, X., Yuan, W., and Lin, L. (2012a). Salusins protect myocardium against ischemic injury by alleviating endoplasmic reticulum stress. *Sci. China Life Sci.* *55*, 358–366.

- Wang, M., Meng, X., Yu, Y., Sun, G., Xu, X., Zhang, X., Dong, X., Ye, J., Xu, H., Sun, Y., et al. (2014a). Elatoside C protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes through the reduction of endoplasmic reticulum stress partially depending on STAT3 activation. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 19, 1727–1735.
- Wang, P., Zhu, L., Sun, D., Gan, F., Gao, S., Yin, Y., and Chen, L. (2016b). Natural products as modulator of autophagy with potential clinical prospects. *Apoptosis* 1–32.
- Wang, Q., Wu, G., Che, X., Li, Q., Zhang, Z., and Tang, Q. (2018a). Sorafenib induces renal cell carcinoma apoptosis via upregulating activating transcription factor 4. *Pharm.* 73, 156–160.
- Wang, S., Song, P., and Zou, M.-H. (2012b). Inhibition of AMP-activated protein kinase α (AMPK α) by doxorubicin accentuates genotoxic stress and cell death in mouse embryonic fibroblasts and cardiomyocytes: role of p53 and SIRT1. *J. Biol. Chem.* 287, 8001–8012.
- Wang, S., Wang, Z., Fan, Q., Guo, J., Galli, G., Du, G., Wang, X., and Xiao, W. (2016c). Ginkgolide K protects the heart against endoplasmic reticulum stress injury by activating the inositol-requiring enzyme 1 α /X box-binding protein-1 pathway. *Br. J. Pharmacol.* 173, 2402–2418.
- Wang, S., Binder, P., Fang, Q., Wang, Z., Xiao, W., Liu, W., and Wang, X. (2017). Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets. *Br. J. Pharmacol.*
- Wang, S., Binder, P., Fang, Q., Wang, Z., Xiao, W., Liu, W., and Wang, X. (2018b). Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets. *Br. J. Pharmacol.* 175, 1293–1304.
- Wang, X., Ni, L., Yang, L., Duan, Q., Chen, C., Edin, M.L., Zeldin, D.C., and Wang, D.W. (2014b). CYP2J2-derived epoxyeicosatrienoic acids suppress endoplasmic reticulum stress in heart failure. *Mol. Pharmacol.* 85, 105–115.
- Wang, Z.V., Deng, Y., Gao, N., Pedrozo, Z., Li, D.L., Morales, C.R., Criollo, A., Luo, X., Tan, W., Jiang, N., et al. (2014c). Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway. *Cell* 156, 1179–1192.
- Wei, H., Zhang, R., Jin, H., Liu, D., Tang, X., Tang, C., and Du, J. (2010). Hydrogen sulfide attenuates hyperhomocysteinemia-induced cardiomyocytic endoplasmic reticulum stress in rats. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 1079–1091.
- Weindruch, R., and Walford, R.L. (1982). Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science* 215, 1415–1418.
- Wen, L., Chen, Z., Zhang, F., Cui, X., Sun, W., Geary, G.G., Wang, Y., Johnson, D.A., Zhu, Y., Chien, S., et al. (2013). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β phosphorylation of Sirtuin 1 in endothelium is atheroprotective. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E2420-2427.
- Wencker, D., Chandra, M., Nguyen, K., Miao, W., Garantziotis, S., Factor, S.M., Shirani, J., Armstrong, R.C., and Kitsis, R.N. (2003). A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J. Clin. Invest.* 111, 1497–1504.
- Westerheide, S.D., Anckar, J., Stevens, S.M., Jr, Sistonen, L., and Morimoto, R.I. (2009). Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323, 1063–1066.

- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 872–884.
- Wiersma, M., Meijering, R.A.M., Qi, X.-Y., Zhang, D., Liu, T., Hoogstra-Berends, F., Sibon, O.C.M., Henning, R.H., Nattel, S., and Brundel, B.J.J.M. (2017). Endoplasmic Reticulum Stress Is Associated With Autophagy and Cardiomyocyte Remodeling in Experimental and Human Atrial Fibrillation. *J. Am. Heart Assoc.* 6.
- Williams, D.B. (2006). Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* 119, 615–623.
- Willis, M.S., and Patterson, C. (2013). Proteotoxicity and cardiac dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 368, 1755.
- Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., et al. (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis.* 1, e18.
- Wormald, M.R., and Dwek, R.A. (1999). Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Struct. Lond. Engl.* 1993 7, R155-160.
- Wu, H., Ye, M., Yang, J., Ding, J., Yang, J., Dong, W., and Wang, X. (2015). Nicorandil Protects the Heart from Ischemia/Reperfusion Injury by Attenuating Endoplasmic Reticulum Response-induced Apoptosis Through PI3K/Akt Signaling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 35, 2320–2332.
- Wu, T., Dong, Z., Geng, J., Sun, Y., Liu, G., Kang, W., Zhang, Y., and Ge, Z. (2011). Valsartan protects against ER stress-induced myocardial apoptosis via CHOP/Puma signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 42, 496–502.
- Wu, Y.-T., Tan, H.-L., Shui, G., Bauvy, C., Huang, Q., Wenk, M.R., Ong, C.-N., Codogno, P., and Shen, H.-M. (2010). Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 285, 10850–10861.
- Xie, J., Zhang, X., and Zhang, L. (2013). Negative regulation of inflammation by SIRT1. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 67, 60–67.
- Xin, W., Li, X., Lu, X., Niu, K., and Cai, J. (2011). Involvement of endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in a heart failure model induced by chronic myocardial ischemia. *Int. J. Mol. Med.* 27, 503–509.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., and Reed, J.C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* 115, 2656–2664.
- Xu, Z., Bu, Y., Chitnis, N., Koumenis, C., Fuchs, S.Y., and Diehl, J.A. (2016). miR-216b regulation of c-Jun mediates GADD153/CHOP-dependent apoptosis. *Nat. Commun.* 7, 11422.
- Xue, M., Liu, M., Zhu, X., Yang, L., Miao, Y., Shi, D., and Yin, H. (2013). Effective Components of *Panax quinquefolius* and *Corydalis tuber* Protect Myocardium through Attenuating Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2013, 482318.
- Yamakuchi, M. (2012). MicroRNA Regulation of SIRT1. *Front. Physiol.* 3.

- Yamakuchi, M., Ferlito, M., and Lowenstein, C.J. (2008). miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 13421–13426.
- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct. Funct.* *23*, 33–42.
- Yamamoto, K., Ichijo, H., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 8469–8478.
- Yamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R.J., and Mori, K. (2004). Differential Contributions of ATF6 and XBP1 to the Activation of Endoplasmic Reticulum Stress-Responsive cis-Acting Elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J. Biochem. (Tokyo)* *136*, 343–350.
- Yan, L., Vatner, D.E., Kim, S.-J., Ge, H., Masurekar, M., Massover, W.H., Yang, G., Matsui, Y., Sadoshima, J., and Vatner, S.F. (2005). Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13807–13812.
- Yan, W., Frank, C.L., Korth, M.J., Sopher, B.L., Novoa, I., Ron, D., and Katze, M.G. (2002). Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15920–15925.
- Yancy, C.W., Jessup, M., Bozkurt, B., Butler, J., Casey, D.E., Drazner, M.H., Fonarow, G.C., Geraci, S.A., Horwich, T., Januzzi, J.L., et al. (2013). 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* *128*, e240–e327.
- Yang, H., Zhang, W., Pan, H., Feldser, H.G., Lainez, E., Miller, C., Leung, S., Zhong, Z., Zhao, H., Sweitzer, S., et al. (2012). SIRT1 activators suppress inflammatory responses through promotion of p65 deacetylation and inhibition of NF-κB activity. *PloS One* *7*, e46364.
- Yang, Y., Fu, W., Chen, J., Olashaw, N., Zhang, X., Nicosia, S.V., Bhalla, K., and Bai, W. (2007). SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1253–1262.
- Yang, Y., Duan, W., Lin, Y., Yi, W., Liang, Z., Yan, J., Wang, N., Deng, C., Zhang, S., Li, Y., et al. (2013). SIRT1 activation by curcumin pretreatment attenuates mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med.* *65*, 667–679.
- Yang, Y., Li, C., Xiang, X., Dai, Z., Chang, J., Zhang, M., Cai, H., Zhang, H., Zhang, M., Guo, Y., et al. (2014). Ursolic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis induced by heat stress in mouse cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *67*, 103–111.
- Yao, T., Ying, X., Zhao, Y., Yuan, A., He, Q., Tong, H., Ding, S., Liu, J., Peng, X., Gao, E., et al. (2014). Vitamin D Receptor Activation Protects against Myocardial Reperfusion Injury through Inhibition of Apoptosis and Modulation of Autophagy. *Antioxid. Redox Signal.*
- Yen, J.-H., Wu, P.-S., Chen, S.-F., and Wu, M.-J. (2017). Fisetin Protects PC12 Cells from Tunicamycin-Mediated Cell Death via Reactive Oxygen Species Scavenging and Modulation

of Nrf2-Driven Gene Expression, SIRT1 and MAPK Signaling in PC12 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **18**.

Yerra, V.G., Kalvala, A.K., and Kumar, A. (2017). Isoliquiritigenin reduces oxidative damage and alleviates mitochondrial impairment by SIRT1 activation in experimental diabetic neuropathy. *J. Nutr. Biochem.* **47**, 41–52.

Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Eskelinen, E.-L. (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* **5**, 1180–1185.

Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., and Tohyama, M. (2001). Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J. Biol. Chem.* **276**, 13935–13940.

Yoon, Y., Pitts, K.R., and McNiven, M.A. (2001). Mammalian Dynamin-like Protein DLP1 Tubulates Membranes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2894–2905.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881–891.

Yoshida, Y., Shioi, T., and Izumi, T. (2007). Resveratrol ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* **71**, 397–404.

Younce, C.W., Burmeister, M.A., and Ayala, J.E. (2013). Exendin-4 attenuates high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress and activation of SERCA2a. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **304**, C508-518.

Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., and Simon, H.-U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1124–1132.

Yu, H., Zhang, H., Zhao, W., Guo, L., Li, X., Li, Y., Zhang, X., and Sun, Y. (2016a). Gypenoside Protects against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting Cardiomyocytes Apoptosis via Inhibition of CHOP Pathway and Activation of PI3K/Akt Pathway In Vivo and In Vitro. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **39**, 123–136.

Yu, L., Li, Q., Yu, B., Yang, Y., Jin, Z., Duan, W., Zhao, G., Zhai, M., Liu, L., Yi, D., et al. (2016b). Berberine Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Reducing Oxidative Stress and Inflammation Response: Role of Silent Information Regulator 1. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1689602.

Yuan, Z., and Seto, E. (2007). A functional link between SIRT1 deacetylase and NBS1 in DNA damage response. *Cell Cycle Georget. Tex* **6**, 2869–2871.

Zachari, M., and Ganley, I.G. (2017). The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem.* **61**, 585–596.

Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Sabanay, H., Pinkas-Kramarski, R., and Kimchi, A. (2009). DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep.* **10**, 285–292.

Zamora, M., and Villena, J.A. (2014). Targeting mitochondrial biogenesis to treat insulin resistance. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 5527–5557.

- Zhang, L., Cui, L., Zhou, G., Jing, H., Guo, Y., and Sun, W. (2013a). Pterostilbene, a natural small-molecular compound, promotes cytoprotective macroautophagy in vascular endothelial cells. *J. Nutr. Biochem.* *24*, 903–911.
- Zhang, Q., Li, H., Wang, S., Liu, M., Feng, Y., and Wang, X. (2013b). Icaritin protects rat cardiac H9c2 cells from apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 17845–17860.
- Zhang, R., Chen, H.-Z., Liu, J.-J., Jia, Y.-Y., Zhang, Z.-Q., Yang, R.-F., Zhang, Y., Xu, J., Wei, Y.-S., Liu, D.-P., et al. (2010). SIRT1 suppresses activator protein-1 transcriptional activity and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *J. Biol. Chem.* *285*, 7097–7110.
- Zhao, H., Liao, Y., Minamino, T., Asano, Y., Asakura, M., Kim, J., Asanuma, H., Takashima, S., Hori, M., and Kitakaze, M. (2008a). Inhibition of cardiac remodeling by pravastatin is associated with amelioration of endoplasmic reticulum stress. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* *31*, 1977–1987.
- Zhao, W., Kruse, J.-P., Tang, Y., Jung, S.Y., Qin, J., and Gu, W. (2008b). Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature* *451*, 587–590.
- Zhao, X., Allison, D., Condon, B., Zhang, F., Gheyi, T., Zhang, A., Ashok, S., Russell, M., MacEwan, I., Qian, Y., et al. (2013). The 2.5 Å crystal structure of the SIRT1 catalytic domain bound to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and an indole (EX527 analogue) reveals a novel mechanism of histone deacetylase inhibition. *J. Med. Chem.* *56*, 963–969.
- Zheng, W., Lu, Y.-B., Liang, S.-T., Zhang, Q.-J., Xu, J., She, Z.-G., Zhang, Z.-Q., Yang, R.-F., Mao, B.-B., Xu, Z., et al. (2013). SIRT1 mediates the protective function of Nkx2.5 during stress in cardiomyocytes. *Basic Res. Cardiol.* *108*, 364.
- Zhou, Y., and Wu, W. (2017). The Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor, Empagliflozin, Protects against Diabetic Cardiomyopathy by Inhibition of the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *41*, 2503–2512.
- Zhou, B., Zhang, Y., Zhang, F., Xia, Y., Liu, J., Huang, R., Wang, Y., Hu, Y., Wu, J., Dai, C., et al. (2014). CLOCK/BMAL1 regulates circadian change of mouse hepatic insulin sensitivity by SIRT1. *Hepatology. Baltim. Md* *59*, 2196–2206.
- Zhu, H., Yang, Y., Wang, Y., Li, J., Schiller, P.W., and Peng, T. (2011). MicroRNA-195 promotes palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes by down-regulating Sirt1. *Cardiovasc. Res.* *92*, 75–84.
- Zhu, H., Xia, L., Zhang, Y., Wang, H., Xu, W., Hu, H., Wang, J., Xin, J., Gang, Y., Sha, S., et al. (2012). Activating transcription factor 4 confers a multidrug resistance phenotype to gastric cancer cells through transactivation of SIRT1 expression. *PLoS One* *7*, e31431.
- Zhu, H., Yang, X., Liu, J., Zhou, L., Zhang, C., Xu, L., Qin, Q., Zhan, L., Lu, J., Cheng, H., et al. (2015). Eukaryotic elongation factor 2 kinase confers tolerance to stress conditions in cancer cells. *Cell Stress Chaperones* *20*, 217.
- Zhuo, X.-Z., Wu, Y., Ni, Y.-J., Liu, J.-H., Gong, M., Wang, X.-H., Wei, F., Wang, T.-Z., Yuan, Z., Ma, A.-Q., et al. (2013). Isoproterenol instigates cardiomyocyte apoptosis and heart failure via AMPK inactivation-mediated endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *18*, 800–810.

Zoratti, M., and Szabò, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 139–176.

Annexes

Article 5

Salah A, Bouaziz C, Prola A, Pires Da Silva J, Bacha H, Abid-Essefi S, Lemaire C.

Citrinin induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells through endoplasmic reticulum stress.

J Toxicol Environ Health A. 2017;80(23-24):1230-1241.

doi: 10.1080/15287394.2017.1359127.






Citrinin induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells through endoplasmic reticulum stress

Amal Salah, Chayma Bouaziz, Alexandre Prola, Julie Pires Da Silva, Hassen Bacha, Salwa Abid-Essefi & Christophe Lemaire

To cite this article: Amal Salah, Chayma Bouaziz, Alexandre Prola, Julie Pires Da Silva, Hassen Bacha, Salwa Abid-Essefi & Christophe Lemaire (2017) Citrinin induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells through endoplasmic reticulum stress, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 80:23-24, 1230-1241, DOI: [10.1080/15287394.2017.1359127](https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1359127)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1359127>

 View supplementary material 

 Published online: 22 Nov 2017.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 



Citrinin induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells through endoplasmic reticulum stress

Amal Salah^{a,b}, Chayma Bouaziz^a, Alexandre Prola^c, Julie Pires Da Silva^c, Hassen Bacha^a, Salwa Abid-Essefi^a, and Christophe Lemaire^d

^aLaboratory of Research on Biologically Compatible Compounds, Faculty of Dental Medicine, Monastir University, Monastir, Tunisia; ^bFaculty of Sciences of Bizerte, Carthage University, Bizerte, Tunisia; ^cINSERM UMR-S 1180, Univ. Paris-Sud, Université Paris Saclay, Chatenay-Malabry, France; ^dUniversité Versailles St-Quentin, Inserm UMR-S 1180, Univ Paris-Sud, Université Paris Saclay, Chatenay-Malabry, France

ABSTRACT

The mycotoxin citrinin (CTN) is a natural contaminant of various human foods that may produce serious adverse health problems. Several studies demonstrated that citrinin exerts cytotoxic and genotoxic effects in both *in vivo* and *in vitro* systems. However, the precise mechanisms of action (MOA), particularly in intestinal cells remain unclear. The aim of the present study was to examine the precise MOA of citrinin *in vitro*. Data demonstrated that CTN significantly decreased the number of viable human intestinal HCT116 cells and induced apoptotic events including (1) decrease in $\Delta\Psi_m$ indicative of mitochondrial membrane permeabilization, (2) activation of caspase 3, (3) elevated production of reactive oxygen species (ROS) and (4) relative persistence of plasma membrane integrity. Further, the genetic deficiency of the pro-apoptotic protein Bax protected cells against CTN-induced apoptosis, indicating that Bax is required for CTN-mediated toxicity. It was also found that CTN triggered endoplasmic reticulum (ER) stress and activated different arms of the unfolded protein response (UPR) as demonstrated by increase in expression of GRP78 (glucose-regulated protein-78), GRP94 (glucose-regulated protein-94), GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein-34), the protein disulfide isomerase associated 6 (PDIA6), CHOP (C/EBP-homologous protein) and the splicing of XBP1 (X-Box Binding Protein 1). Pretreatment of cells with the chemical chaperone 4-phenylbutyrate (PBA), known to alleviate ER stress, prevented significantly the apoptotic process triggered by CTN. Taken together, these results suggest that CTN exerts its cytotoxic effects in HCT116 cells by inducing apoptosis, at least in part, through induction of ER stress.

ARTICLE HISTORY



Received 6 December 2016
Accepted 20 July 2017


Introduction

The mycotoxin citrinin (CTN) is a secondary metabolite produced by several species that belongs mainly to the genus *Penicillium* and *Monascus*. CTN has been identified as a contaminant in various types of food, including corn, wheat, rice, barley and nuts, and is associated with environmental and adverse human health effects (CAST 2003; Blanc et al. 2001). According to World Health Organization (WHO 2008), humans and animals may be exposed to mycotoxins through ingestion, inhalation or skin contact. In the absence of adequate exposure data, characterization of the risk of CTN as a food contaminant was based on the estimation of mycotoxin concentrations in grains and grain-based products that might result in an exposure equal to the

level of no concern for nephrotoxicity (EFSA 2012). For high grain consuming toddlers, other children and adults, this CTN concentration ranges from 9 to 53 μg citrinin/kg and from 19 to 100 μg citrinin/kg for average consumers, respectively. For animals, risk characterization was based upon the estimation of CTN levels in grains that exceed the NOAEL of 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w. per day for pigs, which ranged from 640 to 1,173 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The impact of uncertainties on risk assessment is large, and more data regarding toxicity and occurrence of CTN in human food and animal feed in Europe are needed to enable refinement of the risk assessment (EFSA 2012).

The cytotoxic effects of several mycotoxins including CTN on target tissues and cultured cells are postulated to involve an apoptosis-

CONTACT Chayma Bouaziz  c.chayma@gmail.com  Laboratory of Research on Biologically Compatible Compounds, Faculty of Dental Medicine, rue Avicenne 5019, Monastir University, Monastir, Tunisia.

 Supplemental data for this article can be accessed on [the publisher's website](#).

© 2017 Taylor & Francis

inducing ability (Chan 2007; Yu et al. 2006). CTN was found to affect mitochondrial Ca^{2+} fluxes and membrane permeability transition in cultured kidney cells and in isolated rat liver mitochondria (Chan 2008). In addition, both positive and negative results were reported with respect to mutagenicity and genotoxicity attributed to CTN (Jeswal 1996; Liu et al. 2003; Pfeiffer, Gross, and Metzler 1998). An increase in DNA damage was detected using single cell gel electrophoresis (comet test) in Vero cells exposed for 24 h to CTN (Bouslimi et al. 2008). However, the same method yielded negative results in human-derived liver cells (HepG2) (Knasmuller et al. 2004) and human embryonic kidney cells (HEK293) (Liu et al. 2003). Data suggest that CTN-induced oxidative stress may not have affected DNA (Liu et al. 2003). Oral administration of CTN in the diets of male F344 rats was demonstrated to induce formation of renal adenomas in 70% of treated rats (Arai and Hibino 1983). Experiments with cell lines and animal models showed that CTN triggers nephropathy and hepatotoxicity (Aleo, Wyatt, and Schnellmann 1991; Kogika, Hagiwara, and Mirandola 1993). However, the molecular mechanisms underlying CTN-mediated biological functions and cytotoxicity have yet to be established.

Apoptosis is a highly regulated cellular process, which is essential for normal development and maintenance of cell homeostasis. Apoptosis may be initiated by at least two types of signaling pathways. Specific ligation of members on the death receptor superfamily activates caspase-8, which directly stimulates downstream caspase-3 and leading to cellular degradation (Stennicke et al. 1998). Alternatively, following exposure of cells to environmental stress, apoptogenic proteins including cytochrome c, Smac/Diablo and AIF are rapidly released from mitochondria into the cytosol to induce apoptosis (Kluck et al. 1997). Cytosolic cytochrome c binds to apoptotic protease activation factor 1 (Apaf-1), which then initiates cleavage and activation of caspase-9, which subsequently activates the downstream executioner caspases-3, -6 and -7 (Li et al. 1997). The mitochondrial pathway of apoptosis is usually triggered by intracellular stimuli or signals emanating from other organelles such as the endoplasmic

reticulum (ER) (Sharaf El Dein et al. 2009). Disruption of ER homeostasis induces ER stress, which subsequently leads to Unfolded Protein Response (UPR), a pro-survival process stimulated to restore normal ER functions. However, in the case of prolonged or acute ER stress, the intrinsic apoptotic pathway is triggered to eliminate damaged cells (Hetz 2012). At present, the role of ER-mediated stress in CTN-induced toxicity remains to be determined. Thus, the aim of the present investigation was to gain an understanding of the cellular events involved in CTN-mediated toxicity and more specifically to examine whether CTN-induced ER stress is responsible for apoptosis in intestinal cells.

Intestinal cells lines are widely used in toxicological research involving xenobiotic metabolism, genotoxicity and cytoprotective studies. In particular, the intestinal cell lines HCT116 is one of the most widely used cell system in xenobiotic research, including biochemical and physiological characterization of chemical-mediated responses (Fremgaard and Hartwig 2015; Ben Salem et al. 2015; Ben Sassi et al. 2014; Lupertz et al. 2010; Boussabeh et al. 2015). Therefore, this cell line was employed to determine cell death, mitochondrial depolarization, generation of reactive oxygen species (ROS) and induction of ER stress. In addition, the chemical chaperon 4-phenylbutyrate (PBA) was utilized to examine if this compound alleviates the cytotoxic effects of CTN in HCT116 cell line not only to identify a protective effect but also to understand the relationship between ER stress and apoptosis induced by this mycotoxin.

Materials and methods

Chemicals

Citrinin (CTN) (4,6-dihydro-8-hydroxy-3,4,5-trimethyl-6-oxo-3H-2-benzopyran-7-carboxylic acid) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's modified eagle medium-F12 (DMEM-F12), fetal bovine serum (FBS), phosphate buffer saline (PBS), trypsin-EDTA, penicillin and streptomycin mixture, dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), propidium iodide (PI), fluorescein diacetate (FDA), 3,3'-dihexyloxycarbocyanin iodode (DiOC6(3)),

MitoSOX™ Red were purchased from Invitrogen (Saint Aubin, France). DEVD-NucView™ 488 caspase-3 substrate was obtained from Interchim (Montluçon, France).

Cell culture and treatment

Human colon carcinoma cells HCT116+/+ and HCT116 Bax -/- (generously provided by B. Vogelstein, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD) were cultured in DMEM-F12, supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine (200 mM), 1% of mixture penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 µg/ml), at 37°C with 5% CO₂. CTN was dissolved in ethanol. The volume of added solutions never exceeded 1% of the culture medium to avoid possible toxicity of the vehicle (ethanol).

Flow cytometry analysis

Cells were treated with CTN (75 to 300 µM). For flow cytometry analysis of cell viability, cells were incubated for 5 min at 37°C with the viability probe fluorescein diacetate (FDA) at 0.2 µg/ml. To measure the relative levels of mitochondrial superoxide anion (O₂•⁻), the MitoSOX™ probe was used. Once in the mitochondria, MitoSOX™ reagent is oxidized by superoxide anion and exhibits red fluorescence. Cells were centrifuged (1200 g, 5 min), washed with phosphate buffered saline (PBS) and incubated with 2 µM of MitoSOX™ for 10 min at 37°C. MitoSOX™ fluorescence was immediately analyzed by flow cytometry (at least 5000 cells). To assess the mitochondrial transmembrane potential (MTMP) ($\Delta\Psi_m$), cells were stained with 10 nM DiOC6(3) for 20 min at 37°C. Necrosis was estimated by adding 10 µg/ml PI just before analysis. Caspase-3 activation was assessed using DEVD-NucView 488 caspase-3 substrate. After treatment, cells were incubated with 5 µM DEVD-NucView 488 for 30 min at room temperature before cytometric analysis. Fluorescence of cells was analyzed on an FC500 cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France). Small cells were determined by flow cytometry. The forward-angle light scatter (FSC) relates to the cell size and the side-angle light scatter (SSC) reflects cell granularity. The % small cells was thus obtained by

gating the cell population with decreased FSC signal on cytograms.

Measurement of ROS production

Intracellular amount of ROS was measured by a fluorometric assay with 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) used extensively to monitor oxidation in biological systems as a well-established compound to detect and quantify intracellular ROS such as superoxide radical, hydroxyl radical and hydrogen peroxide (Cathcart, Schwiers, and Ames 1983, Gomes, Fernandes, and Lima 2005; Chen and Wong 2009). The conversion of the non-fluorescent (DCFH-DA) to the highly fluorescent 2,7-dichlorofluorescein product (DCF) ($\lambda_{max} = 522\text{nm}$) occurs in many steps. The fluorescent probe, after diffusing in the cell membrane, is hydrolyzed by intracellular esterases to non-fluorescent dichlorofluorescein (DCFH), which is trapped inside the cells and then oxidized to fluorescent DCF in the presence of ROS (Le Bel et al. 1992). Cells were seeded on 24-well culture plates (Polylabo, France) at 10⁵ cells/well 24 h before treatment. Cells were incubated with CTN (150 µM) for 36 h at 37°C and then stained with 20 µM DCFH-DA. Intracellular production of ROS was measured after 30 min incubation at 37°C by fluorometric detection of DCF oxidation on a fluorimeter (Biotek FL 800×) with an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 522 nm. The DCF fluorescence intensity is proportional to the amount of intracellular ROS. Results were expressed as the ratio of intensity of fluorescence in treated cells to that of the corresponding fluorescence in control.

Western blot analysis

Cells treated with CTN (150 µM), were lysed in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton, 1mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid) plus a cocktail of protease inhibitors (Roche) and PMSF for 30 min at 4°C. Proteins (30 µg) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes (Merck Millipore). Membranes were incubated overnight at 4°C with the following antibodies: anti-GRP78 (sc-1050),

anti-GADD34 (sc-8327) and anti- β -actin (sc-47778) from Santa Cruz, anti-Bax (A3533) from Dakocytomation (California, USA). Proteins were detected on a ChemiDoc XRS (BioRad, Richmond, USA) by using Pierce ECL Western Blotting Substrate ECL (an enhanced chemiluminescent substrate) method according to the manufacturer's instructions. To calculate the relative density (RD), ImageJ software was used and the intensity of each protein was normalized to β -actin. Data obtained were then expressed as the ratio of the intensity of the protein in treated cells to that of the corresponding protein in untreated cells.

RNA isolation and RT-PCR

RNA was isolated from cultured cells left untreated or treated with CTN (150 μ M) using Zymo Research QuickRNA MiniPrep according to the manufacturer's instructions. Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed using BioRad iScript reverse transcription kit. For real-time PCR, cDNA was amplified by the 'two-step' SsoFast EvaGreen supermix (BioRad), heated at 95°C for 30 s, then 50 cycles of denaturation at 95°C during 2 s and hybridization/elongation at 60°C 5'TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG3'(F) and 5'GCTGGCAGGCTCTGGGGAAG3'(R) for spliced *xbp1*. The results were quantified according to the Cq value method, where Cq is defined as the quantification cycle of PCR at which the amplified product is detected. The ratio $(1 + E_{\text{target gene}})^{-\text{(Cq sample - Cq control)}}$ target gene / $(1 + E_{\text{reference gene}})^{-\text{(Cq sample - Cq control)}}$ reference gene was calculated, where E represents the efficiency of the quantitative PCR reaction. With this calculation, expression of control was equivalent to one.

Statistical analysis

Each experiment was performed separately in triplicate. Values were presented as means \pm S.D. One-way ANOVA was used to assess differences among groups followed by Dunnett's post hoc test. When two groups were compared, differences were assessed by two-tailed Student's *t*-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$. SPSS program was used for statistical analysis.

Results

Influence of CTN on HCT116 cell viability

The cytotoxic effects of CTN on intestinal HCT116 cell line were measured by FDA assay. Growing cultures of HCT116 cells were exposed to increasing concentrations of CTN ranging from 75 μ M to 300 μ M for 36 h. As observed in Figure 1, CTN induced an elevation in % dead cells (FDA negative cells) in a concentration-dependent manner. Only 50% of cells were affected by the highest concentration used (300 μ M). A rise in cell death number was also observed in human embryonic kidney (HEK293) cells in response to CTN (Supplementary Figure S1).

CTN induces cell death through mitochondrial pathway of apoptosis

To characterize the type of cell death triggered in response to CTN and assess the role of mitochondria in this process, HCT116 cells were analyzed by flow cytometry after staining with PI to evaluate necrosis or with DiOC₆(3) to measure the MTMP ($\Delta\Psi$ m). The % cells with high PI fluorescence remained low (less than 20%), thus excluding involvement of necrosis in CTN-induced cell death (Figure 2A). A rise in % small cells (more than 50%) (Figure 2B) and DiOC₆(3) low cells (Figure 2C) were observed in a concentration-dependent manner, demonstrating that CTN promotes cell shrinkage and a significant decrease in

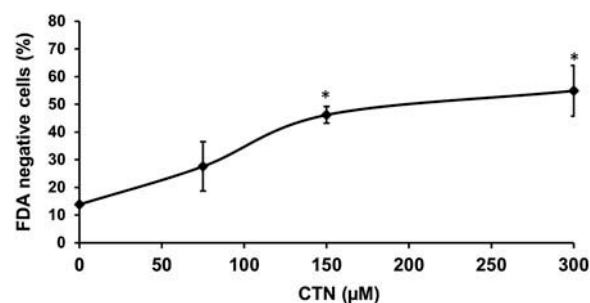


Figure 1. Cytotoxic effects of CTN on HCT116 cells. (A) HCT116 cells were incubated in the presence of CTN (75 to 300 μ M) for 36 h. 50% of cells were affected by the highest concentration used (300 μ M). Controls were performed with ethanol:water (v: v). Viability was assessed by flow cytometry analysis after FDA staining. FDA negative cells correspond to dead cells. Each bar represents means \pm SD of three independent experiments. (*) Values are significantly different ($p < 0.05$) from control.

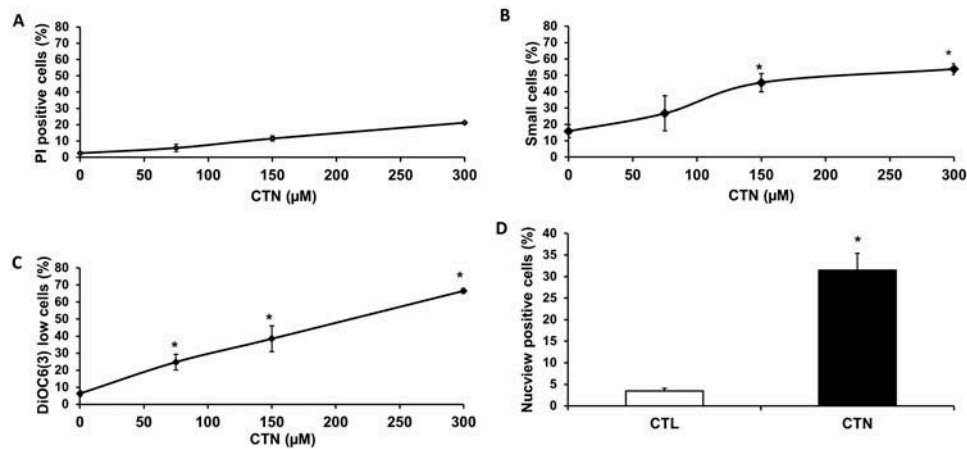


Figure 2. CTN activates the mitochondrial pathway of apoptosis in HCT116 cells. (A, B, C) HCT116 cells were exposed to CTN (75 to 300 μM) during 36 hr, stained with PI to determine the percentage of necrosis/late apoptosis (PI high cells, A) or with DiOC6(3) to estimate $\Delta\Psi\text{m}$ loss (DiOC6(3) low cells, C) and analyzed by flow cytometry. Cell size was also recorded (B). All experiments were done at least three times. Data are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. *, $p < 0.05$ vs control. The levels of active caspase-3 were determined after treatment with CTN (150 μM , 36 h) by flow cytometry using NucView 488 caspase-3 substrate (D). Bar graph represents the mean \pm SD of three independent experiments. (*) Values are significantly different ($p < 0.05$) from control.

$\Delta\Psi\text{m}$. Subsequently, the involvement of caspases was examined in the cell death process triggered by CTN. To this end, HCT116 cells were incubated with CTN (150 μM) for 36 h, labeled with the DEVD-NucView 488 caspase-3 substrate, which fluoresces when cleaved by active caspase-3, and analyzed by flow cytometry. As illustrated in Figure 2D, CTN triggered an elevation in % cells with activated caspase-3. Similarly, a loss of $\Delta\Psi\text{m}$ and an activation of caspase-3 were noted in HEK293 cells in response to CTN (Supplementary Figure S2). Taken together, these results demonstrate that CTN induces an apoptotic process involving at least mitochondrial membrane permeabilization (MMP) and caspase activation.

CTN-induced MMP is regulated by pro-apoptotic protein Bax

Activation of the mitochondrial apoptotic pathway is known to be regulated through the core pro-apoptotic proteins Bax and Bak (Westphal et al. 2011). HCT116 cells were incubated with CTN (150 μM) and the level of the pro-apoptotic protein Bax measured by western blot. As described in Figure 3A, an elevation of Bax expression was stimulated by CTN treatment. To further evaluate the involvement of Bax in CTN-induced apoptosis, HCT116 cells deficient for Bax expression (HCT

Bax $-/-$) were exposed to 150 μM CTN for 36 h and analyzed by flow cytometry. In the absence of Bax, cells were protected from CTN-induced loss of $\Delta\Psi\text{m}$ (Figure 3B), caspase-3 activation (Figure 3C) and cell death (Figure 3D). Consequently, the apoptotic pathway triggered by CTN requires the presence of the pro-apoptotic protein Bax.

CTN induces ROS generation in HCT116 cells

It is known that intracellular ROS generation leads to MMP and subsequent apoptosis (Albano 2008). To examine the changes in the redox status in response to CTN, the production of cellular H_2O_2 was analyzed using the ROS sensitive DCFH-DA probe. CTN treatment led to a significant increase in ROS generation by approximately fivefold compared to untreated cells (Figure 4A). Mitochondrial superoxide anion levels were also detected by staining cells with the MitoSOX[™] probe. Mitochondrial O_2 levels rose from $14.46 \pm 2.51\%$ in control to $54.6 \pm 8.2\%$ in the presence of 150 μM CTN in HCT116 cells (Figure 4B). An elevation in mitochondrial O_2 level was also detected in HEK293 cells (Supplementary Figure S3). These observations indicate that CTN induced an oxidative stress in these cells.

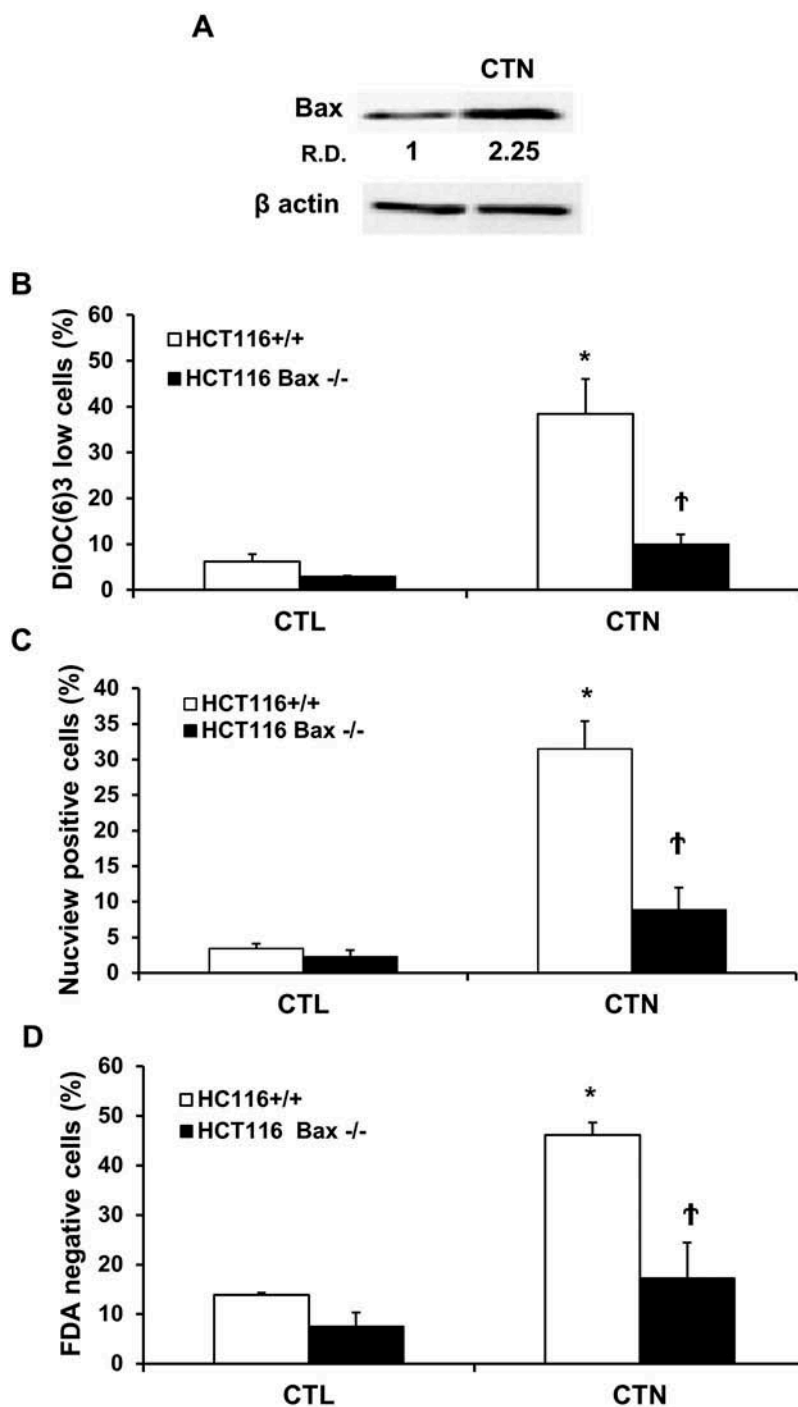


Figure 3. Bax is required for CTN-induced mitochondrial apoptosis. (A) The level of Bax protein was evaluated by western blot after 24 h treatment of HCT116 cells with 150 μ M CTN. β -Actin was used as a loading control. RD = relative density. (B–D) HCT116+/+ parental cells and cells deficient for Bax (HCT116 Bax^{-/-}) were incubated with 150 μ M CTN. After 36 hr, cells were analyzed by flow cytometry for $\Delta\Psi$ m loss (B), caspase-3 activation (C) and cell death (D). Data are expressed as the mean \pm S.D. of three independent experiments. *, $p < 0.05$ vs CTL, †, $p < 0.05$ vs parental HCT116+/+ cells.

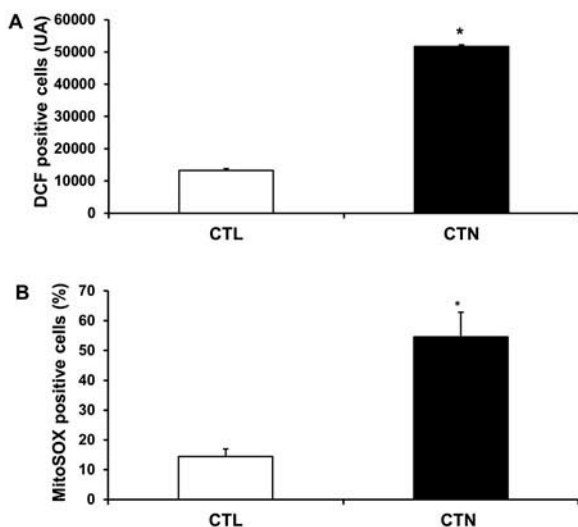


Figure 4. CTN induces an oxidative stress in HCT116 cells. (A) ROS production was evaluated by analyzing DCF fluorescence (UA). DCF positive cells correspond to ROS-generating cells. (B) Mitochondrial superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) generation was evaluated by recording MitoSOXTM Red fluorescence by flow cytometry. MitoSOXTM Red positive cells correspond to cells generating mitochondrial $O_2^{\cdot-}$. Bar graph represents the results of three independent experiments expressed as means \pm S.D. (*) Values are significantly different ($p < 0.05$) from control.

CTN induces an ER stress response in HCT116 cells

ROS generation was demonstrated to elicit an ER stress response in different cell systems (Eletto 2014). It was thus of interest to determine whether CTN induced ER stress in HCT116 cells. Following incubation with or without CTN (150 μ M) for 24 h, cells were harvested and western blotting and quantitative RT-PCR were performed to detect expression of the ER stress markers GRP78, GRP94, GADD34, PDIA6, CHOP and splicing of XBP1. CTN significantly enhanced the expression of GRP78 and GRP94 (Figure 5A-B), indicative of protein misfolding and subsequent ER stress. The rise in expression of GADD34 (Figure 5C), PDIA6 (Figure 5D) and splicing of XBP1 mRNA (Figure 5F) in response to CTN, indicates activation of the UPR. In addition, CTN induced the expression the transcription factor CHOP (Figure 5E), a major pro-apoptotic component of the UPR. Collectively, data indicate that CTN produced ER stress and activated different arms of the UPR in HCT116 cells.

CTN induces apoptosis through ER stress

Up-regulation of the ER stress-associated apoptosis factor CHOP led us to investigate whether ER stress is a cause or a consequence of CTN-induced apoptosis. HCT116 cells were pre-incubated for 2 h with the chemical chaperone PBA, known to alleviate ER stress (Ozcan et al. 2006), prior to CTN treatment. In the presence of PBA, cells were protected from CTN-induced loss of $\Delta\Psi_m$ (Figure 6A), caspase-3 activation (Figure 6B) and cell death (Figure 6C). The % of dead cells (FDA negative cells) was reduced from 46 to 19% in the presence of 100 μ M PBA. Data suggest that ER stress plays an important role in induction of the apoptotic process triggered by CTN.

Discussion

Mycotoxins are among the most significant food contaminant with regard to public health and food security and the oral route is the most common means of human exposure to these toxins. Citrinin is a frequently detected mycotoxins in various food commodities globally (Xu et al. 2006; Zaied et al. 2010) and is responsible for deleterious health effects in animals and human (Aleo, Wyatt, and Schnellmann 1991; Kogika, Hagiwara, and Mirandola 1993). Indeed, the results of a growing number of studies indicate that CTN treatment induces cytotoxic effects in hepatic, renal, epithelial, promyelocytic and mammalian cells (Liu et al. 2003; Yu et al. 2006; Šegvić Klarić et al. 2007; Bouslimi et al. 2008). These cytotoxic effects are accompanied by damage to the ultrastructure and cytoskeletal organization, mitochondrial metabolic dysfunction, intracellular reduced glutathione depletion and DNA lesions (Šegvić Klarić et al. 2007; Bouslimi et al. 2008; Knasmuller et al. 2004; Pfeiffer, Gross, and Metzler 1998). Despite the fact that oral route is the most common means of human exposure to the toxins and that ingested food containing these contaminants travels through the intestinal tract, the cytotoxic effects of CTN on intestinal cells have received little attention. The main focus of this study was thus to explore the involvement of CTN-mediated ER stress and mitochondrial pathway in the induction of cell death in HCT116 human colon cancer cells.

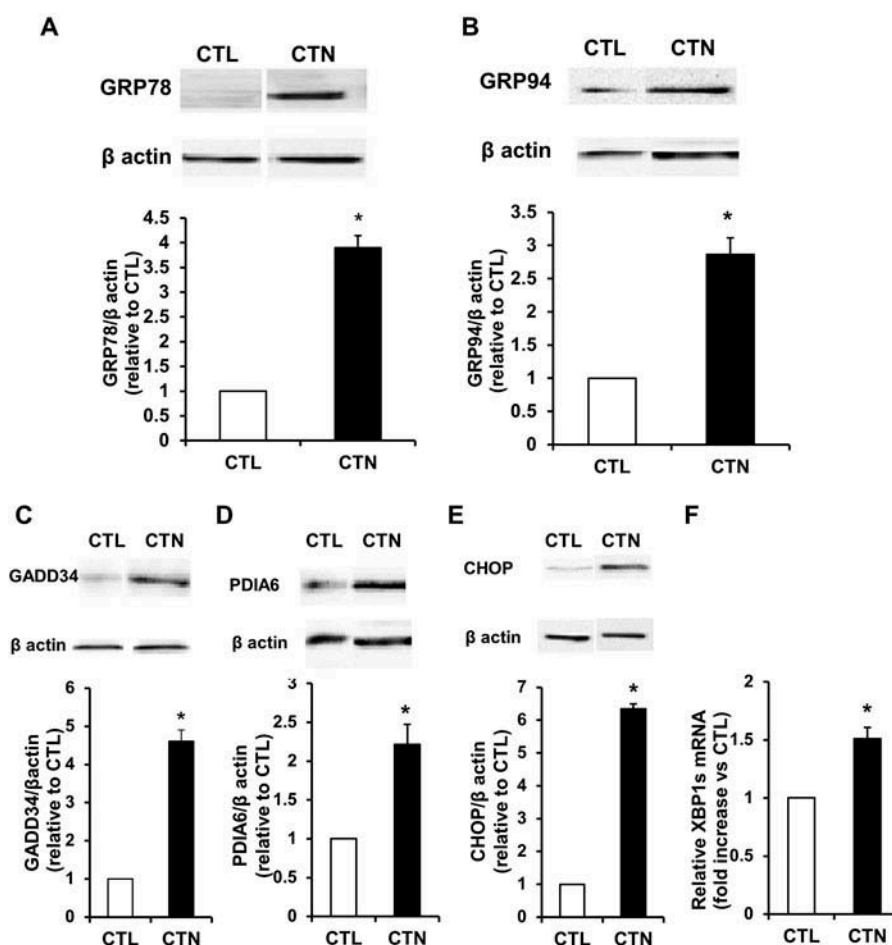


Figure 5. CTN induces endoplasmic reticulum stress in HCT116 cells. Cells were treated for 24 h with 150 μ M CTN and the protein levels of the ER stress markers GRP78 (A), GRP94 (B), GADD34 (C), PDIA6 (D) and CHOP (E) were analyzed by western blot. Representative western blots are presented. (F) The relative level of the spliced form of XBP1 (XBP1s) mRNA was quantified by RT-qPCR and expressed as fold change over untreated control. Each graph is representative of three independent experiments. Data are expressed as the mean \pm S.D. *, $p < 0.05$ vs control.

Our results showed that CTN exerted cytotoxic effects on HCT116 cells in a concentration-dependent manner accompanied by apoptotic events, including a decrease in $\Delta\psi_m$, indicative of MMP, an activation of caspase-3, a diminution of cells size and a relative persistence of plasma membrane integrity. Several investigators found that CTN produces apoptosis in different cell lines, including embryonic, hepatoma and leukemic cells, that was mediated through a mitochondria-dependent pathway (Chan 2007; Chen and Chan 2009; Yu et al. 2006). In agreement with these observations, CTN was also found to induce a mitochondria-mediated caspase-dependent apoptotic pathway in the large intestine-derived HCT116 cancer cells. Moreover, similar results obtained in HEK293 kidney cells show that the apoptotic process triggered

by CTN is not specific to the HCT116 cell line. The pro-apoptotic members of Bcl-2 family Bax and Bak are well-known regulators of the mitochondrial step during apoptosis. Indeed, Bax and Bak play a crucial role in inducing MMP either by forming oligomers in the outer mitochondrial membrane or by activating the opening of the permeability transition pore complex (Kroemer, Galluzzi, and Brenner 2007). The involvement of Bax in CTN-induced apoptosis was investigated by taking advantage of HCT116 cells lacking Bax expression. Data demonstrated that HCT116 Bax^{-/-} cells are resistant to CTN-mediated toxicity, indicating that Bax constitutes an essential gateway in regulating CTN-induced mitochondrial apoptotic pathway. The generation of ROS, which produces oxidative stress, was evidenced as a

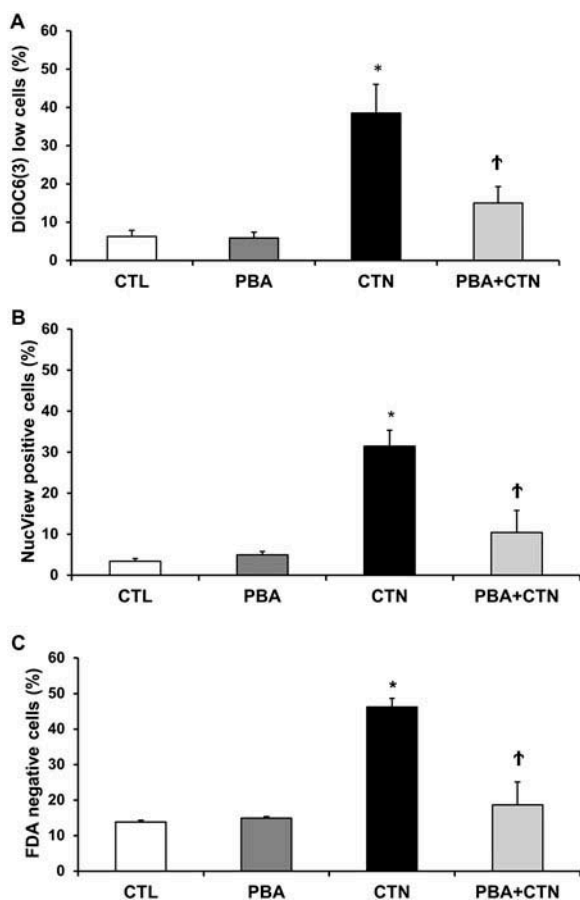


Figure 6. Pharmacological reduction of ER stress protects HCT116 cells from CTN toxicity. Cells were pre-treated or not for 2 h with the chemical chaperone PBA (100 μ M) before treatment with CTN (150 μ M) for 36 h, then stained with the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi$ m)-sensitive dye DiOC6(3) (A), NucView 488 caspase-3 substrate (B), or the viability probe FDA (C). Cell fluorescence was recorded by flow cytometry. Data are expressed as mean \pm S.D. of three independent experiments. *, $p < 0.05$ vs CTN alone.

disruption in the prooxidant/antioxidant balance, which is one of the most common responses to cellular damage and cell death (Avery 2011). CTN was noted to increase intracellular ROS levels and stimulate mitochondrial anion superoxide generation, indicating that the mycotoxin affects the redox status of HCT116 cells. ROS have emerged as important regulators of ER function and UPR activation in several disease conditions (Jomova et al. 2010; Malhotra and Kaufman 2007). In the case of toxic insults, including mycotoxins that induce ROS production, ER stress activation and cell death was reported in various types of mammalian cells (Yen et al. 2012; Lu et al. 2011, 2014).

The ER is a sophisticated luminal network that is involved in the regulation of synthesis, folding, glycosylation, and assembly of newly synthesized secretory proteins (Tabas and Ron 2012). Perturbation of these processes in several different pathological states creates a condition defined as ER stress (Ron and Walter 2007). In turn, ER stress leads to unfolded protein response (UPR), a pro-survival process induced to restore normal ER function (Oyadomari, Araki, and Mori 2002; Ron and Walter 2007). UPR is triggered by ER transmembrane sensors including protein kinase-like ER kinase (PERK), inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), and activating transcription factor 6 (ATF6). Activation of these sensors results in phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α) and translation of the transcription factor ATF4 to attenuate protein synthesis, and expression of UPR-related genes including the chaperones GRP78 and GRP94, GADD34, and XBP1s to increase the folding capacity of the ER and enhance ER-associated protein degradation (ERAD). However, when cells are unable to restore ER homeostasis as a consequence of prolonged or severe ER stress, an apoptotic process is induced mainly through the pro-apoptotic transcription factor CHOP to eliminate damaged cells (Shore et al. 2011; Brekenridge et al. 2003). Previously, several investigators demonstrated that ER stress-induced apoptosis plays an important role in the toxicity of the mycotoxins zearalenone, deoxynivalenol, trichodermin, and patulin (Yang et al. 2010; Banjerdpongchai et al. 2010; Su et al. 2013; Boussabbeh et al. 2015; Ben Salem et al. 2015)

Our findings showed that exposure of HCT116 cells to CTN significantly increased the protein levels of GRP78, GRP94, PDIA6, and GADD34 and the splicing of XBP1, suggesting that CTN induces ER stress and activates the different UPR pathways. In addition, the expression of the pro-apoptotic factor CHOP was elevated following CTN (150 μ M) treatment, indicating that ER stress induced by this mycotoxin is sufficient to activate the pro-apoptotic arm of UPR. Different compounds termed “chemical chaperones,” such as PBA, were reported to reduce the misfolding and mislocalization of

proteins, and thus to alleviate ER stress (Sato et al. 1996; Tatzelt et al. 1996; Rubenstein, Egan, and Zeitlin 1997; Tamarappoo and Verkman 1998; Burrows et al. 2000; Sawkar et al. 2002). Interestingly, the topical application of PBA (100 μ M) resulted in a significant protection against CTN-induced loss of $\Delta\Psi_m$, caspase-3 activation, and cell death. These findings indicate that ER stress plays a critical role in CTN-induced HCT116 apoptosis.

Conclusions

In conclusion, to the best of our knowledge, our study is the first to demonstrate that CTN-induced toxicity is associated with ER stress-mediated activation of the mitochondrial pathway of apoptosis in intestinal cells. In addition, data demonstrated that PBA confers a protection against CTN-induced toxicity in HCT116 cells. Given the fact that PBA is in current clinical use to treat urea cycle disorders under the trade name Buphenyl® and is well-tolerated, our results suggest that this chemical chaperone may have utility to counteract the toxicity and deleterious health effects attributed to CTN. However, further *in vivo* studies are required to determine the efficacy of PBA to ameliorate adverse health effects due to CTN.

Funding

This study was supported by “Le Ministère Tunisien de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Technologie” and by grants from LabEx LERMIT. A. Prola received a fellowship from GRRC.

Declaration of interest

Authors assure there are no conflicts of interest.

References

- Albano, E. 2008. New concepts in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Expert Rev. Gastroenterol Hepatol.* 2:749–759
- Aleo, M. D., Wyatt, R. D., and Schnellmann, R. G. 1991. The role of altered mitochondrial function in citrinin-induced toxicity to rat renal proximal tubule suspensions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 109:455–463.
- Arai, M., and Hibino, T. 1983. Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. *Cancer Lett.* 17:281–287.
- Avery, S. V. 2011. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem. J.* 434:201–210.
- Banjerdpongchai, R., Kongtawelert, P., Khantamat, O., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Subhasitanont, P., and Svasti, J. 2010. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress pathways cooperate in zearalenone induced apoptosis of human leukemic cells. *J. Hematol. Oncol.* 3:1–16.
- Ben Salem, I., Prola, A., Boussabbeh, M., Guilbert, A., Bacha, H., Lemaire, C., and Abid-Essefi, S. 2015. Activation of ER stress and apoptosis by α - and β -zearalenol in HCT116 cells, protective role of quercetin. *Neurotoxicology.* 9:11–004.
- Ben Sassi, F., Gallerne, C., Sharaf el dein, O., Hajlaoui, M.R. Lemaire, C., and Bacha, H. 2014. In vitro investigation of toxicological interactions between the fusariotoxins deoxynivalenol and zearalenone. *Toxicol.* 18:1–6.
- Blanc, P. J., Laussac, J. P., Le Bars, J., Le Bars, P., Loret, M. O., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J. C., Santerre, A. L., and Goma, G. 2001. Characterization of monascidin A from *monascus* as citrinin. *Int. J. Food Microbiol.* 27:201–213.
- Bouslimi, A., Bouaziz, C., Ayed-Boussema, I., Hassen, W., and Bacha, H., 2008. Individual and combined effects of ochratoxin A and citrinin on viability and DNA fragmentation in cultured Vero cells and on chromosome aberrations in mice bone marrow cells. *Toxicology* 251:1–7.
- Boussabbeh, M., Ben Salem, I., Prola, A., Guilbert, A., Bacha, H., Abid-Essefi, S., and Lemaire, C. 2015. Patulin induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress pathway. *Toxicol. Sci.* 144:328–337.
- Breckenridge, D. G., Stojanovic, M., Marcellus, R. C., and Shore, G. C. 2003. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J. Cell Biol.* 160:1115–1127
- Burrows, J. A., Willis, L. K., and Perlmutter, D. H. 2000. Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant alpha 1-antitrypsin (alpha 1-AT) Z: A potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in alpha 1-AT deficiency. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97:1796–1801.
- CAST, Ames, IA. 2003. CAST Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Council of Agricultural Science and Technology, Task force report No. 139.
- Cathcart, R., Schwiers, E., and Ames, B. N. 1983. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal. Biochem.* 134:111–116.
- Chan, W. H. 2007. Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts. *Biochem. J.* 404:317–326.
- Chan, W. H. 2008. Citrinin induces apoptosis in mouse embryonic stem cells. *IUBMB Life.* 60:171.
- Chen, C. C., and Chan, W.-H. 2009. Inhibition of citrinin-induced apoptotic biochemical signaling in human hepatoma G2 cells by resveratrol. *Int. J. Mol. Sci.* 10:3338–3357.

- Chen, T., and Wong, Y. S. 2009. Selenocystine induces caspase-independent apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells with involvement of p53 phosphorylation and reactive oxygen species generation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41:666–676.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2012. Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *EFSA J.* 10:2605
- Eletto, D., Chevet, E., Argon, Y., and Appenzeller-Herzog, C. 2014. Redox controls UPR to control redox. *J Cell Sci* 127:3649–3658.
- Fremgaard Risnesn, S., Hartwig, A. 2015. Impact of cadmium on antioxidant enzymes in HCT116 cells and protective interaction by selenium. *Perspect. Sci.* 3:55
- Gomes, A., Fernandes, E., and Lima, J. L. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Meth* 65:45–80.
- Hetz, C., 2012. The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13:89–102.
- Jeswal, P. 1996. Citrinin-induced chromosomal abnormalities in the bone marrow cells of *Mus musculus*. *Cytobios* 86:29–33.
- Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M., and Valko, M. 2010. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem.* 345:91–104.
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132–1136.
- Knasmuller, S., Cavin, C., Chakraborty, A., Darroudi, F., Majer, B. J., Huber, W. W., and Ehrlich V. A. 2004. Structurally related mycotoxins ochratoxin A, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and in their mode of action in human derived liver (HepG2) cells: Implications for risk assessment. *Nutr Cancer.* 50:190–197.
- Kogika, M. M., Hagiwara, M. K., and Mirandola, R. M. 1993. Experimental citrinin-nephrotoxicosis in dogs: Renal function evaluation. *Vet. Human Toxicol.* 35:136–140.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 87:99–163.
- Le Bel, C. P., Ischiropoulos, H., Bondy, and S. C. 1992. Evaluation of the probe 2-,7- dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5:227–231.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. 1997. Cytochrome c and ATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91:479–489.
- Liu, B. H., Yu, F. Y., Wu, T., Li, S. Y., Su, M. C., Wang, M. C., and Shih, S. M. 2003. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 191:255–263.
- Loh, K. P., Huang, S. H., De Silva, R., Tan, B. K., and Zhu, Y. Z. 2006. Oxidative stress: Apoptosis in neuronal injury. *Curr. Alzheimer Res.* 3:327–337.
- Lu, M., Lawrence, D. A., Marsters, S., Acosta-Alvear, D., Kimig, P. H., Mendez, A. S., Paton, A. W., Paton, J. C., Walter, P., and Ashkenaz, A. 2014. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science.* 345:98–101.
- Lu, T. H., Su, C. C., Chen, Y. W., Yang, C. Y., Wu, C. C., Hung, D. Z., Chen, C. H., Cheng, P. W., Liu, S. H., and Huang, C. F. 2011. Arsenic induces pancreatic beta-cell apoptosis via the oxidative stress-regulated mitochondria-dependent and endoplasmic reticulum stress-triggered signaling pathways. *Toxicol. Lett.* 201:15–26.
- Lüpertz, R., Wätjen, W., Kahl, R., and Chovolou, Y. 2010. Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology.* 271:115–121.
- Ma, Y., and Hendershot, L. M. 2003. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 278:34864–34873.
- Malhotra, J. D., and Kaufman, R. J. 2007. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18:716–731.
- Oyadomari, S., Araki, E., and Mori, M. 2002. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 7:335–345.
- Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R. O., Go“rgu” n, C. Z., and Hotamisligil, G. S. 2006. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313:1137–1140.
- Pfeiffer, E., Gross, K., and Metzler, M. 1998. Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. *Carcinogenesis* 19:1313–1318.
- Qi, X., Hosoi, T., Okuma, Y., Kaneko, M., Nomura, Y., 2004. Sodium 4-phenylbutyrate protects against cerebral ischemic injury. *Mol Pharmacol* 66:899–908.
- Ron, D., and Walter, P. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 8:519–520.
- Rubenstein, R. C., Egan M. E., and Zeitlin, P. L. 1997. In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J. Clin. Invest.* 100:2457–2465.
- Sato S., Ward C. L., Krouse M. E., Wine J. J., and Kopito R. R. 1996. Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J. Biol. Chem.* 271:635–638.
- Sawkar, A. R., Cheng, W. C., Beutler, E., Wong, C. H., Balch, W. E., and Kelly, J. W. 2002. Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta-glucosidase: A therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99:15428–15433.
- Schroder, M., and Kaufman R. J. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 74:739–789.
- Šegvić Klarić, M., Želježić, D., Domijan, A.-M., Peraica, M., and Pepeljnjak, S. 2007. Citotoxicity, genotoxicity and

- apoptosis induced by ochratoxin A and citrinin in porcine kidney PK15 cells: Effects of single and combined mycotoxins. *Toxicol Lett.* 172 (Suppl. 1):S56.
- Sharaf el Dein, O., Gallerne, C., Deniaud, A., Brenner, C., and Lemaire, C. 2009. Role of the permeability transition pore complex in lethal inter-organelle crosstalk. *Front. Biosci.* 14:3465–3482.
- Shore, G. C., Papa, F. R., and Oakes, S. A. 2011. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23:143–149.
- Stennicke, H. R., Jurgensmeier, J. M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B. B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H. M., Ellerby, L. M., Bredesen, D., Green, D.R., Reed, J. C., Froelich, C. J., and Salvesen, G. S. 1998. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 273:27084–27090.
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J., and Brand, M. D. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277:44784–44790.
- Su, C. M., Wang, S. W., Lee, T. H., Tzeng, W. P., Hsiao, C. J., Liu, S. C., and Tang, C. H. 2013. Trichodermin induces cell apoptosis through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress in human chondrosarcoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272:335–344.
- Tabas, I., Ron, D. 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 3:184–190.
- Tamarappoo B. K., and Verkman A. S. 1998. Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones. *J. Clin. Invest.* 101:2257–2267.
- Tatzelt J., Pruisner S. B., and Welch W. J. 1996. Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J.* 15:6363–6373.
- Usmani, S. Z., Bona, R. D., Chiosis, G., and Li, Z. 2010. The anti-myeloma activity of a novel purine scaffold HSP90 inhibitor PU-H71 is via inhibition of both HSP90A and HSP90B1. *J. Hematol. Oncol.* 3:40.
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P. E., and Kluck, R. M. 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim. Biophys. Acta* 1813:521–531
- WHO/IPCS (World Health Organization/International Program on Chemical Safety). 2008. Uncertainty and data quality in exposure assessment. Harmonization project document No. 6. ISBN 978 92 4 156376 5.
- Xu, B. J, Jia, X. Q., Gu, L. J., and Sung, C. K. 2006. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control* 17:271–285.
- Yang, H., Park, S. H., Choi, H. J., Do, K. H., Kim, J, An, T. J., Lee, S. H., and Moon, Y. 2010. Mechanism-based alternative monitoring of endoplasmic reticulum stress by 8-ketotrichothecene mycotoxins using human intestinal epithelial cell line. *Toxicol Lett* 198:317–323.
- Yen, Y. P., Tsai, K. S., Chen, Y. W., Huang, C. F., Yang, R. S., and Liu, S. H. 2012. Arsenic induces apoptosis in myoblasts through a reactive oxygen species-induced endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction pathway. *Arch Toxicol* 86:923–933.
- Yu, F. Y., Liao, Y. C., Chang, C. H., and Liu, B. H. 2006. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. *Toxicol. Lett.* 161:143–151.
- Zaied, C. H., Zouaoui, N., Bacha, H., and Abid, S. 2012. Natural occurrence of citrinin in Tunisian wheat grains. *Food Control* 28:106–109.

Article 6

Zurlo G, Piquereau J, Moulin M, **Pires Da Silva J**, Gressette M, Ranchoux B, Garnier A, Ventura-Clapier R, Fadel E, Humbert M, Lemaire C, Perros F, Veksler V.

Sirtuin 1 regulates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation: role in pulmonary arterial hypertension

J Hypertens. 2018 Jan 24. doi: 10.1097/HJH.0000000000001676

Sirtuin 1 regulates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation: role in pulmonary arterial hypertension

Giada Zurlo^a, Jérôme Piquereau^a, Maryline Moulin^a, Julie Pires Da Silva^a, Mélanie Gressette^a, Benoît Ranchoux^b, Anne Garnier^a, Renée Ventura-Clapier^a, Elie Fadel^{b,c}, Marc Humbert^{b,d}, Christophe Lemaire^{a,e}, Frédéric Perros^b, and Vladimir Veksler^a

See editorial comment on page 1032

Objective: Energy metabolism shift from oxidative phosphorylation toward glycolysis in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) is suggested to be involved in their hyperproliferation in pulmonary arterial hypertension (PAH). Here, we studied the role of the deacetylase sirtuin1 (SIRT1) in energy metabolism regulation in PASMCs via various pathways including activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α), master regulator of mitochondrial biogenesis.

Approach and results: Contents of PGC-1 α and its downstream targets as well as markers of mitochondrial mass (voltage-dependent anion channel and citrate synthase) were diminished in human PAH PASMCs. These cells and platelet-derived growth factor-stimulated rat PASMCs demonstrated a shift in cellular acetylated/deacetylated state, as evidenced by the increase of the acetylated forms of SIRT1 targets: histone H1 and Forkhead box protein O1. Rat and human PASMC proliferation was potentiated by SIRT1 pharmacological inhibition or specific downregulation via short-interfering RNA. Moreover, after chronic hypoxia exposure, SIRT1 inducible knock out mice displayed a more intense vascular remodeling compared with their control littermates, which was associated with an increase in right ventricle pressure and hypertrophy. SIRT1 activator Stac-3 decreased the acetylation of histone H1 and Forkhead box protein O1 and strongly inhibited rat and human PASMC proliferation without affecting cell mortality. This effect was associated with the activation of mitochondrial biogenesis evidenced by higher expression of mitochondrial markers and downstream targets of PGC-1 α .

Conclusion: Altered acetylation/deacetylation balance as the result of SIRT1 inactivation is involved in the pathogenesis of PAH, and this enzyme could be a promising therapeutic target for PAH treatment.

Keywords: mitochondrial biogenesis, oxidative metabolism, proliferation, protein acetylation, pulmonary artery smooth muscle cells, sirtuin 1

Abbreviations: ERR α , estrogen-related receptor α ; FOXO1, Forkhead box protein O1; GLUT1, glucose

transporter 1; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor-1 α ; LDH, lactate dehydrogenase; NAMPT, nicotinamide phosphoribosyltransferase; PAH, pulmonary artery hypertension; PASMC, pulmonary artery smooth muscle cell; PDGF, platelet-derived growth factor; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; SIRT1, sirtuin 1; SOD2, superoxide dismutase 2; TFAM, mitochondrial transcription factor A; VDAC, voltage-dependent anion channel

INTRODUCTION

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare but deadly cardiopulmonary disorder characterized by an extensive remodeling of small-sized and medium-sized pulmonary arteries, mainly due to the hyperproliferation of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs). Such vascular remodeling increases pulmonary vascular resistance and pulmonary arterial pressure, ultimately leading to right-sided heart failure and death [1]. The causes that initiate and perpetuate pulmonary vascular cell proliferation in PAH remain unknown, which explains the absence of curative therapies and, thus, the poor prognosis for this disease.

PAH PASMCs share some common features with cancer such as growth dysregulation, resistance to apoptosis and a metabolic remodeling [2]. Similar to cancer cells, PASMCs display a shift from oxidative phosphorylation toward

Journal of Hypertension 2018, 36:1164–1177

^aINSERM UMR-S 1180, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, ^bINSERM UMR-S 999, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, ^cHôpital Marie-Lannelongue, Service de chirurgie thoracique, Paris, ^dINSERM UMR-S 999, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Hôpital Bicêtre, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Le Kremlin-Bicêtre and ^eUniversité Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Université Paris-Saclay, Versailles, France

Correspondence to Vladimir Veksler, INSERM UMR-S1180, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, 5 rue J.-B. Clément, Paris 92296, France. Tel: +33 1 46 83 57 57; e-mail: Vladimir.veksler@u-psud.fr

Received 26 June 2017 **Revised** 9 October 2017 **Accepted** 21 December 2017

J Hypertens 36:1164–1177 Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

DOI: 10.1097/HJH.0000000000001676

glycolysis even in the presence of oxygen, condition known as the Warburg effect. This metabolic alteration is sustained by the pathological activation of transcription factors such as c-Myc and the hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) [3], as well as the inhibition of the transcription factor Forkhead box protein O1 (FOXO1) [4], contributing to PAH PASM mitochondrial dysfunction. Indeed, PAH PASM mitochondria present numerous abnormalities (for review, see [5]), including lowered oxidative capacity and altered mitochondrial dynamics leading to mitochondrial fragmentation. The recovery of mitochondrial function via the increase in oxidative capacity [6–8] and/or the restoration of fusion/fission balance [9,10] proved beneficial for the treatment of PAH in animal models, thus appearing as a promising therapeutic approach.

Cellular acetylation/deacetylation balance is an important regulator of energy metabolism including mitochondrial function. Particularly, sirtuin 1 (SIRT1), which is a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)-dependent deacetylase, has been found to augment mitochondrial function via several mechanisms. In various tissues including liver and skeletal muscle, SIRT1 enhances mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation by deacetylating and activating one of the master regulators of mitochondrial biogenesis, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) (reviewed in [11]). SIRT1 is able to promote mitochondrial gene expression also via a PGC-1 α independent pathway. By destabilizing HIF-1 α , it prevents HIF-1 α -mediated inhibition of c-Myc, activator of the transcription of mitochondrial transcription factor A (TFAM), thus increasing the expression of mitochondrial-encoded respiratory genes [12]. Finally, SIRT1 can improve mitochondrial activity by activating stress signaling pathways via the mitochondrial unfolded protein response and the nuclear translocation and activation of one of FOXO transcription factors as shown in worms [13].

Therefore, one could hypothesize that SIRT1 is affected in PAH and that its activation could have beneficial effects in this disease. However, neither the expression/activity of SIRT1 nor the acetylation/deacetylation balance in PAH pulmonary vessels of patients or in experimental models has been investigated. Of note, another enzyme belonging to this family, sirtuin 3, which localizes in the mitochondria to activate metabolic pathways including fatty acid oxidation [14] and oxidative phosphorylation [15,16], is down-regulated in human PAH [17]. Importantly, some studies pointed out a potential protective role of SIRT1 in PAH. Indeed, resveratrol, a nonspecific SIRT1 activator, has been found to prevent, and even reverse [18], monocrotaline-induced [19] and chronic hypoxia-induced PAH [20], as well as PAH-associated right ventricle (RV) hypertrophy [21]. Furthermore, Ding *et al.* [22] have recently shown that calorie restriction activates SIRT1 and SIRT1 overexpression can also ameliorate monocrotaline-induced PAH. However, all these studies used nonspecific SIRT1 activators, resveratrol and calorie restriction, all of which affect a large range of other targets [23,24]. Moreover, SIRT1-triggered metabolic signaling pathways (which could be involved in resveratrol or calorie restriction beneficial effects on PAH) were not explored.

Here, we investigate the state of SIRT1 signaling pathway in human PAH PASM cells as well as in rat PASM cells stimulated with platelet-derived growth factor (PDGF). We demonstrate that the acetylation/deacetylation balance is shifted toward acetylation in PAH and PDGF-treated PASM cells. We show that SIRT1 is a negative regulator of PASM growth: its pharmacological inhibition and specific downregulation enhance human and rat PASM proliferation. Moreover, we provide evidence for SIRT1 role in vascular remodeling, as its genetic deletion aggravates chronic hypoxia-induced pulmonary artery muscularization in mice. We then prove that SIRT1 can have beneficial effect in PAH treatment by using the SIRT1-specific activator Stac-3, which completely prevents PDGF-induced proliferation and, importantly, abolishes almost completely the proliferation of PASM cells from PAH patients without effect on the cell mortality. Finally, we show that SIRT1 activation is associated with the increase in the expression of genes implicated in mitochondrial function and the augmentation of mitochondrial biogenesis, thus providing a mechanistic explanation for the role of acetylation/deacetylation balance.

MATERIAL AND METHODS

Rat and human pulmonary artery smooth muscle cells

Primary culture of rat PASM cells were derived from 13 250–300-g male Wistar rats. After anesthesia via intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (100 mg/kg), the trachea, heart and lungs were rapidly removed, and the pulmonary artery isolated and deprived of residual adventitial tissue using dissection forceps and tweezers. Pulmonary artery was then cut in small pieces and incubated in 1% antibiotic/antimycotic Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) containing 150 U/ml type I collagenase and 0.125 mg/ml elastase at 37 °C for 90 min under shaking. Tissue lysate was then filtered through a 70- μ m cell strainer. Cells were collected and cultivated in 15% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic/antimycotic DMEM at 37 °C in a 95% air-5% CO₂ atmosphere till subconfluence. Medium was changed every day. Culture material was previously coated with 50- μ g/ml collagen I. Experiments were performed between passages 2 and 6. All animal care and experimental procedures conformed to the European Community guiding principles in the care and use of animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament) and authorizations to perform animal experiments according to this decree were obtained from the French Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (No. D-92-283, 13 December 2012).

Human PASM cells were prepared from pulmonary artery explants (5–10 mm of diameter) obtained during lung transplantation from five patients with idiopathic PAH and during lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer from seven control (CTL) patients (Table 1). In control subjects, pulmonary arteries explants were isolated at a distance from tumor areas. Transthoracic echocardiography was performed preoperatively in the control subjects to rule out pulmonary hypertension. Patients studied were part of the French Network on Pulmonary Hypertension, a program approved by our institutional Ethics

TABLE 1. Characteristics of pulmonary artery hypertension and control patients

Patient	Age (years)	Sex	NYHA class	mPAP (mmHg)	Cardiac index (l/min per m ²)	Specific medication
PAH	41	F	4	50	3.4	PDE5i, ERA
PAH	44	F	4	50	N/C	
PAH	35	F	3	53	2.15	PDE5i, ERA, PC
PAH	26	F	4	94	1.7	ERA, PC
PAH	44	M	4	N/A	N/C	LTRA
CTR	43	F				
CTR	56	F				
CTR	56	M				
CTR	64	M				
CTR	65	M				
CTR	78	M				
CTR	61	F				

CTR, control; ERA, endothelin receptor antagonists; LTRA, leukotriene receptor antagonists; mPAP, mean pulmonary artery pressure; N/C, noncommunicated; NYHA, New York Heart Association; PAH, pulmonary arterial hypertension; PC, prostacyclin; PDE5i, phosphodiesterase class 5 inhibitors.

Committee, and had given written informed consent (Protocol N8CO-08-003, ID RCB: 2008-A00485-50, approved on 18 June 2008). The principles of the Declaration of Helsinki were followed. Human PSMCs were cultivated in DMEM containing glucose (4.5 g/l), FBS (15%), L-glutamine (2 mmol/l), HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid; 20 mmol/l), epidermal growth factor (10 U/ml), insulin–transferrin–selenium 1×, normocin (0.1 mg/ml), 1% antibiotic/antimycotic and used until passage 6.

Treatments of rat and human pulmonary artery smooth muscle cells

After 24-h incubation in 0.5% FBS and 1% antibiotic/antimycotic supplemented medium, PSMCs were preincubated for 2 h with one of the following compounds diluted in the same medium: 10 μmol/l Stac-3 (sc-222315; Santa Cruz, Heidelberg, Germany), 5 μmol/l sirtinol (sc-205976; Santa Cruz) and 1 μmol/l SRT1720 (A4180; APEX-BIO, Houston, Texas, USA). Control cells were treated with vehicle (dimethyl sulfoxide). Rat PSMC proliferation was then induced with 10-ng/ml PDGF for 24 h. As PAH PSMCs maintain their hyperproliferative phenotype in culture, no compound was used to stimulate their growth.

Evaluation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and death

PASM proliferation was measured via four different approaches. Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation was evaluated using a kit (Millipore, Molsheim, France), following the manufacturer instructions. WST-1 (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) cleavage was measured by a spectrophotometer. Cell counting was performed using a Malassez haemocytometer. The protein amount of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was detected via Western blotting.

For measuring PASM death, cells were labeled with 0.1-μg/ml fluorescein diacetate (FDA), and FDA negative cells were detected by flow cytometry (FC500, Beckman Coulter, Villepinte, France). To analyze late apoptosis/necrosis, cells were also labeled with 10-μg/ml propidium iodide. Only late apoptotic/necrotic cells, which have lost their membrane integrity, can be labeled by this nucleic acid intercalating fluorescent agent.

For each sample, at least 7500 cells were analyzed. Cell aggregates and debris were excluded from analysis.

Pulmonary artery smooth muscle cell transient transfection

Reverse short interference RNA transfection was performed to downregulate SIRT1 in rat and human PSMCs. Cells were seeded in a transfection medium (Santa Cruz) containing transfection reagent (Santa Cruz) and a mix of three short interfering RNA specifically directed against SIRT1 (siSIRT1, Santa Cruz) or having no known target [control small interfering RNA (siRNA)-A, Santa Cruz]. Twenty-four hours after the transfection, cells were cultivated for additional 24 h with 0.5% FBS containing medium, then treated. Transfection rate, evaluated by flow cytometry using a FITC-coupled siRNA (Santa Cruz), was about 60%. Transfection efficiency was confirmed by SIRT1 protein level.

Immunohistochemistry

An amount of 7-μm thick slices were cut and stained with α smooth muscle actin (αSMA) (Sigma, F3777, 1:200), Von Willebrand endothelial factor (A0082, 1:600; Dako, Glostrup, Denmark) and 4 μmol/l Hoechst for nuclear staining. For each mouse, 100 small vessels (with a diameter <50 μm) were examined by a blinded observer. Each vessel was categorized as nonmuscular (vessels without smooth muscle), partially muscular (vessels with smooth muscle layer in only part of their wall) or totally muscular (smooth muscle is identifiable in the entire vessel circumference). Supplemental Fig. S1, <http://links.lww.com/HJH/A897> shows representative images of vessels considered as non-muscular, partially muscular and totally muscular ones.

Immunoprecipitation

The lysates of PSMCs, including 500-μg protein, were precleaned with protein A magnetic beads (Millipore) at 4 °C for 1 h, and then supernatants were collected. The lysates were incubated with antiacetylated lysine antibody (cell signaling, 9681, 1:20) or with antimouse IgG antibodies (Santa Cruz; sc-2025, 1:20) at 4 °C overnight. Immune complexes were collected then resuspended in denaturing lysis buffer and heated at 70 °C for 10 min. The

immunoprecipitated proteins were subjected to Western blot analysis for PGC-1 α detection.

Immunoblot

An amount of 30–50 μ g of protein extract were loaded onto 8–15% polyacrylamide gel and then transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon, Millipore, Darmstadt, Germany).

Primary antibody (see Supplementary Table S1, <http://links.lww.com/HJH/A897>) incubation was performed either overnight at 4°C or for 2 h at room temperature (RT). The incubation of peroxidase-coupled secondary antibody was realized for 1 h at RT. Proteins were visualized using Luminata Crescendo or Forte (Millipore) peroxidase substrates using a charge-coupled device camera (Chem-iDoc XRS+; BioRad, Hercules, California, USA), Band density was quantified using Quantity One software (BioRad) and normalized to a housekeeping protein (β actin for human PSMCs or vinculin for rat PSMCs).

Quantitative real time-PCR

Total RNAs were extracted from cells using TRIzol (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio, USA). Briefly, chloroform was added to TRIzol, samples were centrifuged at 10 000 $\times g$ for 15 min at 4°C and three phases were thus obtained: a protein-containing phenol-chloroform fraction, a DNA-containing interphase and a RNA-containing aqueous phase. The addition of isopropanol to the aqueous phase allowed RNA precipitation.

Reverse transcription was performed from 1- μ g RNA in 20 μ l using BioRad complementary DNA (cDNA) synthesis kit, following manufacturer instructions. Negative controls without reverse transcriptase were performed to verify the absence of genomic DNA in the samples.

Gene expression was evaluated using a quantitative PCR system (BioRad) with SYBR-Green dye. PCR reaction was realized on 5 μ l of the reverse transcription reaction product diluted by 20. Reaction mix contained 0.5 μ mol/l sense and antisense primers (see Supplementary Table S2, <http://links.lww.com/HJH/A897>). To confirm the absence of exogenous contaminations, a negative control without sample was realized. For each gene, a calibration curve was obtained analyzing cDNA series dilutions and was used to calculate sample concentration and determine amplification efficiency. As expression of genes encoding for proteins used for the Western blot loading control (actin and vinculin) showed limited stability, more stable TATA-binding protein (TBP), RPL32 (Ribosomal Protein Large 32), Ribosomal Protein Large P2 and 14–3–3 zeta/delta protein (YWHAZ) were used as reference genes for rat PSMCs to obtain a normalization factor calculated by GeNorm software (Biogazelle, Gent, Belgium). For human PSMCs, RPL32, TBP, Ribosomal Protein Large P0 and Ribosomal Protein Large 4 were used as reference genes.

In-vivo study

Inducible SIRT1 inducible knock out (SIRT1 KO) mice were kindly provided by Dr D.A. Sinclair (Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA). 3-month-old female mice (C57BL/6j) carrying both the UBC-Cre-ERT2 and the

SIRT1flox Δ E4/flox Δ E4 alleles) were subjected to an injection of tamoxifene (30 mg/kg) per day for four consecutive days to induce SIRT1 deletion. Wild-type mice were injected with the same concentration of vehicle (peanut oil). After 3 weeks, mice were exposed to chronic hypoxia (10% O₂) in a ventilated chamber (Biospherix, New York, New York, USA). A mixture of room air and nitrogen was flushed in the chamber to maintain the hypoxic environment. Normoxic mice were kept in the same room, with the same light/dark cycle. After 3 weeks of hypoxia exposure, mice were anesthetized with 4%, 3l/min isoflurane. After skin incision of the sternum, direct transthoracic insertion of a thin catheter into the RV was performed, and RV pressure was measured via PowerLab 4/35 software (ADInstruments Ltd, Paris, France). Due to catheter resistance, absolute values recorded could be lower than the real intraventricular pressure; however, this constant depression does not prevent the detection of changes in the intraventricular pressure.

Then the thorax was opened, mice were then euthanized via exsanguination from the aorta and the lungs and heart rapidly removed. The RV was dissected from the left ventricle (LV) and septum (S), and then the samples were weighted for determining the Fulton's index [RV/(LV + S)]. Right lungs were injected with a solution 1:1 of optimal cutting temperature and physiological serum, and then frozen for subsequent immunohistochemical analysis, and left lungs were frozen for Western blotting.

Mitochondrial network analysis

Cells were incubated for 15 min at 37°C with 500 nmol/l MitoTracker Orange (MTO; ThermoFisher) for mitochondrial staining. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at 37°C, auto-fluorescence was quenched via 5-min incubation with 50 mmol/l NH₄Cl and were mounted using Mowiol mounting medium.

Three-dimensional confocal images were acquired collecting a Z-series stack with 63 \times objective by an inverted Laser Scanning Microscope (Zeiss LSM 510; Carl Zeiss, Jena, Germany). MTO was excited by 543-nm helium neon laser. Three-dimensional images were deconvoluted using AutoDeblur AutoVisualize software (MediaCybernetics, Cambridge, UK) to increase confocal system resolution and then analyzed using Imaris software (Bitplane Company, Oxford, UK) to provide information on mitochondrial volume.

Statistical analysis

The data are presented as mean \pm SEM. For cell culture experiments, *n* means number of batches each being derived from one patient/animal.

For Stac-3 and SRT1720 treatment of rat PSMC, differences were determined using one-way analysis of variance followed by Newman–Keuls post-hoc test. For short interference experiments, sirtinol treatment and in-vivo study, differences were evaluated using a two-way analysis of variance followed by Newman–Keuls post-hoc test. Human CTL and PAH PSMCs were compared using Mann–Whitney *U* test.

Differences were considered as significant when *P* value less than 0.05.

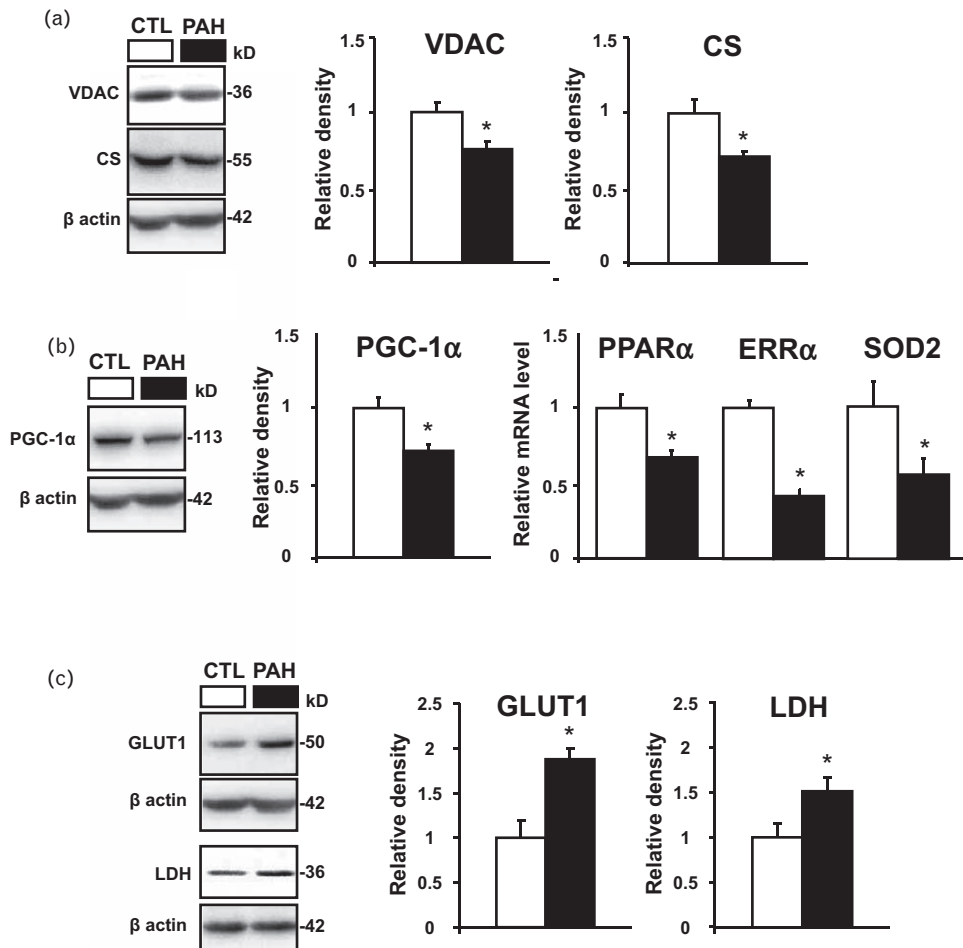


FIGURE 1 Pulmonary artery hypertension pulmonary artery smooth muscle cell metabolic profile is shifted from oxidative phosphorylation toward glycolysis. (a) Protein level of voltage-dependent anion channel and citrate synthase ($n=4$). (b) The expression of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha is reduced in pulmonary artery hypertension pulmonary artery smooth muscle cells, characterized also by a decrease in the mRNA content of peroxisome proliferator-activated receptor α , estrogen-related receptor α , and superoxide dismutase 2 ($n=4$). (c) The expression of glucose transporter 1 and lactate dehydrogenase ($n=4$). * $P < 0.05$ versus control.

RESULTS

Metabolic profile in human pulmonary artery hypertension pulmonary artery smooth muscle cells

In PSMCs from idiopathic PAH patients (PAH PSMCs), mitochondrial mass was decreased compared with control PSMCs (CTL PSMCs) as evidenced by reduced mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC) and citrate synthase protein content (Fig. 1a). Consistently, the protein level of mitochondrial biogenesis master regulator PGC-1 α was reduced in PAH PSMCs, and this was associated with a downregulation of its targets including the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and the estrogen-related receptor α (ERR α) as well as the antioxidant enzyme superoxide dismutase 2 (SOD2) (Fig. 1b). In parallel, the glucose transporter 1 (GLUT1) and lactate dehydrogenase (LDH) protein levels were increased (Fig. 1c). Thus, these results suggest an energy metabolism shift from mitochondrial oxidative phosphorylation toward glycolytic pathway in human PAH.

Acetylation/deacetylation balance in pulmonary artery hypertension pulmonary artery smooth muscle cells and platelet-derived growth factor-treated rat pulmonary artery smooth muscle cells

Deacetylation of PGC-1 α is one of main regulators of its activity, therefore we hypothesized that a downregulation of mitochondrial biogenesis cascade in PAH PSMCs controlled by PGC-1 α could be linked to altered acetylation/deacetylation balance. The deacetylase SIRT1 gene expression (Fig. 2a) and protein content of SIRT1 were unaffected in PAH PSMCs, as well as the protein content of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) (Fig. 2b), an enzyme that produces the SIRT1 cofactor NAD⁺ [25]. However, the balance between the acetylated and total forms of the SIRT1 targets PGC-1 α , and histone H1 (Fig. 2c) was shifted toward higher acetylation in PAH PSMCs. Thus, this shift toward acetylation suggests that the SIRT1 signaling pathway is impaired in PAH PSMCs. Qualitatively similar results were obtained in rat PSMCs, where PDGF-induced proliferation (Fig. 2d) was associated with increased content of the acetylated forms of PGC-1 α and

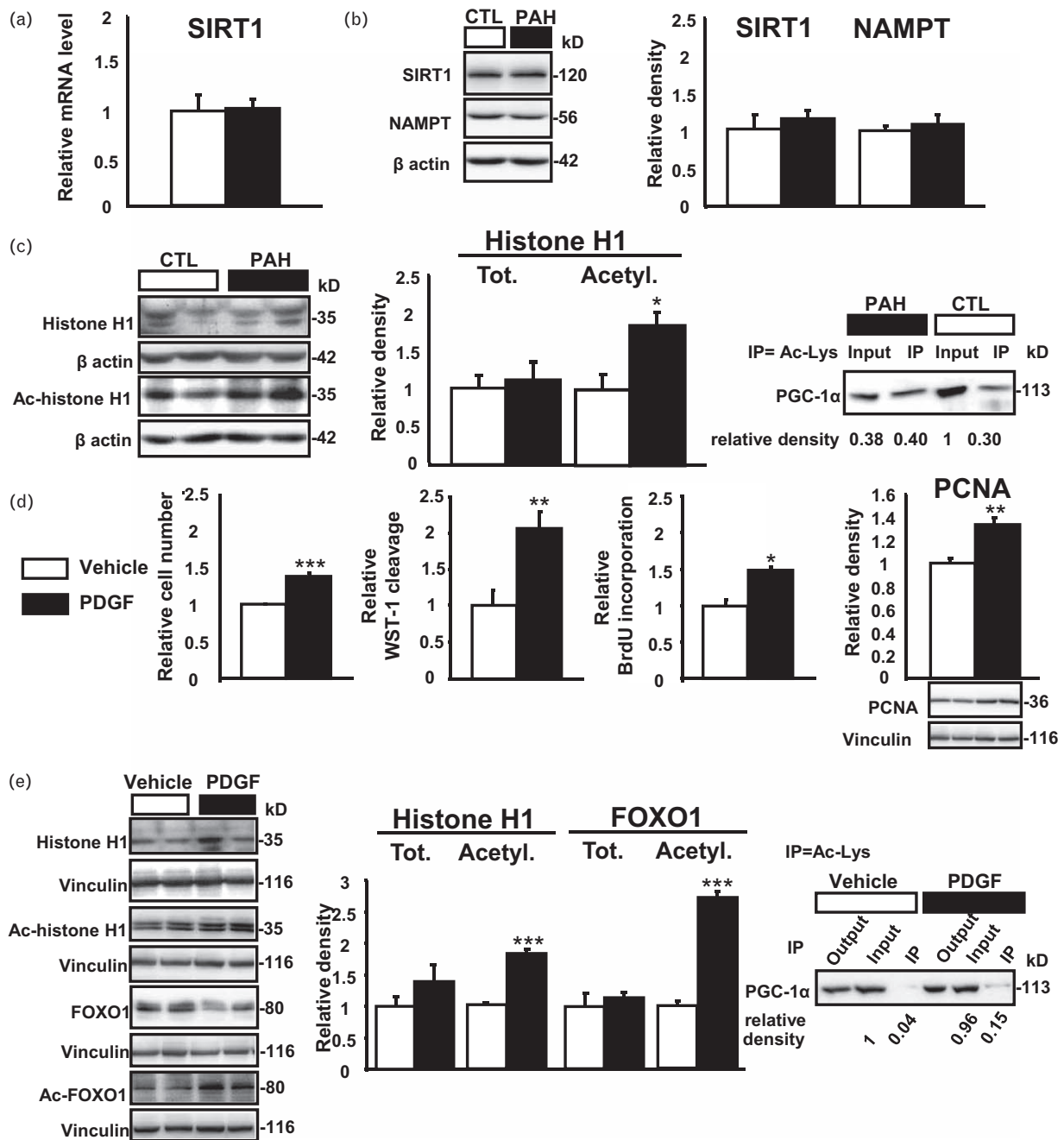


FIGURE 2 Hyperproliferation of pulmonary artery smooth muscle cells is associated with altered acetylation/deacetylation balance. (a) Sirtuin 1 mRNA content ($n=4$). (b) Protein levels of sirtuin 1 and nicotinamide phosphoribosyltransferase ($n=4$). (c) The acetylated form of sirtuin 1 targets histone H1 ($n=4$) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha ($n=3$). (d) 24-h platelet-derived growth factor (10 ng/ml) treatment induces rat pulmonary artery smooth muscle cell proliferation, as evidenced by the increase in cell number, WST-1 cleavage, BrdU incorporation and proliferating cell nuclear antigen protein level ($n=5-6$). (e) In rat pulmonary artery smooth muscle cells, 24-h platelet-derived growth factor (10 ng/ml) treatment induces an increase in the acetylated fractions of sirtuin 1 targets histone H1, Forkhead box protein O1 ($n=4-6$) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha ($n=3$) without affecting total protein expression. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus respective control.

histone H1 as well as that of FOXO1, another SIRT1 target [26] (Fig. 2e).

Effect of sirtuin 1 downregulation or inhibition on human and rat pulmonary artery smooth muscle cell proliferation

Next, we investigated whether altered acetylation/deacetylation balance could play a causative role in PASM

hyperproliferation. We downregulated SIRT1 expression by 85% via siRNA in control human PASM (Fig. 3a). The decline in SIRT1 protein level boosted CTL PASM proliferation, as shown by the 50% increase in the incorporation of the thymidine analog BrdU by replicating cells (Fig. 3a). To confirm this finding, we silenced SIRT1 also in rat PASM. Again, the reduced level of SIRT1 (by almost 70%, Fig. 3b) enhanced PDGF-induced proliferation, as evidenced by the increase in cell number quantified by

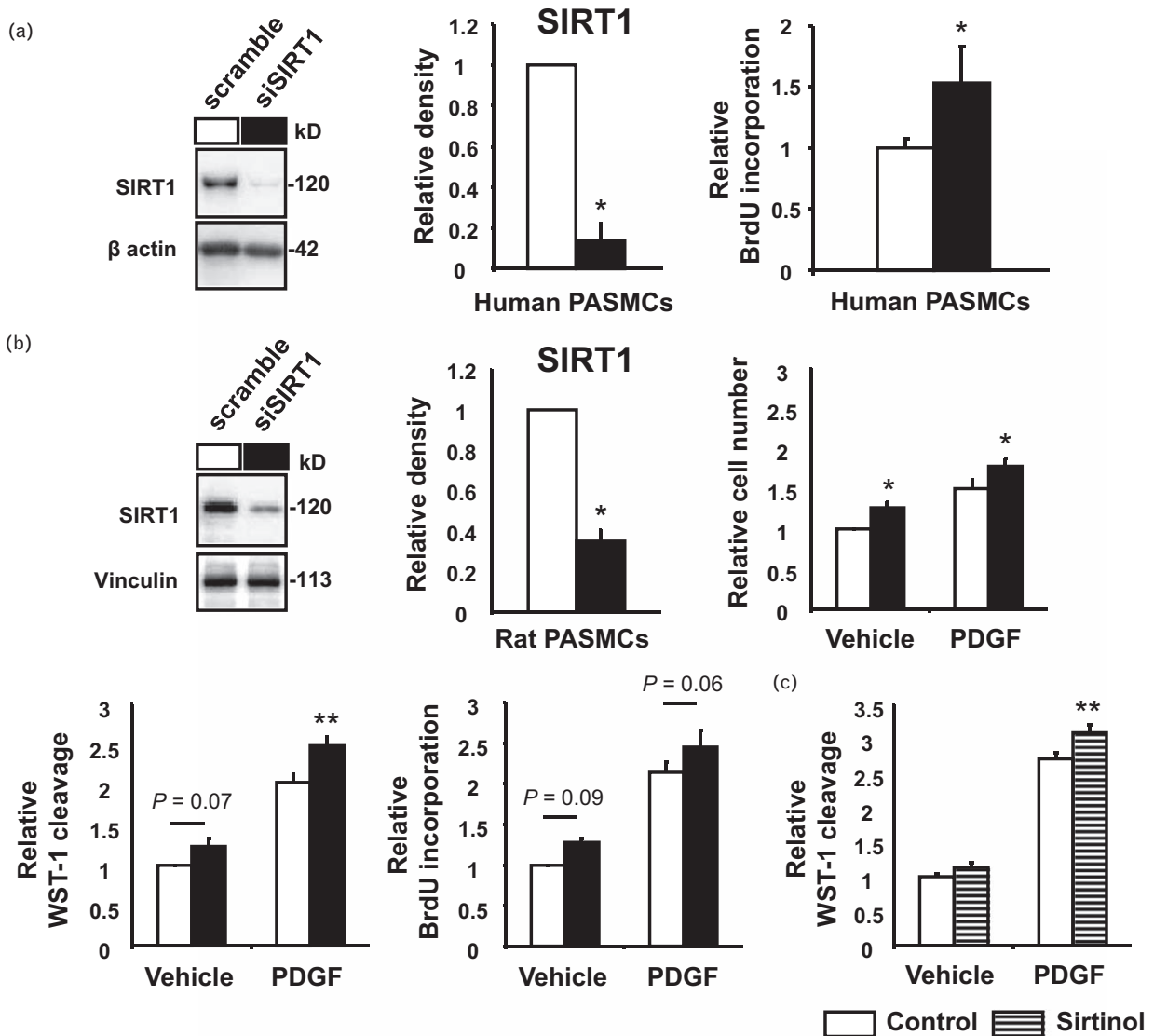


FIGURE 3 Effects of sirtuin 1 downregulation on pulmonary artery smooth muscle cells. (a) Sirtuin 1 silencing by siRNA reduces sirtuin 1 protein level and increases BrdU incorporation in control human pulmonary artery smooth muscle cell ($n=3$). (b) Sirtuin 1 silencing decreases sirtuin 1 level and increases platelet-derived growth factor-induced proliferation in rat pulmonary artery smooth muscle cells, as evidenced by the increase in cell number, WST-1 cleavage and BrdU incorporation ($n=5-6$). (c) Sirtuin 1 pharmacological inhibitor sirtinol ($5 \mu\text{mol/l}$) also facilitates platelet-derived growth factor (10 ng/ml)-induced rat pulmonary artery smooth muscle cell proliferation ($n=7$). * $P < 0.5$, ** $P < 0.01$ versus respective controls.

WST-1 cleavage by viable cells and BrdU incorporation (Fig. 3b). We further corroborated these observations by showing a facilitation of PDGF-induced proliferation also via SIRT1 pharmacological inhibition with sirtinol (Fig. 3c). Thus, these results indicate that SIRT1 downregulation could be a causative factor for PASMC hyperproliferation.

Impact of sirtuin 1 genetic deletion on pulmonary vascular remodeling

We then investigated the potential role of SIRT1 downregulation in vascular remodeling induced by chronic hypoxia exposure known to trigger SMC proliferation. Thus, SIRT1 KO mice and their wild-type littermates were exposed to either chronic hypoxia or normoxia for 3 weeks. As represented in Fig. 4a, the deletion of SIRT1 exon 4, which encodes the catalytic domain, led to the production

of a nonfunctional protein. SIRT1 wild-type protein was significantly reduced in SIRT1 KO lungs both in normoxia and hypoxia, respectively, by 67 and 80%. In control lungs, chronic hypoxia exposure induced a slight increase in PGC-1 α protein level, which was completely absent in SIRT1 KO lungs. Significantly, hypoxia-induced increase of the transcription factor HIF-1 α was less pronounced in SIRT1 KO compared with wild-type mice, whereas GLUT1 induction after chronic hypoxia was higher in SIRT1 deficient mice.

A deeper vascular remodeling, with an increase in α SMA expression (Fig. 4b) and the percentage of completely muscular pulmonary arteries, paralleled by a decrease in the percentage of nonmuscular arteries (Fig. 4c), was observed in mutant lungs. The percentage of partially muscular vessels was also slightly increased in knock out compared with wild-type mice lungs (Fig. 4c). This was associated with an exacerbated increase in the RV pressure

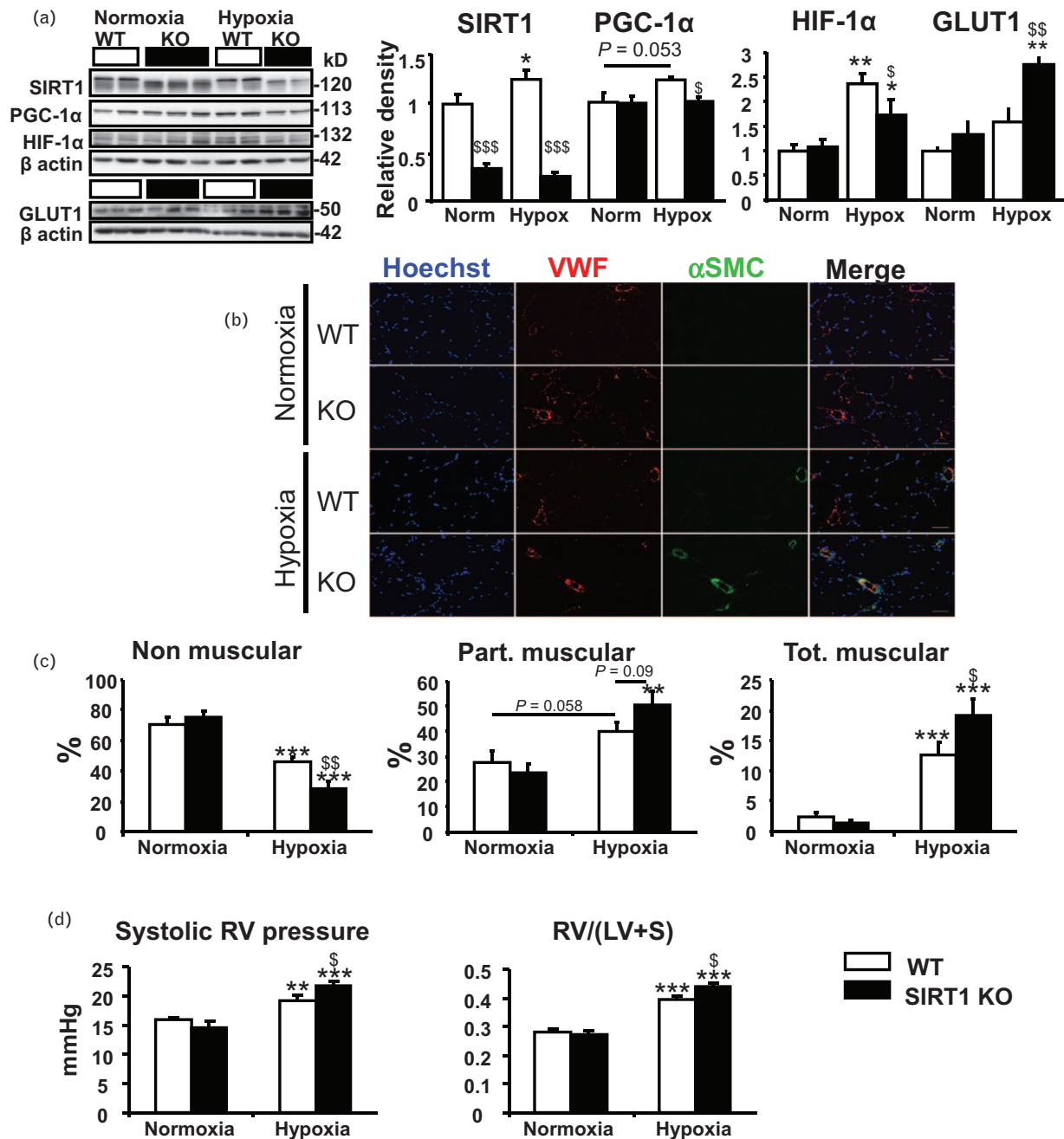


FIGURE 4 Sirtuin 1 downregulation aggravates chronic hypoxia-induced vascular remodeling. (a) Wild-type sirtuin 1 protein in sirtuin 1-induced knock out mice lungs, in normoxic and hypoxic conditions ($n=5-6$). Sirtuin 1 downregulation abolishes hypoxia-induced increase in peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1- α protein content and diminishes the stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α protein while augmenting glucose transporter 1 protein content. ($n=5-6$). (b) Representative images of lung sections prepared from wild-type and sirtuin 1 inducible knock out mice exposed to normoxia and hypoxia. Seven micrometer lung cryosections are labeled with antibodies against von Willebrand endothelial factor (red) and α -smooth muscle actin (green). Nuclei are labeled with Hoechst fluorescent probe (blue). (c) Percentage of nonmuscular vessels, partially muscular and totally muscular ($n=5-6$). (d) Right ventricle pressure ($n=4-5$) and Fulton's index ($n=5-6$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus normoxia; $^{\$}P < 0.05$, $^{\$\$}P < 0.01$ versus wild-type.

and hypertrophy (Fig. 4d). Thus, the inactivation of SIRT1 aggravates vascular and cardiac remodeling *in vivo*.

Inhibition of pulmonary artery smooth muscle cell hyperproliferation via sirtuin 1 pharmacological activation

To test whether correction of the acetylation/deacetylation balance could have beneficial effect on PASM

hyperproliferation, we investigated the effects of the pharmacological activator of SIRT1 Stac-3. As expected, Stac-3 significantly decreased the content of acetylated SIRT1 targets histone H1 and FOXO1 in rat PASMCS as well as PGC-1 α (Fig. 5a). As SIRT1 seemed to be also involved in the expression of NAMPT [27,28], the rate-limiting enzyme in the NAD⁺ biosynthetic pathway, we studied this expression and found that Stac-3 considerable increased NAMPT mRNA level (Supplemental Fig. S2,

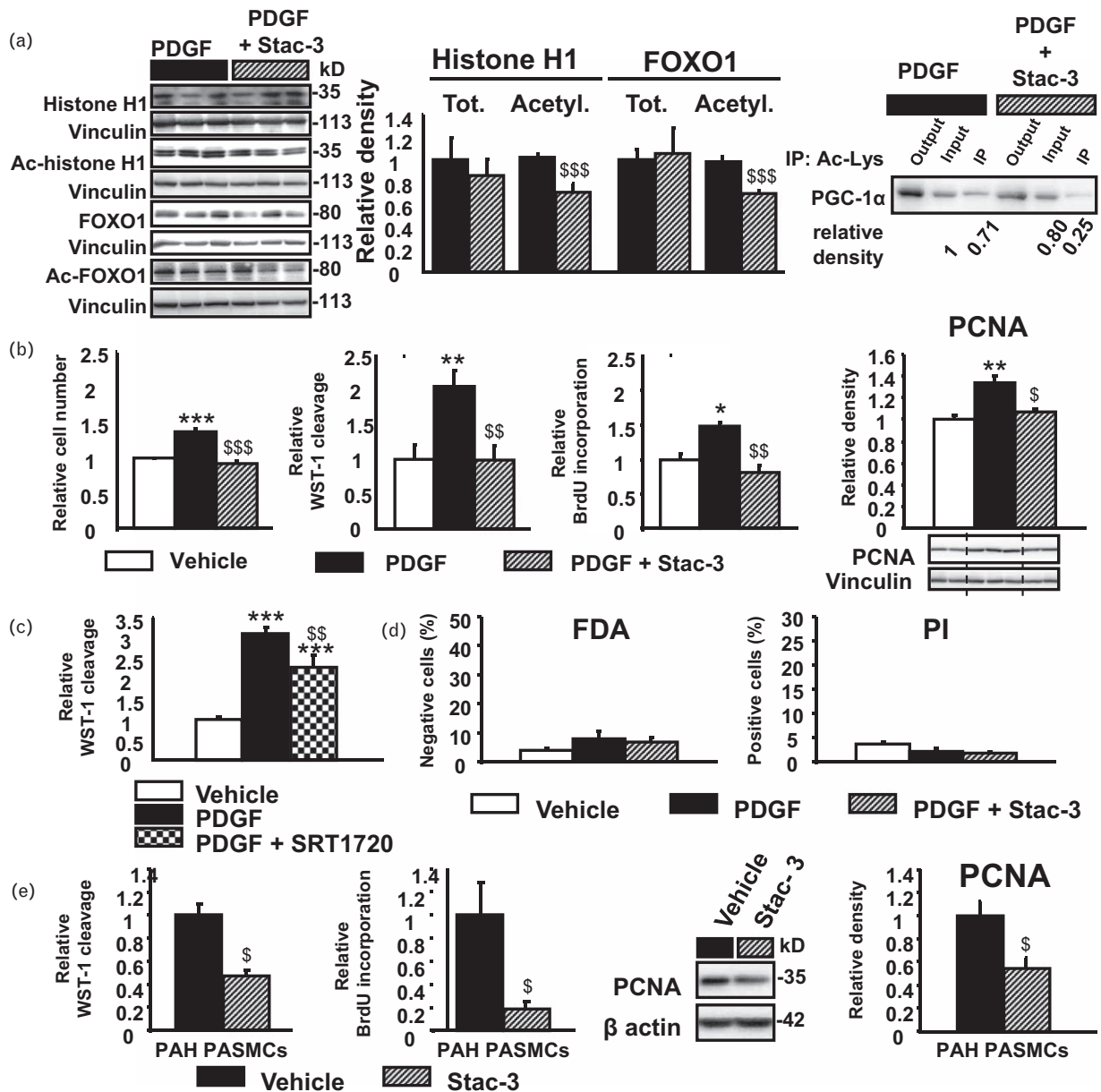


FIGURE 5 Sirtuin 1 activator Stac-3 decreases cell acetylation state and abolishes rat and human pulmonary artery smooth muscle cells hyperproliferation. (a) In rat pulmonary artery smooth muscle cells, Stac-3 (10 μ M) treatment causes a significant reduction of the acetylated levels of sirtuin 1 targets H1, Forkhead box protein O1 ($n=4-6$) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha ($n=3$). Stac-3 also increases nicotinamide phosphoribosyltransferase mRNA content ($n=4$). (b) Stac-3 strongly inhibits platelet-derived growth factor (10 ng/ml)-induced rat pulmonary artery smooth muscle cell proliferation, as indicated by the decrease in cell number, WST-1 cleavage by viable cells, BrdU incorporation by replicating cells and proliferating cell nuclear antigen amount, ($n=4$); (c) Sirtuin 1-specific activator SRT1720 (1 μ M) decreases WST-1 cleavage ($n=6$). (d) Stac-3 does not affect percentage of diacetate negative cells ($n=7$) or percentage of necrotic cells, permeable to the DNA intercalating probe propidium iodide, ($n=4$). (e) In human pulmonary artery hypertension pulmonary artery smooth muscle cells, Stac-3 decreases WST-1 cleavage, BrdU incorporation, as well as proliferating cell nuclear antigen protein level ($n=4$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus control nontreated pulmonary artery smooth muscle cells; $^{\$}P < 0.05$, $^{\$\$}P < 0.01$ versus platelet-derived growth factor-stimulated rat pulmonary artery smooth muscle cells or human pulmonary artery hypertension pulmonary artery smooth muscle cells.

<http://links.lww.com/HJH/A897>), thus favoring the synthesis of the SIRT1 cofactor.

Next, we studied the effect of Stac-3 on PDGF-induced proliferation in rat PASMCS. This treatment completely abolished PDGF proliferative effect (Fig. 5b). Moreover, the protein level of the proliferation marker PCNA was reduced when Stac-3 was added to PDGF-treated PASMCS (Fig. 5b). To further verify this observation, we used another SIRT1 activator, SRT1720. This compound also stunted PASC proliferation but to a lesser extent

(Fig. 5c). Importantly, the antiproliferative effect of Stac-3 was not associated with an increase in cell death. Indeed, Stac-3 increased neither the percentage of cells unable to cleave the viability marker FDA nor the percentage of propidium iodide permeable necrotic cells (Fig. 5d).

Given the inhibitory effect of SIRT1 activation on rat PASC proliferation, we tested Stac-3 in PAH PASMCS. The proliferation of these cells was almost completely abolished, with a decrease by more than 50% of WST-1 cleavage, a reduction of BrdU incorporation by 80% and the

diminution of the protein content of the proliferation marker PCNA by almost 50% (Fig. 5e).

The state of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha downstream cascade and mitochondrial biogenesis upon sirtuin 1 activation

To provide mechanistic insights into the pathways potentially implicated in Stac-3 effect on PASM proliferation, mRNA and protein levels of several actors of mitochondrial bioenergetics were analyzed. Stac-3-mediated SIRT1 activation increased PAH PASM mitochondrial mass, as evidenced by the elevation of VDAC and citrate synthase protein level (Fig. 6a). This augmentation can be explained by activation of mitochondrial biogenesis as Stac-3 increased the expression of PGC-1 α molecular partners PPAR α and ERR α as well as the expression of the antioxidant enzyme SOD2, known to be regulated by PGC-1 α [29] (Fig. 6b). Similar results were obtained in rat PASM, where Stac-3 also promoted mitochondrial biogenesis, as indicated by the increase of VDAC and citrate synthase protein level, as well as of TFAM (Fig. 6c). In rat cells, Stac-3 also activated the expression of PGC-1 α partners [PPAR α , ERR α and nuclear respiratory factor 2 (NRF2)] and the elements of PGC-1 α -triggered cascade (TFAM, antioxidant enzyme glutathione peroxidase 1 and mitochondrial deacetylase sirtuin 3) (Fig. 6d). Therefore, SIRT1 activation is clearly associated with the concerted upregulation of mitochondrial biogenesis pathway.

Effects of sirtuin 1 activation on mitochondrial morphology

As mitochondrial fragmentation can favor the hyperproliferation, we also studied SIRT1 effect on mitochondrial morphology. Stimulation of rat PASM with PDGF for 24 h induced mitochondrial fragmentation, which was abolished by Stac-3 treatment (Fig. 7a and b). SIRT1 activation thus normalizes mitochondrial morphology by inhibiting hyperproliferation-associated excessive fragmentation.

DISCUSSION

The current study has highlighted a potential role of the deacetylase SIRT1, an important modulator of cell metabolism, in PASM hyperproliferation. SIRT1 is a powerful negative regulator of rat and human PASM proliferation and a deficiency in SIRT1 can be a factor favoring vascular remodeling. Conversely, SIRT1 activation could be considered as an effective tool to inhibit PASM proliferation.

PAH PASM exhibited reduced expression of VDAC and citrate synthase, mitochondrial mass markers, confirming the rarefaction of the mitochondrial network observed in patients' cells in an earlier study [3]. This was associated with a negative regulation of mitochondrial biogenesis, as indicated by the decreased protein level of PGC-1 α , also shown by Ryan *et al.* [10], as well as with the reduced expression of its targets, the transcription factors PPAR α and ERR α and the antioxidant enzyme SOD2. The partial loss of mitochondrial mass by PAH PASM was counterbalanced by a considerable increase in GLUT1 expression,

which agrees with the increase in glycolytic flux determined by the uptake of glucose analogue FDG by PAH patients' lungs [30]. The LDH expression was also increased, thus favoring the uncoupling of glycolysis from glucose oxidation. Such a remodeling could contribute to the increased plasma lactate levels found in Chuvash PAH [31], as well as in idiopathic PAH patients [32].

The observed loss of mitochondrial mass in PAH PASM suggests a negative regulation of mitochondrial biogenesis probably at least in part due to downregulation of the PGC-1 α -regulated cascade. Indeed, protein content of this master regulator of mitochondrial biogenesis is lowered. In addition, its activity is known to be modulated by posttranslational modifications, such as the acetylation/deacetylation balance. Regardless of the activity of cell acetyl transferases and deacetylases, the domination of acetylated forms of various cell targets (histone H1, FOXO1, PGC-1 α) in PAH and PDGF-stimulated rat PASM shows a clear shift of the balance toward acetylation. The causal link between weakened deacetylation activity and PASM proliferation has been provided by experiments using SIRT1 silencing or pharmacological inhibition by sirtinol. Indeed, both interventions increased rat and human PASM proliferation, providing the first evidence of pathogenic role of acetylation in PASM hyperproliferation, which could be overcome by SIRT1 activity.

The positive antiproliferative role of SIRT1 was further confirmed in the experiments where SIRT1 deletion in mice significantly aggravated vascular remodeling induced by chronic hypoxia exposure. This effect was accompanied by an increase in RV pressure and hypertrophy. Significantly, SIRT1 deficiency abolished hypoxia-induced increase in PGC-1 α protein level seen in wild-type lungs, and this could attenuate PGC-1 α -controlled pathways including mitochondrial biogenesis. We and other authors [33] have shown that hypoxia increases SIRT1 expression which is able to regulate PGC-1 α transcription [34]. In SIRT1 KO lungs, hypoxia-mediated increase in SIRT1 expression was blocked, and this could abolish the augmentation of PGC-1 α expression. A marked rise in GLUT1 expression in SIRT1 KO lungs argues that under hypoxic conditions, SIRT1 deficiency induces an imbalance in favor of glycolysis at the expense of oxidative phosphorylation.

Recently it has been demonstrated that SIRT1 can maintain mitochondrial biogenesis also via a PGC-1 α -independent pathway [12]. SIRT1 stabilizes the ubiquitin ligase Von Hippel-Lindau, which recognizes HIF-1 α hydroxylated prolines, thus leading to the degradation of this transcription factor. As HIF-1 α inhibits c-Myc, transcription factor activator of TFAM expression, SIRT1-mediated HIF-1 α downregulation positively modulates TFAM and, consequently, mitochondrial gene expression [12]. However, in our experiments, HIF-1 α protein level was unaltered by SIRT1 deficiency under normoxia. In chronic hypoxia, SIRT1 KO lungs show a reduced HIF-1 α response. Therefore, PAH aggravation in SIRT1 KO mice seems to be independent of this transcription factor.

It has been proposed that the stimulation of mitochondrial metabolism could be a promising therapeutic approach to proliferative disorders such as cancer [35]. Reversing the metabolic shift from oxidative metabolism

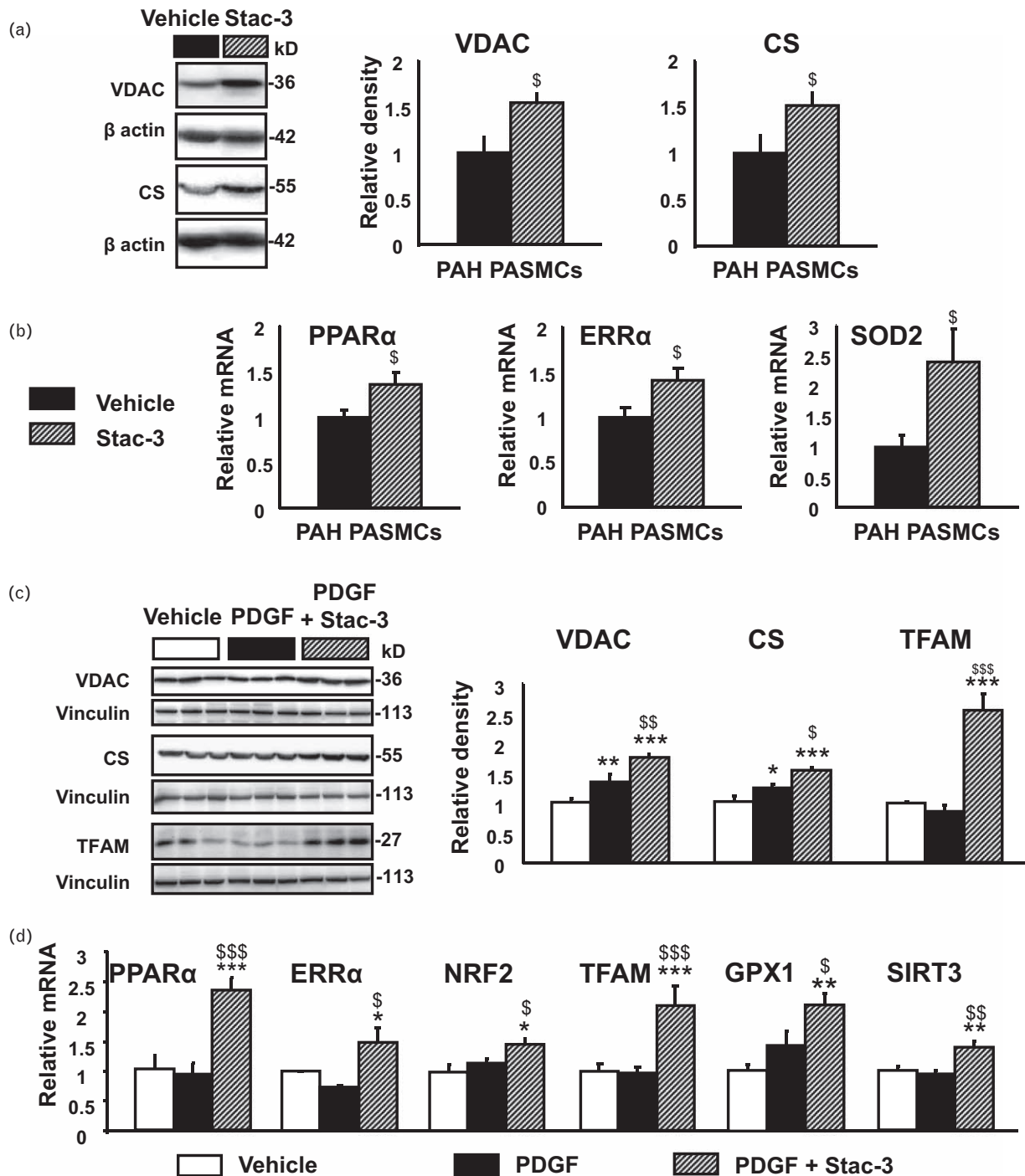


FIGURE 6 Sirtuin 1 activation is associated with a mitochondrial biogenesis enhancement in human and rat pulmonary artery smooth muscle cells. (a) Stac-3 (10 μ mol/l) induces an increase in the protein level of voltage-dependent anion channel and citrate synthase in pulmonary artery hypertension pulmonary artery smooth muscle cells ($n=3$). (b) Stac-3 increases expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha molecular partners peroxisome proliferator-activated receptor α and estrogen-related receptor α as well as expression of an antioxidant enzyme, superoxide dismutase 2, ($n=4$). (c) In rat pulmonary artery smooth muscle cells, Stac-3 increases voltage-dependent anion channel, citrate synthase, and mitochondrial transcription factor A protein level; ($n=4-7$). (d) Stac-3 activates expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha partners (peroxisome proliferator-activated receptor α , estrogen-related receptor α and NRF2) and of elements of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha -triggered cascade (mitochondrial transcription factor A, the antioxidant enzyme glutathion peroxidase 1 and sirtuin3) ($n=4$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus control nontreated pulmonary artery smooth muscle cells; $^{\$}P < 0.05$, $^{\$\$}P < 0.01$ versus platelet-derived growth factor-stimulated rat pulmonary artery smooth muscle cells or human pulmonary artery hypertension pulmonary artery smooth muscle cells.

to glycolysis has proved to be efficient to treat PAH in animal models and is currently the subject of clinical trials [5]. Here, we show that the pharmacological activation of SIRT1 by Stac-3 leads to a strong inhibition of PAH PSMCs

proliferation without effect on cell viability. An increase in the expression of transcription factors involved in mitochondrial biogenesis was observed, with a subsequent increase in mitochondrial mass. These effects of Stac-3

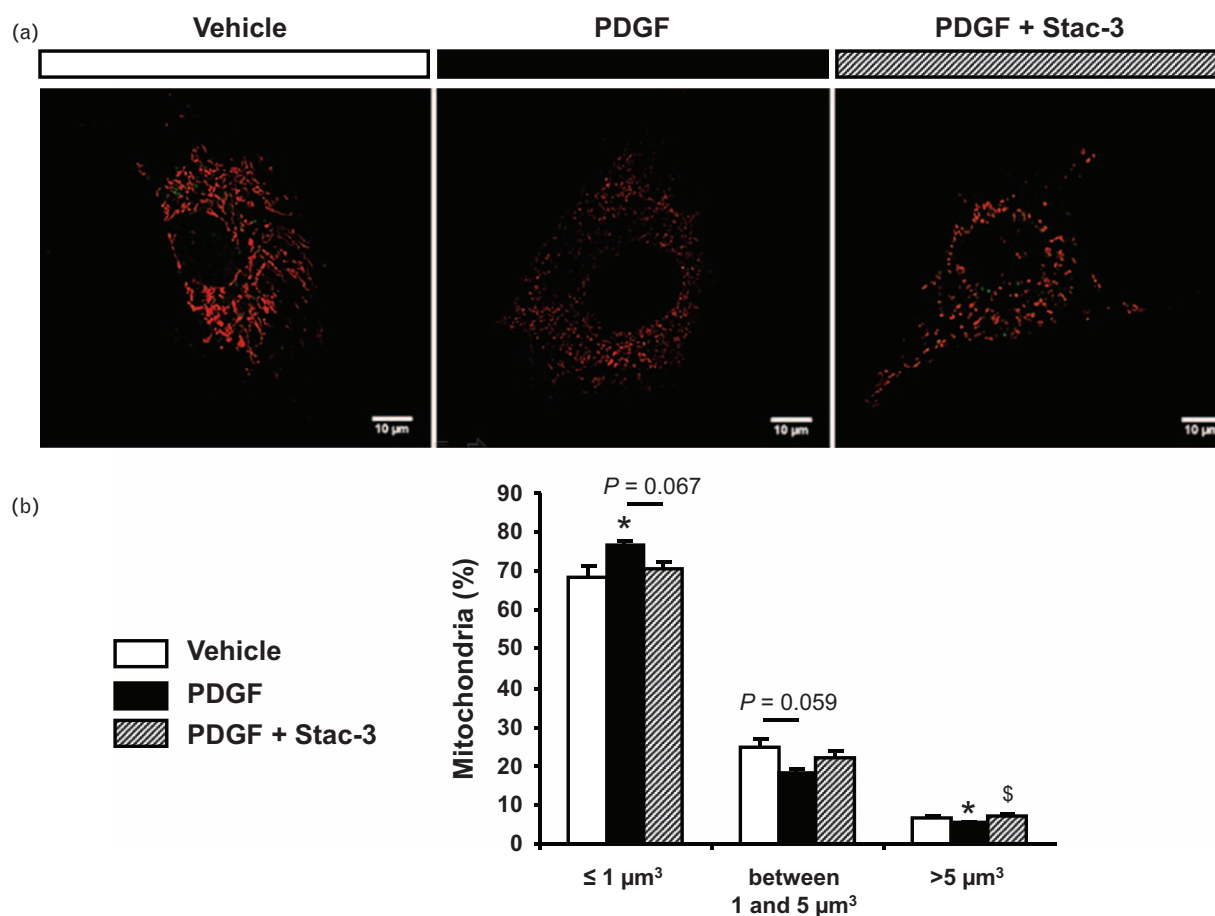


FIGURE 7 Sirtuin 1 activation inhibits platelet-derived growth factor-induced mitochondrial fragmentation. (a) Representative confocal images of rat pulmonary artery smooth muscle cell mitochondrial network, labeled with MitoTracker Orange. (b) Percentage of small, medium-sized and highly connected mitochondria. Data are represented as means \pm standard errors of four independent experiments. For each experience, at least 10 cells per condition are analyzed. * $P < 0.05$ versus control nontreated pulmonary artery smooth muscle cells; \$ $P < 0.05$ versus platelet-derived growth factor-stimulated rat pulmonary artery smooth muscle cells.

seem to be a consequence of direct SIRT1 activation because Stac-3 has no effect on mitochondrial mass in cells reconstituted with activation-defective SIRT1 [36]. More detailed investigation carried out on rat PASMCs has shown that Stac-3 increases the expression of different factors maintaining mitochondrial biogenesis (PPAR α , ERR α , NRF2, TFAM). Moreover, SIRT1 activation prevents PDGF-induced mitochondrial fragmentation. Significantly, a recent study has demonstrated that mitochondrial fission is essential for PAH PASMC proliferation; its inhibition causes cell cycle arrest and ameliorates PAH experimental models [9]. In parallel, mitofusin 2, a protein involved in mitochondrial fusion, is downregulated in PAH PASMCs, and the restoration of its expression inhibits PAH PASMC hyperproliferation [10]. Thus, prevention of proliferation-induced mitochondrial fission by Stac-3 could also contribute to inhibition of PASMC proliferation. Finally, Stac-3 treatment leads to the increase of SOD2 expression, whose downregulation has been shown to contribute to PAH PASMC hyperproliferation. Indeed, SOD2 promoter and enhancer were found to be hypermethylated leading to a decrease in its expression [37]. This in turn led to a decrease in H₂O₂ production, thus allowing HIF-1 α stabilization and Kv potassium channel inhibition, both proproliferative events [37]. The decrease in SOD2 expression could thus

be due to a combination of epigenetic inhibition and downregulation of the coactivator controlling its transcription. Therefore, its induction upon SIRT1 activation could be partly responsible for Stac-3 antiproliferative effects.

Such a concerted upregulation of various factors controlled by PGC-1 α supports the hypothesis that the metabolic remodeling associated with the hyperproliferation inhibition induced by Stac-3 involves PGC-1 α activation via deacetylation. SIRT1-mediated deacetylation of other targets may also play a role. Indeed, SIRT1 catalyses the deacetylation of FOXO1 thus potentiating its transcriptional activity [38]. Yet, PASMC FOXO1 is a critical integrator of multiple signaling pathways driving PAH, and reconstitution of FOXO1 activity is able to restore the physiologically quiescent PASMC phenotype [4]. Regardless of the relative contribution of PGC-1 α or FOXO1 deacetylation to the inhibition of PASMC hyperproliferation, the activation of SIRT1 leads to the same endpoint.

In summary, our results demonstrate the causative link between imbalance of the acetylated/deacetylated state in PASMC associated with weakening of the oxidative phosphorylation machinery and PASMC hyperproliferation, a PAH hallmark (Fig. 8). The data obtained suggest that such imbalance modulates functional activities of various proteins like FOXO1, histone H1 or PGC-1 α , known to be regulators

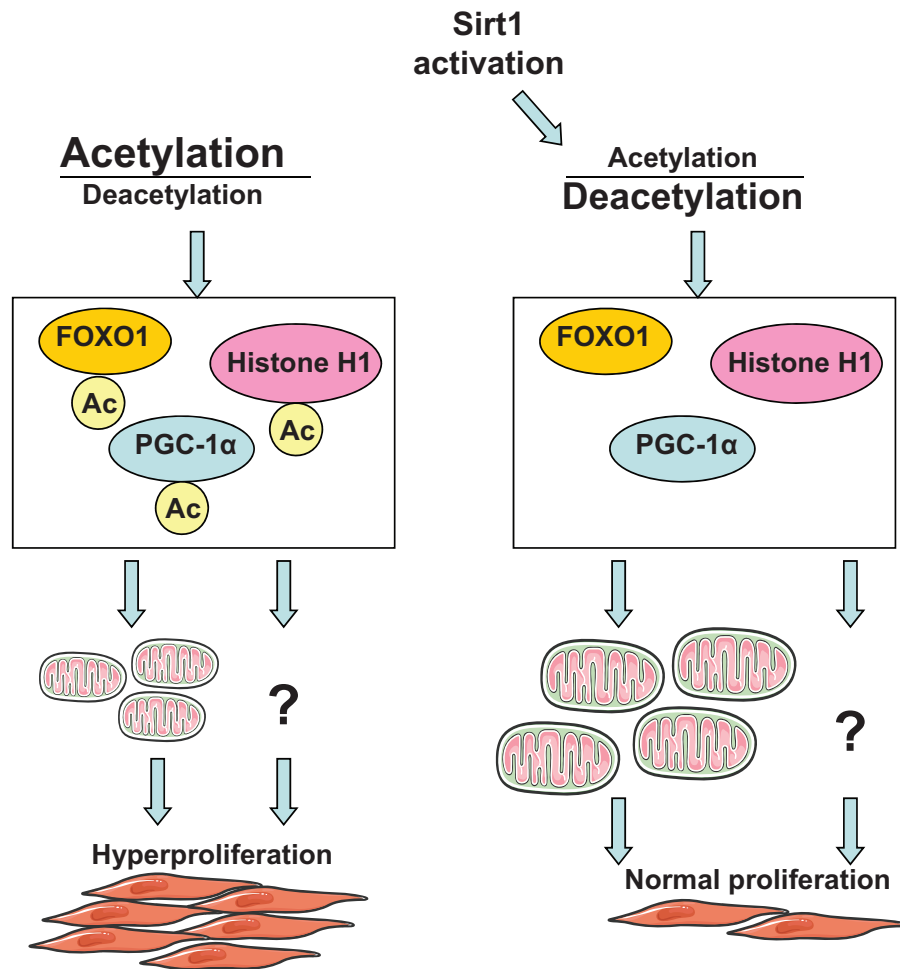


FIGURE 8 Schematic of the potential role of acetylation/deacetylation balance in the pathogenesis of pulmonary artery hypertension (see DISCUSSION section).

of cell energy metabolism. As a consequence, mitochondrial mass of PASMC is reduced, and metabolic profile is shifted from oxidative toward glycolytic mode. In addition, the hyperproliferation is associated with augmented mitochondrial fragmentation. At the same time, it cannot be excluded that other unidentified pathways also mediate the link between acetylation/deacetylation cell status and PASMC hyperproliferation. Activation of the deacetylase SIRT1 restores mitochondrial biogenesis as well as mitochondrial morphology and normalizes the PASMC phenotype. Thus, targeting SIRT1 activity is potentially a novel therapy to inhibit PASMC proliferation and thus, delay the progression of PAH. Such a new strategy for PAH treatment, which reinforces cell oxidative capacities via correction of the acetylation/deacetylation balance may also be beneficial for the failing RV overloaded in PAH. Given that SIRT1 upregulation seems to be also beneficial for the systemic arteries and for the heart (refer to [39,40] and references therein), effects of specific SIRT1 activation on the entire cardiovascular system should also be evaluated.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr V. Nicolas (Imaging facility of IFR141), Dr V. Domergue (Animal facility of IFR141) and Dr C. Deloménie

(Transcriptomic platform of IFR141) for technical help. The authors would also like to thank Dr R. Fischmeister, Dr A.-M. Gomez, Dr S. Cohen-Kaminsky for continuous support and A. Truong for his kind proofreading.

The current article, or part of it, never has been published.

The current work was supported by INSERM (Institut national de la santé et de la recherche médicale, France) as well as by grants from Laboratory of Excellence LERMIT, FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) to AG (#DPM20121125546) and Région Ile de France CODDIM to RVC (#cod110153).

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Humbert M, Lau EMT, Montani D, Jaïs X, Sitbon O, Simonneau G. Advances in therapeutic interventions for patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2014; 130:2189–2208.
- Paulin R, Michelakis ED. The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 2014; 115:148–164.
- Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thébaud B, Bonnet S, et al. An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2006; 113:2630–2641.

4. Savai R, Al-Tamari HM, Sedding D, Kojonazarov B, Muecke C, Teske R, *et al.* Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension. *Nat Med* 2014; 20:1289–1300.
5. Ryan JJ, Archer SL. Emerging concepts in the molecular basis of pulmonary arterial hypertension Part I: Metabolic plasticity and mitochondrial dynamics in the pulmonary circulation and right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2015; 131:1691–1702.
6. McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JRB, Haromy A, Hashimoto K, *et al.* Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res* 2004; 95:830–840.
7. Michelakis ED, McMurtry MS, Wu X-C, Dyck JRB, Moudgil R, Hopkins TA, *et al.* Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation* 2002; 105:244–250.
8. Sutendra G, Bonnet S, Rochefort G, Haromy A, Folmes KD, Lopuschuk GD, *et al.* Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodeling of pulmonary hypertension. *Sci Transl Med* 2010; 2:44ra58–144ra.
9. Marsboom G, Toth PT, Ryan JJ, Hong Z, Wu X, Fang Y-H, *et al.* Dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial mitotic fission permits hyperproliferation of vascular smooth muscle cells and offers a novel therapeutic target in pulmonary hypertension. *Circ Res* 2012; 110:1484–1497.
10. Ryan JJ, Marsboom G, Fang Y-H, Toth PT, Morrow E, Luo N, *et al.* PGC1 α -mediated mitofusin-2 deficiency in female rats and humans with pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187:865–878.
11. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13:225–238.
12. Gomes AP, Price NL, Ling AJY, Moslehi JJ, Montgomery MK, Rajman L, *et al.* Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell* 2013; 155:1624–1638.
13. Mouchiroud L, Houtkooper RH, Moullan N, Katsyuba E, Ryu D, Cantó C, *et al.* The NAD+/sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling. *Cell* 2013; 154:430–441.
14. Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB, *et al.* SIRT3 regulates fatty acid oxidation via reversible enzyme deacetylation. *Nature* 2010; 464:121–125.
15. Ahn B-H, Kim H-S, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, *et al.* A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:14447–14452.
16. Cimen H, Han M-J, Yang Y, Tong Q, Koc H, Koc EC. Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry* 2010; 49:304–311.
17. Paulin R, Dromparis P, Sutendra G, Gurtu V, Zervopoulos S, Bowers L, *et al.* Sirtuin 3 deficiency is associated with inhibited mitochondrial function and pulmonary arterial hypertension in rodents and humans. *Cell Metab* 2014; 20:827–839.
18. Paffett ML, Lucas SN, Campen MJ. Resveratrol reverses monocrotaline-induced pulmonary vascular and cardiac dysfunction: a potential role for atrogen-1 in smooth muscle. *Vascul Pharmacol* 2012; 56:64–73.
19. Csiszar A, Labinskyy N, Olson S, Pinto JT, Gupte S, Wu JM, *et al.* Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hypertension* 2009; 54:668–675.
20. Chen B, Xue J, Meng X, Slutzky JL, Calvert AE, Chicoine LG. Resveratrol prevents hypoxia-induced arginase II expression and proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells via Akt-dependent signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 307:L317–L325.
21. Yang D-L, Zhang H-G, Xu Y-L, Gao Y-H, Yang X-J, Hao X-Q, *et al.* Resveratrol inhibits right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; 37:150–155.
22. Ding M, Lei J, Qu Y, Zhang H, Xin W, Ma F, *et al.* Calorie restriction attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015; 65:562–570.
23. Bitterman JL, Chung JH. Metabolic effects of resveratrol: addressing the controversies. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72:1473–1488.
24. Testa G, Biasi F, Poli G, Chiarpotto E. Calorie restriction and dietary restriction mimetics: a strategy for improving healthy aging and longevity. *Curr Pharm Des* 2014; 20:2950–2977.
25. Revollo JR, Grimm AA, Imai S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 2004; 279:50754–50763.
26. Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, *et al.* Mammalian SIRT1 represses Forkhead transcription factors. *Cell* 2004; 116:551–563.
27. Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P. Circadian control of the NAD+ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* 2009; 324:654–657.
28. Bellet MM, Nakahata Y, Boudjelal M, Watts E, Mossakowska DE, Edwards KA, *et al.* Pharmacological modulation of circadian rhythms by synthetic activators of the deacetylase SIRT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:3333–3338.
29. Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2005; 66:562–573.
30. Zhao L, Ashek A, Wang L, Fang W, Dabral S, Dubois O, *et al.* Heterogeneity in lung (18)FDG uptake in pulmonary arterial hypertension: potential of dynamic (18)FDG positron emission tomography with kinetic analysis as a bridging biomarker for pulmonary vascular remodeling targeted treatments. *Circulation* 2013; 128:1214–1224.
31. Formenti F, Constantin-Teodosiu D, Emmanuel Y, Cheeseman J, Dorrington KL, Edwards LM, *et al.* Regulation of human metabolism by hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:12722–12727.
32. Hu E-C, He J-G, Liu Z-H, Ni X-H, Zheng Y-G, Gu Q, *et al.* High levels of serum lactate dehydrogenase correlate with the severity and mortality of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Exp Ther Med* 2015; 9:2109–2113.
33. Chen R, Dioum EM, Hogg RT, Gerard RD, Garcia JA. Hypoxia increases sirtuin 1 expression in a hypoxia-inducible factor-dependent manner. *J Biol Chem* 2011; 286:13869–13878.
34. Amat R, Planavila A, Chen SL, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. SIRT1 controls the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1 α (PGC-1 α) gene in skeletal muscle through the PGC-1 α autoregulatory loop and interaction with MyoD. *J Biol Chem* 2009; 284:21872–21880.
35. Galluzzi L, Kepp O, Vander Heiden MG, Kroemer G. Metabolic targets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12:829–846.
36. Hubbard BP, Gomes AP, Dai H, Li J, Case AW, Considine T, *et al.* Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science* 2013; 339:1216–1219.
37. Archer SL, Marsboom G, Kim GH, Zhang HJ, Toth PT, Svensson EC, *et al.* Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation* 2010; 121:2661–2671.
38. Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Aratani S, Ohshima T, Miyagishi M, *et al.* Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:10042–10047.
39. Tanno M, Kuno A, Horio Y, Miura T. Emerging beneficial roles of sirtuins in heart failure. *Basic Res Cardiol* 2012; 107:273.
40. Liao Y-C, Wang Y-S, Guo Y-C, Lin W-L, Chang M-H, Juo S-HH. Let-7g improves multiple endothelial functions through targeting transforming growth factor-beta and SIRT-1 signaling. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63:1685–1694.

Titre : Rôle de la sirtuine 1 dans la modulation des réponses apoptotique et autophagique du cœur au stress du réticulum endoplasmique

Mots clés : SIRT1, stress RE, autophagie, apoptose, réponse UPR, cœur

Résumé : Le réticulum endoplasmique rugueux (RE), assure la synthèse, le repliement et la maturation des protéines de la voie de sécrétion. Les altérations des fonctions physiologiques du RE, entraînent l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE, une condition appelée stress RE. En réponse au stress RE, un mécanisme compensatoire adaptatif appelé Unfolded Protein Response (UPR) est activé afin de restaurer l'homéostasie du RE et de permettre la survie de la cellule. Dans le cas d'un stress RE sévère ou prolongé, les altérations ne pouvant plus être compensées, la cellule est éliminée par apoptose contribuant ainsi au développement de pathologies cardiaques. Le but des recherches actuelles sur le stress RE en physiopathologie cardiaque n'est pas d'inhiber la réponse au stress RE, mais plutôt de la moduler afin de limiter l'apoptose des cardiomyocytes et de protéger le cœur.

Dans ce contexte, nous avons mis en évidence que le stress RE induit une modification importante de l'architecture des cardiomyocytes associée à une altération de la fonction mitochondriale. De plus, nous avons montré que SIRT1, une désacétylase dépendante du NAD⁺, inhibe l'apoptose mitochondriale induite par un stress RE en limitant spécifiquement l'activation de la voie PERK de la réponse UPR via la désacétylation du facteur eIF2 α sur la lysine K143. Enfin, nos résultats indiquent que SIRT1 protège les cardiomyocytes de l'apoptose induite par le stress RE en favorisant la mitophagie, via une activation de la voie de signalisation eEF2K/eEF2. Ces résultats montrent que SIRT1 est impliquée dans la régulation de la réponse autophagique et apoptotique des cardiomyocytes au stress RE et suggèrent que cette désacétylase serait une cible thérapeutique intéressante pour limiter le développement des pathologies cardiaques liées au stress RE.

Title : Role of Sirtuin 1 in the modulation of ER stress-induced apoptosis and autophagy in heart

Keywords : SIRT1, ER stress, autophagy, apoptosis, UPR, heart

Abstract: The endoplasmic reticulum (ER) functions to properly synthesize, fold and process secreted and transmembrane proteins. Impairment of ER function induces an accumulation of misfolded proteins in the ER lumen, a condition termed ER stress. In response to ER stress, an adaptive compensatory mechanism called Unfolded Protein Response (UPR) is activated to restore ER homeostasis and promote cell survival. In the case of severe or prolonged ER stress, homeostasis cannot be restored and the cell is eliminated by apoptosis contributing to the development of cardiac pathologies. Currently, cardiac therapy based on ER stress modulation to conserve beneficial adaptations and to avoid cardiomyocyte apoptosis is viewed as a promising avenue towards effective therapies of ER stress-associated cardiac diseases.

In this context, we demonstrated that ER stress induces architectural modifications and alterations of the mitochondrial function in cardiomyocytes. Furthermore, we showed that SIRT1, a NAD⁺-dependent deacetylase, inhibits mitochondrial apoptosis by modulating the activation of the PERK pathway of the UPR through deacetylation of the translation initiation factor eIF2 α on lysine K143. Our results also indicate that SIRT1 protects cardiomyocyte from ER stress-induced apoptosis by activating mitophagy through eEF2K/eEF2 pathway. Collectively, these data demonstrate that SIRT1 regulates ER stress-induced autophagy and apoptosis in the heart and suggest that this deacetylase may be a therapeutic target to protect the heart against ER stress-induced injury.

