

Régulation du métabolisme énergétique cardiaque par l'AMP kinase: Implication dans l'insuffisance cardiaque et effet du sexe biologique

Lucile Grimbert

▶ To cite this version:

Lucile Grimbert. Régulation du métabolisme énergétique cardiaque par l'AMP kinase : Implication dans l'insuffisance cardiaque et effet du sexe biologique. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS430 . tel-02452720

HAL Id: tel-02452720 https://theses.hal.science/tel-02452720

Submitted on 23 Jan 2020 $\,$

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.

UNIVERSITE PARIS-SACLAY

Régulation du métabolisme énergétique cardiaque par l'AMP kinase : Implication dans l'insuffisance cardiaque et effet du sexe biologique

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

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique du fondamental à l'appliqué (ITFA) Spécialité de doctorat : physiologie, physiopathologie

Thèse présentée et soutenue à Chatenay-Malabry, le 8 Novembre 2019, par

Lucile Grimbert

Composition du Jury :

Imad Kansau Professeur des Universités, Université Paris-Sud (EA 4043)	Président
Catherine Vergely Professeur des Universités, Université de Bourgogne (EA 7460)	Rapporteur
Uwe Schlattner Directeur de recherche, Université Grenoble Alpes (U 1055)	Rapporteur
Monique Bernard Directrice de recherche, Université Aix-Marseille (UMR 7339)	Examinateur
Jean-Francois Arnal Professeur des Universités, Université de Toulouse (UMR 1048)	Examinateur
Anne Garnier Professeur des Universités, Université Paris-Sud (UMR 1180)	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je te tiens tout d'abord à remercier les membres du jury ; je remercie Imad Kansau d'avoir accepté de présider ce jury. Je remercie également Catherine Vergely, et Uwe Schlattner, rapporteurs de ma thèse et Monique Bernard et Jean-François Arnal, examinateurs de mon travail. Je vous remercie d'avoir pris le temps d'évaluer mon étude.

Je remercie Rodolphe Fischmeister de m'avoir accueillie au sein de l'U769, puis Ana-Maria Gomez, actuelle directrice de l'unité (maintenant U1180), merci à vous deux pour la bonne ambiance et la qualité de travail qui réside au sein de cette unité. Je pense que c'est un environnement idéal pour commencer dans la recherche.

Je remercie sincèrement Anne Garnier, ma directrice de thèse, pour ces 4 années. Je te remercie pour ta disponibilité, tes conseils et ta bienveillance. Cette expérience de thèse a été extrêmement enrichissante et ça a été un réel de plaisir de travailler avec toi.

Un grand merci à Renée Ventura-Clapier, tant pour la relecture de mon manuscrit de thèse que pour tes précieux conseils. Merci pour ta disponibilité et ta générosité. Je remercie également Jérôme Piquereau, pour ton aide pour l'écriture de l'article ainsi que pour la relecture de mon travail. Merci également de m'avoir initiée à la respiration mitochondriale et de m'avoir appris la dissection des fibres. Merci aussi pour tes précieux conseils.

Un énorme merci à Mélanie Gressette, pour m'avoir appris les techniques de biochimie et de biologie moléculaire. Merci pour ton aide précieuse durant ces 4 années et merci également pour ta sympathie.

Je remercie Marilyne Moulin pour m'avoir appris l'extraction de phospholipides et de m'avoir initiée au monde des cardiolipides.

Durant ma thèse j'ai pu bénéficier des différentes plateformes techniques au sein de la faculté, qui ont contribué à mener mes travaux de thèse. Je remercie tout d'abord Pauline Robert, Valérie Domergue et le reste du personnel de l'animalerie. Votre aide au quotidien a été très précieuse. Je remercie Audrey Solgadi, de m'avoir aidée à l'analyse des phospholipides sur mes échantillons et de m'avoir formée à la

spectrométrie de masse. Merci également à Claudine Deloménie pour tes conseils sur la PCR quantitative.

Je remercie aussi Eric Jacquet et Naïma Nhiri de la plateforme de l'ICSN, pour m'avoir aidée à l'analyse de mes échantillons en TLDA.

Je remercie Susana Gomez d'avoir fait les échocardiographies de mes souris ainsi que pour m'avoir appris à faire les ovariectomies.

Je remercie aussi Florence Lefebvre pour m'avoir appris à implanter les mini-pompes sur mes souris.

Un grand merci aussi à Volodia, Mathias et Christophe pour leurs précieux conseils tout au long de ma thèse.

Je remercie Nieves pour m'avoir aidée au début de mon stage de master et de m'avoir appris à manipuler le souris, faire les génotypages et pleins d'autres choses.

Un merci tout particulier à mes collègues de bureau Julie, Maxance et Kevin pour avoir égayé mes journées, l'expérience de la thèse aurait été très différente sans vous. Merci à mes collègues Ahmet, Anissa et Selma, récemment arrivés dans le bureau pour votre bonne humeur. Merci également aux étudiants du 5^{ème} étage pour la bonne ambiance que vous faites régner au labo.

Je remercie aussi Delphine pour ses conseils et son soutien durant les moments difficiles de la fin de thèse.

Un énorme merci à ma famille, mes parents et mon frère, qui m'ont toujours soutenue dans mes projets. Merci d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir toujours encouragée. Et enfin un grand merci à Alex pour avoir été à mes côtes durant la fin de cette thèse, pour m'avoir soutenue dans les moments difficiles et pour m'avoir incitée à donner le meilleur de moi-même.

Table des matières

Abrévi	iations	12
Table	des illustrations	20
AVAN	T-PROPOS	23
СНАР	ITRE I : METABOLISME ENERGETIQUE DU CŒUR NORMAL	27
I.	Utilisation des substrats	28
A.	Glycolyse	29
В.	Beta-oxydation des Acides Gras (AG)	
II.	Production d'énergie	36
A.	Cycle de Krebs	
В.	Phosphorylation oxydative	
III.	Mitochondries	
A.	Caractéristiques des mitochondries	
	1. Généralités	
	2. Biogenèse mitochondriale	41
	a. Expression et import des protéines mitochondriales	41
	b. Synthèse des cardiolipides	42
	c. Dynamique mitochondriale	43
	3. Contrôle transcriptionnel de la biogenèse mitochondriale	44
	a. Régulation de l'expression du génome mitochondrial	44
	b. Contrôle transcriptionnel nucléaire	45
	4. Régulation de la biogenèse mitochondriale	47
В.	Rôles de la mitochondrie	
IV.	Les systèmes de transfert d'énergie	51
V.	Régulation du métabolisme énergétique	53
CHAP	ITRE II : REMODELAGE DU CŒUR DANS L'INSUFFISANCE CARDIAQUE	55
I.	Insuffisance cardiaque	55
II.	Remodelage cardiaque	57
A.	Remodelage cellulaire	

В		Fibrose	58
	1.	TGF-β	59
	2.	Le CTGF	60
	3.	Dégradation	60
	4.	Les miRNAs	61
С	;.	Homéostasie Calcique	63
D).	Stress oxydant	64
E		Inflammation	64
F		Angiogenèse	65
III.	R	emodelage métabolique	65
А		Utilisation des substrats	66
В		Fonction et capacité mitochondriale	67
С	;.	Transferts d'énergie	68
D).	Biogenèse mitochondriale	68
E		Rôle des cardiolipides	69
			70
IV. CHAP	PITF	Atteintes périphériques RE III : DIMORPHISME SEXUEL DE LA PHYSIOPATHOLOGIE CARDIOVAS	CULAIRE 71
IV. CHAP I.	PITF D	Atteintes périphériques RE III : DIMORPHISME SEXUEL DE LA PHYSIOPATHOLOGIE CARDIOVAS imorphisme sexuel des pathologies cardiovasculaires	CULAIRE 71
IV. CHAP I. II.	D D M	Atteintes périphériques RE III : DIMORPHISME SEXUEL DE LA PHYSIOPATHOLOGIE CARDIOVAS imorphisme sexuel des pathologies cardiovasculaires écanismes des différences sexuelles	CULAIRE 71
IV. CHAP I. II. A	Di Di M	Atteintes périphériques RE III : DIMORPHISME SEXUEL DE LA PHYSIOPATHOLOGIE CARDIOVAS imorphisme sexuel des pathologies cardiovasculaires écanismes des différences sexuelles Mécanismes génétiques	CULAIRE 71
IV. CHAP I. II.	D D M	Atteintes périphériques RE III : DIMORPHISME SEXUEL DE LA PHYSIOPATHOLOGIE CARDIOVAS imorphisme sexuel des pathologies cardiovasculaires écanismes des différences sexuelles Mécanismes génétiques Chromosome Y	CULAIRE 71
IV. CHAP I. II.	D D M 1. 2.	Atteintes périphériques RE III : DIMORPHISME SEXUEL DE LA PHYSIOPATHOLOGIE CARDIOVAS imorphisme sexuel des pathologies cardiovasculaires écanismes des différences sexuelles Mécanismes génétiques Chromosome Y Inactivation incomplète du chromosome X	CULAIRE 71
IV. CHAP I. II.	D D M 1. 2. 3.	Atteintes périphériques RE III : DIMORPHISME SEXUEL DE LA PHYSIOPATHOLOGIE CARDIOVAS imorphisme sexuel des pathologies cardiovasculaires écanismes des différences sexuelles Mécanismes génétiques Chromosome Y Inactivation incomplète du chromosome X Effet de l'hétérochromatine sur les chromosomes sexuels	CULAIRE 71
IV. CHAP I. II. A	D M 1. 2. 3. 4.	Atteintes périphériques	CULAIRE 71
IV. CHAP I. II. A	D D M 1. 2. 3. 4.	Atteintes périphériques	CULAIRE 71
IV. CHAP I. II. A	D D M 1. 2. 3. 4. 5.	Atteintes périphériques	CULAIRE 71
IV. CHAP I. II. A	D M 1. 2. 3. 4. 1. 2.	Atteintes périphériques	CULAIRE 71 71 71 73 73 73 73 73 73 74 74 75 75 75 75 75
IV. CHAP I. II. A B	D M 1 . 2. 3. 4. 1. 2. 3. 1. 2. 1. 1. 2. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1	Atteintes périphériques	CULAIRE 71
IV. CHAP I. II. A B	2/TF D M 1. 2. 3. 4. 4. 5. 1. 2. 2. 2.	Atteintes périphériques	CULAIRE 71
IV. CHAP I. II. A B C C	2/TF D M 1. 2. 3. 4. 1. 2. 2. 1. 2.	Atteintes périphériques	CULAIRE 71
IV. CHAP I. II. A B C C III.	D T T T T T T T T T T T T T T	Atteintes périphériques	CULAIRE 71

В.	Fonction mitochondriale et métabolisme énergétique	80
1	. Stress oxydant	80
2	P. Fonction respiratoire mitochondriale	81
3	. La biogenèse mitochondriale	81
C.	Métabolisme des lipides et des carbohydrates	82
D.	Mort cellulaire	82
E.	Fibrose	83
CHAPIT	RE IV : L'AMP KINASE	85
I. S	Structure de l'AMPK	85
II. L	ocalisation intracellulaire	
III. <i>I</i>	Activation allostérique	87
IV.	Phosphorylation de l'AMPK et autres modifications post-traductionnelles	
V. <i>A</i>	Activateurs pharmacologiques de l'AMPK	
VI.	Régulation du métabolisme énergétique	
VII.	AMPK et mitochondrie	92
Α.	Biogenèse mitochondriale	92
В.	Dynamique mitochondriale	93
VIII.	Rôle de l'AMPK dans le remodelage cardiaque	94
Α.	Hypertrophie cardiaque	94
1	. Régulation transcriptionnelle	94
2	2. L'autophagie	94
3	B. Le stress RE	94
4	Les miARNs	95
В.	Fibrose	95
1	. TGF-β	95
2	2. RAAS	95
3	B. NADPH oxidase (NOX)	96
4	Les SIRTs	96
С.	Inflammation	96
D.	AMPK et modèles animaux de pathologies cardiaques	98

MATERIEL ET METHODES 10 CHAPITRE I: Modèles Animaux 10 1. Modèle murin déficient en AMPK alpha 2 10 1.1. Animaux 10 1.2. Génotypage des souris invalidées pour l'AMPK 110 2. Ovariectomies 11 2.1. Chirurgies 11 3. Modèle de surcharge de pression par perfusion d'angiotensine II 11 3.1. Implantation sous-cutanée de mini-pompes osmotiques 11 1. Etude de la fonction cardiaque par échocardiographie doppler 11 2. Mesure de pression artérielle par pléthysmographie 116 Chapitre III : Analyse de la morphologie cardiaque 119
CHAPITRE I: Modèles Animaux 109 1. Modèle murin déficient en AMPK alpha 2 109 1.1. Animaux 109 1.2. Génotypage des souris invalidées pour l'AMPK 110 2. Ovariectomies 111 2.1. Chirurgies 111 3. Modèle de surcharge de pression par perfusion d'angiotensine II 111 3.1. Implantation sous-cutanée de mini-pompes osmotiques 111 1.1. Etude de la fonction cardiaque par échocardiographie doppler 111 2. Mesure de pression artérielle par pléthysmographie 116 Chapitre III : Analyse de la morphologie cardiaque 119
1. Modèle murin déficient en AMPK alpha 2 109 1.1. Animaux 109 1.2. Génotypage des souris invalidées pour l'AMPK 110 2. Ovariectomies 111 2.1. Chirurgies 111 3. Modèle de surcharge de pression par perfusion d'angiotensine II 113 3.1. Implantation sous-cutanée de mini-pompes osmotiques 114 1.1. Etude de la fonction cardiaque par échocardiographie doppler 115 2. Mesure de pression artérielle par pléthysmographie 116 Chapitre III : Analyse de la morphologie cardiaque 115
1.1. Animaux
1.2. Génotypage des souris invalidées pour l'AMPK
2. Ovariectomies
2.1. Chirurgies 112 3. Modèle de surcharge de pression par perfusion d'angiotensine II 113 3.1. Implantation sous-cutanée de mini-pompes osmotiques 113 Chapitre II : Exploration fonctionnelle du système cardiovasculaire 114 1. Etude de la fonction cardiaque par échocardiographie doppler 115 2. Mesure de pression artérielle par pléthysmographie 116 Chapitre III : Analyse de la morphologie cardiaque 115
3. Modèle de surcharge de pression par perfusion d'angiotensine II 113 3.1. Implantation sous-cutanée de mini-pompes osmotiques 113 Chapitre II : Exploration fonctionnelle du système cardiovasculaire 113 1. Etude de la fonction cardiaque par échocardiographie doppler 113 2. Mesure de pression artérielle par pléthysmographie 116 Chapitre III : Analyse de la morphologie cardiaque 115
3.1. Implantation sous-cutanée de mini-pompes osmotiques
 Chapitre II : Exploration fonctionnelle du système cardiovasculaire
 Etude de la fonction cardiaque par échocardiographie doppler
2. Mesure de pression artérielle par pléthysmographie
Chapitre III : Analyse de la morphologie cardiaque11
1. Analyse histologique
1.1. Inclusion en paraffine des échantillons
1.2. Coupe des blocs de paraffine
1.3. Coloration des coupes
1.4. Mesure du pourcentage de fibrose
2. Analyse de l'ultrastructure des cardiomyocytes par microscopie électronique à
2. Analyse de l'ultrastructure des cardiomyocytes par microscopie électronique a transmission
2. Analyse de l'ultrastructure des cardiomyocytes par microscopie électronique a transmission
2. Analyse de l'ultrastructure des cardiomyocytes par microscopie électronique à transmission 2.1. Fixation des tissus 12' 2.2. Coupes ultrafines
2. Analyse de l'ultrastructure des cardiomyocytes par microscopie électronique à transmission 12' 2.1. Fixation des tissus 12' 2.2. Coupes ultrafines 12' Chapitre IV : Evaluation de la respiration mitochondriale
 Analyse de l'ultrastructure des cardiomyocytes par microscopie électronique à transmission
 Analyse de l'ultrastructure des cardiomyocytes par microscopie électronique à transmission

3. Etu	ude des capacités oxydatives	124
Chapitre \	/ : Exploration des voies métaboliques cardiaques	127
1. Me	sure d'activités enzymatiques	
1.1.	Extraction et dosage des protéines	127
1.2.	Mesure de l'activité de la citrate synthase	
1.3.	Mesure de l'activité du complexe IV	128
1.4.	Mesure de l'activité du complexe I	128
1.5.	Mesure de l'activité de l'hydroxyacylCoA deshydrogénase	129
1.6.	Analyse des données de spectrophotométrie	129
2. Me	sure de l'expression protéique par immunoempreinte	129
2.1.	Lyses tissulaire	130
2.2.	Western Blot	130
3. Me	sure de niveau d'expression d'ARNm par RT-PCR	132
3.1.	Extraction des ARN totaux	132
3.2.	Analyse quantitative et qualitative des échantillons d'ARN	132
3.3.	PCR quantitative basée sur la technologie TaqMan	132
3.3.	1. Transcription inverse	133
3.3.	2. PCR quantitative en temps réel	133
3.3.	3. Analyse des résultats	136
Chapitre \	/I : Etude de l'environnement lipidique du complexe I de la chaîne respiratoire	e et de son
assembla	ge en supercomplexes	139
1. Pro	ofilage des phospholipides cardiaques	139
1.1.	Extraction de phospholipides	139
1.2.	Chromatographie liquide	139
1.3.	Quantification des phospholipides	140
1.4.	Identification des espèces de cardiolipide	141
2. Ca	ractérisation des supercomplexes de la chaîne respiratoire mitochondriale	142
2.1.	Préparation des extraits mitochondriaux	142
2.2.	Préparation des échantillons pour éléctrophorèse	142
2.3.	BN-PAGE	142
RESULTA	TS	145

RES	ULTATS
CHA	PITRE I. Etude des effets de la délétion de l'AMPK α 2 spécifiquement dans le cœur et
inau	ctible à l'âge adulte chez les souris male et femelle à l'état basal
I.	Présentation147
II.	Résultats et discussion
<i>III.</i>	Résultats complémentaires196
Prés	entation
Rési	ultats
Disc	ussion
СНА	PITRE II : ETUDE DU DIMORPHISME SEXUEL DE LA DELETION CARDIOSPECIFIQUE ET
INDU	JCTIBLE DE L'AMPKα2
I.	Présentation
II.	Résultats
III.	Discussion
Figu	re supplémentaire
СНА	PITRE III : Etude des effets de la délétion de l'AMPK $lpha$ 2 spécifiquement dans le cœur et
indu	ctible à l'âge adulte chez les souris mâle et femelle lors d'un stress cardiaque
I.	Présentation
CON	ICLUSION ET PERSPECTIVES
ANN	EXE
BIBL	.IOGRAPHIE

Abréviations

 α -SMA: alpha-smooth muscle actin α et β -MHC: alpha and beta-Myosin Heavy Chain ADN: Acide Désoxyribonucléique AID: Autoinhibition Domain ARNm: Acide Ribonucléique messager Acétyl-CoA: acétyl-coenzyme A ACS: Acétyl-CoA Synthase ADP: Adénosine Diphosphate AG: Acides Gras AK: Adénylate Kinase ALCAT1: Lysocardiolipin Acyltransférase 1 ALDH2: aldéhyde déshydrogénase-2 ANT: Adénine Nucléotide Transférase AMP: Adénosine Monophosphate AMPK: Protéine kinase activée par l'AMP AR: Androgen Receptor ARN: Acide Ribonucléique ATP: Adénosine Triphosphate ATGL: adipose triglyceride lipase CACT: Carnitine/Acylcarnitine Translocase

CAD: Coronary Artery Disease

CamK: calcium-calmoduline kinase

Cat: Catalase

CBP: CREB Binding Protein

CHF: Chronic Heart Failure

ChREBP: carbohydrate responsive element binding protein

CK: Créatine Kinase

CL: cardiolipides

Cn: Calcineurine

CoQ: Coenzyme Q

CPTI: Carnitine Palmitoyltransferase I

CPTII: Carnitine Palmitoyltransferase II

Cr: Créatine

CREB: cAMP Response Element-Binding protein

CS: Citrate Synthase

CTGF: Connective Tissue Growth Factor

DHT: Dihydrotestostérone

DN: Dominant Négatif

DRP1: Dynamin-related protein 1

E1: Estrone

E2: 17-β-estradiol

E3: Estriol

E4: Estestrol

ERRE: ERR response Element

ERRs: Estrogen-Related Receptors

ERα/ERβ: récepteurs aux œstrogènes

ET: Endothéline

FABP: Fatty-Acid-Binding protein

FAD/FADH2: Flavine adénine Dinucléotide

FAT: Fatty Acid Translocase

FATP: Fatty Acid Transporter

FE: Fraction d'Ejection

Fis1: Fission protein 1

FOXO: forkhead box protein O

GLUT: GLUcose Transporter

GPERs: G protein Coupled Estrogen Receptors

GPx: Gluthatione Peroxidase

GTP: Guanosine Triphosphate

HDL: High Density Lipoprotein

HFpEF: Heart Failure with preserved Ejection Fraction

HFrEF: Heart Failure with reduced Ejection Fraction

HIF1 α : Hypoxia Inducible Factor 1 α

HK: Hexokinase

HMG: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl

HMGCR: HMG CoA Reductase

HNF-4 α : Hepatocyte Nuclear Factor 4 α

IC: Insuffisance Cardiaque

IDH: isocitrate Deshydrogénase

LBD: Ligand Binding Domain

LDH: Lactate Deshydrogénase

LDL: Low Density Lipoprotein

LPL: lipoprotéine lipase

LTCC: canal calcique de type L

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MEC: Matrice ExtraCellulaire

Mfn1/Mfn2: Mitofusine 1 et 2

MI: Myocardial Infarction

MISS: Membrane Initiated Steroid Signaling

MLCL: monolysocardiolipide

MMP: Métalloprotéase de la Matrice

MnSOD: Mitochondrial superoxide dismutase

mPTP: mitochondrial Permeability Transition Pore

MRS: Magnetic Resonance Spectroscopy

NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NCX: Echangeur Na⁺/Ca²⁺

NOX: NADPH oxidase

NRFs: Nuclear Respiratory Factors

OPA1: optic atrophy-1

OVX: Ovariectomie

PDH: Pyruvate Déshydrogénase

PDHA: Dihydroxyacétone Phosphate

PDK: Pyruvate Déshydrogénase Kinase

PFK1: Phosphofructokinase 1

PGA: Glycéraldhédyde-3-Phosphate

PGC-1a: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARg) coactivator-1 alpha

Pi: Phosphatidyl inositol

PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase

PKA: Protein Kinase A

PLD1: phospholipase D1

POLRMT: ARN polymérase mitochondriale

PPARs: Peroxisome-Proliferator-Activated Receptors

PPRE: PPARs response element

ROS: Reactive Oxygen Species

RS: Réticulum Sarcoplasmique

RyR: Ryanodine Receptor SERCA: Sarco/Endoplasmique Réticulum Ca2+ ATPase SGLTs: cotransporteurs sodium-glucose SOD: Superoxide Dismutase Spry-1: homologue 1 de Sprouty SREBP1: sterol regulatory binding protein 1 **TAC: Tranverse Aortic Constriction** TAG: triacylglycerol TAK-1: TGF-β Activated Kinase-1 TCA: TriCarboxylic Acid cycle TEFM: Mitochondrial transcription Elongation Factor TF1BM/TF2BM: mitochondrial Transcription Factor B1 et B2 TFAM: Facteur de transcription mitochondrial A TGF: Transforming Growth Factor TIM: Translocase de la membrane interne TIMP: Inhibiteur des Métalloprotéases de la matrice TLR4: Toll Like Receptor 4 TNF- α : Tumor Necrosis Factor α TOM: Translocase de la membrane externe TSP-1: Thrombospondine-1 UCP: Uncoupling Protein

VDAC: Voltage-Depending Anion Channel

VG: Ventricule Gauche

Table des illustrations

Figure 1 : Métabolisme énergétique cardiaque	27
Figure 2 : Schéma des voies de synthèse du métabolisme cardiaque	28
Figure 3 : Voie de la glycolyse	
Figure 4 : La navette mitochondriale malate/aspartate	31
Figure 5 : Régulation de l'oxydation du glucose et du lactate par la pyruvate deshydrogénase (P	DH)32
Figure 6 : Import cellulaire des acides gras	33
Figure 7 : Schéma de l'entrée des acyl-CoA dans la mitochondrie	34
Figure 8 : Dégradation des acides gras	35
Figure 9 : Cycle de Krebs	
Figure 10 : La phosphorylation oxydative	
Figure 11 : Représentation schématique du système OXPHOS montrant ces complexes individu	els (I-V),
ces supercomplexes et leur nomenclature	
Figure 12 : (A) Images de microscopie électronique et reconstruction 3D.de mitochondrie (B)	Schéma
d'une coupe de mitochondrie	40
Figure 13 : Schéma de l'ADN mitochondrial	41
Figure 14 : Voies d'import des protéines mitochondriales	42
Figure 15 : Étapes de synthèse et de remodelage des cardiolipides	43
Figure 16 : Acteurs de la dynamique mitochondriale	44
Figure 17 : Initiation de la transcription mitochondriale	45
Figure 18 : Schéma de la voie de signalisation de PGC-1 $lpha$	46
Figure 19 : Les voies de régulation de PGC-1a	47
Figure 20 : Schéma des voies de signalisation régulées par la sirtuine 1	49
Figure 21 : Schéma des différentes fonctions cellulaires de la mitochondrie	50
Figure 22 : Schéma des sites de production et d'élimination des ROS dans la mitochondrie	51
Figure 23 : Systèmes de transfert d'énergie	52
Figure 24 : Régulation locale de la bioénergétique cardiaque	54
Figure 25 : Etiologies de l'insuffisance cardiaque	55
Figure 26 : miARNs jouant un rôle dans le développement de la fibrose	61

Figure 27 : Transport de calcium dans les cardiomyocytes	63
Figure 28 : Altérations des 3 composants du métabolisme énergétique cardiaque lors de l'IC	66
Figure 29 : Différences sexuelles les plus importantes dans la prévalence de maladies cardiovascula	aires
	72
Figure 30 : Régulation des gènes par le chromosome sexuel	73
Figure 31 : Modifications de l'ADN et des histones dépendantes du sexe et des hormones sexuelles.	75
Figure 32 : Structures moléculaires des œstrogènes	77
Figure 33 : Multiples voies de signalisation des œstrogènes dans les cellules cardiovasculaires	78
Figure 34 : Influence des œstrogènes sur la fonction mitochondriale	80
Figure 35 : Structure moléculaire du complexe AMPK	85
Figure 36 : Modulateurs les plus connus de l'AMPK	89
Figure 37 : Fonctions métaboliques de l'AMPK	90
Figure 38 : Rôle de l'AMPK dans la régulation de la biogenèse mitochondriale	92
Figure 39 : Rôle de l'AMPK dans la régulation de l'inflammation	97
Figure 40 : Invalidation cardio-spécifique et inductible de l'AMPKa2 chez la souris grâce au système (Cre-
Lox	110
Figure 41 : Exemple de résultats de génotypage A. AMPKalpha2Lox; B. génotypage Cre-ERT2	111
Figure 42 : Schéma d'expérience des souris soumises à une ovariectomie	112
Figure 43 : Schéma d'expérience des souris implantées avec des mini-pompes à angiotensine II	113
Figure 44 : A.Paramètres cardiaques mesurés par échocardiographie en 2 dimensions ; B. Profil de	flux
transmitral normal avec une onde E haute et A petite. Issu de Cluzel, J Radiol, 2004	116
Figure 45 : A. Système de mesure de pression artérielle avec la bague d'occlusion (occlusion cuff) e	et le
capteur (VPR cuff) ; B. Mesure de pression artérielle. En rouge : O-cuff et en bleu : VPR-cuff	117
Figure 46 : Illustration du seuillage pour quantifier la fibrose périvasculaire (à gauche) et totale (à dro	oite)
à l'aide du logiciel Fiji	120
Figure 47 : Illustration de la perméabilisation des fibres musculaires à la saponine	123
Figure 48 : Illustration du système de mesure et d'acquisition pour les mesures de respira	ation
mitochondriale	124
Figure 49 : Détermination de la respiration via les différents complexes de la chaine respiratoire	125
Figure 50 : Séparation des classes de phospholipides obtenues par LC-ESI/MS.	141

Figure 51 : Spectre de cardiolipides obtenu par LC-ESI/MS avec intensités moyennes des CL(18:2)4 et
CL(18:2)3(22:6)
Figure 52. Phénotype cardiaque des souris α -MHC-MerCreMer 16 semaines après injection de
tamoxifène197
Figure 53. Schéma d'expérience des souris soumises à une ovariectomie198
Figure 54. Morphologie du cœur et évaluation de la fonction cardiaque des souris Sham et OVX 16
semaines après induction de la délétion de l'AMPKa2
Figure 55. Analyse de la fibrose cardiaque et de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme
énergétique cardiaque des souris 16 semaines après induction de la délétion de l'AMPK α 2200
Figure 56. Evaluation de la fonction, de la biogenèse et de la dynamique mitochondriale des cœurs de
souris 16 semaines après induction de la délétion de l'AMPKa2201
Figure 57. Analyse du contenu en cardiolipides des cœurs de souris 16 semaines après injection de
tamoxifène par spéctrométrie de masse couplée à une HPLC202
Figure supplémentaire 58
Figure 59 : Schéma d'expérience des souris implantées avec des mini-pompes à angiotensine II211

Table 1 : Critères de Framingham de diagnostic de l'IC	56
Table 2 : Classification des stades de developpement de l'IC par l'American College of Cardiolog	gy (ACC)
	56
Table 3 : Liste des anticorps utilisés pour l'immunoempreinte	131
Table 4 : Identification des amorces TaqMan désignées par Applied Biosystems	136
Table 5 : Programme chromatographique des différentes compositions de phases mobiles suiva	ntes : A-
Heptane/Isopropanol 98/2, B-Chloroforme/Isopropanol 65/35, C-Methanol/H ₂ O 95/5, D-Isopropa	nol. 140
Table 6 : Composition des solutions	144

Tableau 1 : Effets métaboliques et non métaboliques de l'AMPK dans différents modèles de patholog	ie
cardiaque	99
Tableau 2 : Récapitulatif des effets de la délétion spécifique au cœur et inductible de l'AMPK α 2 observé	és
chez les souris mâles et femelles à l'état basal, 16 semaines après la délétion21	4

AVANT-PROPOS

Selon l'OMS, les maladies cardiovasculaires sont la première cause de décès dans le monde. En France, c'est la deuxième cause de mortalité et la première pour les femmes avant les cancers. Les maladies cardiovasculaires sont responsables de 150 000 décès par an en France, dont 70 000 sont dus à une insuffisance cardiaque. L'insuffisance cardiaque est un syndrome complexe qui est caractérisé par l'incapacité du cœur à assurer au repos et à l'effort, un débit suffisant pour répondre aux besoins métaboliques et fonctionnels des différents organes. C'est une pathologie sévère dont le taux de mortalité atteint 50%, 5 ans après le diagnostic malgré les traitements. La compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'insuffisance cardiaque et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques reste donc un enjeu majeur.

L'activité contractile du cœur est soumise à un contrôle optimal du métabolisme énergétique. Comme il le sera détaillé dans une première partie de l'introduction, le cœur est en effet un important consommateur d'énergie, ce qui implique une fonction mitochondriale adéquate, des systèmes de transfert d'énergie efficaces, ainsi qu'une régulation de la production d'énergie très fine afin de maintenir une homéostasie, quels que soient les besoins énergétiques du cœur.

Lors de l'insuffisance cardiaque, le cœur subit d'importants remodelages au niveau cellulaire et métabolique, qui seront présentés dans une deuxième partie de l'introduction. Nous verrons que le métabolisme joue un rôle majeur dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque. En effet, le dérèglement du cycle de vie de la mitochondrie occupe un rôle central dans le développement de la pathologie.

Par ailleurs, l'insuffisance cardiaque montre un dimorphisme sexuel notable comme il le sera décrit dans la troisième partie de l'introduction. Les femmes plus jeunes sont protégées, mais cette protection du cœur est perdue après la ménopause et l'insuffisance cardiaque devient alors la première cause de mortalité chez les femmes. Bien que les œstrogènes soient très probablement impliqués, les mécanismes de signalisation ne sont pas encore totalement compris. De manière intéressante, les mitochondries participent à la spécificité sexuelle de pathologies importantes dont les maladies cardiovasculaires [1].

La sérine/thréonine kinase dépendante de l'AMP (AMPK), sensible au rapport AMP/ATP, constitue une voie essentielle dans le contrôle de l'énergétique cellulaire. Elle agit à court terme par des modifications

post-traductionnelles et à long terme par des effets transcriptionnels en activant les processus cataboliques et en inhibant les processus anaboliques pour rétablir la balance énergétique. Ses mécanismes d'action seront détaillés dans la quatrième et dernière partie de l'introduction. Plusieurs travaux suggèrent un effet protecteur de l'AMPK dans l'insuffisance cardiaque, cependant, la spécificité cardiaque, la composante métabolique et le dimorphisme sexuel des effets cardioprotecteurs de l'AMPK n'ont pas été clairement établis.

Dans ce contexte, nous avons cherché à comprendre le rôle de l'AMPK dans la bioénergétique cardiaque et le fonctionnement mitochondrial, ainsi que le dimorphisme sexuel des effets de l'AMPK sur le métabolisme énergétique. Nous avons également cherché à comprendre les mécanismes des effets protecteurs de l'AMPK dans un contexte de pathologie cardiaque.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude seront confrontés aux données de la littérature dans le cadre d'une discussion.

INTRODUCTION

CHAPITRE I : METABOLISME ENERGETIQUE DU CŒUR NORMAL

Le métabolisme énergétique du cœur est complexe. Il fait intervenir 3 composants majeurs : l'utilisation des substrats, la production d'énergie et le transport et l'utilisation de l'énergie (*Figure 1*).

L'utilisation des substrats comprend l'entrée du glucose et des acides gras dans la cellule, leur transformation en intermédiaires pendant la glycolyse et la β-oxydation respectivement, ainsi que l'entrée de ces intermédiaires dans le cycle de Krebs. Le deuxième composant est la phosphorylation oxydative par la chaîne respiratoire mitochondriale qui permet la production d'ATP (Adénosine Triphosphate), source d'énergie pour toutes les réactions nécessaires au maintien des fonctions cellulaires et d'une homéostasie normale. Le troisième composant comprend le transfert de l'énergie par le système de navette mettant en jeu la créatine kinase et sa consommation par les différentes ATPases [2].



Figure 1 : Métabolisme énergétique cardiaque

Le métabolisme énergétique est composé de 3 parties. La première est l'utilisation des substrats (en rouge), leur entrée dans la cellule et leur catabolisme avec la β-oxydation et la glycolyse. La deuxième partie est la production d'énergie par la phosphorylation oxydative. La troisième partie est le transfert d'énergie et son utilisation (en vert). *Issu de Neubauer, S., N Engl J Med, 2007.*

Le cœur est l'organe qui consomme le plus d'énergie du corps, en effet il consomme environ 1mM d'ATP/s. D'autre part, c'est un organe très oxydatif car plus de 90% de l'énergie qu'il produit, et qu'il doit renouveler toutes les 20 secondes environ, provient de la respiration mitochondriale [3]. La régulation de la balance entre sa production d'énergie et sa consommation énergétique est donc cruciale au maintien de l'homéostasie de la cellule.

I. Utilisation des substrats

Le cœur est un organe omnivore car il peut utiliser plusieurs substrats : les acides gras (AG), les hydrates de carbone, le lactate, les acides aminés et les corps cétoniques. Mais les substrats utilisés majoritairement par le myocarde normal (sain) sont les acides gras (pour 60 à 90%) et le glucose (pour 10 à 40%) (*Figure 2*). Le cœur est un organe flexible, c'est-à-dire qu'en cas de modification de la charge de travail (pré-charge), de la disponibilité des substrats, des hormones circulantes, du flux coronaire ainsi que du métabolisme, il est capable de s'adapter et de choisir un autre substrat [4].



Figure 2 : Schéma des voies de synthèse du métabolisme cardiaque CPT-1 : Carnitine Palmytoyl Transferase I, FAT : Fatty Acid Transporter/CD36, G-6-P : Glucose-6-Phosphate, GLUT : Glucose Transporter, MCT : Monocarboxylic Acid Transporters, PDH : Pyruvate Deshydrogénase. *Adapté de Stanley, Physiol Rev, 2005.*

A. Glycolyse

En premier lieu, l'entrée du glucose dans le cardiomyocyte se fait grâce à des transporteurs car le glucose est hydrophobe et par conséquent la double membrane plasmique lui est imperméable. Il existe deux classes de transporteurs du glucose dans les cardiomyocytes: Les GLUTs (GLUcose Transporter, transporteurs facilitants), et les SGLTs (cotransporteurs sodium-glucose)[5].

Les GLUTs sont les transporteurs majoritaires dans le cœur. Ils font partie d'une superfamille de transporteurs de glucose qui contient 14 membres chez les mammifères. L'isoforme majoritaire dans le cœur adulte est GLUT4 qui représente environ 70% des transporteurs. D'autres isoformes ont été observées dans le cœur (GLUT1, GLUT3, GLUT8, GLUT10, GLUT11, et GLUT12) mais leur expression dépend du stade de développement. GLUT1 par exemple, est très présent au stade embryonnaire et néonatal mais après la naissance son expression est diminuée tandis que celle de GLUT4 augmente. En conditions basales, GLUT4 est situé dans des vésicules intracellulaires, et en réponse à un stimulus (Par exemple : ischémie, catécholamines, insuline, ...), le transporteur est déplacé à la surface de la cellule et peut augmenter de 10 à 20 fois l'entrée du glucose par diffusion facilitée [5].

Très peu de choses sont connues sur les SGLTs dans le cœur. Des études ont montré la présence d'ARNm (Acide Ribonucléique) de SGLT1 dans le cœur et que son expression est 10 fois supérieure à celle dans le rein [6]. Mais l'expression de la protéine SGLT1, sa localisation cellulaire et sa fonction ne sont pas connus. Ce transporteur utilise le gradient électrochimique du sodium pour le transport de glucose et en réponse à l'insuline et à la leptine, il a été démontré qu'il permet une augmentation de l'utilisation du glucose [7].

La glycolyse consiste en la dégradation progressive d'une molécule de glucose à 6 carbones en deux molécules de pyruvate à 3 carbones. Elle comporte 10 étapes catalysées par 10 enzymes différentes solubles dans le cytosol. Cette voie métabolique peut être divisée en 3 séquences [8] *(Figure 3)*.





Le catabolisme du glucose par la glycolyse anaérobie aboutit à la formation de 2 molécules de pyruvate et de 2 ATP. Les enzymes de la voie de la glycolyse : 1, Hexokinase ; 2, Phosphoglucose isomérase ; 3, Phosphofructokinase-1 ; 4, Aldolase ; 5, Triosephosphate isomérase ; 6, Glutaraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; 7, Phosphoglycérate kinase ; 8, Phosphoglycéromutase ; 9, Enolase ; 10, pyruvate kinase. *Issu de http://monde.ccdmd.qc.ca/recherche/index.fcgi?demande=rech&str=glycolyse*

- La phosphorylation du glucose en fructose-1,6-bisP consomme 2 molécules d'ATP:
 L'hexokinase (HK) permet la phosphorylation du glucose en glucose-6-P à partir de 1 ATP.
 Ensuite, il y a isomérisation du glucose-6-P en fructose-6-P et phosphorylation du fructose-6-P en fructose-1,6-bisP par la phosphofructokinase 1 (PFK I) avec utilisation d'1 ATP.
- Le clivage du fructose-1,6-bisP produit 2 trioses-P :
 Ce clivage par l'aldolase produit une molécule de Glycéraldhédyde-3-Phosphate (GAP) et une molécule de Dihydroxyacétone Phosphate (DHAP) qui sera isomérisée en GAP.
- L'oxydation d'un GAP produit 1 pyruvate, 1 NADH,H⁺ et 2 ATP :
 LA GAP déshydrogénase oxyde le GAP conduisant à la réduction du NAD⁺ en NADH,H⁺ et à la synthèse du 1,3-bisP-glycérate, premier substrat riche en énergie. La transformation du 1,3-bisP-

glycérate en 3-P-glycérate par la P-glycérate-kinase permet la synthèse d'1 ATP. Ensuite, il y a transformation du 3-P-glycérate en 2-P-glycérate, puis déshydratation en P-énolpyruvate par l'énolase. A partir du P-énolpyruvate, une deuxième synthèse d'ATP a lieu par la pyruvate-kinase avec formation du pyruvate.

→ La glycolyse produit donc 2 ATPs (4 produits mais 2 consommés) et 2 NADH,H⁺: Glucose + 2 ADP + 2 Pi + 2 NAD⁺ => 2 Pyruvate + 2 ATP +2H₂O + 2 NADH,H⁺

Le NADH,H⁺ sera transporté dans la mitochondrie par la navette malate/aspartate pour être oxydé par la chaîne respiratoire (*Figure 4*).



Figure 4 : La navette mitochondriale malate/aspartate Le couplage des translocases dicarboxylate et glutamate/aspartate permet le transfert d'un equivalent réduit (NADH) du cytosol vers la matrice mitochondriale. Issu de Horton et al, Principes de Biochimie, 1994.

En conditions anaérobies, le NADH,H⁺ réduit le pyruvate en lactate dans le cytosol, réaction catalysée par la lactate déshydrogénase (LDH). Cette réoxydation du NAD⁺ permet à nouveau l'oxydation d'un GAP au niveau de la glycolyse, ce qui explique la rapidité de la glycolyse anaérobie. Le lactate produit et libéré dans le sang peut être à nouveau mobilisé (cycle du lactate ou de Cori) par les cardiomyocytes pour permettre sa transformation par la LDH en pyruvate accompagnée d'une réduction de NAD⁺. Cette production d'énergie anaérobie intervient comme source supplémentaire en fonction des besoins.

En conditions aérobies, le pyruvate est importé dans la matrice mitochondriale où il est décarboxylé par la pyruvate déshydrogénase (PDH), qui est elle-même régulée négativement par la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) et positivement par la PDH phosphatase (*Figure 5*). L'acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA) formé pourra ensuite entrer dans le cycle de Krebs.



Figure 5 : Régulation de l'oxydation du glucose et du lactate par la pyruvate deshydrogénase (PDH) L'activité de la PDH est inhibéeles produits de l'inhibition de l'acétyl-Coa et du NADH (flèche en pointillés), et de la phosphorylation par la PDH kinase et la déphosphorylation de la PDH phosphatase. *Issu de Stanley et al, Physiol Rev, 2005.*

La régulation des enzymes glycolytiques se fait principalement par l'état énergétique de la cellule. La PFK I qui est une enzyme clé de la glycolyse est activée par une augmentation de la concentration en ADP et AMP, lorsque la demande énergétique augmente. Son activité est inhibée par l'ATP, les AG, le lactate et le citrate (intermédiaire du cycle de Krebs). Son inhibition provoque une accumulation de glucose-6-P ce qui inhibe l'HK. La PDH est également régulée par les niveaux d'ATP, de NADH et d'acétyl-CoA ainsi que par phosphorylation par la PDK [9].

B. Beta-oxydation des Acides Gras (AG)





Figure 6 : Import cellulaire des acides gras

(1) Diffusion simple à travers le sarcolemme. (2,3) Transport dépendant du récepteur FABPm (Fatty Acid Bound Protein membrane) et/ou de la translocase CD36. (4) Transport via CD36 et les transporteurs FATP 1 et 6 (fatty acid transporters). Dans la cellule, (a) prise en charge des acides gras par la chaperonne FABPc (cytplasmic fatty acid-binding Protein) ou conversion en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthase. *Issu de Scwenk, Cardiovasc Res, 2008.*

Tout d'abord, la plupart des AG du sang sont sous forme de lipoprotéines, et pour passer la membrane des vaisseaux sanguins, ils doivent être convertis en AG libres par la lipoprotéine lipase (LPL). Une fois sous forme d'AG libres, ils se lient à l'albumine pour former un complexe. L'entrée des AG liés à l'albumine dans la cellule, est dépendante de leur concentration de part et d'autre du sarcolemme. Elle peut se faire par diffusion passive (flip-flop), mais elle est largement facilitée par plusieurs transporteurs. La protéine membranaire de liaison des acides gras, FABPm (Fatty Acid Bound Protein membrane) qui agit comme récepteur aux complexes AG/albumine. Ensuite, la translocase CD36 (aussi appelée FAT pour Fatty Acids Translocase) très exprimée dans le cœur, permet le transport des AG à travers la membrane. Les transporteurs FATP 1 et 6 (Fatty Acid Transporters) peuvent également participer à ce processus. La protéine CD36 est présente dans des endosomes et de la même manière que pour GLUT4, sa translocation à la membrane se fait sous stimulation par l'insuline et stimuli contractiles. Les AG sont alors pris en charge par une chaperonne, FABPc (cytoplasmic fatty acid-binding protein) qui les dirige vers la membrane externe des mitochondries, site d'ancrage de l'acetyl-coA synthase (ACS), l'enzyme qui convertit les AG en acyl-coenzymeA :

Acide Gras + ATP+CoA => Acyl-CoA + PPi + AMP

La dégradation des Acyl-CoA se fait dans la mitochondrie. Les acyl-CoA à chaîne courte ou moyenne peuvent entrer dans la matrice mitochondriale par diffusion simple et les acyl-CoA à longue chaîne doivent

CHAPITRE I : METABOLISME ENERGETIQUE DU CŒUR NORMAL

passer par le système de transport carnitine-palmitoyltransférase. Ce système est composé de 3 protéines : carnitine palmitoyltransferase I (CPTI), carnitine/acylcarnitine translocase (CACT), et la carnitine palmitoyltransférase II (CPTII) *(Figure 7)* [11]. Dans un premier temps, les acyl-CoA sont transformés en acyl-carnitine, cette trans-estérification couplée à la translocation dans l'espace intermembranaire est catalysée par CPT-IB, localisé à la membrane externe de la mitochondrie. La CACT, localisée à la membrane interne de la mitochondrie, catalyse alors la translocation de l'acyl-carnitine vers la matrice en échange d'une molécule de carnitine. Enfin, la CPT-II reconvertit les acyl-carnitines en acyl-CoA.



Figure 7 : Schéma de l'entrée des acyl-CoA dans la mitochondrie VDAC : Voltage Dependent Anion Channel, CPT-I et CPT-II : Carnitine-Palmotoyl Transfera I et II, CACT : Carnitine Acyl-Carnitine Translocase. Issu de http://ressources.unisciel.fr/biocell/chap5/co/Chap5_webUnisciel.html
La β-oxydation des AG consiste en plusieurs cycles (hélice de Lynen) qui contiennent 4 réactions [8] *(Figure 8).*



Figure 8 : Dégradation des acides gras A chaque tour de β-oxydation, une molécule d'acétyl-CoA et deux équivalents réduits : un NADH et un FADH2 sont libérés. *Issu de https://www.abcam.com/pathways/fatty-acid-oxidation.*

- Première oxydation d'un acyl-CoA à nC par diverses acyl-CoA-déshydrogénases produisant un dérivé insaturé, l'énoyl-CoA et un FADH₂.
- Hydratation de la double liaison par l'énoyl-CoA-hydratase ou crotonase produisant le β-OH-acyl-CoA.
- Deuxième oxydation par la β-OH-acyl-CoA-déshydrogénase qui produit un β-cétoacyl-CoA et un NADH,H⁺.
- Clivage du β-cétoacyl-CoA, après le carbone β, par la cétothiolase qui libère l'acyl-CoA raccourci (n-2) et un acétyl-CoA.

Ce cycle se répète n fois libérant à chaque fois un acétyl-CoA et un acyl-CoA raccourci de 2C, qui subira le cycle autant de fois qu'il y a de paires de C restantes. Ces 4 réactions du cycle produisent également 1 FADH₂ et 1 NADH,H⁺.

La β-oxydation des AG est régulée par l'Acétyl-CoA Carboxylase (ACC). L'ACC a deux isoformes : l'ACC-1 qui est plus exprimée dans le foie et les tissus adipeux, et l'ACC-2 qui est exprimée dans le cœur et les muscles squelettiques. L'ACC fournit du malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA pour la synthèse de novo d'AG libres et également pour l'inhibition de CPT-I qui transfert les AG dans la mitochondrie [12].

II. Production d'énergie

A. Cycle de Krebs

Les 2 principaux rôles du cycle de Krebs (ou TCA pour TriCarboxylic Acide cycle) sont d'une part d'utiliser les intermédiaires métaboliques afin de générer de l'ATP (à travers la phosphorylation oxydative) et également de produire des précurseurs à des voies métaboliques de biosynthèse. Le cycle de Krebs a lieu dans la matrice de la mitochondrie et fait intervenir 7 enzymes solubles et 1 enzyme fixée dans la membrane interne de la mitochondrie : la succinate deshydrogénase (qui est aussi le complexe II de la chaîne respiratoire) (*Figure 9*). Il permet d'extraire l'énergie de l'acétyl-CoA en oxydant 2 CO₂. Il produit 1 molécule d'ATP, et réduit 3 NAD⁺ et un FAD. Le NADH,H⁺ et le FADH₂ permettront la synthèse d'ATP dans la chaîne respiratoire. Au total, une molécule d'acétyl-CoA conduit à l'équivalent de 12 ATPs. Ce cycle de 8 réactions irréversibles et réversibles commence avec la condensation d'un oxaloacétate et d'un acétyl-CoA et se termine par la régénération d'un oxaloacétate [13].



Figure 9 : Cycle de Krebs

L'oxydation de l'acétyl-CoA, issu de la glycolyse ou de la β-oxydation, assure la production d'une molécule de Guanosine TriPhosphate (GTP) et de 4 équivalents réduits : 3 NADH₂ et un FADH₂. *Issu de https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-andmicrobiology/citric-acid-cycle*.

CHAPITRE I : METABOLISME ENERGETIQUE DU CŒUR NORMAL

La régulation du cycle de Krebs se fait au niveau de trois enzymes : la Citrate Synthase (CS), l'isocitrate Deshydrogénase (IDH) et l'a-cétoglutarate deshydrogénase. Lorsque la charge énergétique du cardiomyocyte est élevée (c'est-à-dire le rapport AMP/ATP est faible), le NADH inhibe l'IDH et l'a-cétoglutarate deshydrogénase, tandis que l'accumulation de citrate inhibe la CS. L'ATP peut également inhiber la CS et l'a-cétoglutarate deshydrogénase, alors que l'ADP les active.

B. Phosphorylation oxydative

La chaîne respiratoire est localisée dans la membrane interne des mitochondries. Elle permet la réoxydation des équivalents réduits NADH, H⁺ et FADH₂ provenant de la glycolyse, de la β -oxydation des acides gras et du cycle de Krebs. Elle est constituée de 5 complexes : la NADH déshydrogénase (complexe I), la succinate déshydrogénase (complexe II), la coenzyme Q déshydrogénase (complexe III), la cytochrome c oxydase (complexe IV) et l'ATP synthase (ou complexe V) (Figure 10). Le NADH,H⁺ est oxydé par le complexe I et le FADH₂ est oxydé par le complexe II ce qui libère des électrons qui sont pris en charge par la suite par différents transporteurs (CoQ, complexe III, cytochrome c). Le complexe IV reçoit les électrons provenant du cytochrome c et catalyse la réduction d'un O₂ en 2H₂O, ce qui constitue la respiration. Le passage des électrons dans la chaîne respiratoire entraîne une libération d'énergie qui permet aux complexes I, III, et IV de faire passer des protons dans l'espace intermembranaire. Cela crée alors un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie. Les protons vont retourner dans la matrice mitochondriale par le canal de l'ATP synthase, permettant la fixation de l'ADP et du Pi sur celui-ci et la synthèse d'ATP. Ainsi l'oxydation des équivalents réduits est couplée à la phosphorylation de l'ADP via un gradient électrochimique. Les molécules d'ATP formées dans la matrice mitochondriale sont exportées vers le cytosol par l'antiport ATP/ADP, l'ANT (adénine nucléotide translocase) qui fait entrer en parallèle de l'ADP. L'oxydation d'un NADH.H+ génère un flux de 10 protons et l'oxydation du FADH₂ génère 6 protons. La formation d'un ATP nécessite un flux de 4 protons. Un NADH,H⁺ produit donc environ 3 ATPs (2.5) et un FADH₂ environ 2 ATPs (1.5). Le bilan énergétique pour une molécule de glucose est de 36 ATPs, 130 ATPs pour un AG comme le palmitate, 24 ATPs pour un corps cétonique comme l'acétoacétate, et 24 ATPs pour l'oxydation d'une molécule de glutamine.



Figure 10 : La phosphorylation oxydative L'oxydation des équivalents réduits issus du cycle de Krebs et de la β-oxydation par la chaîne de transporteurs d'électrons (complexes l à IV) est couplée à la synthèse d'ATP (complexe V). Adapté de DiMauro et al, Biochem Biophys Acta, 2004.

Les complexes de la chaîne respiratoire peuvent interagir les uns avec les autres et s'assembler pour former des super-structures, appelés supercomplexes ou « respirasomes » dont le rôle fonctionnel et l'assemblage ne sont pas complétement élucidés (*Figure 11*). Les complexes IV et V peuvent former des dimères et des oligomères. De plus, des associations entre les complexes I, III et IV ont été observées dans des extraits de membranes mitochondriales. Les supercomplexes suivants ont été identifiés selon leur poids moléculaire et les sous-unités les composant : III2+IV1, I1+III2, I1+III2+IV1, et I2+IIV1–2. Le supercomplexe I1+III2+IV1 est appelé « respirasome » et le supercomplexe I2+III2+IV2 a été nommé « megacomplexe respiratoire ». Ces assemblages suggèrent qu'il existerait des associations et dissociations dynamiques des complexes afin de s'adapter à la demande énergétique, si le rôle des supercomplexes est d'augmenter l'efficacité des transferts d'électrons comme le suggère le modèle « flexible » [14, 15]. La régulation de la chaîne respiratoire et de la synthèse d'ATP, se fait par la concentration en ADP qui active les réactions d'oxydation, et le taux de NADH,H+ qui va stimuler la chaîne respiratoire.



Figure 11 : Représentation schématique du système OXPHOS montrant ces complexes individuels (I-V), ces supercomplexes et leur nomenclature

(A) Chaîne respiratoire mitochondriale et synthèse d'ATP. Dans le cycle de Krebs, le NADH et le succinate sont des donneurs d'électrons oxydés par la NADH déshydrogenase (I) et la succinate déshydrogenase (II), respectivement. L'Ubiquinone (Q) est l'un des accepteurs d'électrons qui transfèrent les électrons vers le cytochrome c (c) par la cytochrome c réductase (III). Les électrons sont alors transférés sur leur dernier accepteur moléculaire (O2) et libère de l'eau par la cytochrome-c oxydase (IV). Le transfert d'électrons et couplé au transfert de protons (H*) à travers la membrane interne sauf pour le complexe II (II). Le gradient de protons éléctrochimique généré permet la production d'énergie chimique sous la forme d'ATP par l'ATP synthase (V). Sur cette figure les complexes sont représentés en monomères mais en réalité leur stoechiométrie est plus complexe. Par exemple, le complexe II existe sous forme de dimères (III₂). Des dimères et des formations multiples du complexe IV sont également présents. (B et C) La représentation de la stœchiométrie et de la nomenclature des supercomplexes mitochondriaux en (B) et en BN-PAGE en (C). I, II, III, IV et V : les complexes de I à V, M : matrice, IM : Inner Membrane, IMS : Inner Membrane Space, C : Complexe, SC : Supercomplexes.*Issu de Jha, P. et al, Current Protocol in Mouse Biol, 2016.*

III. Mitochondries

- A. Caractéristiques des mitochondries
 - 1. Généralités

CHAPITRE I : METABOLISME ENERGETIQUE DU CŒUR NORMAL

Les mitochondries ont été identifiées la première fois au 19^e siècle et d'après la théorie endosymbiotique largement acceptée, la mitochondrie serait le descendant d'une alpha-protéobactérie ayant comme hôte une autre cellule.

Les mitochondries peuvent être sphériques, en bâtonnets, voire en réseau. Leur taille est d'environ 1 à 2 µm de long et de 0.5 à 1 µm de large. Elles sont composées de 2 bicouches lipidiques, qu'on appelle membrane externe et membrane interne qui délimitent 3 compartiments : le cytoplasme, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. La membrane interne forme à l'intérieur de la mitochondrie des invaginations appelées crêtes mitochondriales [16].

(A)





Figure 12 : (A) Images de microscopie électronique et reconstruction 3D.de mitochondrie (B) Schéma d'une coupe de mitochondrie Issu de http://ressources.unisciel.fr/biocell/chap5/co/Chap5_webUnisciel.html

2. Biogenèse mitochondriale

Le rôle central des mitochondries dans la contractilité cardiaque dépend de régulations et d'adaptations spécifiques de la structure et de la fonction du réseau mitochondrial. Cette plasticité est due à la dynamique du réseau mitochondrial et à la biogenèse mitochondriale qui sont responsables de la croissance et de l'organisation des mitochondries ainsi que de la synthèse de constituants mitochondriaux. La biogenèse mitochondriale se définit par les processus et les évènements responsables de la croissance et la division d'organelles préexistantes. En raison de son origine bactérienne, la mitochondrie possède son propre génome (ADN mitochondrial) et sa propre capacité d'autoréplication qui code pour 13 protéines de la chaine respiratoire. Les protéines mitochondriales sont donc essentiellement codées par le génome nucléaire (> 1000), synthétisées dans le cytosol et importées dans la mitochondrie. Ceci implique une coordination spatio-temporelle entre la synthèse et l'import des protéines codées par le noyau et leur assemblage avec les protéines codées par l'ADN mitochondrial.

a. Expression et import des protéines mitochondriales

L'expression des protéines mitochondriales est régulée à la fois par des gènes mitochondriaux et des gènes nucléaires. L'ADN mitochondrial circulaire double brin est de 16,5 kb chez les vertébrés et contient 37 gènes qui codent pour 13 sous-unités des complexes I, III, IV, et V de la chaîne respiratoire, 22 ARNs de transfert et 2 ARNs ribosomaux nécessaires à la traduction. Chaque mitochondrie contient une ou plusieurs copies d'ADNmt localisées dans la matrice (entre 10³ et 10⁴ par cellule chez les mammifères). Chez les mammifères, l'ADNmt est d'héritage maternel *(Figure 13)*.



Figure 13 : Schéma de l'ADN mitochondrial Issu de http://ressources.unisciel.fr/biocell/chap5/co/Chap5_webUnisciel.html

L'essentiel des protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire (sous-unités restantes de la chaîne respiratoire, les enzymes et les protéines impliqués dans l'oxydation du pyruvate, les enzymes

du cycle de Krebs, les enzymes de la β -oxydation des AG, et des enzymes de la réponse au stress et du transport). Afin d'assurer le bon fonctionnement de la mitochondrie, un mécanisme permet donc l'adressage, l'import et le bon repliement des protéines mitochondriales.

Les ARNm sont traduits dans le cytosol sous forme de précurseurs non-repliés et possédant très souvent mais pas toujours une séquence d'adressage pour les différents compartiments mitochondriaux. Les protéines s'adressant à la matrice possèdent souvent un signal en N-terminal (hélice alpha). Ces protéines sont escortées par des chaperonnes et importées dans la mitochondrie via la translocase de la membrane externe (TOM) (*Figure 14*). Les protéines s'engagent ensuite à travers le complexe de la membrane interne (TIM) en fonction du potentiel de membrane. La séquence d'import est ensuite clivée et les précurseurs sont repliés grâce à des protéines intramitochondriales. D'autres mécanismes permettent l'adressage à d'autres sous-compartiments mitochondriaux (membrane externe, interne et espace intermembranaire) [17].



Figure 14 : Voies d'import des protéines mitochondriales OM : Outer Membrane ; IM : Inner Membrane ; IMS : Intermembrane Space. *Issu de Baker, Trends in Cell Biology,* 2007.

b. Synthèse des cardiolipides

Une augmentation du nombre ou de la taille des mitochondries implique une augmentation des phospholipides qui sont des constituants importants des membranes. En effet, ils sont impliqués dans la régulation de nombreux processus comme la biogenèse mitochondriale, la dynamique mitochondriale, la

respiration et l'import de protéines. Mais également des processus non-mitochondriaux tels que : l'homéostasie des vacuoles, le vieillissement, le cycle cellulaire, et l'apoptose [18]. Les cardiolipides (CL) sont des phospholipides de la membrane mitochondriale, qui se situent principalement dans la membrane interne. Ils constituent de 8 à 15% des phospholipides cardiaques. Ils sont constitués de deux groupements phosphatidyl reliés par un squelette glycérol et de 4 chaînes acyl d'acides gras reliées au glycérol. La composition des chaînes acyl varie suivant les tissus. La synthèse *de novo* de cardiolipides apparait dans la membrane interne de la mitochondrie (*Figure 15*). Elle débute avec la conversion d'un acide phosphatidique en CDP-diacylglycérol, et se termine par la condensation d'un phosphatidylglycérol et d'un CDP-diacylglycérol, formant un cardiolipide [18]. La synthèse des cardiolipides se poursuit par une étape de remodelage. Ce remodelage peut se faire de deux manières, soit en deux temps : par une première étape de déacétylation en monolysocardiolipide (MLCL) par une phospholipase puis une réacétylation en cardiolipide par la tafazzine, soit directement par transacylation par l'acyltransférase (ALCAT1).



Figure 15 : Étapes de synthèse et de remodelage des cardiolipides Issu de Hatch, Biochem Cell Biol, 2004.

c. Dynamique mitochondriale

Le réseau mitochondrial est une structure dynamique qui s'adapte en permanence aux conditions énergétiques de la cellule. La dynamique mitochondriale est responsable de sa plasticité et comprend des évènements dits de fusion et de fission (*Figure 16*), ce qui permet la création de nouvelles

CHAPITRE I : METABOLISME ENERGETIQUE DU CŒUR NORMAL

mitochondries (fission) et la répartition adaptée de ces mitochondries aux besoins cellulaires. La fission joue aussi un rôle très important dans l'élimination d'organites endommagés. Dès qu'une mitochondrie devient dysfonctionnelle, la fission permet l'isolement spatial de la mitochondrie endommagée. La fusion et la fission sont assurées par de petites GTPases très conservées [19].

La fission est assurée par 2 protéines, DRP1 (Dynamin-related protein 1) qui est cytosolique et qui lorsqu'elle est activée va être recrutée à la membrane externe de la mitochondrie par FIS1 (Fission protein 1). FIS1 se trouve dans la membrane externe mais pas forcément au niveau du site de fission. DRP1, une fois recrutée à la membrane externe, est capable de se multimériser formant un anneau autour de la cellule, ce qui permet la constriction et la scission de la mitochondrie lors de l'hydrolyse du GTP (Guanosine Triphosphate) [19].

Dans les cellules de mammifères, la fusion est permise par 3 protéines : MFN1 et 2 (Mitofusine 1 et 2), 2 GTPases qui sont situées à la membrane externe des mitochondries et qui vont permettre la fusion des 2 membranes externes. OPA1 (optic atrophy-1) est une autre GTPase située à la membrane interne des mitochondries et dans l'espace intermembranaire. Elle permet la fusion des membranes internes de deux mitochondries et le maintien des crêtes mitochondriales.



Figure 16 : Acteurs de la dynamique mitochondriale

La dynamique mitochondriale est contrôlée par des GTPases. La fusion est régulée par les mitofusines 1 et 2 localisées dans la membrane externe des mitochondries et la GTPase OPA1 (optic atrophy 1) ancrée dans la membrane interne. La fission est intitiée par le recrutement de la dynamique cytoplasmique DRP1 (dynamin related protein) par la protéine FIS1 localisée dans la membrane externe. Issu de Youle, Nat Rev Mol Cell Biol, 2005.

3. Contrôle transcriptionnel de la biogenèse mitochondriale

a. Régulation de l'expression du génome mitochondrial

Les mécanismes transcriptionnels de régulation contrôlant la biogenèse mitochondriale sont essentiels à la coordination de l'expression du génome mitochondrial et nucléaire. En effet, la régulation de la

CHAPITRE I : METABOLISME ENERGETIQUE DU CŒUR NORMAL

biogenèse mitochondriale est largement effectuée par des protéines codées par le génome nucléaire. La transcription et la réplication de l'ADNmt sont contrôlées par le facteur de transcription mitochondrial TFAM lui-même codé par le noyau. Il est capable de se lier à des séquences communes en amont des promoteurs sur le double brin mitochondrial (HSP1 et LSP) et induit une courbure de l'ADNmt. Le complexe TFAM-ADNmt permet ensuite le recrutement de POLRMT (ARN polymérase mitochondriale) à l'extrémité C terminale de TFAM, ce qui constitue le complexe de pré-initiation. TF1BM et TF2BM (mitochondrial Transcription Factor B1 et B2) sont ensuite recrutés au complexe de pré-initiation afin de faciliter le recrutement de substrat au site catalytique de POLRMT. Enfin TEFM (Mitochondrial transcription Factor) permet l'élongation [20].



Figure 17 : Initiation de la transcription mitochondriale POLRMT : ARN polymérase mitochondriale ; TFB2M : Facteurs de transcription mitochondriaux B. *Issu de Shokolenko I.N., Front Biosci,* 2017.

b. Contrôle transcriptionnel nucléaire

En amont, la cascade transcriptionnelle contrôlant la biogenèse mitochondriale est orchestrée par le coactivateur PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) coactivator-1 alpha). PGC-1 α appartient à la famille des coactivateurs comprenant PGC-1 β et PGC-1 related coactivator (PRC). C'est un régulateur majeur du métabolisme énergétique au niveau transcriptionnel. PGC-1 α est capable de se fixer à un grand nombre de facteurs de transcription afin de réguler la biogenèse mitochondriale [21]. Parmi eux : les NRFs (nuclear respiratory factors), les ERRs (estrogen-related receptors), et les PPARs (peroxisome-proliferator-activated receptors) (*Figure 18*). Il permet une coordination entre l'expression des gènes nucléaires et mitochondriaux, notamment il active la transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial en activant transcriptionnellement et en coactivant les NRFs. PGC-1 α et PGC-1 β sont particulièrement exprimés dans les tissus riches en mitochondrie exerçant des effets bioénergétiques spécifiques, PGC-1β induisant préférentiellement des gènes impliqués dans la dégradation des espèces réactives de l'oxygène [21].



Figure 18 : Schéma de la voie de signalisation de PGC-1 α

Les facteurs de transcription NRF1 et NRF2 contrôlent l'expression de nombreux gènes mitochondriaux. TFAM possède également en amont de son promoteur des séquences pouvant se lier à NRF1 et/ou NRF2, permettant ainsi une activation mitochondriale et nucléaire coordonnée. Les NRFs permettent également l'expression de nombreuses protéines mitochondriales codées par le noyau dont les gènes nécessaires aux 5 complexes de la chaîne respiratoire.

Les récepteurs nucléaires ERRs peuvent se lier à l'ADN sous forme mono-, homo-, ou hétérodimérique sur des séquences ERRE (ERR response element). Ils régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'internalisation des substrats énergétiques (AG et carbohydrates), la production et le transport d'ATP. Ils possèdent une activité constitutive mais la présence d'un domaine LBD (Ligand Binding Domain) dans leur structure suggère une régulation. Les ERRs sont exprimés dans les tissus à besoins énergétiques importants. ERR α est ubiquitaire, tandis que ERR β et ERR γ sont surtout exprimés dans le cœur et les reins [21].

CHAPITRE I : METABOLISME ENERGETIQUE DU CŒUR NORMAL

La famille des facteurs de transcription PPARs sont des récepteurs nucléaires qui forment des hétérotrimères avec les RXR et sont capables de se lier aux PPRE (PPARs response element). Toutes les isoformes sont exprimées dans le cœur mais PPAR α et PPAR β/δ sont les majoritaires. PPAR α joue un rôle majeur dans la régulation de l'expression de transporteurs membranaires, mitochondriaux d'acides gras et d'enzymes responsables de la β -oxydation. PPAR β/δ régulerait l'utilisation des lipides et des sucres ainsi que des processus anti-inflammatoires [21].

4. Régulation de la biogenèse mitochondriale

Comme vu précédemment, la régulation de la biogenèse mitochondriale se fait largement par le coactivateur PGC-1 α . Plusieurs voies de signalisation peuvent réguler l'expression et/ou l'activité de PGC-1 α (*Figure 19*).



Figure 19 : Les voies de régulation de PGC-1a

Les hormones thyroïdiennes (TH), les voies NOS/GMPc (NO synthase), p38MAPK (mitogen-activated protein kinase p38), les sirtuines (SIRTs), les voies de la calcineurine (CaN) et de la CaMK (calcium-calmoduline kinase), l'AMPK (AMP-activated kinase), les CDKs (cyclindependant kinases) et les stimulations β-adrénergiques (β/AMPc) ont été montrés comme impliquées dans la régulation de l'expression et/ou l'activité de PGC-1α. Ce co-activateur régule l'activité de nombreux facteurs de transcription tels que TRβ1 (thyroid receptor β1), les NRFs (nuclear respiratory factors), les ERRs (estrogen-related receptors) et les PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) qui sont impliqués dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale et/ou du métabolisme énergétique en général. *Issu de Ventura-Clapier et al, Cardiovasc Res, 2008.*

PGC-1 α est régulé de manière post-transcriptionnelle par plusieurs effecteurs, dont le calcium et les nucléotides cycliques. En effet, l'augmentation de l'activité contractile cardiaque est couplée à une augmentation soutenue de la concentration calcique intracellulaire qui constitue un signal capable d'activer des protéines dépendantes du calcium comme la calcineurine (Cn) et la calcium-calmoduline kinase (CamK). La Cn et la CamK sont toutes les deux capables d'activer PGC-1 α de manière directe ou indirecte [22, 23]. De plus, l'activation des récepteurs β -adrénergiques conduit à la production d'AMPc,

CHAPITRE I : METABOLISME ENERGETIQUE DU CŒUR NORMAL

capable d'activer le facteur de transcription CREB, par l'intermédiaire de la PKA qui le phosphoryle. La phosphorylation de CREB permet sa liaison à des éléments de réponse spécifiques, notamment sur le promoteur de PGC-1 α . L'expression de PGC-1 α , stimulée par CREB, est largement potentialisée par des co-activateurs de CREB : les TORCs [24]. CREB constitue donc un intégrateur des signaux AMPc et calcium via 2 kinases : la PKA et la CaMK. Le GMPc, second messager produit suite à l'activation de la guanylate cyclase soluble par le NO, est lui aussi impliqué dans la régulation de la biogenèse mitochondriale. En effet, la voie NO-GMPc induit l'expression de PGC-1 α , NRF, TFAM dans de nombreux types cellulaires [25, 26].

PGC-1 α est également régulé par d'importants senseurs du métabolisme, l'AMPK (la protéine kinase sensible à l'AMP) et les sirtuines. Le rôle de l'AMPK dans cette régulation sera développé dans le chapitre 3 de cette introduction. Les sirtuines sont des déacétylases dépendantes du NAD⁺ qui ont pour cible un grand nombre de protéines (histones et non-histones) impliquées notamment dans le métabolisme et la longévité. Elles portent également une activité ADP-ribosylase : Protéine acétylée + NAD⁺+ADP-ribose => Protéine + NAM+Acétyl-ADP-ribose. La réaction inverse est catalysée par l'acétyltransférase GCN5. Découvertes chez la levure, les sirtuines comptent 7 membres identifiés chez les mammifères dont SIRT1 est le plus étudié (*Figure 20*). SIRT1 contrôle différents processus métaboliques chez les mammifères. Les SIRTS sont connues pour contrôler la durée de vie associée à une phosphorylation oxydative mitochondriale et des capacités aérobies augmentées. Le resvératrol, un polyphénol, est connu pour augmenter la durée de vie, augmenter les capacités oxydatives chez les souris, et l'expression de certains gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative et la biogenèse mitochondriale. Ces effets se produisent via une augmentation de l'expression de PGC-1 α dépendante de SIRT1 [27].



Figure 20 : Schéma des voies de signalisation régulées par la sirtuine 1 Adapté de Nakagawa T et al, J Cell Science 2011

D'autre part, la restriction calorique induit une augmentation de la biogenèse mitochondriale qui est associée à une augmentation de l'expression de SIRT1 [28].

En plus de la régulation de son expression par divers stimulis métaboliques, PGC-1 α subit également des modifications post-traductionnelles. En effet, plusieurs travaux ont montré une phosphorylation de PGC-1 α par l'AMPK [29] et la p38-MAPK [30], une acétylation et une désacétylation par les sirtuines [31],une méthylation par PRMT1 (Proteine arginine N-méthyltransférase 1) [32] ou encore une SUMOylation [32].

B. Rôles de la mitochondrie

La mitochondrie est un organite hautement spécialisé dans la production aérobie d'ATP comme nous venons de le voir. En effet, c'est la « centrale énergétique » de la cellule, mais elle a d'autres fonctions cellulaire vitales telles que l'homéostasie calcique, la régulation du pH intracellulaire, la synthèse d'hormones stéroïdes et des hèmes, la thermogenèse et enfin l'apoptose (mort cellulaire programmée) [33] (*Figure 21*).

CHAPITRE I : METABOLISME ENERGETIQUE DU CŒUR NORMAL



Figure 21 : Schéma des différentes fonctions cellulaires de la mitochondrie

La mitochondrie est impliquée dans différentes formes de mort cellulaire qui disposent de voies de signalisation cellulaires propres. Elle est impliquée majoritairement dans l'apoptose et la nécrose. Elle est capable d'intégrer et de communiquer les signaux de mort cellulaire aussi bien extérieurs à la cellule qu'intérieurs comme les dommages à l'ADN, le stress oxydant, ou la carence nutritionnelle. L'apoptose peut être induite par deux voies de signalisation principales (intrinsèque ou extrinsèque) qui font toutes les deux intervenir la mitochondrie et qui ont pour effet final l'activation des caspases (exécutants de l'apoptose).

Les mitochondries sont la source majeure de production de ROS (Espèces Réactives de l'Oxygène) notamment au niveau de la chaîne respiratoire. Elles sont également la cible directe de leur effet néfaste. L'apoptose provoquée par les ROS est un phénomène important dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque. A des quantités physiologiques, les ROS jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire mais en quantité trop importante ils peuvent provoquer la mort cellulaire, ce pourquoi un équilibre entre production et élimination des ROS est important. Les mitochondries disposent pour cela de nombreux systèmes anti-oxydants comme la superoxide dismutase (SOD), la catalase (Cat) et la glutathion peroxidase (GPx) (*Figure 22*).



TRENDS in Endocrinology & Metabolism



La perte d'un électron de l'oxygène en O_2^{-} se passe majoritairement au niveau des complexes I et III. L' O_2^{-} produit par ces deux complexes peut être transformé en H_2O_2 par la CuZnSOD ou la MnSOD (Superoxide Dismutase) qui se trouve dans la mitochondrie. L' H_2O_2 peut être éliminé par la gluthatione peroxidase (GPX) dans la matrice mitochondriale ou la catalase dans le cytosol. L' O_2^{-} libéré dans l'espace intermembranaire peut aller dans le cytosol à travers VDAC (voltage dependant anion channel) et peut être transformé en H_2O_2 par la CuZnSOD cytosolique. Les ROS de la matrice peuvent également passer à travers le port de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP), formé par VDAC, la cyclophiline D (CypD) et le translocateur du nucléotide adénine (ANT), directement vers le cytosol pour contribuer à la mot cellulaire nécrotique. *Issu de Poyton et al, Trends in endocrinoly and metabolism, 2009.*

La mitochondrie joue également un rôle dans l'homéostasie calcique. En effet, le calcium peut rentrer dans la mitochondrie grâce à son gradient électrochimique. En revanche, la sortie se fait grâce à des processus actifs dépendants ou indépendants du sodium. Un excès de calcium peut provoquer un découplage de la phosphorylation oxydative, l'ouverture du mPTP (mitochondrial Permeability Transition Pore) et par conséquent la mort cellulaire. La mitochondrie contrôle l'excès de calcium en exerçant une balance entre l'entrée du calcium et les mécanismes d'extrusion du calcium [33].

IV. Les systèmes de transfert d'énergie

La cellule cardiaque, de par sa fonction, nécessite une concentration en ATP élevée au niveau des ATPases du Réticulum Sarcoplasmique (RS) et des myofilaments afin d'assurer une contractilité optimale. C'est une cellule très différenciée et organisée en compartiments spécialisés ce qui permet une colocalisation des sites producteurs et consommateurs d'énergie. La proximité des complexes glycolytiques et des mitochondries avec les ATPases du RS et des myofilaments permet une canalisation directe de l'ATP et de l'ADP au niveau de ces microdomaines. Cependant, la diffusion cytoplasmique reste limitée, d'autres systèmes de transfert d'énergie sont donc nécessaires. Il a été identifié deux

systèmes de transfert d'énergie dans les cardiomyocytes qui sont le système Créatine Kinase (CK) et le système Adénylate Kinase (AK) *(Figure 23)* [34]. Dans le cœur normal 80-88% du flux énergétique est porté par la PCr grâce à la CK, environ 15% par l'AK et les 5-7% restants par la glycolyse [35-37].



Figure 23 : Systèmes de transfert d'énergie AK : Adénylate Kinase ; CK : Créatine kinase ; mtCK : Créatine kinase mitochondriale ; ANT : Adénine nucléotide transférase ; *Issu de Guzun R, Acta Physiol, 2015.*

La CK catalyse le transfert réversible d'un groupement phosphate entre l'ATP et la créatine (Cr).

Le cœur adulte exprime 4 isoenzymes de CK. La CK cytosolique est sous forme de dimère M et B donnant 3 isoenzymes MM-, MB-, BB-CK (les deux dernières étant minoritaires). Il existe également une 4^{ème} isoenzyme mitochondriale (mi-CK). La MM-CK myofibrillaire est une protéine structurale du myofilament. Elle est couplée à la myosine ATPase et catalyse la phosphorylation de l'ADP induisant une concentration en ATP importante au voisinage de l'ATPase afin de permettre une contraction optimale. La MM-CK est également localisée au niveau du RS couplée à la SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase) et assure l'approvisionnement en énergie nécessaire au recaptage du calcium. La mi-CK est retrouvée dans l'espace intermembranaire des mitochondries, entre l'ANT située dans la membrane interne et VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) fixé dans la membrane externe. Elle permet le transfert d'un groupement phosphate d'un ATP provenant de la phosphorylation oxydative vers une Cr (Créatine). L'ADP ainsi libéré est immédiatement disponible pour stimuler la respiration. La connexion entre les CK mitochondriales et cytosoliques permet le transfert rapide de l'énergie de la mitochondrie vers les sites utilisateurs. Le transfert de la créatine vers la mi-CK contrôle l'activité de l'ATP synthase. Il y a donc un couplage efficace entre production et utilisation de l'énergie. L'AK constitue un autre système de transfert d'énergie essentiel pour la synthèse et l'homéostasie des nucléotides adényliques. Elle catalyse de façon réversible la réaction suivante : 2ADPs \Leftrightarrow ATP + AMP. L'AK1, isoforme majoritairement exprimée dans le myocarde, est localisée au niveau des myofilaments et du sarcolemme, tandis que l'isoforme AK2 se situe dans l'espace intermembranaire mitochondrial et l'AK3 dans la matrice. Elle permet également la transduction du signal métabolique porté par l'AMP.

V. Régulation du métabolisme énergétique

La particularité du cœur est qu'il travaille en condition d'homéostasie énergétique avec des concentrations en ATP, PCr et Cr constantes même lors d'un exercice intense où le travail et la consommation en oxygène vont varier de manière importante [3]. Pour maintenir cette homéostasie métabolique, des voies de signalisation importantes doivent exister afin d'assurer cette balance entre la consommation et la production d'énergie. Dans le cœur, de nombreux signaux permettent cette régulation comme l'oxygène, les substrats, l'ATP, l'ADP, la PCr, le calcium, le statut redox, les systèmes de transfert d'énergie. Parmi ces signaux, deux ont été plus particulièrement étudiés, comme le calcium qui régule la myosine et la SERCA d'une part ainsi que l'ATP synthase d'autre part [38-40]. Mais le calcium n'est pas le seul mécanisme qui permet cette coordination entre la production et la consommation d'énergie. L'ADP joue aussi un rôle majeur dans la régulation de la respiration mitochondriale. Des microdomaines énergétiques existent aux sites de production et de consommation d'énergie où la concentration en ADP et ATP peut être différente du reste de la cellule [41]. Ces microdomaines sont connectés grâce aux systèmes de transfert d'énergie et à l'architecture cellulaire. Ces réactions permettant la production et l'utilisation d'ATP sont intégrées dans des entités structurelles et fonctionnelles coordonnées de manière spatiale et temporelle. Les enzymes glycolytiques sont arrangées dans des complexes supramoléculaires liés aux myofilaments et au RS où elles participent à la production locale d'énergie utilisée plus rapidement par les pompes ioniques et autres structures membranaires [42]. Les mitochondries sont en étroite interaction avec le RS, les myofilaments et le noyau [43, 44]. Ces mécanismes permettant la régulation de la respiration et des flux énergétiques sont donc des systèmes biologiques incluant de petites variations locales de métabolites cytosoliques [45]. Ainsi les deux grands régulateurs de la production d'énergie dans la cellule cardiague sont le calcium ainsi que l'ATP et l'ADP grâce à ces microdomaines énergétiques (Figure 24).





Le rapport ATP/ADP à proximité de l'ATPase est finement contrôlé par des kinases de transfert de phosphate (myokinase MK, créatine kinase CK), les complexes glycolytiques, et les mitochondries sont en contact rapproché avec les autres organelles. *Issu de Ventura-Clapier et al, Biochim Biophys Acta, 2011.*

L'action de pompe du myocarde est une activité particulièrement consommatrice en énergie et 90% de son énergie est produite par la mitochondrie. Le métabolisme énergétique est donc essentiel au maintien de la fonction cardiaque. Le cœur possède une réserve en ATP très faible et il travaille en flux tendu. La régulation du métabolisme est donc cruciale afin de préserver la balance entre production d'énergie et consommation.

I. Insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque (IC) se définit par l'incapacité du cœur à apporter le volume requis de sang et d'oxygène aux tissus périphériques pour subvenir à leurs besoins métaboliques. Cela mène à un syndrome clinique qui se manifeste par des symptômes comme de l'essoufflement ou une fatigue au repos, des signes comme une pression veineuse jugulaire élevée, une tachycardie, des œdèmes...

L'IC est le plus souvent causée par des pathologies cardiaques sous-jacentes comme l'ischémie due à une perfusion altérée, comme des cardiomyopathies (idiopathiques ou toxiques) ou des valvulopathies. Il peut y avoir plusieurs facteurs de risques combinés. Les principaux sont l'hypertension, les coronaropathies, l'hyperglycémie et les diabètes, l'hypercholestérolémie, les maladies cardiaques congénitales, les maladies chroniques pulmonaires, et l'utilisation de toxines cardiaques [46] (*Figure 25*).



Figure 25 : Etiologies de l'insuffisance cardiaque

Le diagnostic de l'IC se fait à partir des critères de Framingham qui sont basés sur les signes cliniques et les symptômes du patient. Le diagnostic requiert au moins 2 critères majeurs, ou 1 critère majeur et deux critères mineurs, ou exceptionnellement 2 critères mineurs s'ils n'impliquent aucune atteinte d'un autre organe (*Table1*).

Major criteria	Minor criteria
Paroxysmal nocturnal dyspnea	Bilateral ankle edema
Basal crepitations	Dyspnea on ordinary exertion
(> 10 cm above the lung base)	
Third heart sound (S3 gallop)	Tachycardia (>120 bpm)
Cardiomegaly	Nocturnal cough
Increased central venous pressure	Hepato(Spleno)megaly
(>12 cmH ₂ O in the right atrium)	
Jugular vein distension	Pleural effusion
Acute pulmonary edema	Decrease in vital capacity by one-third from max.
Hepatojugular reflux	
Weight loss >4.5 kg/5 days in response to treatment	

 Table 1 : Critères de Framingham de diagnostic de l'IC

 Issu de Tanai, Compr Physiol, 2015

Une autre classification complémentaire a été établie par l'American College of Cardiology (ACC) et l'American Heart Association (AHA) qui permet d'évaluer le stade de l'IC (*Table 2*).

Stage	Description
A: High risk for developing heart failure	Hypertension, diabetes mellitus, family history of cardiomyopathy
B: Asymptomatic heart failure	Previous myocardial infarction, left ventricle dysfunction, valvular heart disease
C: Symptomatic heart failure	Structural heart disease, dyspnoea and fatigue, impaired exercise tolerance
D: Refractory end-stage heart failure	Marked symptoms at rest despite maximal medical therapy

 Table 2 : Classification des stades de developpement de l'IC par l'American College of Cardiology (ACC)

 Issu de Tanai, Compr Physiol, 2015.

Le risque de développer une IC pour une personne de 40 ans est de 1 sur 5 en Europe et en Amérique du Nord [47]. Malgré les nombreuses stratégies thérapeutiques développées, le risque de décès pour les patients atteints d'insuffisance cardiaque est important, avec une mortalité de 25 à 50%, 5 ans après le diagnostic.

Parmi les patients avec une IC diagnostiquée, plus de 50% présentent une fraction d'éjection (FE) diminuée (<40%) (HFrEF ; Heart Failure with reduced Ejection Fraction) et un peu moins de 50% ont une FE préservée (>49%), souvent avec une fonction diastolique altérée (HFpEF ; Heart Failure with preserved Ejection Fraction). L'HFrEF ou insuffisance systolique se caractérise par une contractilité du ventricule gauche diminuée, et induit par conséquent une diminution de la FE. L'HFpEF ou insuffisance diastolique se caractérise par une relaxation et un remplissage des ventricules altérés, une augmentation de la rigidité des ventricules et une surcharge de pression [46].

II. Remodelage cardiaque

L'IC est généralement précédée d'un processus de remodelage macroscopique qui inclut des altérations de structure, de forme et de fonction, celles-ci induites par le stimulus pathologique.

Lors d'une surcharge de pression ou de volume, le cœur rentre dans un premier temps dans une phase de compensation afin de réduire la pression ventriculaire et maintenir la fonction cardiaque. Il existe deux types de compensation. Lorsqu'il y a une surcharge de pression, lors d'une hypertension ou d'une sténose aortique, le cœur développe une hypertrophie concentrique avec des cardiomyocytes qui augmentent plus en épaisseur qu'en longueur, ce qui augmente l'épaisseur des parois et permet de diminuer la pression. Tandis que lorsqu'il y a une surcharge de volume, comme lors d'un infarctus ou une cardiomyopathie dilatée, les cardiomyocytes restants se réarrangent en formant une hypertrophie excentrique avec une augmentation de leur longueur. Ce réarrangement des cardiomyocytes s'accompagne d'un volume ventriculaire plus important et d'une dilatation [48].

L'hypertrophie caractérisée par une augmentation de la taille des cardiomyocytes, est associée à une augmentation de la transcription de gènes ainsi que des niveaux de traduction, et un métabolisme énergétique augmenté. Ces altérations induisent également des modifications de la matrice extracellulaire (MEC) (fibrose) et de l'angiogenèse. Si le stimulus hypertrophique persiste, l'hypertrophie devient maladaptative, le ventricule va se dilater, la fonction va diminuer et le cœur va devenir insuffisant.

A. Remodelage cellulaire

Le cœur contient de multiples types cellulaires comme les cardiomyocytes (qui représentent 30% du nombre total de cellules du cœur, et environ 70-80% du volume total), les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales contenues dans les vaisseaux, ainsi que des cellules immunitaires.

Les cardiomyocytes ne se divisant pas, lors de l'hypertrophie cardiaque il y a donc un élargissement des cardiomyocytes préexistants. La croissance des cardiomyocytes est le résultat d'une augmentation globale de synthèse protéique et s'accompagne d'une réexpression de nombreux gènes fœtaux incluant des facteurs de transcription (GATA, MEFA, Nkx2.5...) ainsi que des gènes impliqués dans la contraction, le métabolisme énergétique et la signalisation hormonale [49, 50].

Chez le rongeur, il y a également une diminution de la forme rapide de myosine (α -MHC) au profit de l'isoforme lente (β -MHC) responsable de la diminution de la vitesse de contraction [51]. Chez l'homme, cette reprogrammation est moindre car la β -MHC est déjà l'isoforme majoritaire. Il y a en parallèle une augmentation de l'expression de l' α -actine afin de maintenir une contractilité cardiaque optimale.

Lorsque les limites du processus adaptatif (reprogrammation des gènes fœtaux et croissance des cardiomyocytes) sont atteintes, les mécanismes compensatoires du processus hypertrophique sont dépassés et survient la transition vers l'IC. Les sarcomères vont s'étirer et vont mener à une dilatation ventriculaire.

Dans le cœur normal, l'apoptose survient à un très faible niveau et permet d'éliminer les cellules endommagées. Dans l'IC, il y a une augmentation du niveau d'apoptose et cela contribue à la transition de l'hypertrophie vers l'IC [52, 53]. On observe une augmentation des récepteurs cellulaires de voie de signalisation de mort comme TNF- α (tumor necrosis factor α), de l'augmentation de la voie apoptotique mitochondriale avec Bax et Bak et une libération du cytochrome c.

En conséquence de ces réactions inadaptées, la surcharge de pression ou de volume affecte les cardiomyocytes restants, ce qui mène à une diminution de la contractilité.

B. Fibrose

La fibrose est l'accumulation progressive de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) comme les collagènes, la fibronectine, les métalloprotéases de la matrice MMPs, ou les inhibiteurs de MMPs (TIMPs) dans le cœur. C'est un phénomène que l'on retrouve dans de nombreuses pathologies cardiaques [54].

Dans le cœur normal, les fibroblastes cardiaques produisent du collagène I et III. C'est un processus constant où le nouveau collagène remplace l'ancien qui est par la suite dégradé. Les fibroblastes maintiennent un niveau constant de collagène via la sécrétion de cytokines, de facteurs de croissance, et de MMPs. La MEC constitue un réseau organisé autour des cardiomyocytes qui sert de support aux composants cellulaires mais est également utile au maintien mécanique, chimique et électrique afin d'assurer l'homéostasie et la coordination de la fonction contractile et du couplage électrique entre les cardiomyocytes.

Les phases les plus précoces de la fibrose lors de pathologies cardiaques sont l'augmentation de l'expression de collagènes de type I et III et de fibronectine. Au fur et à mesure de la progression de la fibrose, de nouvelles variétés de protéines matricielles apparaissent comme les glycoprotéines (thrombospondine, vitronectine...), des protéoglycanes (decorine, perlecan, heparane sulfate ...), ou bien des protéines constitutives des membranes basales comme la laminine ou le collagène de type IV [55]. La mort cellulaire et les stimuli pathologiques comme une augmentation chronique de pression ou de volume activent les voies de signalisation pro-fibrosantes.

Plusieurs types cellulaires peuvent contribuer au développement de la fibrose, soit de manière directe comme les fibroblastes en produisant les protéines matricielles, ou alors de manière indirecte comme les macrophages, les cellules mastocytaires, les cardiomyocytes, et les cellules vasculaires en secrétant des médiateurs fibrogéniques comme le TNF- α , le TGF- β (transforming growth factor β), le CTGF (Connective tissue growth factor) et l'endothéline 1 (ET-1). La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est également un évènement crucial. Les myofibroblastes ont une prolifération plus importante et une mobilité également plus importante pour se rendre sur le site endommagé.

1. TGF-β

Le TGF- β est induit lors de la réparation du tissu normal et il va induire à son tour la production de protéines de la MEC par les fibroblastes. Il a plusieurs rôles majeurs, car il agit notamment comme suppresseur du système immunitaire et de la prolifération endothéliale.

Il possède 3 isoformes : β 1, β 2 et β 3 qui sont d'abord produites sous forme inactive, puis vont être ensuite clivées pour être activées par la plasmine ou la thrombospondine-1 (TSP-1). L'isoforme majoritaire de TGF- β dans le cœur est TGF- β 1. Le TGF- β actif va se lier aux récepteurs de type I et II, et par l'intermédiaire des smads, TGF- β 1 va induire la transcription de gènes pro-fibrosants. Il est largement accepté que l'angiotensine II est un inducteur important de la fibrogenèse, et que TGF- β est le médiateur des effets profibrosants de l'angiotensine II. En effet, elle régule l'expression de TGF- β 1 dans les fibroblastes [56, 57]. De plus, les antagonistes de l'angiotensine II bloquent l'augmentation d'expression de TGF-β1 dans le cœur et les vaisseaux chez le rat hypertendu [58].

Le TGF- β est une cytokine pro-fibrosante. En effet, l'augmentation de l'expression de TGF- β dans la cicatrice de l'infarctus est corrélée à l'augmentation de l'expression du collagène I, de smad 2, 3 et 4 dans cette cicatrice [59]. Le TGF- β induit directement l'augmentation de l'expression de collagène I par les fibroblastes. Les souris déficientes en TGF- β 1 présentent des dépôts de collagène réduits, une réponse inflammatoire généralisée et une nécrose du tissu entrainant une défaillance de l'organe [60, 61].

2. Le CTGF

Le CTGF est une cible en aval du TGF-β. C'est un membre de la famille des « CCN » qui sont des protéines sécrétées. Le CTGF est un important régulateur de la fibrose tissulaire dans différents organes y compris le cœur [62-64]. En effet, l'expression de CTGF induite par TGF-β se fait par une cascade de signalisation impliquant Smad, Ets-1, ras/MEK/ERK, MMP3, SP1/3, YAP. Le CTGF agit sur un grand nombre d'effecteurs comme plusieurs récepteurs, des facteurs de croissance, et des molécules de signalisation. Il joue un rôle dans l'organisation matricielle, et la transduction du signal par la promotion de l'adhésion cellulaire et/ou agissant comme un pont entre signalisation extracellulaire et intracellulaire.

Dans le cœur normal, le CTGF est exprimé dans les fibroblastes, mais lors du remodelage cardiaque, il peut être exprimé dans les cardiomyocytes. Néanmoins, les cellules sécrétrices principales étant les myofibroblastes, ce sont la source principale de CTGF sécrété [65].

L'expression du CTGF est augmentée dans le cœur insuffisant et hypertrophique des modèles animaux expérimentaux comme la constriction aortique transverse (TAC) chez le rat [63, 66].

3. Dégradation

L'homéostasie de la MEC résulte d'une balance entre la synthèse et la dégradation des protéines la constituant. La fibrose est la conséquence à la fois d'une augmentation de la synthèse et d'une diminution de la dégradation. Le cœur normal contient de nombreuses protéases impliquées dans la dégradation de la matrice comme les MMPs, il en existe plusieurs avec des substrats de la matrice extracellulaire différents pour chaque MMPs. Il existe également les TIMPs qui sont des inhibiteurs naturels des MMPs, et inhibent leur activité protéolytique.

En plus de leur activité d'inhibition sur les MMPs, les TIMPs présentent de multiples fonctions dans les domaines de croissance cellulaire, d'apoptose, de survie, de stéroïdogenèse, d'angiogenèse, et d'embryogenèse.

4. Les miRNAs

Plusieurs études ont démontré un rôle de régulation des miRNAs dans le métabolisme des collagènes [67]. Les miR-29, miR-133, miR-26a, miR-24, miR-19a-3p/19b-3p, et miR101a sont les principaux miRs antifibrosants, tandis que le principal miR profibrosant est miR-21 (*Figure 27*).



Figure 26 : miARNs jouant un rôle dans le développement de la fibrose En bleu : action anti-fibrosante, en rouge : action pro-fibrosante. *Issu de Wang H, Biochimica et Biophysica Acta, 2017.*

La famille des miR-29 contient 3 membres, miR29a, miR29b, miR-29c. La famille des miR-29 est associée à plusieurs gènes de la MEC codant pour la brilline, l'élastine, et des collagènes. Elle régule l'expression de gènes profibrosants dont l'élastine, la fibrilline 1 (Fbn 1), le collagène de type I, α 1 et 2 (col1 α 1, col1 α 2) et le collagène de type III, α 1 (col3 α 1). La surexpression de miR-29 dans les fibroblastes cardiaques diminue l'expression de collagène [68]. Zhang et al [69] ont montré que lors d'une surexpression de miR-29b dans le cœur, il y avait une diminution de la progression de la fibrose dans le cœur et une amélioration de la fonction cardiaque via la voie de signalisation TGF- β /Smad3 qui est une cible du miR-29b.

L'implication du miR-133 dans la fibrose cardiaque a été mise en évidence dans un modèle d'invalidation pour le miR-133a-1/2 qui mène à une fibrose sévère du myocarde et à une IC [70]. Matkovich et al [71] ont montré à l'aide d'une surexpression transgénique dans les cardiomyocytes que miR-133 atténue la fibrose et l'apoptose induite par une surcharge de pression. Il semblerait que le miR-133 ait un effet

protecteur en ciblant le récepteur du TGF-β1 [72]. Le rôle de miR-133a dans la régulation de l'expression de col1α1, Serca2a et CaN (calcineurine) a été montré dans des modèles pathologiques de fibrose induite par surcharge de pression [71, 73].

Le miR-26a atténue le dépôt de collagènes en ciblant col1 α 2 et col1 α 1 [74]. Son expression est diminuée dans les fibroblastes dans l'IC en ciblant KCNJ2 (le membre 2 de la sous famille J des canaux potassiques)[75].

Les miR-19a-3p/19b-3p, faiblement exprimés dans le plasma de patient IC, inhibent l'effet de Smad2 et la phosphorylation d'Akt (protéine kinase B) via le récepteur II du TGFβ [76].

Dans un modèle d'infarctus, il a été démontré que miR-24 cible la pro-protéine convertase furine, nécessaire à l'excrétion de TGF-β et par conséquent, diminue les niveaux de TGF-β dans les fibroblastes cardiaques [77]. Et de ce fait il a été démontré que la surexpression de miR-24 dans le cœur de souris avec infarctus induit une diminution de la taille de l'infarctus et améliore la fonction cardiaque.

Les miR-101 et 101-a régulent négativement la signalisation du TGF-β en ciblant le TGFβR1 et c-Fos. Il a donc été démontré que la fibrose cardiaque était diminuée par activation du miR-101 chez le rat avec infarctus [78, 79].

L'expression du miR-21 augmente spécifiquement dans les fibroblastes du cœur insuffisant en comparaison avec les autres types cellulaires chez la souris [80]. MiR-21 régule la survie des fibroblastes et l'expression des facteurs de croissance en augmentant l'activité de ERK-MAP kinase à travers l'inhibition de l'homologue 1 de sprouty (Spry1). Il induit donc de la fibrose et de l'hypertrophie. Mir-21 peut également être responsable d'arythmies par induction de fibrose au niveau des oreillettes. Les résultats concernant l'importance de miR-21 dans la physiopathologie de l'IC sont contradictoires. Certaines études montrent en effet que l'inhibition de miR-21 ne réduit pas le remodelage cardiaque pathologique et ne prévient pas la dysfonction cardiaque [81].



C. Homéostasie Calcique

Figure 27 : Transport de calcium dans les cardiomyocytes

L'entrée de Ca²⁺ par le canal ICa active le réticulum sarcoplasmique (SR) qui relargue le calcium via le récepteur à la ryanodine (RyR) ce qui induit une activation des myofilaments. L'entrée de calcium dans le SR via la SR-Ca²⁺-ATPase et son extrusion par l'échangeur sodium/calcium (NCX) permettent la relaxation du sarcolemme. *Issu de Bers DM, Annu Rev Physiol, 2014.*

La contraction du cœur est régulée par des changements cycliques de concentration de calcium au sein des cardiomyocytes. Lors d'un potentiel d'action normal et du couplage excitation/contraction, une petite quantité de calcium entre dans la cellule via le canal calcique de type L (LTCC) et en moindre quantité par l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ (NCX) localisés au niveau des tubules T. Le calcium va se lier au récepteur à la Ryanodine (RyR) situé sur le réticulum sarcoplasmique (RS) ce qui va induire le phénomène de « Ca²⁺ induced Ca²⁺ release », c'est à dire une libération de calcium dans le cytosol par le RS. L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, va induire la liaison du calcium au niveau de la troponine C des filaments fins d'actine des sarcomères. Ceci va modifier les interactions protéines-protéines au sein du filament et va permettre un pont entre les filaments fins et épais, ce qui provoque la contraction. Pour que la relaxation se fasse, il faut que la concentration en calcium intracellulaire diminue. Une fois que celle-ci a diminué, le calcium va se dissocier des myofilaments. Cette concentration va diminuer car l'entrée de calcium va être stoppée, il y aura également un transport actif de calcium dans le RS grâce à la Ca-ATPase (SERCA) ou hors de la cellule grâce au NCX, mais également grâce à la Ca-ATPase sarcolemmale (PMCA) et l'uniporteur mitochondrial calcique (MCU). La SERCA est régulée par le phospholamban (PLN), qui va l'inhiber lorsqu'il sera sous sa forme déphosphorylée.

Des altérations au niveau de l'homéostasie calcique peuvent entrainer des dysfonctions contractiles. Une altération de la fonction de la SERCA provoquée par une diminution de son expression ou une diminution de la phosphorylation du PLN entraine une augmentation du calcium cytosolique. Ceci va diminuer la relaxation et diminuer le pool de calcium du RS disponible pour la systole suivante. Une diminution de l'activité de SERCA a été observée dans de nombreux modèles d'IC [82, 83]. Une fuite de calcium par le RyR peut également contribuer à une dysfonction contractile en diminuant les réserves de calcium du RS, en augmentant la concentration en calcium cytosolique et en augmentant la probabilité de survenue d'arythmies et par conséquence les besoins énergétiques [84]. Des altérations au niveau des tubules T peuvent également contribuer à la dysfonction contractile dans l'IC, car une association étroite doit être maintenue entre le LTCC et RyR pour une libération synchronisée de calcium par le RS [85].

D. Stress oxydant

Le stress oxydant se produit lorsqu'il y a un déséquilibre entre la production de ROS et leur élimination par les systèmes de détoxification (SOD, Cat, GPX).

Une production excessive de ROS est associée à l'hypertrophie pathologique et à l'IC chez l'Homme et dans différents modèles animaux [86]. Des études ont montré que des stimuli hypertrophiques comme l'angiotensine II (AngII), ET-1, les catécholamines, les cytokines, ainsi que des stress mécaniques induisent une augmentation de la production de ROS dans les cardiomyocytes [87], et que ceux-ci peuvent activer des voies de signalisation ou des facteurs de transcription comme la voie ERK1/2 ou le facteur nucléaire κ B (NF- κ B) [88]. L'augmentation des ROS par la NADPH oxydase ou par la mitochondrie dans le cadre de pathologies cardiaques peut contribuer au développement de l'hypertrophie, de la fibrose, de l'apoptose et à une diminution de la contractilité [86, 88, 89].

E. Inflammation

La surcharge de pression ou l'infarctus peuvent activer le système immunitaire et induire une inflammation. L'augmentation de cytokine pro-inflammatoire TNF- α a été montrée dans divers modèles pathologiques expérimentaux [90, 91] et chez les patients atteints d'IC [92, 93]. D'autres cytokines, comme les toll like receptor (TLR) et des interleukines (IL) sont impliquées dans le remodelage cardiaque pathologique et contribuent à la dysfonction contractile, l'augmentation de ROS, et à l'induction de l'apoptose et de la fibrose. La réponse inflammatoire à court terme est une réponse adaptative importante pour la réparation cardiaque. Par exemple, TLR2 semble être crucial pour l'adaptation du cœur à la surcharge de pression. Cependant, une réponse inflammatoire chronique est délétère et peut induire un dommage tissulaire, un remodelage cardiaque inadapté, et une IC [94].

F. Angiogenèse

L'angiogenèse est un processus important du remodelage cardiaque qui permet le maintien de la perfusion et l'apport de nutriment lors de l'hypertrophie cardiaque, grâce à une signalisation paracrine entre les cardiomyocytes et les vaisseaux. En effet, l'inhibition de l'angiogenèse lors de l'hypertrophie adaptative mène à une dysfonction cardiaque [95]. Lorsque l'angiogenèse est stimulée pendant une surcharge de pression, celle-ci est protectrice et prévient le cœur hypertrophié de la transition vers l'IC [96]. Il existe une corrélation significative entre la densité capillaire et la masse du ventricule gauche chez les patients avec une sténose aortique et une fraction d'éjection préservée [97]. A l'inverse, lorsque l'on a un remodelage cardiaque pathologique, on retrouve une diminution de la densité capillaire [98].

III. Remodelage métabolique

Des changements du métabolisme énergétique au cours de l'insuffisance cardiaque se retrouvent au niveau des 3 composantes du métabolisme, c'est-à-dire au niveau : de l'utilisation des substrats, de la production d'énergie, et au niveau de son transfert et de son utilisation [2]. L'utilisation de la spectroscopie de RMN du phosphore-31 permet une évaluation quantitative in vivo de 3 des métabolites clés participant au transfert de l'énergie dans la cellule cardiaque, à savoir la phosphocréatine (PCr), le Pi libre et l'ATP. Le rapport PCr/ATP est largement utilisé comme un index de l'état énergétique cellulaire [99, 100]. Plusieurs études ont rapporté que le rapport PCr/ATP était diminué chez les patients atteints d'IC. Il apparait comme un bon facteur prédictif d'une dysfonction ventriculaire gauche [101].



Figure 28 : Altérations des 3 composants du métabolisme énergétique cardiaque lors de l'IC. Issu de Neubauer et al, N Engl J Med, 2007

A. Utilisation des substrats

L'utilisation des substrats dans l'IC peut être limitante au niveau de l'entrée des substrats et également au niveau de leur oxydation (*Figure 28*). Durant la phase adaptative de l'hypertrophie, la source d'énergie du myocarde change, l'utilisation des AG décline au profit de l'utilisation du glucose. Cependant, cela dépend du stimulus qui induit l'hypertrophie. Le stimulus peut être physiologique (exercice ou grossesse)

ou pathologique (hypertension). Lors de la pratique d'un exercice physique, il y aura une augmentation de l'utilisation des AG, alors que lors d'une hypertension, il y aura plutôt une diminution de l'utilisation des acides gras [102].

Dans le premier stade de l'IC, on retrouve une utilisation normale ou légèrement augmentée des AG. A des stades plus avancés ou terminaux de l'IC, on a une diminution de l'utilisation des AG [103] liée à un remodelage métabolique avec une diminution de la régulation de la voie de signalisation PPAR α /RXR α [104]. La diminution de l'oxydation des AG peut également être expliquée par une activation de la voie HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α)-PPAR γ qui altère le transport des AG dans la mitochondrie et diminue la régulation des enzymes de l'oxydation des AG [105]. Cependant, la diminution de l'oxydation des AG n'est pas associée à une diminution de l'entrée des AG dans la cellule, a contrario les niveaux d'acides gras plasmatiques augmentent dans les stades avancés de l'IC, ce qui a pour conséquence une entrée d'acide gras dans la cellule augmentée [106, 107]. Cette accumulation cellulaire de lipides est en partie stockée sous forme de TAGs (triacylglycerol) mais peut aussi entrer dans des voies non oxydatives générant des lipides toxiques comme les céramides et le diacylglycérol. Cette lipotoxicité peut engendrer une dysfonction mitochondriale et contribuer à la progression de l'IC [108, 109].

Une augmentation de la glycolyse ou des enzymes glycolytiques peut être observée lors de l'hypertrophie, mais rapidement elle diminue comme l'expression des enzymes et des transporteurs de la glycolyse et l'oxydation des hydrates de carbone [110] (*Figure 28*).

Ce processus de remodelage mène rapidement à un stade de décompensation, l'adaptation métabolique devient insuffisante, l'efficacité de la glycolyse diminue [111], ainsi que la flexibilité métabolique [112]. Ce défaut d'utilisation des substrats peut alors contribuer à la dysfonction contractile et au remodelage cardiaque ainsi qu'à la transition vers l'IC.

B. Fonction et capacité mitochondriale

La capacité oxydative de la mitochondrie est déterminée par la masse mitochondriale et par son activité intrinsèque. Dans l'IC, on retrouve des anomalies structurales des mitochondries et une augmentation en nombre [113]. Les propriétés mitochondriales évaluées sur fibres cardiaques perméabilisées montrent que la capacité oxydative maximale est diminuée et la régulation de la respiration est altérée chez l'Homme et l'animal [114-117]. Chez des patients atteints d'IC et dans des modèles animaux, il a été retrouvé une diminution de l'activité des enzymes du cycle de Krebs, des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase [118, 119], et ceci corrèle avec la fraction d'éjection [120]. Des études transcriptomiques et protéomiques à grande échelle ont permis de confirmer les altérations au niveau de

la production d'énergie et les dysfonctions mitochondriales et leur implication dans le développement de l'IC [121, 122].

Les mitochondries peuvent également montrer des modifications de leurs propriétés. La diminution du rapport ADP/O reflète une diminution de 14% de l'efficacité du cœur insuffisant [123]. Les mitochondries montrent une augmentation de la susceptibilité au calcium et aux ROS, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité de la membrane interne qui peut être due à une augmentation de l'ouverture du PTP [124]. Par ailleurs, le cœur insuffisant montre également un défaut de régulation de la phosphorylation oxydative par les accepteurs de phosphate AMP, ADP et créatine [114, 125]. Ceci est donc responsable d'une production d'énergie moins importante et moins efficace par les mitochondries dans l'IC (*Figure 28*).

C. Transferts d'énergie

Une diminution des transferts et de l'utilisation de l'ATP peut avoir pour conséquence une fonction contractile altérée car il y a un niveau insuffisant de transfert de liaisons riches en énergie vers les myofibrilles et une augmentation de la concentration en ADP [114]. Dans les stades précoces de l'IC, la quantité d'ATP est normale et diminue de 30 à 40 % à des stades plus avancés [101], tandis que, les quantités de phosphocréatine et créatine diminuent dès les stades précoces de l'IC de 30 à 70% [126]. Il est à noter que le système créatine-kinase subit également de profondes modifications dans l'IC. L'activité de la mi-CK diminue de 80% et l'activité de la MM-CK de 50% [114]. De plus, la mesure du flux d'ATP via le système CK montre une réduction de l'ATP transféré vers les myofibrilles de 71% dans le mypcarde de patient IC [127].

Ces altérations métaboliques contribuent à la dysfonction contractile et particulièrement à la perte de réserve inotrope caractéristique du myocarde défaillant (*Figure 28*).

D. Biogenèse mitochondriale

Notre équipe a montré précédemment dans un modèle d'IC induite par surcharge de pression chez le rat, une diminution de la fonction mitochondriale dans le muscle cardiaque et les muscles squelettiques, liée à une altération de l'expression des protéines mitochondriales associée à une diminution de l'expression de PGC-1 α et de ses cibles, les facteurs de transcription NRFs et TFAM [115]. La diminution de l'expression de PGC-1 α a par la suite été montrée dans de nombreux modèles d'IC [128]. ERR α ainsi que ses gènes cibles, ont également été décrits comme participant à la diminution des capacités métaboliques mitochondriales dans l'IC [129].

Nous avons également observé dans notre modèle une diminution de l'expression de PGC-1 β , qui a également été retrouvée chez des patients atteints de cardiomyopathie dilatée [130]. Cette diminution de l'expression concomitante de PGC-1 α et PGC-1 β renforce l'importance de la biogenèse mitochondriale dans le développement de cette pathologie.

E. Rôle des cardiolipides

Plusieurs études ont montré un lien entre cardiolipides et pathologies cardiovasculaires. Dès les stades précoces d'ischémie/reperfusion (I/R) chez le rat, on observe une augmentation de la production de ROS. Pendant et après l'I/R, les ROS induisent une peroxydation des lipides ainsi que des altérations au niveau de macromolécules cellulaires et au niveau de la chaîne respiratoire. Ces altérations peuvent mener à de l'apoptose, de la nécrose et à un dommage tissulaire [131, 132]. Les espèces de CL insaturées proches des sites de production de ROS sont plus susceptibles de subir des dommages oxydatifs. Dans le cœur de rat pendant I/R, les niveaux de CL totaux sont significativement plus bas et les niveaux de CL peroxydés sont augmentés [133]. La baisse de cardiolipides a été associée à une diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, en particulier pour le complexe I [134], le complexe III [135], et le complexe IV [133]. L'activité enzymatique de ces complexes est restaurée par addition exogène de CL. Par ailleurs, la diminution de CL induit une dysfonction de la chaîne respiratoire, ce qui augmente à nouveau la production de ROS. Les CL peuvent également se lier au cytochrome c, les CL liés au cytochrome c ont une activité peroxydase et produisent des CL hydropéroxydes [136].

Dans des modèles de rats rendus spontanément hypertensifs ou des patients IC, on retrouve une diminution des niveaux d'ARNm de tafazzine, avec une augmentation de l'activité phosphatidylglycérophosphate synthase et de MLCL transférase [137]. Dans un modèle de cardiotoxicité induite par traitement à la doxorubicine, il existe également un remodelage des cardiolipides [138].

Un déficit en CL peut mener à une dysfonction mitochondriale et par conséquent à une dysfonction cardiaque. Les CL interagissent avec de nombreuses protéines mitochondriales comme les complexes de la chaîne respiratoire incluant les protéines composant les complexe I [139, 140], le complexe III [141, 142], l'ATP synthase [143] et le cytochrome c [144]. Le déficit en CL peut donc impacter négativement l'activité de ces complexes. Plusieurs études montrent que l'oxydation des CL induite par les ROS induit l'inactivation des complexes I, III et IV. Des études *in vitro* montrent que l'ajout de liposomes de CL permet de prévenir les altérations induites par l'oxydation des CL. Dans les mitochondries de mammifères, au niveau des supercomplexes, on retrouve le complexe I associé avec des dimères du complexe II et jusqu'à 4 monomères de complexe IV. Les CL sont nécessaires à l'assemblage et à la stabilité de ces supercomplexes. En plus des altérations au niveau de la chaîne respiratoire, le déficit en CL induit

d'autres dommages comme des dysfonctions au niveau de l'import de protéine [145]. Les cardiolipides sont donc essentiels au maintien de la fonction mitochondriale.

IV. Atteintes périphériques

Les activations neurohormonales compensatoires mises en place au cours du processus hypertrophique sont à terme responsables de désordres périphériques qui exercent des effets délétères sur la fonction cardiaque.

L'activation du système nerveux sympathique, du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et la synthèse d'endothéline induisent une vasoconstriction générale visant à maintenir un débit sanguin suffisant au niveau des tissus à hauts besoins énergétiques (cœur, cerveau ...). De plus, la vasoconstriction des artères rénales ainsi que la réabsorption sodée stimulée par l'aldostérone et l'excrétion d'eau diminuée par la vasopressine sont responsables d'une rétention hydrosodée importante et d'une augmentation de la volémie. L'ensemble de ces mécanismes est responsable d'une élévation des résistances périphériques et de l'apparition d'œdèmes augmentant le travail cardiaque et précipitant sa dysfonction.

Au niveau pulmonaire, l'augmentation des pressions conduit à l'apparition d'œdèmes d'abord interstitiels puis alvéolaires. Les conséquences de ces mécanismes peuvent conduire à des effusions pleurales et accélérer la dysfonction cardiaque en provoquant une surcharge du ventricule droit. Les œdèmes pulmonaires, associés à la diminution du débit cardiaque sont responsables d'une dyspnée à l'effort puis au repos.

Au niveau rénal, le débit de filtration glomérulaire est maintenu grâce au pouvoir vasoconstricteur de l'angiotensine II. Cependant, ce mécanisme peut conduire au développement d'une insuffisance rénale.

Le foie et les muscles squelettiques sont également touchés. L'augmentation des résistances périphériques est responsable d'une hypertension veineuse qui peut provoquer une congestion hépatique. Les muscles présentent une atrophie et une répartition typologique des fibres modifiée : avec une réduction du nombre de fibres rouges oxydatives au profit des fibres blanches glycolytiques. Ces désordres musculaires sont responsables d'un déconditionnement musculaire caractérisé par une incapacité à l'exercice chez les patients IC.

Le métabolisme des muscles squelettiques est aussi atteint dans l'insuffisance cardiaque [146] avec une diminution en particulier de la biogenèse mitochondriale amenant au concept d'une myopathie métabolique généralisée dans l'insuffisance cardiaque.
CHAPITRE III : DIMORPHISME SEXUEL DE LA PHYSIOPATHOLOGIE CARDIOVASCULAIRE

Les différences entre les hommes et les femmes sont importantes dans le système cardiovasculaire. Elles peuvent être épidémiologiques, physiopathologiques, concerner les manifestations cliniques ou la réponse aux traitements. Ces différences peuvent être dues à des différences biologiques mais sont également influencées par l'environnement comme la nutrition, l'activité physique ou le stress ainsi que le contexte socio-culturel. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux mécanismes biologiques qui induisent ce dimorphisme sexuel.

I. Dimorphisme sexuel des pathologies cardiovasculaires

Les hommes et les femmes sont susceptibles de développer différentes maladies cardiovasculaires [147] (Figure 29). En effet, la prévalence des maladies coronariennes obstructives est plus importante chez les hommes que chez les femmes. En revanche, les femmes sont plus susceptibles de développer des pathologies coronariennes non-obstructives ou des dysfonctions microvasculaires. Le défaut de perfusion du myocarde peut se situer au niveau des coronaires épicardiques, dû à de l'athérosclérose (maladies coronariennes obstructives), ce qui est plus fréquent chez les hommes, ou dû à un défaut de réactivité vasculaire, comme des spasmes ou une dysfonction endothéliale, ce qui est plus fréquent chez les femmes [148, 149]. Les femmes sont également susceptibles de développer d'autres pathologies ischémiques comme les dissections de l'artère coronaire et les Takotsubo. Les dissections de l'artère coronaire spontanées se produisent à 90% chez des femmes âgées de moins de 60 ans et les 34 se produisent au cours d'une grossesse. Le Takotsubo se manifeste comme un syndrome coronarien aigu généralement précédé d'un stress psychologique ou physique. Cependant, son étiologie est peu connue. La diminution des œstrogènes circulants après la ménopause pourrait contribuer à l'augmentation de la sensibilité du cœur aux catécholamines circulantes. De manière générale, la physiopathologie des dysfonctions microvasculaires est très peu connue et plus de recherches sont nécessaires afin de la comprendre.

Après la puberté, les arythmies sont plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes. Les femmes ont un risque plus important de développer des torsades de pointes (avec intervalle QT long de type 1 et 2 : début de l'onde Q et la fin de l'onde T, correspond à la durée électrique de la contraction cardiaque ou systole) [150]. L'hypothèse formulée est que la testostérone contribue à diminuer l'intervalle QT chez les hommes, alors que les œstrogènes induisent un intervalle QT plus long chez les femmes [151, 152].

Dans la population jeune, l'hypertension touche plus particulièrement les hommes que les femmes, alors que dans la population âgée, le pourcentage de femmes hypertendues est le double de celui des hommes [153]. Le cœur des femmes s'adapte différemment à la surcharge de pression. Chez les femmes, on retrouvera une hypertrophie avec une cavité interne du VG (Ventricule Gauche) plus petite et une augmentation de l'épaisseur des parois [154-156]. Durant la progression de la sténose aortique, les femmes présentent plus fréquemment une meilleure fraction d'éjection et une meilleure contractilité [156-158]. L'hypertrophie du VG est plus facilement réversible chez les femmes que chez les hommes.

L'IC a une prévalence plus importante chez le sujet âgé. Ce syndrome affecte plus de 10% des + de 70 ans dans les sociétés occidentales et touche plus de femmes que d'hommes. L'IC avec fraction d'éjection réduite (HFrEF) affecte plus les hommes, tandis que l'IC à fraction d'éjection préservée (HFpEF) touche plus de femmes [159]. Dans les deux cas, les femmes ont moins d'altérations que les hommes [160-162].

D'autres part, il existe une cardiotoxicité des anthracyclines, le traitement anti-cancéreux largement utilisé, et notre équipe a montré une toxicité de ces anthracyclines chez rats femelles moins importante que chez les rats mâles [163].



Figure 29 : Différences sexuelles les plus importantes dans la prévalence de maladies cardiovasculaires HFpEF : Heart Failure with preserved Ejection Fraction ; HFrEF : Heart Failure with reduced Ejection Fraction ; CAD : :Coronary Artery Disease. Issu de DeBellis, Heart Fail Rev, 2019.

II. Mécanismes des différences sexuelles

Les mécanismes biologiques comprennent différentes composantes génétique, épigénétique et hormonale.

A. Mécanismes génétiques



Figure 30 : Régulation des gènes par le chromosome sexuel (A) Le chromosome Y induit l'expression de gène de manière spécifique aux mâles, (B) l'inactivation du chromosome X (15 des gènes) induit des effets spécifiques aux femelles, affectant la physiopathologie de manière spécifique au sexe. *Issu de regitz-zagrosek et al, Physiol Rev, 2017.*

1. Chromosome Y

Certaines différences sexuelles du transcriptome peuvent être liées à l'expression de certains gènes du chromosome Y et induire différents phénotypes cardiovasculaires masculins (*Figure 30*).

Des liens entre des variants du chromosome Y et l'hypertension ont été établis, qui pourraient contribuer à l'incidence de maladies cardiovasculaires plus importante chez les mâles que chez les femelles [164]. D'autre part, plusieurs résultats mettent en évidence un locus du chromosome Y impliqué dans les niveaux de LDL (low-density lipoprotein) indépendamment des niveaux de testostérone [165]. Un autre variant de gène du chromosome Y est impliqué dans certaines formes sévères de CAD (coronary artery disease) [166]. Ces résultats montrent que certains variants du chromosome Y peuvent contribuer au phénotype cardiovasculaire des hommes.

2. Inactivation incomplète du chromosome X

Les femelles présentant deux copies du chromosome X, il existe un mécanisme d'inactivation des gènes de l'un des X (*Figure 30*). Cependant, certains gènes du chromosome X peuvent échapper à l'inactivation

ce qui contribue au déséquilibre lié au sexe de l'expression de ces gènes. Ce phénomène touche dans l'espèce humaine 15% des gènes du chromosome X et 3% chez la souris. De plus, il existe une tissu-spécificité de l'échappement de l'inactivation de l'X pour certains gènes.

3. Effet de l'hétérochromatine sur les chromosomes sexuels

La présence d'un chromosome sexuel hétérochromatique peut empêcher la disponibilité des facteurs de l'hétérochromatine pour l'expression de gènes autosomaux. Ce mécanisme théorique n'a pas encore été démontré chez l'Homme. Des études ont suggérés que le niveau d'hétérochromatine sur les chromosomes sexuels pourrait réguler l'état épigénétique des chromosomes autosomaux.

4. Effets des variants génétiques autosomaux sur le dimorphisme sexuel

Certains loci de gènes ont été identifiés comme régulant de nombreux effets (des effets de l'insuline et de la distribution du tissu adipeux). Parmi ces loci, 20 présentent un dimorphisme sexuel et 19 jouent un rôle important chez la femme. L'analyse des voies de signalisation concernant ces gènes montre qu'elles incluent l'adipogenèse, l'angiogenèse, la régulation transcriptionnelle et la résistance à l'insuline [167].

Certains gènes sur les chromosomes autosomaux codant pour les cytochromes de la famille des monoxygénases, des anhydrases carboniques et des peptides natriurétiques comme *Nppb*, ont des niveaux d'expression dépendant du sexe [168].

Dans des conditions pathologiques comme l'IC, les femelles ont généralement une plus haute expression des gènes régulant le métabolisme énergétique que les mâles [169-172], indiquant qu'elles peuvent maintenir leurs fonctions métaboliques en conditions pathologiques. Des patients avec une sténose aortique montrent des différences génétiques liées au sexe, impliquées dans la régulation de la fibrose et de l'inflammation avec une répression significative de ces processus chez la femme [173]. Par ailleurs, l'utilisation des modèles de rongeurs avec surcharge de pression a aussi démontré des différences spécifiques au sexe concernant l'apoptose, l'intégrité du cytosquelette, la fibrose et le métabolisme [174-178]. D'autres études ciblant le métabolisme et le stress oxydant ont identifié des patrons d'expression spécifiques sexuels concernant la famille des apolipoprotéines, des anhydrases carboniques, de la desmine, de la nitrilase 1 et la peroxiredoxine 2 [179]. La plupart de ces proteines ont des fonctions antioxydantes et un haut niveau d'expression de ces proteines peut contribuer à une meilleure adaptation des femelles en conditions physiopathologiques.

B. Mécanismes épigénétiques

1. Histones et modifications de l'ADN

Les changements épigénétiques incluent la méthylation des cytosines ou la modification des histones par acétylation ou méthylation. Ces modifications peuvent se faire de manière spécifique au sexe et être influencées par les hormones stéroïdes (*Figure 31*). Ces modifications seraient impliquées dans les maladies cardiovasculaires. En effet, les histones acétylases et déacétylases contrôlent l'hypertrophie cardiaque et une dérégulation du profil de méthylation des histones a été retrouvée dans l'IC [180-182].



Figure 31 : Modifications de l'ADN et des histones dépendantes du sexe et des hormones sexuelles Issu de Regitz-Zagrosek, Physiol Rev, 2017

2. ARN non codants

Plusieurs espèces d'ARN non codants peuvent contribuer aux différences sexuelles, cependant seulement quelques études ont pu étudier la régulation des miARNs et leur rôle dans les différences sexuelles observées dans les maladies cardiovasculaires. Dans un modèle de TAC, certains miR possèdent une régulation spécifique au sexe. En effet, une augmentation de l'expression des miRs 21, 27a, 27b, 106a, 106b a été observée chez les mâles. Leur expression est régulée par les œstrogènes et les récepteurs ERβ. Ces différences d'expression peuvent expliquer les différences sexuelles concernant le développement de la fibrose en condition de surcharge de pression [183]. L'analyse des miRs cardiaques dans une autre étude a montré 31 miRs dont l'expression est augmentée uniquement chez les mâles dans un modèle de TAC. Ces miRs sont impliqués dans le métabolisme mitochondrial, les voies

de signalisation des MAPK, et le remodelage de la MEC [184]. Six protéines mitochondriales possèdent un site de liaison pour des miRs spécifiquement induits chez les mâles (Auh, Crat, Decr1, Hadha, Hadhab, Ndufs4).

- C. Les hormones sexuelles et leurs récepteurs
 - 1. Synthèse et métabolisme des hormones sexuelles

Les hormones sexuelles sont synthétisées dès le développement embryonnaire et agissent via différents mécanismes. Les hormones sexuelles appartiennent à la large famille des molécules endogènes qui peuvent moduler les processus cellulaires via la régulation de gènes et la modification des protéines. En effet, les androgènes, les œstrogènes et la progestérone influencent le système cardiovasculaire induisant un dimorphisme sexuel. La plupart des hormones sexuelles sont synthétisées dans les gonades, mais la synthèse extra-gonadienne peut exister. En particulier, la testostérone peut être métabolisée par l'aromatase en œstrogène et contribuer à la physiopathologie chez les mâles.

Les androgènes sont principalement synthétisés par les cellules de Leydig des testicules mais peuvent être également synthétisés par la glande surrénale, les tissus adipeux et osseux [185, 186]. Globalement, tous les organes expriment le récepteur aux androgènes (AR) et répondent aux androgènes [187-189]. La testostérone est l'androgène le plus important. Le métabolite de la testostérone, la DHT (dihydrotestostérone) est 10 fois plus active que la testostérone [190-192]. Son rôle principal est d'amplifier les actions de la testostérone comme la formation des organes reproducteurs [193]. La DHT est convertie à partir de la testostérone par l'enzyme $5-\alpha$ -reductase 1 et 3 qui est exprimée de manière égale dans le cœur des souris mâles et femelles [190, 194].

Une augmentation des niveaux de DHT a été observée dans les microsomes de cœur hypertrophiés chez l'Homme [195]. Les études épidémiologiques et les études cliniques montrent des résultats contradictoires. En effet, la testostérone apparait comme améliorant les capacités à l'effort de patients IC [196-198]. Cependant, l'utilisation à long terme de stéroïdes anabolisant androgéniques a été associée à une hypertrophie myocardique et une dysfonction du VG [199]. Une hypothèse suggère que la testostérone pourrait être bénéfique tandis que la DHT exercerait des effets délétères [200].

L'œstrogène majoritaire circulant est le 17- β -estradiol (E2) qui se lie de manière équivalente aux récepteurs ER α et β [201]. Les autres œstrogènes naturels sont l'estrone (E1), l'estriol (E3) et l'estestrol (E4) dont les rôles physiologiques ne sont pas encore établis [202] *(Figure 32)*. Les premières sources de production d'E2 sont les cellules de la thèque et de la granulosa de l'ovaire [203]. Cependant, l'E2 peut aussi être produite localement par la conversion de testostérone par l'aromatase. L'aromatase est

présente dans de nombreux tissus comme le tissu adipeux, l'os, le cerveau, le cœur et les vaisseaux sanguins chez les deux sexes [204, 205].



Figure 32 : Structures moléculaires des œstrogènes Issu de Arnal JF, Physiol Rev, 2017.

2. Les récepteurs des hormones sexuelles dans le système cardiovasculaire

Les récepteurs des hormones sexuelles et leurs voies de signalisation sont des composants clés des mécanismes permettant les différences sexuelles dans le système cardiovasculaire.

Les récepteurs activés par les hormones sexuelles AR ; ER α , ER β et le récepteur couplé à une protéine G GPR30, affectent un certain nombre de voies de signalisation génomiques et non génomiques de manière spécifique au sexe. Les AR, ER α et ER β sont les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes [206, 207]. Ces récepteurs sont intracellulaires et régulent l'expression de gènes lorsqu'ils sont activés par les hormones (*Figure 33*).

Plusieurs polymorphismes des formes humaines de ER α et ER β ont été reportés. En particulier, certains polymorphismes de ER α corrèlent avec l'augmentation du risque d'infarctus du myocarde (MI) [208, 209]. Les polymorphismes de ER β sont associés à une augmentation de la masse du VG et de l'épaisseur des parois [210]. Les ARs possèdent également des polymorphismes associés avec une épaisseur des parois du VG maximale [211].

Les récepteurs ERs ont été identifiés dans les cellules endothéliales vasculaires, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes cardiaques et les cardiomyocytes chez les mâles et les femelles [212-217]. Les niveaux d'ARNm de ER α sont similaires dans le cœur des mâles et des femelles, tandis que les niveaux

d'ARNm de ERβ dans le cœur des hommes sont plus importants que pour les femmes [218]. Un pool de ERs est localisé à la membrane plasmique afin de transmettre rapidement une activité extranucléaire, ce qu'on appelle des actions MISS (membrane initiated steroid signaling). En plus de la localisation membranaire et nucléaire, les ERs ont également été détectés dans la mitochondrie [219, 220] (*Figure 33*).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 33 : Multiples voies de signalisation des œstrogènes dans les cellules cardiovasculaires Issu de Regitz-zagrosek, Nature Rev Drug Discovery, 2006.

Une étude a permis de démontrer l'implication des ERs dans les maladies cardiovasculaires par l'augmentation de l'expression des récepteurs dans le myocarde de patients présentant une sténose aortique [218]. Elle montre l'élévation du niveau d'ARNm et de protéines de ER α dans les stades avancés de l'IC avec une redistribution loin des disques intercalaires où ils sont retrouvés dans le cœur sain [221]. L'étude a identifié NF- κ B comme régulant l'expression d'ER α dans le cœur humain [222]. De plus, l'ANP interagit avec ER α de manière dépendante de E2 [223].

III. Dimorphisme sexuel des processus biologiques cellulaires

A. Homéostasie ionique et rythmologie

Il y a plusieurs différences électrophysiologiques entre les hommes et les femmes, par exemple une augmentation de la fréquence cardiaque au repos et un intervalle QT plus long chez les femmes [224-226]. Les femmes sont plus sensibles aux prolongations de l'intervalle QT induites pharmacologiquement et aux torsades de pointe [227-229]. Cependant les arythmies, les morts subites et les fibrillations auriculaires sont plus fréquentes chez les hommes [230, 231]. Ces mécanismes pathologiques affectent les canaux ioniques ou les voies de signalisation régulant ceux-ci de manière spécifique au sexe.

Il existe notamment plusieurs différences concernant l'homéostasie calcique entre les hommes et les femmes. Les femelles rongeurs présentent de plus petits transitoires calciques, une réserve cardiaque moins importante et un rechargement du RS moins important que les mâles en réponse à une stimulation β-adrénergique [232, 233]. Ces différences sont en partie induites par la voie de signalisation cAMP/protéine kinase A (PKA) [234]. Le contenu en calcium et l'amplitude des transitoires sont significativement augmentés chez les rongeurs ovariectomisées (OVX), ce qui est réversible par un traitement aux E2 [235-237].

De plus, la S-nitrosylation des canaux calciques de type L est augmentée dans les cœurs femelles après I/R, ce qui induit une diminution de l'entrée de calcium et une diminution de la charge du RS et une zone infarcie réduite [238]. Chez les OVX, on retrouve une diminution du niveau de NO-synthase endothéliale et une augmentation de l'expression des canaux calciques de type L, ce qui est rétabli par un traitement aux œstrogènes [239, 240].

La sensibilité des myofilaments au calcium est régulée par l'administration d'œstrogènes [239, 241]. On observe chez les rats OVX une augmentation de la sensibilité au calcium ce qui est rétablie par les E2 [242].

Le sexe féminin est associé à un plus haut niveau de canaux K_{ATP} au niveau de la mitochondrie et du sarcolemme, dont l'inhibition durant l'I/R augmente la taille de la zone infarcie [243]. Le traitement aux cestrogènes induit une augmentation du nombre de canaux K_{ATP} au niveau du sarcolemme et protège les cellules cardiaques durant l'I/R.

Les œstrogènes augmentent l'activité des canaux K (à large conductance) dans les mitochondries de cardiomyocytes de rat et modulent le courant potassique en interagissant avec l'angiotensine ce qui a un effet anti-arythmogène [244]. Les œstrogènes diminuent la fréquence des arythmies induites par I/R par modulation du NO et de canaux potassiques calcium dépendants [245].

Introduction

B. Fonction mitochondriale et métabolisme énergétique

Le matériel génétique du génome mitochondrial est hérité de la mère de manière asymétrique chez les mammifères. A travers l'évolution, ces gènes ont subi une sélection dans un environnement femelle et sont donc davantage optimisés chez les femelles que chez les mâles [1].



Figure 34 : Influence des œstrogènes sur la fonction mitochondriale

La liaison des œstrogènes (E2) à leur récepteurs cytosoliques induit la translocation du complexe œstrogènes/ER vers le noyau. L'interaction de ce complexe avec l'ADN nucléaire permet la transcription de PGC-1α et les NRFs qui stimulent la biogenèse mitochondriale et les défenses anti-oxydantes. Les œstrogènes interagissent également avec les récepteurs aux œstrogènes liés à l'ADN mitochondrial menant à la transcription et à la réplication de l'ADN mitochondrial. *Issu de Ventura-clapier, Clin Science, 2017.*

1. Stress oxydant

Les cardiomyocytes de rongeurs femelles présentent un contenu en mitochondrie moins important mais les mitochondries apparaissent plus efficaces et génèrent moins de ROS que les mâles [246-248]. L'expression des gènes antioxydants et le contenu en protéines anti-oxydantes est plus important chez les femelles. Les récepteurs aux œstrogènes et leur cascade de signalisation sont impliqués dans la régulation de l'expression d'enzymes anti-oxydantes [247]. De plus, le stress oxydant moins important dans les muscles cardiaques des animaux femelles semble être induit par les GPERs [249]. Les E2 sont capables de stimuler la Superoxide Dismutase mitochondriale (MnSOD) afin de diminuer les niveaux d'ion superoxide dans les cardiomyocytes de rats néonataux [250]. Chez les rats Dahl OVX, les niveaux d'enzymes antioxydantes gluthatione peroxidase 1 et 4 (GPX 1 et 4) sont réduits, mais cet effet est reversé après un traitement aux E2 [251]. Une meilleure capacité de rétention du calcium a été observée dans les mitochondries cardiaques de femelles [252]. Les mitochondries de rats femelles ont également

une meilleure capacité à maintenir un niveau bas de calcium et à maintenir le potentiel de membrane en conditions de concentration en calcium élevée [253]. Ceci dépend de la régulation de l'uniport calcique [254]. En condition de concentration physiologique, les œstrogènes protègent les mitochondries cardiaques de la libération du cytochrome c par le calcium le [255]. Ces effets contribuent à une plus haute résistance à l'I/R. Par ailleurs, en plus d'être des régulateurs du métabolisme, la PDH et l'a-cétoglutarate déshydrogénase sont responsables d'un certain niveau de ROS générés par la mitochondrie [256-258]. Lagranha et al ont constaté qu'après I/R les femelles rates ont une phosphorylation plus importante de ces enzymes qui inhibe leur activité. Elles ont une activité également plus importante de l'ALDH2 (aldehyde dehydrogenase-2) qui est une enzyme de détoxification des ROS. Les femelles présentent alors une production de ROS moins importante que les mâles et les cœurs des femelles rates présentent moins d'altérations [259]. Les femelles présentent donc des niveaux plus bas de production de ROS et de meilleurs systèmes anti-oxydants ce qui assure une protection au niveau du cœur. (*Figure 34*).

2. Fonction respiratoire mitochondriale

Les capacités oxydatives des mitochondries mâles et femelles diffèrent dans plusieurs tissus. Dans les cardiomyocytes de rats femelles, le contenu en mitochondrie est plus faible mais les mitochondries semblent plus différenciées [260]. Cependant, à l'état basal il n'y a pas de différence des niveaux de consommation d'oxygène par les mitochondries entre femelles et mâles, ni du contenu en cardiolipides [163]. En conditions ischémiques, les souris femelles possèdent une fonction respiratoire mitochondriale et des niveaux d'ATP plus importants que chez les mâles. On retrouve des niveaux de transcrits de *Ppara*, de *Cpt1b* et de *Pdk4* plus faibles chez les femelles, ce qui permettrait une meilleure adaptation au stress [261]. Le traitement aux œstrogènes de rongeurs OVX exposés à une l/R permet de restaurer la fonction respiratoire mitochondriale et les dommages ultrastructuraux [262, 263]. Ces effets protecteurs sont associés à une induction des protéines de la phosphorylation oxydative et du cycle de Krebs de manière cestrogènes-dépendante [264, 265]. Par ailleurs, des modifications post-traductionnelles de protéines induites par les œstrogènes dans le cœur ont été observées, notamment la S-nitrosylation de l'ATP-synthase modulant ainsi la bioénergétique mitochondriale [266] (*Figure 34*).

3. La biogenèse mitochondriale

Il a été démontré que les œstrogènes régulent la biogenèse mitochondriale. En effet, les récepteurs aux œstrogènes (ER α et ER β) peuvent se lier à l'ADNmt et induire son expression [267, 268]. Les œstrogènes peuvent également augmenter l'expression du co-activateur PGC-1 α et ses cibles en activant ER α et grâce à la présence d'ERE au niveau du promoteur de NRF [178, 269]. E2 stimule

l'interaction de ERs avec TFAM et d'autres facteurs de la mitochondrie stimulant ainsi la transcription de l'ADNmt. Fernández-Vizarra et al. ont observé des rapports ADNmt/ADNn similaires dans les cœurs de rats mâles et femelles [270] (*Figure 34*).

Les altérations aux niveaux des mitochondries jouent un rôle central dans le développement de maladies cardiovasculaires. Les différences observées entre mâles et femelles au niveau de la fonction mitochondriale peuvent expliquer en partie les différences de susceptibilité aux maladies cardiovasculaires qui existent entre mâles et femelles.

C. Métabolisme des lipides et des carbohydrates

Dans les cardiomyocytes, les transporteurs CD36 et FATP, responsables de l'entrée des acides gras, sont soumis à une régulation par les œstrogènes [271, 272]. Les acides gras libres sont également maintenus à des niveaux bas par les œstrogènes [273]. Les œstrogènes sont aussi associés à des taux bas de cholestérol LDL (low density lipoprotein) et des taux élevés de cholestérol HDL (high density lipoprotein) [274, 275].

La testostérone parait également affecter le métabolisme cardiaque en régulant l'activité de la lipase sensible aux hormones, altérant ainsi la balance entre métabolisme des lipides et des carbohydrates dans les cardiomyocytes [276].

Le sexe féminin a été associé dans plusieurs études chez l'Homme et les rongeurs à une oxydation des acides gras plus importante que chez les mâles, à l'état basal et en condition d'exercice [277, 278].

D. Mort cellulaire

La mort cellulaire se produit de manière spécifique au sexe. En effet, dans plusieurs modèles pathologiques, on retrouve une mort cellulaire plus importante chez les mâles que chez les femelles [53]. La perte de cardiomyocytes liée à l'âge est plus importante chez l'homme que chez la femme. La mort cellulaire est plus importante chez le mâle IC que chez la femelle [279]. L'apoptose est moins importante chez la femme après I/R [280] et la nécrose chez la souris femelle après I/R [281, 282].

Plusieurs mécanismes de régulation cellulaire semblent être à l'origine de cette différence. Chez la femme, avant la ménopause on retrouve des niveaux plus importants de phosphorylation d'Akt nucléaire ce qui contribue à la protection contre la mort cellulaire [283]. Chez les souris après I/R, on observe une diminution du facteur anti-apoptotique Bcl2 chez les mâles et une diminution du facteur pro-apoptotique Bax chez les femelles [284]. On retrouve également une production de ROS moins importante chez les femelles [248], ainsi qu'une sensibilité au calcium moindre.

De plus, les hormones peuvent exercer des effets anti-apoptotiques (pour les femelles). En effet, un traitement avec E2 chez les souris OVX soumises à un infarctus du myocarde réduit l'apoptose [285]. Cette protection est en partie induite par la voie de signalisation PI3K/Akt [286]. Les E2 peuvent induire la localisation nucléaire de Akt ainsi que sa phosphorylation dans les cardiomyocytes en culture [283]. E2 exerce également un effet anti-apoptotique par la répression de TNF- α [287]. E2 peut aussi prévenir l'apoptose dans les cardiomyocytes en culture via la régulation de la voie p38/MAPK avec l'inhibition de p53 et sa translocation vers la mitochondrie [288].

E. Fibrose

L'activation des voies de signalisation pro-fibrosantes peut aggraver certaines pathologies cardiaques et induire une dysfonction sévère. Plusieurs études ont montré une augmentation plus importante des marqueurs de fibrose chez les mâles après une sténose aortique par rapport aux animaux femelles [173, 289]. Les récepteurs ER α , ER β et AR contrôlent les voies de signalisation de la fibrose, comme la synthèse de collagène et de MMPs. Cette régulation peut se faire de manière directe comme pour les collagènes I et III ainsi que certaines MMPs [223, 289-291], ou par le biais d'autres voies de signalisation comme la voie MAPK/ERK1/2 [292]. Les ERs peuvent également réguler l'expression de miRs qui peuvent jouer un rôle dans l'installation de la fibrose [183]. Une étude a montré que l'augmentation de l'expression de ER α dans les cardiomyocytes peut augmenter l'angiogenèse et diminuer la fibrose après infarctus [293]. De manière intéressante, la délétion d'ARs augmente la fibrose et la dysfonction cardiaque induite par l'angiotensine II [294]. Il semblerait donc que les ERs régulent la production de fibrose en inhibant la synthèse de collagènes et les MMPs, cependant les mécanismes de cette régulation restent encore incompris.

Il existe donc de nombreuses différences sexuelles au sein du système cardiovasculaire. Celles-ci peuvent expliquer les différences de susceptibilité aux maladies cardiovasculaires entre mâles et femelles. Une meilleure connaissance de ces différences et des mécanismes sous-jacents est nécessaire afin de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques ciblant des mécanismes cardiovasculaires spécifiques au sexe.

CHAPITRE IV : L'AMP KINASE

L'AMPK joue un rôle essentiel pour le fonctionnement de la cellule car elle agit en tant que gardien du statut énergétique de la cellule. En effet, lorsque le niveau énergétique de la cellule est bas (à cause d'une augmentation de la demande par exemple), l'AMPK est activée. Elle va alors inhiber les processus anaboliques qui consomment de l'ATP et qui ne sont pas nécessaires à la survie de la cellule et activer les processus cataboliques qui permettent la production d'ATP. L'AMPK est activée par régulation allostérique par l'AMP et l'ADP, ce qui va induire sa phosphorylation par d'autres kinases et induire son activation complète. Son activité de régulation se fait par phosphorylation de protéines cibles à court terme et par régulation transcriptionnelle de gènes cibles sur le plus long terme.

I. Structure de l'AMPK

L'AMPK est une sérine thréonine kinase composée d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ , dont la co-expression est essentielle pour générer une enzyme fonctionnelle (*Figure 35*). Chaque sous-unité possède plusieurs isoformes α 1, α 2, β 1, β 2, γ 1, γ 2, et γ 3, qui peuvent s'assembler pour former 12 complexes différents. Les différentes expressions tissulaires de ces sous-unités et leur association aux substrats permettent une régulation sur mesure des processus métaboliques.



Figure 35 : Structure moléculaire du complexe AMPK

Le complexe AMPK est composé d'une sous-unité catalytique α et deux sous-unités régulatrices β et γ. La sous-unité α contient un domaine serine/threonine kinase, qui est activé par phosphorylation du résidu Thr172 par les kinases LKB1 et CAMKKβ. L'AMPK est maintenue dans un état non-phosphorylé par l'auto-inhibiteur AID et avec la myristoylation en position N-terminale de la sous-unité β. L'interaction de l'AMP avec les sites de liaison de la sous-unité γ induit un changement conformationnel qui lève l'inhibition de l'AID et permet la phosphorylation du résidu Thr172. *Issu de Young LH, Circ Res, 2012.*

Dans le cœur, la sous-unité α 1 représente environ 35%, tandis que l'isoforme α 2 majoritaire représente environ 65%. La sous-unité α 2 est prédominante dans les cardiomyocytes, tandis que l' α 1 est retrouvée

dans d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules mésenchymateuses et les fibroblastes [295]. La sous-unité α contient le domaine kinase dans une boucle d'activation en N-terminal avec un petit lobe N et un lobe C plus large ce qui est caractéristique des protéines kinases. Le lobe C contient un résidu (Thr172 pour α 1 et Thr174 pour α 2) qui peut être phosphorylé par des kinases et qui permet une activation complète de l'AMPK. Le domaine kinase est suivi par un petit domaine globulaire (AutoInhibition Domain, AID) qui se lie aux lobes N et C lorsque l'AMP n'est pas lié à la sous-unité γ , ce qui empêche la phosphorylation de l'AMPK et par conséquent l'inhibe. Le domaine AID est lié à l'extrémité C terminale par un domaine « α linker » qui interagit avec la sous-unité γ par 2 motifs d'interaction de sous-unité régulatrice (α -RIM motifs), quand l'AMP est sur le site 3 de la sous-unité γ , ceci déplace le domaine AID es a position inhibitrice.

L'isoforme β 1 de la sous-unité β est ubiquitaire, mais β 2 est très exprimée dans le muscle squelettique et dans le cœur et légèrement exprimée dans le poumon et le rein. La sous-unité β contient un domaine de liaison au glycogène. Cette sous-unité est très importante pour la formation hétérotrimérique de l'AMPK, elle fait le pont entre la sous-unité α et le domaine terminal C (β -CTD) de la sous-unité γ .

Pour la sous-unité γ , c'est l'isoforme γ 1 qui est majoritaire dans le cœur, cette isoforme est ubiquitaire. L'isoforme γ 2a de 3.8 Kb est exprimée dans le cerveau, le rein, le pancréas, le foie mais pas dans le cœur alors que celle de 3 Kb est exprimée très fortement dans le cœur et plus faiblement dans le muscle, le rein, la rate et les testicules. L'isoforme γ 2b est présente dans le cœur, le placenta et les testicules. L'isoforme γ 3 est présente exclusivement dans le muscle squelettique. Elle contient 4 domaines CBS (cystathionine- β -synthase) sur lesquels peuvent se lier les nucléotides adényliques (site 1 à 4). Sur la sous-unité γ 1, le site 2 est toujours vide, le site 4 contient une molécule d'AMP fortement liée. Les sites 1 et 3 sont les sites régulateurs qui lient de manière compétitive l'AMP, l'ADP et l'ATP. L'AMP lié au site 1 provoque l'activation allostérique de l'AMPK, alors que l'AMP ou l'ADP lié sur le site 3 module l'état de phosphorylation de l'AMPK. La liaison de l'AMP, et dans une moindre mesure celle de l'ADP à la sousunité γ de l'AMPK, peut stimuler son activité de manière allostérique, même sans phosphorylation sur le Thr172 par une autre kinase. Tout ceci confère à l'AMPK sa sensibilité au rapport AMP-ADP/ATP et son rôle de senseur énergétique dans la cellule.

II. Localisation intracellulaire

La localisation cellulaire est un important déterminant de la signalisation intracellulaire. L'AMPK est considérée comme cytosolique mais des études récentes suggèrent qu'elle pourrait être aussi localisée au noyau et dans des domaines membranaires spécifiques [296].

L'isoforme α 2 de l'AMPK possède un signal de localisation nucléaire [297], et les deux isoformes α 1 et α 2 possèdent des signaux d'exportation du noyau [298]. La translocation nucléaire nécessite la phosphorylation de la Thr172, indiquant que seule l'AMPK activée peut aller dans le noyau. Dans le noyau, l'AMPK peut phosphoryler des facteurs de transcription, des histones et des histones déacétylases [299]. L'exercice physique provoque l'activation de l'AMPK et la translocation au noyau d'un complexe contenant l'AMPK α 2 dans le muscle squelettique chez l'Homme [300].

La localisation de l'AMPK au niveau de domaines membranaires spécifiques est déterminante dans son action. La myristoylation du site Gly2 de la sous-unité β permet au complexe AMPK de se localiser au niveau des membranes [301]. La myristoylation augmente également la capacité de l'AMP à activer allostériquement l'AMPK. D'autres mécanismes pourraient permettre la localisation de l'AMPK dans des domaines membranaires. Par exemple, l'AMPK se lie à LKB1, qui colocalise avec la E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales polarisées [302].

L'AMPK pourrait également être située au niveau de domaines cytosoliques particuliers en interagissant avec les protéines du cytosquelette. L'AMPK interagit avec TAK-1-binding proteine-1, une protéine du cytosquelette, plus connue pour réguler l'activité de TAK-1 et de la p38-MAPK. L'interaction de l'AMPK avec TAK-1 binding protein-1 parait importante dans le cœur, puisque lors d'une diminution de l'activité de l'AMPK, p38-MAPK est moins recrutée vers TAK-1 binding protein-1 et cela bloque l'activité de p38 lors d'une ischémie [303].

III. Activation allostérique

L'activité de l'AMPK est déterminée en premier lieu par le statut énergétique de la cellule, qui est reflété par le rapport AMP(ADP)/ATP. Un stress énergétique va induire la transformation de l'ATP en ADP, et par conséquent, la production d'AMP par l'action de l'adénylate kinase. L'ATP est présent en plus grande concentration que l'AMP mais sous forme prédominante de MgATP qui a une plus faible affinité pour l'AMPK que l'AMP ou l'ADP [304]. L'ADP est également présent en plus grande concentration que l'AMP dans la cellule. Lors d'un faible stress, l'ADP régule de manière plus importante le site 3 de la sous-unité γ , ce qui induit un changement conformationnel et permet la phosphorylation de l'AMPK [305]. Cependant, lors d'un stress plus prononcé, le niveau d'AMP augmente et active allostériquement le complexe par le site 1.

IV. Phosphorylation de l'AMPK et autres modifications post-traductionnelles

L'AMPK est activée par une phosphorylation sur la Thr172 de la boucle d'activation par d'autres kinases en amont. La principale kinase de l'AMPK est LKB1, c'est aussi la première à avoir été identifiée [306]. Elle fonctionne comme un hétérotrimère avec STRAD et MO-25 [307, 308]. Le gène codant pour LKB1 est muté dans le syndrome de Peutz-Jeghers, une maladie génétique rare, autosomique dominante. Les patients atteints de ce syndrome développent des tumeurs bénignes dans le tractus gastro-intestinal, et présentent un risque 20 fois plus élevé de développer des tumeurs malignes dans d'autres sites [309-311]. LKB1 est donc classé dans les suppresseurs de tumeurs, ce qui montre pour la première fois le lien entre AMPK et cancer. Des souris présentant une inactivation génétique de LKB1 révèlent que LKB1 est responsable de la majorité de l'activation de l'AMPK lors d'un stress énergétique même dans des tissus métaboliques comme le foie et le muscle [312-314].

L'AMPK peut aussi être phosphorylée en réponse à un flux de calcium par la CaMKK2 [315-317]. Une augmentation du calcium intracellulaire active la CaMKK2 qui phosphoryle l'AMPK, indépendamment de LKB1 et des niveaux d'AMP [318]. Cette voie de régulation est importante notamment dans le cerveau et les cellules non cardiaques [319].

V. Activateurs pharmacologiques de l'AMPK

Il existe de nombreux activateurs naturels de l'AMPK (*Figure 36*), on retrouve parmi eux : les biguanides, le resvératrol, la berbérine, la salidroside, le D-xylose, la quercetine, la genisteine, l'epigallocatechine-3-gallate, la capsaïcine, et la curcumine... [320]. Ces activateurs n'interagissent pas directement avec l'AMPK. Ils agissent en modifiant la concentration en ATP, en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire ou la fonction mitochondriale, ou encore en inhibant les enzymes du métabolisme de l'AMP [321]. Ils peuvent agir également en activant les kinases régulant l'AMPK. Il existe également des activateurs indirects comme les thiazolidinediones qui activent l'AMPK en augmentant la concentration en AMP intracellulaire [322]. Comme la metformine qui est un composé synthétique, les thiazolidinediones (rosiglitazone et plioglitazine) sont utilisés comme traitement pour le diabète de type 2 [323].



Figure 36 : Modulateurs les plus connus de l'AMPK La metformine et la phenformine sont des activateurs indirects. AICAR et A-76966 sont des activateurs allostériques. PT1 active l'AMPK en bloquant son domaine autoinhibiteur. Le composé C est un inhibiteur de l'AMPK. *Issu de Novikova, Biochemistry, 2015.*

De plus, il existe des analogues de l'AMP, comme l'AICAR qui est métabolisé par la cellule en 5aminiimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranosyle-5'-monophosphate (ZMP), qui mime l'action de l'AMP et interagit directement avec l'AMPK provoquant l'activation du complexe [324] (*Figure 36*). L'AICAR est capable d'activer l'AMPK, mais en comparaison avec l'AMP, le ZMP a une moins bonne efficacité [325]. De plus, l'AICAR est impliqué dans un grand nombre de processus biologiques et cause des effets secondaires importants, ce qui indique plusieurs limitations a l'utilisation de l'AICAR [326]. Le composé A-769662 a été identifié également comme interagissant directement avec l'AMPK [327]. Cependant, il active seulement la sous-unité β 1 et non la 2 qui est l'isoforme majoritaire dans le cœur [328].

VI. Régulation du métabolisme énergétique

Lors d'un stress énergétique, les effets de l'AMPK sur le métabolisme peuvent être divisés en 2 catégories : l'inhibition des processus anaboliques qui consomment de l'ATP et qui ne sont pas nécessaires à la survie de la cellule et l'activation des processus cataboliques qui produisent de l'ATP,

afin de restaurer la balance énergétique [318]. L'AMPK régule ces processus de deux manières : soit à court terme, en phosphorylant directement ses cibles afin de moduler leur activité, soit à plus long terme en phosphorylant des facteurs de transcription qui vont réguler l'expression de gènes cibles (*Figure 37*).



Figure 37 : Fonctions métaboliques de l'AMPK

Schéma résumant les voies métaboliques régulées par l'AMPK. Les flèches indiquent des activations et les lignes barrées indiquent des inhibitions. Issu de Jeon et al, experimental and Molecular Medicine, 2016.

L'AMPK inhibe de nombreuses voies de signalisation anaboliques en condition de stress énergétique. Premièrement, l'AMPK inhibe la synthèse de lipides en phosphorylant l'ACC 1 et 2 qui participent à la première étape de la synthèse des lipides [329, 330]. L'AMPK inhibe la synthèse de stérols en inhibant l'HMG CoA réductase (HMGCR) qui catalyse l'étape limitante dans la synthèse de cholestérol. L'AMPK prévient également le stockage de glycogène en phosphorylant la glycogène synthase GYS1 et GYS2 et en inhibant la synthèse d'hexosamine et les modifications OGIcNAc des protéines cellulaires par la phosphorylation de GFAT1 [331, 332].

Dans des conditions prolongées de stress énergétique, l'AMPK reprogramme le métabolisme par une régulation transcriptionnelle des voies de biosynthèse. L'AMPK régule la gluconéogenèse en phosphorylant CRTC2 et les HDACs qui sont des coactivateurs des voies de signalisation de CREB

(cAMP response element binding protein) et de FOXO (forkhead box protein O) [333] (*Figure 37*). L'AMPK régule également le métabolisme au niveau transcriptionnel par la phosphorylation de SREBP1 (sterol regulatory bonding protein 1) [334] et de ChREBP (carbohydrate responsive element binding protein) [335] ainsi que de HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) [336], qui sont des régulateurs transcriptionnels clés du métabolisme des lipides et du glucose. La phosphorylation de p300 par l'AMPK a également été reportée régulant ainsi l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires aux hormones [337].

La croissance cellulaire et la synthèse protéique sont les 2 consommateurs d'ATP les plus importants pour la vie de la cellule. L'AMPK régule ces processus à travers la modulation du régulateur de croissance mTOR. L'activation de l'AMPK mène à l'activation du régulateur négatif mTORc1 (TSC2) [338] et à l'inhibition de la sous-unité RAPTOR de mTORC1 [339]. Ceci induit une inhibition de la croissance cellulaire et de la synthèse protéique. L'AMPK régule également la synthèse protéique en phosphorylant eEf2K un régulateur négatif de l'élongation protéique [340]. En résumé, l'AMPK inhibe la synthèse de lipides, de glucose et de protéines, ce qui limite la consommation d'ATP en condition de stress énergétique (*Figure 37*).

La stimulation des processus cataboliques permet l'augmentation de la production d'ATP. Pour cela l'AMPK stimule l'utilisation du glucose, la mobilisation des stocks de lipides et le turnover des macromolécules par l'autophagie. En effet, l'AMPK stimule l'utilisation du glucose en phosphorylant TXNIP et TBC1D1 ce qui augmente la localisation de GLUT1 et GLUT4 respectivement à la membrane plasmique [341]. L'inhibition de TXNIP diminue l'internalisation de GLUT1 et l'inhibition de TBC1D1 permet la localisation de GLUT4 à la membrane plasmique. La phosphorylation de la phospholipase D1 (PLD1) par l'AMPK a également été montrée comme permettant indirectement l'entrée de glucose dans la cellule [342]. La phosphorylation de PFKFB3 augmente l'activité de PFK1, une enzyme limitante de la glycolyse [343].

L'AMPK stimule aussi les lipases, comme l'ATGL (adipose triglycéride lipase) qui libère des acides gras à partir des stocks de triglycérides [344]. L'import des acides gras dans les mitochondries se fait par CPT1 qui n'est plus inhibé par le malonyl-CoA grâce à la phosphorylation de l'ACC [345, 346].

L'AMPK régule également les voies cataboliques par régulation transcriptionnelle. L'AMPK régule transcriptionnellement les gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale et l'autophagie.

VII. AMPK et mitochondrie

A. Biogenèse mitochondriale

La biogenèse mitochondriale requiert une augmentation de l'expression des protéines mitochondriales ainsi que des lipides et leur transfert à la mitochondrie afin d'augmenter la surface des membranes internes et externes des mitochondries.

Plusieurs conditions physiologiques et expérimentales ont pour conséquence l'augmentation de la masse mitochondriale. La plus étudiée, l'exercice physique, active l'AMPK et induit une augmentation de la biogenèse mitochondriale ainsi qu'une augmentation des capacités oxydatives des muscles [347]. Plusieurs études ont démontré l'implication de l'AMPK dans la régulation de la biogenèse mitochondriale. En effet, un modèle de surexpression d'une AMPK constitutivement active permet une induction de la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique glycolytique [348]. De plus, des souris exprimant un dominant négatif de l'AMPK n'induisent pas d'augmentation de la biogenèse mitochondriale après un stress énergétique dans le muscle squelettique [349]. Dans plusieurs types cellulaires dont les adipocytes [350], les macrophages [351] et les hépatocytes [352], a été observée une régulation du contenu cellulaire en mitochondrie par l'AMPK. Globalement ces études ont permis de montrer que l'AMPK joue un rôle central dans la régulation de la biogenèse mitochondriale (*Figure 38*).



Figure 38 : Rôle de l'AMPK dans la régulation de la biogenèse mitochondriale Issu de Van Bergen et al, Eye and Brain, 2011.

La plupart des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale sont sous le contrôle de PGC-1 α . Il a été reporté que la régulation de la transcription de plusieurs gènes du métabolisme oxydatif par l'AMPK nécessite PGC-1 α [29]. Par ailleurs, deux sites sur PGC-1 α (Thr 177 et Ser 538) sont phosphorylés par l'AMPK *in vitro*. L'AMPK peut également activer PGC-1 α par des mécanismes indirects impliquant p38-MAPK [353], HDAC5 [354] ou la SIRT1 [355]. L'AMPK augmente également la transcription de TFEB qui se lie et active le promoteur de PGC-1 α [356].

De plus, une diminution de l'expression et de l'activité de l'AMPK ainsi qu'une diminution de PGC-1 α ont été associées à des altérations au niveau de la biosynthèse des cardiolipides dans un modèle de cardiotoxicité induite par doxorubicine [163]

A l'état basal, il semblerait que l'AMPK ne soit pas nécessaire au maintien de la biogenèse mitochondriale car celle-ci n'est pas altérée lors d'une délétion constitutive de l'AMPKα2. Cependant, la perte d'AMPKα2 entraine des dysfonctions au niveau de la fonction mitochondriale et au niveau de la biosynthèse des cardiolipides [357].

B. Dynamique mitochondriale

Une étude récente montre que l'AMPK est nécessaire à la fragmentation des mitochondries induite par la roténone ou l'antimycine A, qui sont des inhibiteurs du complexe I et III de la chaîne respiratoire respectivement. Par ailleurs, il a été démontré que l'activation de l'AMPK par des molécules activatrices, en absence de dommage aux mitochondries, est suffisante pour induire une fission mitochondriale [358].

Des études *in vitro* montrent que l'AMPK est capable de phosphoryler MFF sur 2 sites : Ser 155 et Ser 173. En effet, l'activation de l'AMPK permet le recrutement de DRP1 à la membrane et cet effet serait dépendant de la phosphorylation de MFF [359].

En conclusion, l'AMPK semble également réguler la dynamique du réseau mitochondrial durant un stress énergétique en phosphorylant MFF et en contrôlant la localisation de la protéine de fission DRP1.

L'AMPK contrôle donc de nombreuses voies de signalisation régulant la biogenèse et la fonction mitochondriale, ainsi que l'utilisation des substrats, ce qui en fait un acteur majeur du métabolisme énergétique cardiaque.

VIII. Rôle de l'AMPK dans le remodelage cardiaque

A. Hypertrophie cardiaque

L'AMPK est un des régulateurs cles du métabolisme énergétique et joue également un rôle important dans de nombreux processus cellulaires pour réguler le processus d'hypertrophie [360], diminuer la synthèse protéique (comme décrite précédemment), l'activité transcriptionnelle des cardiomyocytes, l'autophagie, le stress RE ainsi que l'expression de certains miRs (*Figure 37*).

1. Régulation transcriptionnelle

L'AMPK régule l'hypertrophie au niveau transcriptionnel via plusieurs mécanismes. L'AMPK diminue l'hypertrophie en réduisant la translocation de NFAT dans le noyau supprimant ainsi la transcription de gènes hypertrophiques [361]. L'AMPK induit la dégradation de protéine myofibrillaire par l'activation de la voie de signalisation FOXO1/muRF1 [362]. Enfin, l'AMPK at active spécifiquement la voie PKCζ/AP-1 et induit l'hypertrophie cardiaque [363]. L'AMPK inhibe aussi les synthèses protéiques nécessaires à l'hypertrophie.

2. L'autophagie

L'autophagie joue un double rôle dans l'hypertrophie. L'autophagie constitutive maintien la structure et la fonction cardiaque alors que l'excès d'autophagie est délétère pour le cœur hypertrophié en induisant de la mort cellulaire. mTOR constitue deux complexes distincts : mTORC1 dont l'inhibition par la rapamycine augmente l'autophagie, et mTORC2, dont le rôle est controversé. Les effets protecteurs de l'AMPK dans des cœurs en surcharge de pression, seraient en partie induits par l'augmentation de l'autophagie par l'inhibition de mTORC1. L'AMPK inhibe mTORC1 en phosphorylant TSC2, un régulateur négatif de mTORC1 [339]. L'AMPK interagit avec ULK1 (protéine indispensable pour l'activation de l'autophagie), et elle induit également sa phosphorylation sur de multiples résidus, modifications nécessaires à son activation en réponse à un stress énergétique ou à des activateurs de l'AMPK comme la metformine et l'AICAR.

3. Le stress RE

Le stress du réticulum endoplasmique se caractérise par une dérégulation du repliement des protéines et entraine l'accumulation de protéines non-repliées dans le RE. Si le stress RE est trop important, il peut induire la dysfonction de la cellule et l'apoptose. L'excès de stress RE peut être à l'origine d'une hypertrophie cardiaque en induisant de la mort cellulaire. L'activation de l'AMPK par l'AICAR diminue le stress RE dans les cardiomyocytes [364]. De plus, une stimulation prolongée à l'ISO augmente le stress RE en inhibant l'AMPK [365]. La metformine protège les cardiomyocytes du stress RE en activant l'AMPK. D'autre part, l'intermédine, un peptide de la famille de la calcitonine, exerce un effet cardioprotecteur en inhibant le stress RE et l'apoptose par l'intermédiaire de l'AMPK [366].

4. Les miARNs

Les miARNS sont d'importants régulateurs du développement de l'hypertrophie cardiaque. L'AMPK interagit avec plusieurs d'entre eux dont miR-133a, miR-451, et miR-195. MiR-133a joue un rôle protecteur dans l'hypertrophie cardiaque. D'autres part, il a été montré qu'un traitement à la metformine permet d'augmenter l'expression de miR 146a et 99 qui sont des miR anti-hypertrophiques et également de diminuer l'expression du miR 155 qui est pro-hypertrophique [367]. L'adiponectine augmente l'expression de miR-133a en activant l'AMPK et diminue l'hypertrophie induite par l'angiotensine II. Par ailleurs, les miRNAs régulent également la voie de signalisation de l'AMPK. En effet, miR-451 et miR-195 ont une expression augmentée dans les cardiomyocytes hypertrophiques et suppriment l'activation de l'AMPK par LKB1, ce qui a pour effet d'accélérer la progression vers l'hypertrophie [368].

B. Fibrose

Le rôle de l'AMPK dans la fibrose a été mis en évidence récemment dans le cœur, dans d'autres organes et dans diverses conditions pathologiques [369].

1. TGF-β

La signalisation du TGF- β est en lien important avec l'AMPK. En effet, dans les fibroblastes, l'AMPK inhibe HNF-4 α qui régule l'expression de TGF- β [370]. L'activation de l'AMPK par l'AICAR inhibe la croissance et la prolifération des fibroblastes cardiaques en inhibant ERK. La délétion de l'AMPK α 1 inhibe la voie de signalisation TGF- β /p38 MAPK et induit un défaut de maturation des myofibroblastes [295]. TAK-1 a été montré comme régulant p38-MAPK dans les myofibroblastes et contribue à la régulation de p38 via l'activation de l'AMPK, ce qui induit le contrôle de l'expression de l' α -SMA (alpha-smooth muscle actin) dans la zone infarcie. Par ailleurs, plusieurs études ont montré un rôle de l'activation de l'AMPK dans le contrôle de la différenciation des myofibroblastes par l'inhibition de la voie TGF- β /smad-3 [371, 372].

2. RAAS

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS) est impliqué dans le développement de la fibrose cardiaque lors de pathologies comme les cardiomyopathies hypertensives ou l'IC chronique [373]. Ce système est indispensable à l'initiation de la fibrose puisque l'angiotensine II et l'aldostérone peuvent stimuler la synthèse des collagènes et leur dépôt [374]. L'activation de l'AMPK inhibe les effets de l'angiotensine II, alors que le losartan (antagoniste du récepteur à l'angiotensine II) augmente la

phosphorylation de l'AMPK et diminue l'hypertrophie [375]. Une autre étude montre que l'adiponectine protègerait des effets de l'angiotensine II sur la fibrose cardiaque via l'activation de l'axe AMPK/PPARα [376].

3. NADPH oxidase (NOX)

L'AMPK peut exercer des effets anti-oxydants en régulant l'expression et/ou la translocation à la membrane des sous-unités de la NOX. L'expression de la NOX induite par la délétion de l'AMPK α 1 et la perfusion d'angiotensine II augmente la production de ROS et induit des dommages endothéliaux [377]. Dans les cardiomyocytes, l'activation de l'AMPK α 2 empêche la translocation de NOX à la membrane plasmique dans des conditions hyperglycémiques [378]. Elle régule également l'expression de NOX 2/4 dans le cœur et diminue la production de ROS et la fibrose induite par l'isoprotérénol [379].

4. Les SIRTs

Les protéines SIRTs sont une famille d'histones déacétylases qui régule le métabolisme. SIRT1 réduit la production de ROS induite par un stress cardiaque en formant une boucle de rétrocontrôle positif avec l'AMPK [380]. SIRT1 déacétyle LKB1 qui active ensuite l'AMPK [381]. AMPK augmente également les rappports NAD+/NADH qui permettent l'activation de SIRT1 [382]. SIRT3 [383] et SIRT6 [384] peuvent aussi diminuer les niveaux de stress oxydatant via l'AMPK.

C. Inflammation

Les effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs de l'AMPK ont été reportés dans différents tissus et maladies inflammatoires et auto-immunes [385] (Figure 39). L'activation de l'AMPK aigue et chronique diminue le remodelage cardiaque en réduisant l'infiltration de neutrophiles périphériques dans le tissu cardiaque après infarctus du myocarde et en inhibant l'expression de TLR4 (TOLL Like Receptor 4) [386, 387]. Une autre étude montre que l'activation de l'AMPK par la metformine inhibe l'activité des TLR4 cardiaques et les réponses inflammatoires induites par les lipopolysaccharides. L'AMPK a été également impliquée dans des effets protecteurs contre la nécrose induite par le TNF- et l'infiltration de cellules inflammatoires dans le cœur ischémique [388]. Dans un modèle de rat DOCA-sel et néphrectomie, les chercheurs ont observé une dysfonction cardiaque accompagnée de fibrose et d'une hypertrophie. Le traitement à la metformine a permis de restaurer la fonction cardiaque et une augmentation de l'expression du miARN-146 anti-inflammatoire a été notée [367]. Les cellules endothéliales jouent un rôle important dans l'inflammation cardiaque. L'AMPK phosphoryle et active la eNOS par un mécanisme indépendant du calcium [389]. De plus, L'AMPK inhibe l'inflammation induite par l'infarctus du myocarde en activant la voie de signalisation eNOS-NO [390].



Figure 39 : Rôle de l'AMPK dans la régulation de l'inflammation Issu de Peixoto, Experimental Neurology, 2017

En plus de son rôle dans la régulation du métabolisme énergétique, l'AMPK possède un rôle dans la régulation du phénotype et de la fonction des cellules impliquées dans le remodelage cardiaque. En effet, l'AMPK régule 3 aspects du remodelage cardiaque, l'hypertrophie, la fibrose et l'inflammation. Cependant, plusieurs mécanismes restent inconnus et nécessitent plus de recherches pour mieux décrypter les effets non métaboliques cardiaques de l'AMPK.

D. AMPK et modèles animaux de pathologies cardiaques

Pathologie cardiaque	Modèle	Activité de l'AMPK	Traitement Pharmacolo gique	Effet cardiaque	Références
Ischémie/ Reperfusion	Cœur perfusé	↑		Régule le métabolisme durant I/R (↑ l'entrée du glucose et favorise la glycolyse); limite les altérations cardiaques et l'apoptose après reperfusion	Russel, 2004, J Clin Invest Zarrinpashneh, 2006, Am J Physiol Carvajal, 2007, Am J Physiol
	Cœur perfusé	↑		Maintien de l'intégrité et la fonction mitochondriale Meilleure résistance à l'ouverture du mPTP	Zaha, 2016, JMCC
	Cœur perfusé α 2KO ou KD	Ļ		↑ des altérations cardiaques	Russel, 2004, J Clin Invest Carvajal, 2007, Am J Physiol Kim, 2011, JMCC
	Coeur perfusé	↑	Metformine A-769662	Effets cardioprotecteurs	Kim, 2011, JMCC Calvert, 2008, Diabetes
Remodelage post infarctus du myocarde	Ligature artère coronaire WT+α2-DN	↑ = dans les DN		Dans DN : ↑ apoptose, ↑ taille de l'infarctus, ↓ fonction cardiaque et ↑ stress oxydant	Wang, 2009, Circulation
	Ligature artère coronaire WT et α2-DN	Ļ	Metformine	Dans WT : ↓ dysfonction systolique, ↓ hypertrophie, ↑ phosphorylation de eNOS, ↑ PGC-1α, ↑ fonction mitochondriale Dans Dans DN : Pas d'effet protecteur	Gundewar, 2009, Circ Res

	Inhibition ou				Ikeda, 2009, J Biol Chem
Hypertrophie	délétion de LKB1	Ţ		Effets pro-hypertrophiques	Dolinsky, 2009, Circulation
	Angiotensine II ou phenylephrine	î	Metformine ou losartan ou A769662	Suppression de l'hypertrophie	Hernandez, 2014, JMCC Gelinas, 2018, Nat Commun
	Activation chronique de l'AMPK + constriction aortique	Î		Suppression des effets de l'hypertrophie	Li, 2007, J Cell Biochem
	Constriction aortique	î	AICAR ou Metformine	↑ action pro-autophagique de mTOR et ↓ l'hypertrophie cardiaque	Li, 2014, Arch Biochem Biophys
	Constriction aortique ou isoprenaline et α2-KO	Ţ		 ↑ de l'hypertrophie, dysfonction diastolique ↑ de l'activité de p70S6K 	Zharrinpashneh, 2008, Biochem Biophys Res Commun Zhang, 2008, Hypertension
	DOCA-sel + uniphréctomie	1	Metformine	↓ hypertrophie, fibrose et dysfonction cardiaque	Venkateswara RA, Toxicol Appl Pharmacol, 2019
Insuffisance cardiaque	α2-KO et constriction aortique	Ļ		↑ fibrose, ↓ la fonction cardiaque, ↑ hypertrophie et accélère la progression vers l'IC	Zhang, 2008, Hypertension
	Ligature coronaire	1	Metformine	↓ mortalité	Gundewar, 2009, Circ Res
	Continous rapid Pacing	î	AICAR ou Metformine	↓ fibrose, ↓ apoptose, ↓ Stress oxydant et stoppe la progression vers l'IC	Sasaki, 2009, Circulation

Tableau 1 : Effets métaboliques et non métaboliques de l'AMPK dans différents modèles de pathologie cardiaque

Le rôle bénéfique de l'AMPK dans le cœur ischémique a été démontré dans de nombreuses études [391-393]. Chez les souris invalidées pour l'AMPK ou exprimant un dominant négatif (DN) et ayant subi une ischémie, les altérations du cœur sont plus importantes que chez les souris contrôles [391, 393, 394]. L'utilisation d'agents pharmacologiques activateurs de l'AMPK, comme la metformine et le composé A-769662, ont confirmé cet effet cardioprotecteur dans des modèles d'ischémie [394-396]. L'AMPK permettrait de maintenir l'intégrité et la fonction des mitochondries durant la reperfusion [397]. Les dommages sont dus à l'ouverture du mPTP qui provoque un découplage des mitochondries. L'augmentation de l'activité de l'AMPK permet une plus grande résistance à l'ouverture du mPTP, ce qui permet de maintenir les capacités respiratoires des mitochondries durant l'I/R.

L'AMPK a un rôle central dans l'adaptation métabolique à l'I/R, en améliorant en outre la survie des cardiomyocytes. Le rôle protecteur de l'AMPK α 2 a été démontré *in vivo* en utilisant des modèles de ligature coronaire chez des souris AMPK α 2-DN ou traitées à la metformine [398, 399]. A noter également que l'AMPK α 1 ne joue pas un rôle important dans la régulation de la mort cellulaire durant l'ischémie, cependant lors du remodelage post-ischémique, elle régule les propriétés des fibroblastes. La délétion de l'AMPK α 1 a été associée à une augmentation de la prolifération des fibroblastes dans la zone infarcie, à un défaut de différenciation en myofibroblastes, à une diminution de l'expression de l' α -SMA et de TGF- β -P38 MAPK favorisant une moins bonne cicatrisation de la zone infarcie [295, 400], ce qui induit une diminution de la contractilité cardiaque et une dilatation des cavités ventriculaires.

Lors de l'hypertrophie cardiaque, l'expression de l'AMPK augmente, ce qui a été interprété au début, comme un effet délétère de l'AMPK dans le cœur [401]. Il a été ensuite observé que l'augmentation de l'activité de l'AMPK dans l'hypertrophie apparait plus tardivement et est induite par la dérégulation du statut énergétique du cœur. Elle apparait aussi comme un processus adaptatif à l'augmentation des besoins énergétiques et des processus anaboliques de l'hypertrophie [402]. Lors d'une délétion [312] ou une inhibition [403] de LKB1, on observe au niveau des cardiomyocytes des effets pro-hypertrophiques importants associés à une diminution de l'activité de l'AMPK. Ces effets seraient liés à la régulation de la synthèse protéique sous le contrôle de mTOR/p70S6K et eEF2. La metformine et le losartan activent l'AMPK et suppriment l'hypertrophie dans des cardiomyocytes isolés, la mitochondrie semblant avoir un rôle important dans ces effets [375]. De même, l'activation chronique de l'AMPK via l'AICAR ou la metformine induit une action pro-autophagique de mTOR et diminue l'hypertrophie cardiaque induite par constriction aortique [405]. Lors d'une hypertrophie induite par constriction aortique ou isoprotérénol, les souris déficientes en AMPK α 2 montrent un phénotype avec une hypertrophie exacerbée [406, 407]. De

plus, l'AMPKα2 apparait essentielle à l'action anti-hypertrophique de la metformine [408]. Cependant, deux études montrent des résultats contradictoires vis-à-vis de cette théorie [409, 410].

Zhang et al ont été les premiers à montrer un rôle important de l'AMPK α 2 dans la transition vers l'IC. Ils ont montré qu'une délétion de l'AMPK α 2 a des effets délétères sur la fibrose et la fonction cardiaque, augmente l'hypertrophie et favorise la transition vers l'IC du cœur soumis à une constriction aortique [407]. Pour les cœurs ayant subi une ligature coronaire, la metformine diminue la mortalité. Cet effet est associé à une induction de l'axe AMPK/eNOS/PGC-1 α [399]. Chez le chien, une étude montre que les cœurs soumis à une stimulation électrique continue et traités à la metformine, montrent une diminution de la fibrose, de l'apoptose, du stress oxydant et cela a pour effet de stopper la progression vers l'IC [411].

Toutes ces études montrent un rôle cardioprotecteur de l'AMPK, ce qui indique que celle-ci pourrait être une cible thérapeutique dans l'IC

.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Au travers de cette introduction, nous avons vu que la contraction du cœur est une activité consommatrice en énergie dont 90% est produite par la mitochondrie. Le métabolisme énergétique est donc essentiel au maintien de la fonction cardiaque et sa régulation est cruciale afin de préserver la balance entre production et consommation d'énergie.

Le cœur insuffisant subit de profonds remodelages au niveau cellulaire, notamment une hypertrophie et de la fibrose, ainsi qu'un remodelage métabolique au niveau des trois composants du métabolisme énergétique : l'utilisation des substrats, la production d'énergie et les systèmes de transfert d'énergie.

L'insuffisance cardiaque est une pathologie qui présente un dimorphisme sexuel important ce qui explique la différence de susceptibilité de cette pathologie entre les hommes et les femmes. Cependant, les mécanismes expliquant ce dimorphisme n'ont pas encore été complétement élucidés.

La sérine/thréonine kinase dépendante de l'AMP (AMPK), sensible au rapport AMP/ATP, est un senseur énergétique important dans la cellule cardiaque, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle.

Nous nous sommes donc posé les questions suivantes :

- 1- Quel est le rôle de l'AMPK dans la bioénergétique et le fonctionnement mitochondrial cardiaque ?
- 2- Quelle est la spécificité sexuelle des effets cardiaques de l'AMPK sur le métabolisme énergétique ?
- 3- Quels sont les mécanismes des effets protecteurs de l'AMPK dans un contexte de pathologie cardiaque ?

Afin de répondre à ces questions, notre laboratoire a développé un modèle original de souris invalidé pour l'AMPK α 2 (l'isoforme majoritaire dans le cœur) de manière spécifique au cœur et inductible à l'âge adulte grâce au système Cre-Lox et trois études ont été entreprises. La première étude a consisté à valider le modèle de délétion de l'AMPK α 2 et d'explorer le phénotype cardiaque et métabolique chez les souris mâles et femelles en conditions basales. Cette étude du phénotype de ces souris a révélé un important dimorphisme sexuel et nous avons voulu comprendre les mécanismes à l'origine de ce dimorphisme. Nous avons donc mené une deuxième étude où des ovariectomies ont été réalisées chez les souris femelles dans le but de comprendre quelle part de ces effets est due à une protection des hormones femelles. Dans une troisième étude, nous avons étudié le phénotype des souris mâles et femelles invalidées pour l'AMPK α 2 dans un modèle pathologique de surcharge de pression induite par perfusion d'angiotensine II.
MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE I: Modèles Animaux

1. Modèle murin déficient en AMPK alpha 2

1.1. Animaux

Afin d'étudier le rôle de l'AMPK dans le cœur sain et pathologique nous avons utilisé un modèle murin invalidé pour la sous-unité catalytique $\alpha 2$ de l'AMPK de manière inductible et spécifique au cœur grâce au système Cre-Lox. Les souris homozygotes comportant deux sites LoxP encadrant l'exon 6 codant pour le domaine catalytique de l'AMPKa2 (acides aminés 189-260) nous ont été fournies par le Dr B. Viollet de l'Institut Cochin de Paris [412]. Les souris hétérozygotes Myh6-MerCreMer +/- (aMHC-Cre +/-) par le Dr M. Mericskay de l'UPMC de Paris, possédant protéine de fusion entre la recombinase Cre et le domaine de fixation au ligand muté du récepteur aux œstrogènes. L'expression de cette protéine de fusion est placée sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde de la myosine (α-MHC) et donc dirigée spécifiquement dans le cœur. La Cre ainsi fusionnée est inactive et ne devient active qu'en présence d'un agoniste des glucocorticoïdes comme le tamoxifène. En croisant ces deux lignées, nous avons obtenu les souris qui portent le locus AMPKa2 floxé et qui expriment la recombinase Cre (a-MHC-MCM+/-:AMPKa2fl/fl = AMPKa2 KO) et les souris contrôles issues des mêmes portées qui n'expriment pas la recombinase Cre (AMPKo2fl/fl = CT). Après injection, la Cre est activée et va reconnaitre les sites LoxP autour du gène cible et pourra les cliver. Ainsi les souris AMPKa2KO n'expriment pas l'exon 6 qui code pour la sous-unité catalytique de l'AMPKalpha2. Pour chaque expérience, les souris KO ont été comparées à des souris WT issues de la même portée (littermate) (Figure 40).



Figure 40 : Invalidation cardio-spécifique et inductible de l'AMPKa2 chez la souris grâce au système Cre-Lox

L'induction de la délétion du gène est donc réalisée par injection intra-péritonéale de tamoxifène (dilution de tamoxifène (T5648 ; Sigma-aldrich) dans de l'huile d'arachide (P2144 ; Sigma-Aldrich) à 5 mg/ml) ; 1 injection à la dose de 40 mg/kg par jour sur une période de 2 jours consécutifs sur des animaux âgés de 8 semaines.

Toutes les souris ont été nourrie ad libitum et hébergées dans une pièce dans laquelle l'alternance jour/nuit et la température de 22°C sont constantes. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et une thoracotomie a été réalisée afin de prélever le cœur qui est ensuite congelé à -80°C.

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.

1.2. Génotypage des souris invalidées pour l'AMPK

Pour chaque souris, une biopsie de la queue a été prélevée et l'ADN génomique en a été extrait. Pour cela, la biopsie de queue est incubée dans du NaOH 50 mM à 95°C pendant 45 min, le mélange est ensuite neutralisé avec du tampon TRIS-HCL pH 8 et sont ensuite centrifugé pendant 15 min à 4°C à 14000 rpm. On réalise ensuite une PCR (à l'aide du mix GreenTaq PCR master Mix de Thermoscientific et du thermocycler C1000 Thermalcycler de Biorad) à partir d'1 μ l de surnageant afin d'amplifier une partie du gène codant pour la protéine de fusion Cre-ERT2 et les sites loxP entourant l'exon 6 de l'ampkalpha2. Le mélange PCR contient le Green Buffer 10X, les dNTPs (0,2 mM), l'amorce sens (0,5 μ M) et 1 μ l d'ADN dans un volume total de 25 μ l.

Amorces Cre-ERT2 :

Sens : 5'-CTG ATT TCG ACC AGG TTC GT-3'

Anti-sens : 5'-TTG CCC CTG TTT CAC TAT CC-3'

Amorces AMPKalpha2Lox :

Sens : 5'-GCT TAG CAC GTT ACC CTG GAT GG-3'

Anti-sens : 5'-GTC TTC ACT GAA ATA CAT AGC A-3'

Les conditions de PCR sont les suivantes :

- température de dénaturation : 95°C, pendant 30 secondes
- température d'hybridation : 60°C, pendant 30 secondes
- température d'élongation : 72°C, pendant 30 secondes



Figure 41 : Exemple de résultats de génotypage A. AMPKalpha2Lox; B. génotypage Cre-ERT2

2. Ovariectomies

Nous avons procédé à des ovariectomies sur les souris femelles CT et KO afin de savoir si l'absence de phénotype observée chez les femelles KO (contrairement aux souris mâles) est due à une protection hormonale grâce aux hormones femelles. Les souris ont été opérées à l'âge de 7 semaines, ensuite elles ont été injectées au tamoxifène à l'âge de 8 semaines. Un mois après opération, un dosage sanguin d'œstrogène a été fait sur une partie des animaux afin de valider la procédure d'ovariectomie. Après une échocardiographie, toutes les souris ont été sacrifiées 16 semaines après injection de tamoxifène (*Figure 42*). Les animaux ont été séparés en 4 groupes : femelles CT-Sham ; femelles CT-OVX ; femelles KO-Sham ; femelles KO-OVX.

CHAPITRE I: Modèles Animaux



Figure 42 : Schéma d'expérience des souris soumises à une ovariectomie

2.1. Chirurgies

Avant chirurgie, les souris ont été anesthésiées avec un mélange de Kétamine/Xylazine à une dose de 80 mg.kg⁻¹/12 mg.kg⁻¹ et injecté en intrapéritonéal à un volume de 10 µl/g de souris. Une fois l'animal endormi, il est positionné en décubitus ventral et rasé sur le dos. La température corporelle de l'animal est maintenue à 37°C sur une plaque chauffante. La peau est désinfectée avec de la Vétédine (Vétoquinol). On pratique ensuite une incision de bas en haut à peu près 2 cm au-dessus de la base de la queue. Le muscle est ouvert sur le côté caudalement à la dernière côte. A l'aide d'une pince à tissu sans dent la masse de graisse est soulevée, on peut observer l'ovaire à l'intérieur de cette masse. Pour les souris ovariectomisées (OVX), on fait ensuite une ligature entre la corne utérine et l'ovaire à l'aide d'un fil de suture 4.0, l'ovaire est retiré à l'aide de micro-ciseaux de chirurgie. Le gras et la corne utérine sont replacés dans la cavité abdominale. Les souris sham (SH) sont tout de suite refermées. La couche musculaire est fermée avec des agrafes stériles de 7mm. De la Vétédine est appliquée sur la plaie et les agrafes. L'animal est placé dans sa cage et chauffé sous une lampe jusqu'à son réveil.

Au moment du réveil de la souris, de la Buprenorphine (un antalgique) lui est administré en sous-cutané, à une dose de 0.05 mg/kg et un volume injecté de 10 µl/g de souris.

3. Modèle de surcharge de pression par perfusion d'angiotensine II

Dans le but d'étudier le rôle de l'AMPK dans un cœur pathologique nous avons choisi d'implanter des souris avec des mini-pompes osmotiques diffusant de l'angiotensine II car une élévation de la concentration plasmatique en angiotensine II est un signe caractéristique de l'IC et celle-ci mène à un remodelage cellulaire et métabolique évoluant vers une IC à fraction d'éjection préservée [413]. Ceci représente un intérêt particulier car l'IC à fraction d'éjection préservée est de plus en plus rencontrée dans la population, elle touche principalement les femmes et ses mécanismes physiopathologiques sont encore peu connus [414].



Figure 43 : Schéma d'expérience des souris implantées avec des mini-pompes à angiotensine II

Les souris ont été injectées avec du tamoxifène 8 semaines après la naissance, elles ont été opérées à la 12^{ème} semaine après la naissance. Les souris sont divisées en 8 groupes : un groupe de souris mâles CT, un groupe de souris femelles CT, un groupe de souris mâles KO, un groupe de souris femelles KO, chacun de ces groupes recevant soit une dose quotidienne d'angiotensine II (A9525, Sigma-Aldrich) de 1 mg/kg soit du sérum physiologique pour les souris contrôles. A la 16^{ème} semaine après la naissance, une echocardiographie a été réalisée sur l'ensemble des souris et leur pression artérielle a été mesurée avant sacrifice (*Figure 43*).

3.1. Implantation sous-cutanée de mini-pompes osmotiques

Ce modèle permet la diffusion de substances pharmacologiques chez l'animal pendant 28 jours de manière continue, à une vitesse de 0.11 µl/h. L'implantation des mini-pompes osmotiques (modèle 1004, Alzet) en sous-cutané se fait chez la souris préalablement anesthésiée à l'isoflurane 2 %. L'animal est positionné en décubitus ventral et rasé au niveau du cou entre les deux oreilles. La température corporelle de l'animal est maintenue à 37°C sur une plaque chauffante. La peau est désinfectée avec de la Vétédine (Vétoquinol). Une incision de quelques millimètres (entre 1 à 1.5 fois la taille de la mini-pompe) est réalisée au niveau du cou. La peau est ensuite décollée de la paroi musculaire en passant une spatule

entre la peau et la couche musculaire. La pompe osmotique pré-remplie avec l'agent pharmacologique ou le sérum physiologique est introduite dans l'espace entre la peau et la paroi musculaire (la « tête » de la pompe orientée vers la queue de l'animal). Un massage est réalisé pour faire glisser la pompe sur les côtés de l'animal. Les deux bords de la peau incisée sont rapprochés et selon le besoin une à deux agrafes stérilisées sont posées à l'aide d'une pince appropriée ou suturées avec un fil 4.0. De la Vétédine est appliquée sur la plaie et les agrafes. L'animal est placé dans sa cage et chauffé sous une lampe jusqu'à son réveil. Pour la prévention de la douleur de l'Ibuprofène est ajouté à l'eau de boisson 24 h avant et 24 h après intervention (5 ml/500 ml d'eau).

Chapitre II : Exploration fonctionnelle du système cardiovasculaire

1. Etude de la fonction cardiaque par échocardiographie doppler

Afin d'étudier l'impact de la délétion de l'AMPK sur le phénotype cardiaque des souris nous avons dans un premier temps évalué la fonction cardiaque par échographie doppler cardiaque. Pour pouvoir effectuer les mesures, il est nécessaire de réaliser une anesthésie préalable de l'animal, car les mesures nécessitent que la sonde reste plusieurs secondes à un endroit fixe. L'immobilisation indispensable des souris pour obtenir des mesures fiables a été obtenue à l'aide d'une anesthésie légère par inhalation d'isoflurane à 2,5 % et d'un maintien sous oxygène (0,8 l/min, 100 % O₂), ce qui évite également une diminution trop importante de la fréquence cardiaque. Une fois les souris anesthésiées, les différents branchements pour la mesure de l'électrocardiogramme ont été installés sur les pattes de l'animal. Une épilation chimique sur le thorax a été alors appliquée pour permettre à la sonde de glisser plus facilement sur la cage thoracique et limiter aussi les bruits de fond causés par les bulles d'air contenues dans le pelage. Les échocardiographies sont réalisées à l'aide d'un échocardiographe Vivid9 (GE Healthcare) et à l'aide d'une sonde adaptée à la taille des petits animaux.

L'échocardiographie doppler est un examen non invasif dont le principe est fondé sur l'analyse des signaux ultrasonores émis par la sonde posée sur le thorax en regard du cœur. Les ondes sont réfléchies par les structures cardiaques puis recueillies par cette même sonde. Plusieurs modes d'acquisition sont possibles comme le mode bidimensionnel (2D) permettant d'obtenir des images précises des structures anatomiques ou le mode temps-mouvement (T-M) qui permet la mesure des diamètres des cavités ventriculaires en fonction du temps, comme les diamètres télésystoliques et télédiastoliques. Les images sont obtenues en coupes parasternales petit axe et grand axe en diastole et en systole en mode 2D et T-M et il est possible d'obtenir différents paramètres à partir de ces images comme le diamètre ventriculaire gauche en diastole (Dtd) et en systole (Dts), l'épaisseur de la paroi postérieure (PP, Epaisseur de la paroi postérieure du VG) et septale (SIV, épaisseur du septum interventriculaire) en diastole et en systole. Il est possible également de mesurer la fréquence cardiaque des animaux. De plus, ces données permettent de déterminer d'autres paramètres fonctionnels comme la fraction de raccourcissement (FR=[(Dtd-Dts)/Dtd]x100), les volumes télédiastoliques (Vtd) (Vtd=7 Dtd³/(2.4+Dtd)) et télésystoliques (Vts) (Vts=7 Dts³/(2.4+Dts)) et la fraction d'éjection (FE=[(Vtd-Vts)/Vtd]x100) (*Figure 44*).

Nous avons pu également évaluer la fonction diastolique des souris par doppler en mesurant le rapport E/A en flux mitral diastolique. Le temps de relaxation isovolumique, la vitesse maximale de l'onde E du flux mitral, la vitesse protodiastolique de déplacement de l'anneau mitral et surtout la vitesse de

propagation du flux mitral enregistrée en Doppler couleur nous ont permis une évaluation correcte de la relaxation VG.



Figure 44 : A.Paramètres cardiaques mesurés par échocardiographie en 2 dimensions ; B. Profil de flux transmitral normal avec une onde E haute et A petite. Issu de Cluzel, J Radiol, 2004.

2. Mesure de pression artérielle par pléthysmographie

Le système d'enregistrement des pressions et des volumes (CODA, Emka technology) permet une mesure rapide et automatique de la pression artérielle chez la souris éveillée sans chirurgie. Afin d'effectuer les mesures, les souris ont été placées sur une plateforme chauffante (35°C) afin d'augmenter l'afflux sanguin dans la queue, améliorant la détection des signaux. Les animaux ont été maintenus dans un tube de contention, et une mesure de pression caudale a été effectuée par le biais d'un manchon et d'une bague d'occlusion appliquée sur leur queue (occlusion cuff, *Figure 45*). Le rythme cardiaque a été simultanément détecté par un capteur (VPR cuff, *Figure 45*). Le gonflage du manchon et de la bague a été assuré de manière contrôlée et automatique par le système, équipé d'une pompe interne. La pression

appliquée par la bague augmentant, le signal du rythme cardiaque a diminué jusqu'à disparition dans le manchon posé en aval. La pression a été alors relâchée jusqu'à ce que le signal du rythme cardiaque soit de nouveau perçu, la pression systolique correspond alors à la pression appliquée par le brassard. Lorsque la valeur pression revient à sa valeur initiale, cela correspond à la pression diastolique. Les souris ont été habituées à l'appareillage pendant 2 jours consécutifs, afin de réduire le stress associé à la manipulation, à la contention et au dispositif placé autour de la queue de la souris, et ainsi d'améliorer la qualité et la fiabilité des mesures. De plus, le jour de la mesure, chaque souris a été soumise d'abord 5 cycles de gonflage/dégonflage pour les acclimater, puis la pression artérielle moyenne a été déterminée à partir des 15 cycles de mesure suivants.



Figure 45 : A. Système de mesure de pression artérielle avec la bague d'occlusion (occlusion cuff) et le capteur (VPR cuff) ; B. Mesure de pression artérielle. En rouge : O-cuff et en bleu : VPR-cuff. Issu de http://cvrc.med.uky.edu/sites/default/files/Blood%20Pressure%20-%20Kent%20Coda%208.pdf

Chapitre III : Analyse de la morphologie cardiaque

1. Analyse histologique

Afin d'étudier la forme et la taille des cardiomyocytes ainsi que la présence de fibrose ou non nous avons fait une analyse histologique des cœurs de souris CT et KO. Lors du sacrifice des animaux une coupe (entre 1 et 2 mm d'épaisseur) à la base du cœur a été placée dans une cassette d'inclusion et conservée dans du paraformaldéhyde 4 %. Les étapes suivantes d'inclusion, de coupe et de coloration des coupes tissulaires ont été ensuite réalisées en collaboration avec le Dr Catherine Rucker-Martin (U999, centre chirurgical de Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson).

1.1. Inclusion en paraffine des échantillons

L'inclusion a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation pendant 12 h. Il est à déshydraté par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant 70 %, 80 %, 95 %, 100 % puis dans des bains de toluène à 100 % avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage à 45°C, qui infiltre alors toute la pièce. Ces étapes sont effectuées par un automate à inclusion à mouvement de fluides de Tissue-Tek[®] le VIP[™] (SAKURA). Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

1.2. Coupe des blocs de paraffine

Afin d'analyser les échantillons, on réalise des tranches du bloc d'échantillon qui pourront ainsi être colorées pour accroître le contraste, et observées au microscope. Les coupes du bloc de paraffine sont faites avec un microtome (LEICA RM 2245, LEICA) permettant de réaliser des tranches de section (coupes) de 4 µm d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre SuperFrost®PLus.

1.3. Coloration des coupes

Les colorations réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation. Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Celle-ci est effectuée après déparaffinage des coupes par la chaleur et des bains de toluène à 100 %, suivi d'une immersion des lames dans des bains d'alcool de degré décroissant de 100 % à 70 % puis dans de l'eau distillée. Plusieurs colorations différentes sont utilisées pour l'étude histologique du myocarde. Les colorations trichromiques usuelles utilisent trois colorants différents : l'Hématéine-Eosine-Safran (H.E.S.) associe l'hématéine (3 g/l d'Alun mélangé à 2 % d'acide acétique glacial) qui colore les noyaux en violet, l'éosine (2,5 g d'éosine/100 ml d'eau distillée) qui colore les cytoplasmes en rose, et enfin le safran qui colore les fibres conjonctives en jaune-orangé (comme celles des vaisseaux).

Le rouge Sirius (0,1 g/100 ml d'eau distillée) qui colore de façon simultanée le collagène de type I et la réticuline (collagène de type III) en rouge (signalétique) est associé à une contre coloration nucléaire bleue par l'hématéine.

1.4. Mesure du pourcentage de fibrose

Vingt images (en grossissement x20) par souris sont analysées à l'aide du logiciel Fiji. Cette analyse s'effectue par seuillage, à l'aide de la fonction « threshold » du logiciel et on obtient l'aire de la fibrose. La fibrose périvasculaire est déterminée dans un premier temps, puis ensuite la fibrose totale *(Figure 46)*. De ces deux mesures, lafibrose périmyocytaire ou interstitielle ont été déduites. Puis la totalité du tissu a été marqué pour en déduire le pourcentage de fibrose par rapport à la surface tissulaire.



Figure 46 : Illustration du seuillage pour quantifier la fibrose périvasculaire (à gauche) et totale (à droite) à l'aide du logiciel Fiji

2. <u>Analyse de l'ultrastructure des cardiomyocytes par microscopie électronique à</u> <u>transmission</u>

L'ultrastructure des cardiomyocytes a été observée par microscopie électronique à transmission en collaboration avec le Dr Marta Novotova (Institute of Experimental Endocrinology, Biomedical Research Center, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic).

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. Les électrons accélérés sont produits à l'aide d'un canon à électrons constitué d'une source d'électrons et d'un champ électrique. Ces électrons sont focalisés sur un échantillon très fin à l'aide de lentilles électromagnétiques. Les électrons interagissent avec l'échantillon en fonction de son épaisseur, de sa densité ou de sa nature, ce qui conduit à la formation d'une image contrastée dans le plan image. En plaçant le détecteur dans le plan image, on peut observer une image par transparence de la zone observée. Le 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.

2.1. Fixation des tissus

La fixation des tissus a été initiée par perfusion rétrograde du cœur selon la méthode de Langendorff. Le coeur a ainsi été perfusé pendant 5 minutes avec une solution 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 (Na-Cacodylate 150 mM, HCl 3,6 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 1 mM, Glutaraldéhyde 2 %, pH 7,3). Le coeur a été perfusé pendant 5 minutes avec cette solution avant d'être retiré de la canule pour être plongée dans cette solution de fixation durant 45 minutes. Les muscles papillaires ont ensuite été isolés et traités de nouveau 45 minutes dans la solution de fixation. Après avoir été rincées dix fois dans une solution exempte de glutaraldéhyde (Na-Cacodylate 150 mM, HCl 3,6 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 1 mM, orgCl₂ 2 mM, EGTA 1 mM, pH 7,3) pendant 10 minutes, ces pièces de tissu ont été traitées 45 minutes avec une solution d'osmium permettant la fixation des lipides membranaires (Na-Cacodylate 150 mM, HCl 3.6 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 1 mM, 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 été ensuite 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 pendant 1h. Les pièces de tissus ont été enfin disposées selon l'orientation choisie (longitudinale ou transversale) pour être incluses dans du durcupan qui polymérise pour constituer un bloc.

2.2. Coupes ultrafines

Les coupes ultrafines ont été réalisées au moyen d'un ultramicrotome PowerTorne MT-XL (RMC/Sorvall, USA) équipé d'un couteau 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, JEOL Japan) afin d'y être observées avec des grossissements variant de x4000 à x100000. Les images ont été visualisées et enregistrées grâce à une caméra Gatan Dual Vision 300W CCD (Gatan Inc, USA).

Chapitre IV : Evaluation de la respiration mitochondriale

Afin d'évaluer la fonction de la chaîne mitochondriale, nous avons mesuré la consommation d'oxygène sur fibres cardiaques perméabilisées, selon la technique mis au point par Veksler et al. [415]. Cette méthode repose sur le traitement des fibres cardiaques avec de la saponine qui est un détergent doux, solubilisant les molécules de cholestérol. Or, cette molécule est abondante dans les membranes plasmiques, mais pratiquement absente des autres membranes. Les membranes cellulaires sont alors perforées alors que les membranes des autres organites préservent leur intégrité. Cette perméabilisation permet à des substrats exogènes de pénétrer dans la cellule et de stimuler les mitochondries. Les mesures de consommation d'oxygène de la mitochondrie reflètent ses capacités oxydatives (*Figure 47*).

Perméabilisation des fibres à la saponine



Veksler V. et al., Biochim Biophys Acta 1987 Kuznetsov A. et al., Nature protocols 2008

Figure 47 : Illustration de la perméabilisation des fibres musculaires à la saponine

1. Préparation des fibres perméabilisées musculaires cardiaques

Immédiatement après le sacrifice de la souris, le cœur a été rincé dans du tampon PBS, le ventricule gauche a été isolé et transféré dans une solution relaxante S *Table 6*). Le ventricule gauche est alors délicatement disséqué en fins amas de fibres (100-200 µm de diamètre) sous loupe binoculaire et avec l'aide de pinces de précision. Cette séparation mécanique des fibres facilite la diffusion de l'oxygène et de la solution au plus près des mitochondries. La perméabilisation chimique des membranes plasmiques a ensuite lieu sous l'action de la saponine (50 µg/ml dans solution S) pendant 30 min à 4°C et sous agitation. Un lavage de 10 minutes à 4°C sous-agitation avec la solution S exempte de saponine a permis l'élimination du détergent. Les fibres ont été conservées dans cette solution qui permet le maintien des fonctions cellulaires, jusqu'au moment de l'expérimentation.

2. <u>Mesure de la consommation d'oxygène sur fibres perméabilisées</u>

Dans un premier temps, les fibres sont lavées dans une solution de respiration R (*Table 6*) pour éliminer toutes traces d'ADP, ATP et PCr qui pourraient perturber l'activité de la chaîne respiratoire. Les fibres

sont ensuite placées dans des chambres thermostatées à 22°C contenant 3 ml de solution de respiration (avec créatine à la concentration de 20 mM) sous agitation. La consommation en dioxygène des fibres contenues dans les chambres est mesurée à l'aide d'une électrode de Clark reliée à une interface (Oxygen Model 928 Strathkelvin Instruments) qui transmet les informations à un ordinateur *(Figure 48).* Les données sont enregistrées et analysées par le logiciel Strathkelvin 928 System. En fin de mesure, les fibres sont récupérées, séchées pendant 1h sous vide à 75°C et pesées. Cette étape permet de normaliser les vitesses de respiration au poids de tissu sec, et de les exprimer ainsi en µmol d'O₂.min⁻ 1.g⁻¹ de poids sec de fibres.



Figure 48 : Illustration du système de mesure et d'acquisition pour les mesures de respiration mitochondriale

3. Etude des capacités oxydatives

Tout d'abord, la vitesse initiale de respiration en l'absence de fibres (Vi) est enregistrée dans chaque chambre contenant chacune 3 ml de solution R. Elle reflète l'utilisation de l'oxygène par la membrane de téflon de l'électrode. Suite à l'ajout des fibres perméabilisées, la vitesse de respiration basale (Vo) correspond à la consommation en dioxygène des fibres sans ADP exogène.

Ensuite, une séquence d'activateurs et d'inhibiteurs spécifiques de chacun des complexes de la chaîne respiratoire ainsi que différents substrats ont été ajoutés successivement (2-3 min) dans l'ordre suivant :

1) L'ajout d'ADP (2 mM) et de malate (4 mM) amorce le cycle de Krebs en l'alimentant en oxaloacétate (OAA). Le malate pénètre dans la mitochondrie grâce au transporteur oxoglutarate/malate et sa conversion en oxaloacétate par la malate déshydrogénase mitochondriale produit principalement du NADH (*Figure 49*).

2) L'ajout de Glycérol-3-Phosphate (4 mM) permet la production de FADH₂ par son oxydation.

3) Puis, l'addition de palmitoyl-CoA (0,1 mM) et de carnitine (2 mM) permet l'étude de l'oxydation des acides gras (AG). Le palmitoyl-CoA est un AG à chaîne longue, donc son transport nécessite l'action du

transporteur CPT1 / Carnitine. En soustrayant cette vitesse de respiration à la mesure précédente, on peut donc en déduire la respiration spécifique des mitochondries à partir d'un AG à chaîne longue.

4) L'ajout de pyruvate (1 mM) permet l'étude de l'utilisation des hydrates de carbone. Le pyruvate représente au mieux la voie des glucides, car il est le produit final de la glycolyse et est transformé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH), pour rentrer dans le cycle de Krebs.

5) L'ajout de glutamate (10 mM) et de succinate (15 mM) permet d'atteindre la respiration maximale de la chaîne respiratoire mitochondriale (par stimulation des complexes I et II), et en court-circuitant le cycle de Krebs. Il est donc ainsi possible de déterminer le pourcentage d'utilisation des substrats en comparant la respiration obtenue spécifiquement pour chaque substrat par rapport à la respiration maximale. *(Figure 49).*

6) La respiration du complexe I est inhibée en ajoutant de l'amytal (2 mM) afin de mesurer uniquement celle du complexe *II (Figure 49).*

7) L'activité maximale du complexe IV a été enregistrée suite à l'addition de TMPD (tetraméthyl-pphénylènediamine) 0,5 mM dans la chambre de respiration (en présence d'acide ascorbique 0,5 mM pour limiter l'auto-oxydation du TMPD) (*Figure 49*).



Figure 49 : Détermination de la respiration via les différents complexes de la chaine respiratoire Le complexe I est activé en présence de glutamate et de malate et est inhibé par l'amytal. L'ctivité du complexe II est mesurée en présence de succinate. Le complexe IV est activé par du TMPD et présence d'ascorbate.

Chapitre V : Exploration des voies métaboliques cardiaques

1. Mesure d'activités enzymatiques

La fonction mitochondriale a également été évaluée par mesure d'activité enzymatique mitochondriale. L'activité de la citrate synthase (CS), enzyme du cycle de Krebs et de la cytochrome-c oxydase (COX, complexe IV de la chaine respiratoire) sont considérés comme des bons marqueurs de la masse mitochondriale. En effet, leur activité est corrélée à la quantité de mitochondries contenues dans le tissu étudié.

1.1. Extraction et dosage des protéines

La mesure d'activité enzymatique a nécessité l'extraction des protéines contenues dans les tissus ventriculaires prélevés lors du sacrifice des animaux. Des extraits de ventricules gauches ont été préalablement pesés et broyés dans un tampon d'homogénéisation (*Table 6*) au moyen d'un broyeur homogénéiseur Precellys (Bertin Technologies) pendant 2 x 8 sec (pause de 5 sec) à 6500 rpm.

La concentration protéique des lysats tissulaires est mesurée par un dosage colorimétrique au BCA (acide bicinchoninique). La technique au BCA est dérivée de la méthode au Biuret. En milieu alcalin, les ions cuivriques Cu²⁺ présents dans le réactif sont réduits par les protéines en ions cuivreux Cu⁺, formant ainsi des complexes qui présentent un maximum d'absorbance à 540 nm. La sensibilité de cette méthode au Biuret est améliorée par la présence de l'acide bicinchoninique qui permet une gamme de mesure des concentrations protéiques de 0,05 à 2 g/l. Les ions cuivriques Cu²⁺ présent dans le réactif sont réduits par les protéines en ions cuivreux Cu⁺ qui forment avec le BCA un complexe coloré en violet absorbant à 562 nm. L'absorbance lue par spectrométrie est alors proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans les échantillons. La concentration précise des protéines est finalement déterminée grâce à une gamme de BSA de concentrations connues (Bovine Serum Albumine).

Protéine + Cu²⁺ → Protéine-Cu + Cu⁺

 $\mathsf{Cu^{\scriptscriptstyle +}} + \mathsf{BCA} \xrightarrow{} \mathsf{BCA-Cu}$

1.2. Mesure de l'activité de la citrate synthase

La CS est une enzyme du cycle de Krebs qui catalyse la formation de citrate à partir de l'oxaloacétate et de l'acétyl-CoA issu du catabolisme des sucres et des acides gras :

Citrate Synthase

AcétylCoa + Oxaloacétate + H₂O ⇔ Citrate + CoASH

Les produits formés par cette réaction n'étant pas mesurables, la réaction indicatrice suivante est utilisée :

$$CoASH + DNTB \rightarrow CoAS + H^+ + C_6O_4S^{2-}$$

Le DNTB (5,5-dithiobis-(2-Nitrobenzoïc acid)) réagit avec les molécules de CoASH pour produire des ions mercaptiques ($C_6O_4S^{2-}$) possédant des propriétés spectrales spécifiques à 412 nm. L'apparition des ions mercaptiques dans le milieu réactionnel peut donc être suivie par mesure d'absorbance à 412 nm, pendant 3 min à 30°C dans un tampon Tris 100 mM, pH 8, contenant les substrats nécessaires : DNTB 0,1 mM, acétyl-CoA 0,3 mM, et oxaloacétate 0,5 mM.

1.3. Mesure de l'activité du complexe IV

La cytochrome-c oxydase ou complexe IV de la chaîne respiratoire est responsable de l'oxydation du cytochrome c réduit par le complexe III (cytochrome-c réductase).

COX

Cytochrome c réduit + $0_2 \rightarrow$ Cytochrome c oxydé + H₂O

L'activité de la COX est dosée dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7,4 contenant 50 µM de cytochrome c réduit [cytochrome-c réduit à 90 % (par ajout du dithionite de sodium)]. Le cytochrome-c réduit n'ayant pas le même spectre d'absorption que le cytochrome-c oxydé, la disparition du cytochrome-c réduit est suivie à 30°C pendant 3 min et à 550 nm.

1.4. Mesure de l'activité du complexe l

Le complexe I de la chaîne respiratoire est responsable de l'oxydation du NADH en NAD⁺. Par conséquent, son activité a été mesurée en suivant, pendant 3 minutes, la disparation du NADH dont l'absorbance à 340 nm en fait un parfait rapporteur des processus réactionnels. L'accepteur d'électrons naturel du complexe I, l'ubiquinone aussi appelée Coenzyme Q10, a été remplacé par la décylubiquinone (ou le décyl-Coenzyme Q10) qui est plus hydrophile et facilite ainsi le dosage qui a été réalisé en milieu aqueux dans un tampon phosphate 50 mM à 30°C contenant 3,75 mg/ml de BSA, 100 µM de NADH et 100 µM de décylubiquinone (pH 7,5).

Complexe I

NADH, H⁺ + Décyl-CoQ \rightarrow NAD⁺ + Décyl-CoQH₂

1.5. Mesure de l'activité de l'hydroxyacylCoA deshydrogénase

La 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HADHA) est une oxydoréductase qui catalyse la 3^{ème} étape de la β-oxydation : l'oxydation du 3-hydroxyacyl-CoA par le NAD⁺ en 3-kétoacyl-coA.

HADHA

AcétoacétylCoA + NADH ⇔ HydroxylbutyrylCoA + NAD+

La mesure de l'activité enzymatique de l'HADHA a été réalisée en suivant la disparition du NADH à 340 nm durant 3 minutes à 30°C dans un tampon contenant pyrophosphate 200 mM, EDTA 5 mM, NADH 1 mM, et de l'acétoacétylcoA 10 mM.

1.6. 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, a 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 disparation 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}).F)/(ϵ .L. Δ t) ou F correspond au facteur de dilution de l'échantillon, ϵ à l'absorptivité molaire de la molécule absorbante (L.mol⁻¹.cm⁻¹; ϵ _{NADH}=6220; ϵ _{cyt c réduit}=18500; ϵ _{c604S2}.=13600), L à la longueur de la cuve (1 cm) et Δ t au temps de mesure. Cette activité a enfin été rapportée à la concentration protéique des échantillons de manière à être exprimée en μ M.min⁻¹ par gramme de protéines.

2. Mesure de l'expression protéique par immunoempreinte

Nous avons utilisé la technique de Western Blot (WB) afin de valider la délétion de l'AMPKalpha2 dans le cœur des souris, de vérifier la tissu spécificité de la délétion, ainsi que pour vérifier une possible compensation d'une autre isoforme de l'AMPK (alpha1). Nous avons également utilisé cette technique afin de mesurer l'expression de protéines cibles de l'AMPK ainsi que leur modification post-traductionnelle dans le cœur sain et pathologique.

2.1. Lyses tissulaire

Les tissus ventriculaires de souris ont été lysés mécaniquement à l'aide d'un broyeur homogénéiseur Precellys (Bertin Technologies) dans 200 µl de tampon de lyse RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer, *(Table 6)* complété avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche + PMSF 0,2 %) et un cocktail inhibiteurs de phosphatase *(Table 6)*. Les lysats sont ensuite centrifugés pendant 15 min à 10000 G à 4°C, et les surnageants sont récupérés.

2.2. Western Blot

Cette technique se compose d'une étape d'électrophorèse sur gel, d'une étape de transfert sur une membrane et ensuite d'une étape d'immunoprécipitation.

Pour préparer les échantillons, 25 μ g de protéines sont dilués pour chaque échantillon dans un tampon dénaturant Nu-PAGE LDS 4X (Thermo Fischer Scientific) en utilisant 1 volume de tampon pour 3 volumes d'échantillon protéique. Les protéines extraites sont ensuite chauffées pendant 10 min à 70°C. En présence de SDS (un détergent ionique fort), les protéines sont dénaturées par dissociation des liaisons non covalentes. La réduction des ponts disulfures par le β -mercaptoéthanol complète cette dénaturation des protéines. De plus, le SDS va recouvrir les protéines de charges négatives, ce qui confère à toutes les protéines un rapport charge/masse sensiblement identique. La vitesse de migration des protéines dans un gel de polyacrylamide ne dépend donc plus que de leur taille.

Dans un premier temps, les protéines sont séparées par gel d'électrophorèse SDS-Page. Les gels sont constitués d'un premier gel de concentration à un pourcentage d'acrylamide très faible et à un pH 6,8, et d'un second gel de séparation contenant entre 10-15 % d'acrylamide (selon la taille des protéines à séparer) et à un pH 8,8. Sous l'action d'un voltage constant de 220 V et dans un tampon de migration Tris-Glycine-SDS (TG-SDS 10x, Euromedex), les protéines vont se concentrer puis se séparer.

Les gels sont ensuite transférés sur une membrane de PVDF (0,2 µm, Iblot Transfer Stack, Invitrogen), selon les instructions du fabricant. L'efficacité du transfert est contrôlée par une coloration au rouge Ponceau pendant 5 min (rouge Ponceau 0,2 %, acide acétique 5 %). La membrane PVDF est ensuite saturée en protéines pendant 1h dans une solution de TBS Tween 0,1 % additionnée de BSA ou de lait 5 %.

Elle est ensuite incubée en présence de l'anticorps primaire (dilué dans une solution TBS-Tween 0,1 % + BSA ou lait 1 %) dirigé contre la protéine d'intérêt, durant la nuit à 4°C. La membrane de PVDF est ensuite rincée avec du TBS-Tween 0,1 % 3 fois pendant 10 min, puis incubée pendant 1h à température ambiante et sous agitation avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et dirigé contre l'espèce de l'anticorps

primaire. La membrane est à nouveau rincée 3 fois pendant 10 min avec du TBS-Tween 0.1 % et incubée 5 min avec le substrat de la peroxydase (Pico ou Dura, Invitrogen), avant révélation par un appareil Ibright FL1000 (Invitrogen) en utilisant la méthode ECL selon les instructions du fabricant. Enfin, les densités relatives de chaque bande sont quantifiées (logiciel Image J). Les intensités des bandes correspondantes aux protéines d'intérêt ont été normalisées avec celles d'une protéine de référence (Actine, Tubuline, GAPDH, ou Vinculine). Les données obtenues sont exprimées sous forme d'un rapport de ces deux intensités.

Cible de l'anticorps	Fournisseur	Référence	Dilution
Actine	Santa Cruz	sc47778	1/10000e
ACC	Cell Signaling	3676	1/1000e
Phospho ACC	Cell Signaling	3661	1/1000e
ΑΜΡΚα1	Santa Cruz	sc19126	1/1000e
ΑΜΡΚα2	Santa Cruz	sc19129	1/1000e
Phospho AMPK	Cell signaling	2531	1/500e
AMPK total	Cell signaling	2532	1/500e
Phospho ACL	Cell signaling	4331	1/250e
ACL	Sigma	sab4501964	1/250e
Caspase 3	Cell Signaling	9665	1/1000e
CS	Abcam	Ab96600	1/1000e
Grim19 (NDUFA13)	Abcam	ab110240	1/1000e
Oxphos	Mitoscience	Ms604	1/500e
Phospho Ulk1	Cell signaling	5869	1/250e
Ulk1	Cell signaling	8054	1/250e
Tubuline	Abcam	Ab7291	1/10000e

Table 3 : Liste des anticorps utilisés pour l'immunoempreinte

3. Mesure de niveau d'expression d'ARNm par RT-PCR

Une analyse de l'expression des ARNm a été effectuée afin d'identifier les modifications d'expression génique qui ont lieu chez les souris AMPKciKO, notamment dans le contrôle du remodelage cardiaque, de la biogenèse et de la fonction mitochondriale. Cette technique basée sur la répétition de réplications *in vitro*, permet d'amplifier, à l'aide d'amorces spécifiques, un ADN complémentaire (ADNc), obtenu par transcription inverse d'un ARN cible, dans le but de quantifier son niveau d'expression. Pour cela, il faut d'abord extraire les ARN totaux, ensuite synthétiser leur ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse, et enfin mesurer le niveau d'expression de ces ADNc par PCR quantitative.

3.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN est réalisée par la méthode au Trizol (Gibco BRL, USA). Cette solution, composée de phénol et de guanidine isothiocyanate, permet la lyse des membranes cellulaires tout en conservant l'intégrité des acides nucléiques. L'homogénéisation des échantillons congelés de ventricule gauche congelés est réalisée par microbroyage (Precellys, Bertin technologies) à raison de 10 à 20 mg de tissu dans 1 ml de Trizol. L'addition de 0,2 ml de chloroforme par ml de Trizol, suivi d'une centrifugation à 4°C (10000 G, 15 minutes), permet la séparation de chaque homogénat en deux phases : une phase organique en bas où il y a les protéines, une phase aqueuse en haut où il y a les ARN, et à l'interface se situe l'ADN. La phase aqueuse est prélevée et mélangée à 0,5 ml d'alcool isopropylique. Les échantillons sont ensuite conservé une nuit à -20°C permettant la précipitation des ARNs. Une nouvelle centrifugation à 4°C (12000 G, 15 minutes) permet la formation de culots d'ARN. Les culots d'ARN sont ensuite lavés deux fois à l'éthanol 75 % pour éliminer l'alcool isopropylique. Après séchage, chaque culot est ensuite remis en solution dans 15-20 µl d'eau sans RNase/DNase et congelé à - 80°C.

3.2. Analyse quantitative et qualitative des échantillons d'ARN

La quantification des échantillons des ARNs totaux contenus dans chaque extrait est réalisée par mesure de leur absorbance à 260 nm. En effet, une unité de DO à 260 nm correspond à une concentration en ARN de 40 µg/ml. La pureté des ARNs est estimée par le rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀. Un rapport inférieur à 1,5 témoigne d'une contamination par des protéines ou des composés aromatiques, à l'inverse un rapport supérieur à 2 caractérise une contamination par des acides nucléiques de l'ADN génomique.

3.3. PCR quantitative basée sur la technologie TaqMan

Pour l'étude des génomes des animaux KO et soumis à une surcharge de pression, nous avons choisi une méthode d'analyse à haut débit : les cartes microfluidiques TLDA (TaqMan Low Density Array, Applied

Biosystems). Cette technologie, très sensible, nous permet de quantifier de manière simultanée l'expression de 48 gènes sur un seul extrait d'ADNc.

3.3.1. <u>Transcription inverse</u>

La transcription inverse est réalisée avec le kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, France). L'enzyme utilisée est un recombinant murin de la transcriptase inverse de M-MLV (moloney murine leukimia virus) fonctionnant à 37°C. Les amorces utilisées pour l'initiation de la réaction sont des oligonucléotides « random » qui s'hybrident au hasard avec les ARN contenus dans l'échantillon. La réaction de transcription inverse est réalisée dans un volume de 20 µl à partir de 2 µg de matrice d'ARN en présence d'un inhibiteur de RNase, pendant 1h à 37°C.

3.3.2. PCR quantitative en temps réel

La chimie TaqMan est basée sur l'utilisation d'un oligonucléotide complémentaire d'une séquence interne du fragment à amplifier, en plus des amorces sens et anti-sens lors de la réaction de PCR. Cet oligonucléotide porte un fluorochrome (Reporter) à son extrémité 5' et un groupement quencher à son extrémité 3'. Lorsque ces groupements sont trop proches, les groupements sont séparés par l'activité 5'-3' exonucléase de la polymérase. La fluorescence alors émise est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié (*Figure 50*). Les sondes TaqMan et les amorces spécifiques des gènes impliqués dans le remodelage cardiaque, le métabolisme énergétique et la biogenèse mitochondriale ont été sélectionnés à partir de la banque de séquences TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems).





La sonde TaqMan complémentaire de la séquence à amplifier, porte un fluorochrome à son extrémité 5' et un quencher en 3' qui absorbe la fluorescence émise par le fluorochrome à proximité. A chaque étape d'élongation, l'activité exonucléase de la polymérase permet la libération du fluorochrome. L'éloignement du fluorochrome du quencher lui permet d'émettre une fluorescence proportionnelle au nombre de fragments amplifiés.



TaqMan[®] Arrays (384)

Figure 51 : Format des cartes TLDA (TaqMan Low Density Array)

Chacun des 8 réservoirs de la carte alimente 48 cupules de contenance 1 µl, dans lesquelles les réactions de PCR ont lieu. Ainsi, l'expressionde 48 gènes peut être déterminée à partir d'une même préparation de chaque échantillon d'ADNc Les cartes ont été désignées de façon à quantifier l'expression de 48 gènes dont 6 gènes de référence pour 8 échantillons de cDNA (*Figure 51*). Les séquences sélectionnées peuvent être consultées sur le site du fabricant (Applied Biosystsems) avec les numéros d'accession présentés dans le tableau (*Table 4*). Pour chaque échantillon, 4 µl de cDNA (correspondant à 400 ng d'ARN totaux) sont mélangés à 46 µl d'eau sans RNase et DNase et 50 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Les 100 µl de ce mélange de PCR sont déposés dans un des réservoirs de la carte microfluidique, chaque réservoir alimentant 48 puits contenant les amorces et une sonde TaqMan spécifiques de chaque gène cible. Cette carte est ensuite centrifugée 1 min à 280 G pour répartir le mélange dans ces alvéoles. Les puits sont ensuite scellés et la carte est introduite dans le thermocycleur ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems).

L'amplification des séquences correspondant aux différents gènes d'intérêt est suivie en temps réel.

			Numéro
Nom du gàng	Symbole	Exection	d'identification
Nom du gene	du gène	Fonction	(Assay ID, Applied
			Biosystems)
myosin, heavy chain 7B, cardiac muscle, beta	Myh7b	Hypertrophie	Mm01249941_m1
natriuretic peptide type A	Nppa	Hypertrophie	Mm01255747_g1
natriuretic peptide type B	Nppb	Hypertrophie	Mm01255770_g1
connective tissue growth factor	Ctgf	Fibrose	Mm01192933_g1
transforming growth factor, beta 1	Tgfb1	Fibrose	Mm01178820_m1
collagen, type I, alpha 1	Col1a1	Fibrose	Mm00801666_g1
collagen, type III, alpha 1	Col3a1	Fibrose	Mm01254476_m1
peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha	Ppargc1a	Biogenèse mitochondriale	Mm00447181_m1
peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta	Ppargc1b	Biogenèse mitochondriale	Mm00504730_m1
nuclear respiratory factor 1	Nrf1	Biogenèse mitochondriale	Mm01135606_m1
GA repeat binding protein, alpha	Gabpa	Biogenèse mitochondriale	Mm00484598_m1
estrogen related receptor, alpha	Esrra	Biogenèse mitochondriale	Mm00433143_m1
peroxisome proliferator activated receptor alpha	Ppara	Biogenèse mitochondriale	Mm00440939_m1
transcription factor A, mitochondrial	Tfam	Biogenèse mitochondriale	Mm00447485_m1
mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I	COX1	Biogenèse mitochondriale	Mm04225243_g1
cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	Cox4i1	Biogenèse mitochondriale	Mm01250094_m1
optic atrophy 1	Opa1	Dynamique mitochondriale	Mm00453879_m1
mitofusin 1	Mfn1	Dynamique mitochondriale	Mm00612599_m1
mitofusin 2	Mfn2	Dynamique mitochondriale	Mm00500120_m1
dynamin 1-like	Dnm1l	Dynamique mitochondriale	Mm01342903_m1
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	Slc2a4	Métabolisme Glucides	Mm00436615_m1
hexokinase 2	Hk2	Métabolisme Glucides	Mm00443385_m1
pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	Pdk4	Métabolisme Glucides	Mm00443325_m1
carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle	Cpt1b	Métabolisme AG	Mm00487191_g1
CD36 antigen	Cd36	Métabolisme AG	Mm01135198_m1
hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, alpha subunit	Hadha	Métabolisme AG	Mm00805228_m1
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain	Acadm	Métabolisme AG	Mm00431611_m1
sirtuin 1	Sirt1	Signalisation énergétique	Mm01168521_m1
sirtuin 3	Sirt3	Signalisation énergétique	Mm00452131_m1
protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit	Prkaa1	Signalisation énergétique	Mm01296702_m1
nicotinamide riboside kinase 2	Nmrk2	Signalisation énergétique	Mm01172899_g1
nicotinamide phosphoribosyltransferase	Nampt	Signalisation énergétique	Mm00451938_m1
superoxide dismutase 2, mitochondrial	Sod2	Stress oxydant	Mm01313000_m1
catalase	Cat	Stress oxydant	Mm00437992_m1
glutathione peroxidase 1	Gpx1	Stress oxydant	Mm00656767_g1
acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	Acsl1	Biosynthèse des cardiolipides	Mm00484217_m1
CDP-diacylglycerol synthase 1	Cds1	Biosynthèse des cardiolipides	Mm01208328_m1
cardiolipin synthase 1	Crls1	Biosynthèse des cardiolipides	Mm00503002_m1
tafazzin	Taz	Biosynthèse des cardiolipides	Mm00504978_m1
elongation of very long chain fatty acids-like 2	Elovl2	Biosynthèse des cardiolipides	Mm00517086_m1
ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids	ElovI5	Biosynthèse des cardiolipides	Mm00506717_m1
fatty acid desaturase 1 (delta 5 desaturase)	Fads1	Biosynthèse des cardiolipides	Mm00507605_m1
fatty acid desaturase 2 (delta 6 desaturase)	Fads2	Biosynthèse des cardiolipides	Mm00517221_m1
beta-2 microglobulin	B2m	Gènes de références	Mm00437764_m1
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	Ywhaz	Gènes de références	Mm03950126_s1
ribosomal protein, large P2	Rplp2	Gènes de références	Mm00782638_s1
polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A	Polr2a	Gènes de références	Mm00839493_m1
	185	Gènes de références	Hs99999901 s1

 Table 4 : Identification des amorces TaqMan désignées par Applied Biosystems

3.3.3. Analyse des résultats

Les logiciels GeNorm et Normfinder sont utilisés, dans un premier temps, pour sélectionner les gènes de référence dont l'expression est la plus stable dans nos conditions expérimentales. Ces logiciels estiment la stabilité d'expression des gènes de référence sur la base de leur niveau d'expression.

Cette analyse nous a permis de sélectionner les gènes de référence suivants : Ywhaz, Polr2a, 18S, Rplp2, B2m.

La quantification de l'expression de ces gènes est déterminée par la différence de leur Ct. La moyenne géométrique des niveaux d'expression de ces gènes sera par la suite utilisée pour la normalisation de la quantification de chaque gène cible :

Facteur de normalisation = $2\sqrt{(Qref1 * Qref2)}$

Avec Qref = 2 (Ct référence calibrateur-Ct référence échantillon)

Où Ct calibrateur = Ct moyen du groupe contrôle

Les sonde TaqMan développées par Applied biosystems sont garanties pour avoir une efficacité de 90-100 %, c'est pourquoi tous les calculs de quantification sont basés sur des efficacités de PCR maximales, d'où le calcul de quantification suivant pour chaque échantillon et chaque gène cible utilisant la méthode 2^{-ΔΔCt} [416] :

 $Q_{gène cible normalisée} = \frac{2^{(Ct cible calibrateur-Ct cible échantillon)}}{Facteur de normalisation}$

Chapitre VI : Etude de l'environnement lipidique du complexe I de la chaîne respiratoire et de son assemblage en supercomplexes

1. <u>Profilage des phospholipides cardiaques</u>

Nous savons que l'environnement lipidique des complexes de la chaîne respiratoire est très important pour leur assemblage et leur fonctionnement. Afin d'étudier l'environnement lipidique du complexe I, nous avons extrait les phospholipides totaux d'échantillons de ventricule gauche de souris selon la méthode de Folch [417], et nous les avons analysés par spectrométrie de masse couplé à ma chromatographie liquide (LC-MS) afin de les quantifier et d'identifier les espèces de cardiolipides.

1.1. Extraction de phospholipides

Les tissus de ventricule gauche sont lysés mécaniquement à l'aide d'un broyeur homogénéiseur Precellys (Bertin Technologies) dans 250 µl de PBS. Après ajout de 1.5 ml de méthanol (dans des tubes en verre), les échantillons sont vortexés 3 fois 20 secondes avec le même temps entre chaque vortex pour chaque échantillon. Après ajout de 3 ml de chloroforme, les échantillons sont vortexés 6 fois 20 secondes de la même manière que précédemment. On ajoute ensuite 1.25 ml d'eau pour la phase de séparation, on laisse 10 min à température ambiante et on vortex 2 fois 20 secondes. Les tubes en verre sont mis dans des falcons fermés et on les centrifuge 10 min à 1000 G. On récupère ensuite la phase organique (inférieure) dans des petits tubes en verre. On ajoute 3 ml d'un mélange CHCl₃/MeOH/H₂O (8,06/1,4/0,1 ml) dans la phase aqueuse et on vortex ensuite 3 fois 20 secondes. Les tubes sont mis dans des falcons fermés et centrifugés pendant 10 minutes à 1000 G. On ajoute la phase organique obtenue dans les petits tubes de 6 ml. Les échantillons sont ensuite séchés par évaporation sous flux d'azote et repris dans du chloroforme en fonction du poids de tissu utilisé pour l'extraction (100 µl / 100 mg).

1.2. Chromatographie liquide

Le système de chromatographie de Thermo Fischer Scientifique inclus un Dionex U3000 RSLC avec deux pompes quaternaires, un distributeur automatique d'échantillons, et un logement pour colonne thermostatée.

La séparation des lipides a été effectuée sur une colonne PVA-Sil (150 × 2.1 mm I.D., 120 A) (YMC Europe GmbH). La température de la colonne est fixée à 35°C. Cette méthode de chromatographie a été inspirée de la méthode développée par Imbert et al [417]. Le débit est de 400 µl/min et 5 µl d'échantillon est injecté. La composition des phases mobiles est identique pour tous les échantillons (*Table 5*).

Chapitre VI : Etude de l'environnement lipidique du complexe I de la chaîne respiratoire et de son assemblage en supercomplexes

L'effluent de la chromatographie liquide est séparé après la colonne analytique, 250 µl/min vont vers un corona CAD Ultra (Thermo Fischer) pour l'analyse quantitative des phospholipides et 150 µl/min vont vers le spectromètre de masse (LTQ Orbitrap Velos, Thermo Fischer) pour l'étude lipidomique. Pour augmenter le débit et pour stabiliser le signal de l'aérosol, la phase mobile envoyée vers le corona CAD est complétée par de l'éthanol 90% à 200µL/min.

Temps	A	В	С	D
0	98	2	0	0
2	98	2	0	0
8	12	88	0	0
22	0	60	40	0
26	0	60	40	0
27	0	0	0	100
28	0	0	0	100
30	98	2	0	0
44	98	2	0	0

 Table 5 : Programme chromatographique des différentes compositions de phases mobiles suivantes : A-Heptane/Isopropanol

 98/2, B-Chloroforme/Isopropanol 65/35, C-Methanol/H₂O 95/5, D-Isopropanol.

1.3. Quantification des phospholipides

La quantité totale de phospholipides a été déterminée grâce au Corona CAD en calculant la concentration de chaque classe de phospholipides (en µg/ml) en les comparant aux concentrations d'une gamme d'un mélange de phospholipides commerciaux. L'intensité de chaque espèce de phospholipide a été obtenue en faisant la moyenne des intensités relatives des ions m/z sur le pic chromatographique.

Chapitre VI : Etude de l'environnement lipidique du complexe I de la chaîne respiratoire et de son assemblage en supercomplexes



Figure 50 : Séparation des classes de phospholipides obtenues par LC-ESI/MS.

1.4. Identification des espèces de cardiolipide

L'Orbitrap LTQ Velos Pro est équipé d'une sonde H-ESI. Le voltage du spray est configuré à 3.3 kV. La température de chauffe de la sonde est de 200°C. La température du capillaire est de 325°C et le niveau de S-lens RF est de 60 %. L'analyse a été faite en mode négatif pour obtenir des informations structurelles sur les chaînes des phospholipides. Le spectromètre de masse est équipé de deux analyseurs : un double piège à ion linéaire (LTQ) pour une fragmentation à basse résolution et une trappe orbitale pour une détection à haute résolution. La détection a été faite en scan masse entière (MS) et en fonction des données, MS² et MS³ avec une fragmentation par collision (avec une énergie de collision de 35).



Figure 51 : Spectre de cardiolipides obtenu par LC-ESI/MS avec intensités moyennes des CL(18:2)4 et CL(18:2)3(22:6)

2. Caractérisation des supercomplexes de la chaîne respiratoire mitochondriale

Afin d'observer si des différences d'association existent entre les supercomplexes de la chaîne respiratoire mitochondriale entre les souris CT et les souris KO nous avons extrait les mitochondries à partir de ventricule gauche de souris, nous avons isolé les protéines mitochondriales et nous les avons séparées en bleu d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide natif (BN-PAGE) [418].

2.1. Préparation des extraits mitochondriaux

Afin d'homogénéiser les tissus, nous avons d'abord enlevé les gros vaisseaux et les oreillettes des cœurs de souris et nous avons coupé les ventricules en petits morceaux dans un tampon d'homogénéisation isotonique (TRIS HCI 5mM pH 7,4, Saccharose 300 mM, EGTA 1 mM). Le broyage des morceaux est ensuite effectué dans un potter verre-verre sur glace.

L'extraction des mitochondries se fait ensuite par centrifugation différentielle à 4°C : une première centrifugation de 800 G pendant 10 minutes afin d'éliminer le noyau et les débris cellulaires (dans le culot). Et une deuxième centrifugation de 11000 G pendant 10 minutes pour isoler les mitochondries du reste du contenu cellulaire (dans le surnageant). Ensuite, le culot est repris dans le tampon d'homogénéisation et un dosage de protéines est réalisé par la méthode BCA (décrite précédemment). Des aliquots de 300 µg de protéines sont préparés, centrifugés à 1000 G pendant 10 min à 4°C et conservés sous forme de culot sec à -80°C.

2.2. Préparation des échantillons pour éléctrophorèse

Pour resolubiliser les culots mitochondriaux, on utilise le kit Native Page Prep (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. On ajoute de la digitonine 6x et on incube sur glace 15 min. On centrifuge 20000 G pendant 20 min à 4°C, le culot est éliminé et un dosage de protéines est réalisé sur le surnageant selon la méthode BCA (décrite précédemment) et les échantillons sont préparés pour le BN-Page à l'aide du kit Native Page Prep (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur.

2.3. BN-PAGE

Pour séparer les supercomplexes de la chaîne respiratoire, les échantillons sont déposés dans deux gels Bis-Tris 3-12 % d'acrylamide (Invitrogen, Native Page Bis Tris gels) et la migration est réalisée dans un tampon de migration (Invitrogen, Native Page Running Buffer et Cathode Buffer Additive). Celle-ci se fait à 80 V pendant 30 minutes, à 100 V pendant 90 min. Le tampon de migration est changé pour du tampon 10 fois moins concentré en bleu de coomassie. La migration se poursuit à 100 V pendant 60 minutes, et 150 V pendant 180 minutes.
Les deux gels sont ensuite pris en photo par scanner (Invitrogen, iBright FL1000).

Un des deux gels est transféré sur une membrane de PVDF à 100 V pendant 90 minutes dans un tampon de transfert (192 mM Glycine, 25 mM TRIS-HCL, 0,2 % SDS, 20 % éthanol). La membrane est ensuite préparée pour une immunoprécipitation, en fixant les protéines par un bain d'acide acétique 10% et d'isopropanol 25% pendant 10 minutes, en lavant ensuite à l'isopropanol 100% pendant 5 minutes et en équilibrant la membrane avec du PBS-Tween 20 0,1% (PBST) pendant 5 minutes. La membrane est ensuite saturée pendant 1h à température ambiante avec une solution de lait 5 % PBST et incubée avec un anticorps primaire dirigé contre le complexe I (anti-grim19). L'immunoprécipitation et l'immunorévélation ont lieu comme précédemment décrites pour le Western Blot.

Le deuxième gel est mis sur glace en attendant son utilisation, puis il est incubé avec une solution pendant 20 min (*Table 6*) permettant de révéler l'activité du complexe I dans le gel [419]. Le gel est ensuite pris en photo à l'aide d'un scanner.

Chapitre VI : Etude de l'environnement lipidique du complexe I de la chaîne respiratoire et de son assemblage en supercomplexes

Nom de la solution	Composition
Tampon PBS	NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na ₂ HPO ₄ 10 mM, KH ₂ PO ₄ 1,76 mM
Solution de Krebs	NaCl 120 mM, KCL 4.8 mM, MgSO ₄₋ 7H2O 2.4 mM, KH ₂ PO ₄ 1.2 mM, NaHCO ₃ 24 mM
Solution S	EGTA 10 mM, CaCO ₃ 2.77 mM, KOH 70 mM, Imidazol 20 mM, Mg ²⁺ libre 1 mM, Taurine 20 mM, dithiotréitol 0.5 mM, MgATP 5.7 mM, phosphocréatine 15 mM, potassium méthanesulfonate 50 mM, pH 7,1
Solution R	EGTA 10 mM, CaCO ₃ 2,77 mM, KOH 110 mM, NaOH 10 mM, K ₂ HPO ₄ 3 mM ; Imidazole 20 mM, Mg ²⁺ libre 1 mM, Taurine 20 mM DTT 0,5 mL, Glutamate 10 mM, Malate 4 mM, CH ₃ KO ₃ S 100 mM, BSA 2 mg/ml et pH 7,1
Tampon d'homogénéisation	HEPES 4 mM, EGTA 1 mM, Tritonx100 0.1 %, pH8,7
Tampon RIPA	50 mM Tris-HCL pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % de Triton, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS, 0,5 % acide déoxycholique
Inhibiteurs de phosphatases	NaF 50 mM, NaPPi 5 mM, DTT 1 mM, β-glycérophosphate 1 mM, Orthovanadate 1 mM
Solution activité complexe I	2 mM TRIS HCL, 0,1 mg/mL NADH, 2,5 mg/mL Nitrotetrazolium Blue Chloride

Table 6 : Composition des solutions

RESULTATS

CHAPITRE I. Etude des effets de la délétion de l'AMPK α 2 spécifiquement dans le cœur et inductible à l'âge adulte chez les souris mâle et femelle à l'état basal

I. Présentation

La protéine kinase dépendante de l'AMP (AMPK) est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire et un senseur métabolique cellulaire important [420]. Cette kinase est constituée d'une sous-unité catalytique (α) et deux sous-unités régulatrices (β et γ). L'isoforme de la sous-unité catalytique majoritaire dans le cœur est l'isoforme $\alpha 2$ (70 à 80% de l'activité catalytique totale de l'AMPK) qui est principalement exprimée dans les cardiomyocytes, alors que l'isoforme α 1 est prédominante dans les cellules non-myocytaires [421, 422]. L'AMPK est activée par un rapport AMP/ATP élevé et régule le métabolisme énergétique en modulant l'activité d'enzymes du métabolisme énergétique et en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans la production/consommation d'énergie. L'AMPK stimule les processus catalytiques produisant de l'ATP et inhibe les processus consommant de l'ATP afin de rétablir la balance énergétique [423]. Des études récentes ont montré une implication de l'AMPK dans des régulations non-métaboliques comme la fibrose cardiaque, ainsi que la production de ROS cytosoliques par la NADPH oxidase [295, 369, 378, 424]. Il y a un peu plus de dix ans, notre équipe a montré des modifications de la composition en cardiolipides (CL) de la membrane des mitochondries dans le ventricule gauche de souris mâles invalidées de manière globale et constitutive pour l'AMPK α 2 [357]. Chez les animaux KO, la délétion de l'AMPK α 2 a mené à une diminution des capacités oxydatives mitochondriales sans modification de la biogenèse mitochondriale ou d'activité d'enzymes clés du métabolisme énergétique : mais avec une baisse du niveau de CL ainsi que de l'expression génique d'enzymes de la biosynthèse des CL. Cette étude a établi un lien entre l'AMPK et la composition phospholipidique de la membrane mitochondriale. Sachant que cette dernière est cruciale pour le maintien de la fonction mitochondriale [425-427], une modulation de la respiration mitochondriale par l'AMPK à travers la modification de la synthèse et/ou de la maturation des CL peut être envisagée. De manière intéressante, une étude plus récente a montré une diminution de l'activité de l'AMPK associée à une baisse de CL dans le ventricule gauche de rats mâles traités à la doxorubicine [163]. Dans cette étude, les rats femelles traitées à la doxorubicine montraient une moindre dégradation de la fonction cardiaque et des capacités oxydatives mitochondriales que les mâles et présentaient un maintien de l'activité de l'AMPK et du contenu en cardiolipides. Ces résultats ont donc montré également un rôle possible de l'AMPK dans le dimorphisme sexuel rapporté dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires [147]. Dans plusieurs

études, l'AMPK a été présentée comme une cible thérapeutique potentielle pour plusieurs maladies cardiovasculaires puisque son activation pharmacologique a été protectrice pour le cœur dans des modèles d'ischémie/reperfusion, de cardiomyopathie diabétique et d'insuffisance cardiaque (IC) [391-393, 411]. Une déficience dans la production d'ATP a été observée dans différents modèles [428] et étant donné le rôle de l'AMPK dans le métabolisme énergétique, une activation de l'AMPK comme stratégie thérapeutique serait à envisager. Cependant, les mécanismes des effets protecteurs de l'AMPK dans ces pathologies cardiaques ne sont pas encore élucidés. Le lien entre AMPK et CL est à approfondir car ceci pourrait être un des mécanismes responsables de la plus grande résistance observée dans le cœur des animaux femelles. Nous avons donc généré un modèle original de souris invalidées pour l'AMPK α 2 spécifiquement dans le cœur et inductible à l'âge adulte afin d'étudier les conséquences de la délétion sur la fonction contractile et le métabolisme énergétique cardiaque, d'explorer le lien entre AMPK et CL, et d'identifier une spécificité sexuelle des effets dépendants de l'AMPK.

II. Résultats et discussion

Dans cette étude, nous montrons chez les souris mâles que la délétion spécifique au cœur et inductible de l'AMPK α 2 1) n'induit pas d'hypertrophie cardiaque, 2) mène à une dysfonction systolique du ventricule gauche associée à une légère dilatation du ventricule gauche, 3) induit le développement d'une fibrose, cardiaque, 4) réduit la respiration par le complexe I sans modification de la masse mitochondriale ou de l'activité *in vitro* du complexe I, 5) cette diminution de la respiration mitochondriale étant associée à un réarrangement des espèces de cardiolipides et à une augmentation de la quantité de complexe I non intégré dans des supercomplexes. Ces effets ont été observés uniquement chez les mâles et n'ont pas été retrouvés chez les femelles, suggérant qu'il n'y a pas d'effet majeur de la délétion chez les souris femelles à l'état basal.

Plusieurs modèles de souris invalidées pour l'AMPK ont été générés par knock-out ou par des dominants négatifs ciblant une ou plusieurs sous-unités et ont montré des modifications variables de l'activité de l'AMPK et des mécanismes compensatoires entre les différentes isoformes [392, 407, 429]. Dans notre modèle de délétion de l'AMPK α 2 spécifique au cœur et inductible à l'âge adulte, l'expression de la protéine AMPK α 2 est fortement diminuée et ceci est associé à une baisse de la phosphorylation de l'AMPK. Cependant, la phosphorylation de l'ACC, une cible directe de l'AMPK, n'est pas modifiée. Ceci indique que le faible niveau d'AMPK α 2 restant ainsi que celui d'AMPK α 1, dont l'expression cardiaque n'est pas modifiée dans notre modèle, peut être suffisant pour maintenir la phosphorylation de cette enzyme lorsque l'animal n'est pas soumis à un stress cardiaque [430]. De plus, l'AMPK phosphoryle plusieurs autres protéines et l'affinité de l'AMPK α 1 et de l'AMPK α 2 pour leurs cibles diffère et leur donne une spécificité

Résultats

relative [431]. Le phénotype des souris mâles observé dans cette étude prouve que la diminution importante de l'expression de l'AMPKa2 peut modifier des voies de signalisation en aval de l'AMPK. Ceci suggère que l'action de différentes cibles préférentielles de l'AMPKa2 pourrait être modulée dans ce modèle du fait que le peu d'AMPKa2 résiduelle ne permettrait pas d'assurer leur phosphorylation et que ces cibles ne pourraient pas être phosphorylées aussi efficacement par l'AMPKa1.

Chez les mâles KO, les altérations modestes des paramètres contractiles du cœur (fraction d'éjection, fraction de raccourcissement, diamètres internes du VG en fin de systole, diamètre interne du VG en fin de diastole) suggèrent une légère dysfonction systolique du ventricule gauche, comme il a été observé dans le modèle d'invalidation globale et constitutive de l'AMPK α 2 [357, 393, 407]. L'altération de la fonction cardiaque a été observée dès la 7^{ème} semaine après la délétion et s'est aggravée durant les semaines suivantes sans modification des paramètres anatomiques en comparaison avec les souris mâles contrôles. Plusieurs études ont montré un lien étroit entre AMPK et la régulation de la synthèse protéique [338, 339] et ont suggéré un effet anti-hypertrophique de l'AMPK en condition de stress [401, 407, 432]. Cependant, notre étude ne montre aucune modification de la masse cardiaque chez les souris mâles et les femelles lorsque les animaux ne sont pas soumis à un stress. Ce résultat rappelle ce qui a été observé dans un autre modèle de souris dominant négatif ou KO global de l'AMPK α 2 [357, 407], suggérant que l'AMPK ne joue pas de rôle majeur dans la croissance/hypertrophie cardiaque à l'état basal.

De manière intéressante, la dysfonction ventriculaire observée chez les souris mâles KO est associée à une augmentation importante de la fibrose cardiaque qui corrèle de manière significative avec une diminution de la fraction d'éjection, indiquant que la fibrose affecte les propriétés mécaniques et la fonction cardiaque. La fibrose met en jeu essentiellement les fibroblastes cardiaques. Dans notre modèle expérimental, l'AMPK α 2 a été délétée spécifiquement dans les cardiomyocytes, et cette délétion a conduit à une stimulation de la fibrose par les fibroblastes, impliquant ainsi une communication entre les deux types cellulaires. Le lien entre l'AMPK et la fibrose a déjà été suggéré puisqu'une activation de l'AMPK peut supprimer la fibrose induite par différents stress (pour revue, [369]) ; Contrairement au rôle de l'AMPK α 1, l'isoforme majoritaire dans les fibroblastes, qui a clairement été démontré dans la prolifération des fibroblastes cardiaques et dans le développement de la fibrose en particulier à travers l'axe TGF- β 1/p38 [295], la régulation de la fibrose par l'AMPK α 2 est encore peu comprise. Il est maintenant bien établi que les voies moléculaires impliquées dans la fibrose cardiaque sont largement régulées par les microARNs (miRs) [433, 434], parmi eux miR-21 et miR-133 ont été décrits comme des facteurs pro-fibrosant et anti-fibrosant respectivement. Dans les fibroblastes cardiaques de rat, il a également été montré que l'activation de l'AMPK permet l'expression de la famille miR-29 anti-fibrosante [435], démontrant ainsi un rôle de

l'AMPK dans le développement de la fibrose grâce à une régulation de l'expression des miRs. Dans notre étude, l'expression de miR-21 est significativement augmentée chez les souris KO, tandis que l'augmentation de l'expression du miR-133 qui est régulée par le 17β-estradiol [436], chez la femelle pourrait empêcher l'action pro-fibrosante du miR-21. Le miR-21 pourrait ainsi être à l'origine du dépôt de fibres de collagènes observé chez les mâles KO.

De manière surprenante, étant donné le rôle de l'AMPK dans le métabolisme énergétique, les souris femelles KO ne montrent pas d'altération mitochondriale. Ceci est cohérent avec la préservation des fonctions mitochondriales observée chez les femelles après un stress cardiaque, grâce à l'implication du 17β -estradiol dans la régulation de la biogenèse mitochondriale [436]. Notre analyse transcriptomique a confirmé l'impact du sexe biologique sur l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la biogenèse mitochondriale (*Pgc-1* β , *Ppar* α *et Err* α). Dans cette étude, la délétion cardiaque de l'AMPK α 2 induit une diminution de la respiration par le complexe I dans le ventricule gauche des souris mâles. Ceci n'est pas associé à une modification de la capacité oxydative maximale des mitochondries ainsi que de la masse mitochondriale comme observée dans le modèle de KO global et constitutif [357], même si l'expression de certains gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale est significativement diminuée (*Nrf-2* et *Cox1*) ou tend à diminuer (*ERR* α , *Tfam* et *Cox4*).

Il est connu que l'activité in situ des complexes de la chaîne respiratoire peut être affectée par le contenu en phospholipides de la membrane interne de la mitochondrie et que le complexe I est particulièrement sensible à ce microenvironnement [437]. Chez les souris mâles AMPKa2 KO globale et constitutive, l'altération de la respiration pas le complexe I était associée à une diminution importante du contenu en CL du VG [357]. Les CL jouent un rôle important dans plusieurs processus du métabolisme mitochondrial [438], ceci suggère que ces altérations de la composition en CL de la membrane mitochondriale pourraient expliquer les dysfonctions de la chaîne respiratoire observées dans ce modèle. Dans cette étude, la délétion de l'AMPK α 2 a induit une diminution de l'expression de plusieurs enzymes de la biosynthèse des CL (Cds1 et Fads2) ainsi qu'un réarrangement des différentes espèces de CL. Ceci permet d'avancer que l'AMPK influence le profil des CL mitochondriaux, conformément à ce que notre équipe avait déjà observé dans des études précédentes [163, 357]. La réduction de l'expression de Cds1 chez les souris mâles KO est intéressante puisque son expression est sous le contrôle de l'axe PGC-1a/ERRa [439]. L'AMPK régulant de manière importante PGC-1 α , celle-ci pourrait moduler le métabolisme des CL par cette voie de signalisation. La tendance à la baisse de l'expression de ERRa chez les souris mâles KO est en faveur de cette hypothèse. Ces altérations au niveau de la composition en CL n'ont pas été retrouvées chez les souris femelles KO, ce qui suggère qu'il existe un dimorphisme sexuel dans la régulation de la composition

CHAPITRE I

des CL de la membrane interne mitochondriale [440, 441]. Il semblerait que la régulation de la biosynthèse/maturation des CL soit légèrement différente entre les sexes puisque l'expression de la majorité des enzymes impliquées dans ces processus est affectée par le sexe dans ce modèle. L'impact du statut hormonal sur la synthèse de CL a été montré récemment dans le cerveau [442] mais ceci requière de plus amples recherches dans le cœur. Il a été retrouvé une profonde disparité entre des rats mâles et femelles traités à la doxorubicine ce qui appuie l'hypothèse d'un dimorphisme sexuel dans le métabolisme des CL [138]. Les CL jouent plusieurs rôles dans l'organisation de la membrane mitochondriale et sont essentiels à la formation de supercomplexes [139]. En effet, les complexes de la chaîne respiratoire interagissent physiquement en structures très organisées, plutôt qu'en entité seule, ce qui permet un meilleur couplage fonctionnel et par conséquent un transfert d'électrons plus efficace. Chez les souris mâles KO, la proportion de complexe I non inclus dans des supercomplexes est augmentée. Étant donné que ni la respiration mitochondriale, ni la composition en CL, ni le niveau de complexe I dans des supercomplexes ne sont modifiés dans le cœur des souris femelles KO, nous pouvons émettre l'hypothèse que ces altérations de la composition phospholipidique de chaîne respiratoire, de la membrane et des supercomplexes ne peuvent être une coïncidence. Dans le syndrome de Barth induit par une mutation du gène codant pour la taffazine, une enzyme responsable de la maturation des CL, cela mène à une instabilité des supercomplexes de la chaîne respiratoire qui affecte l'activité du complexe I [443], ce qui souligne le rôle important des CL dans la formation et la fonction des supercomplexes contenant le complexe I. Chez les souris mâles KO, les altérations au niveau du profil de CL et des supercomplexes contenant le complexe l affectent le fonctionnement de la chaîne respiratoire, ce qui pourrait expliquer le déficit de respiration mitochondriale par le complexe l observé chez ces animaux.

CHAPITRE I

Spatiotemporal AMPKα2 deletion in mice induces fibrosis and cardiolipin remodeling leading to cardiac and mitochondrial dysfunction in males only.

Lucile Grimbert¹, Maria-Nieves Sanz¹, Mélanie Gressette¹, Catherine Rucker-Martin², Marta Novotova^{3,4}, Audrey Solgadi⁵, Eric Jacquet⁶, Christophe Lemaire^{1,7}, Vladimir Veksler¹, Mathias Mericskay¹, Renée Ventura-Clapier¹, Jérôme Piquereau^{1,†} and Anne Garnier^{1,†}

¹ UMR-S 1180, Inserm, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

² INSERM UMR_S 999, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, France

³ Institute of Molecular Physiology and Genetics, Centre of Biosciences, Slovak, Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

⁴ Institute of Experimental Endocrinology, Biomedical Research Center, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

⁵ Univ. Paris Sud, Université Paris Saclay, Faculté de Pharmacie, Service d'Analyse des Médicaments et Métabolites, Institut d'Innovation Thérapeutique, Chatenay-Malabry, France.

⁶ Institut de chimie des substances naturelles, Université Paris-Sacla, CNRS, Gif-sur-Yvette, France.

⁷ Université Versailles St. Quentin, Université Paris-Saclay, Versailles, France

+ These authors contributed equally to this work.

Address for correspondence: Pr Anne Garnier

U-1180 INSERM

Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud

5 rue J-B Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

Tel.: (33-1) 46.83.52.49, Fax: (33-1) 46.83.54.75, E-mail: anne.garnier@u-psud.fr

Abstract

AMPK is a major regulator of cellular energetics which plays key role in acute metabolic response and in long term adaptation of organs subjected to stress by phosphorylating a large variety of substrates. For instance, it phosphorylates the peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1α (PGC- 1α), the master regulator of energy metabolism, and it's thus no surprise that AMPK has largely been studied for its involvement in energy homeostasis. However, its role extends beyond this energetic aspect and recent works have suggested much more complex functions for this enzyme which also exhibits non-metabolic effects. In the heart, in which AMPK has been the subject of great interest for its implication in the pathophysiology of heart failure, the exact role of this kinase is yet incompletely understood and its non-metabolic effects in particular are shrouded in mystery. We thus generated a cardio-specific inducible model of Ampka2 gene deletion in mice (Ampka2ciKO) to decipher the role of AMPK in the heart of males and females under basal conditions. Ampka2 deficiency led to a progressive left ventricular systolic dysfunction and the development of cardiac fibrosis in male only. Sixteen weeks after deletion induction, cardiac alterations were associated with complex I-driven respiration reduction without any significant changes in mitochondrial mass or in vitro complex I activity. A rearrangement of the cardiolipin species and an increase in the amount of complex I that is not integrated into the supercomplexes were observed in these male $Ampk\alpha 2ciKO$ mice. None of these effects have been reported in female $Ampk\alpha 2ciKO$ mice, suggesting no major impact of this deletion in female mice at basal state. Whereas the results confirm the narrow link between AMPK and cardiac energy metabolism, they also propose an involvement of AMPK in the regulation of myocardial fibrosis and mitochondrial membrane cadiolipin composition. Importantly, it would seem that AMPK could be differently involved in these process in males and females.

Introduction

AMP activated protein kinase (AMPK) is an ubiquitous serine/threonine kinase which acts as a cellular "fuel gauge" regulating energy homeostasis [1]. This kinase is composed of a catalytic subunit (α) and two regulatory subunits (β and γ), each including several isoforms exhibiting differential tissue expression. In murine heart, the α -subunit type 2 (α 2) is the major catalytic subunit isoform (70-80% of the total AMPK activity) and is mostly expressed in the cardiomyocytes, the α -subunit type 1 (α 1) isoform being predominant in the non-myocyte cells [2, 3]. AMPK is activated under conditions of metabolic stress that depletes ATP [1] and modulates a number of physiological processes aiming at restoring energy balance [4]. Its activation requires allosteric stimulation by AMP and the α -subunit Thr172 phosphorylation by upstream kinases [5] such as Liver Kinase B1 (LKB1) [6] or Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase (CamKK) [7]. It regulates energy metabolism since it can directly modulate the activity of key enzymes of cellular energetics and impact expression of many genes involved in energy production/consumption processes [8]. For instance, AMPK interacts with the peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1α (PGC- 1α), a master regulator of energy metabolism which amongst others stimulates mitochondrial biogenesis process. It also stimulates glucose and fatty acid uptake through the translocation of GLUT4 and CD36 transporters to the membrane [9], boosts glycolysis by directly activating 6-phosphofructo-2-kinase (PFK2) [10], and increases fatty acid oxidation by phosphorylating and inhibiting acetyl-CoA carboxylase (ACC) [11]. In a nutshell, AMPK stimulates catabolic processes producing ATP and inhibits anabolic processes consuming ATP [12].

Although the metabolic regulations of AMPK have been the main subject of a number of studies these last years, the role of AMPK extends beyond this energetic aspect. In the heart, it is known that this enzyme also exhibits non-metabolic effects like regulation of myocardial fibrosis and inhibition of cytosolic reactive oxygen species (ROS) production by NADPH oxidase [13-16]; this has to be considered when deciphering the part played by AMPK in cardiac physiology and pathophysiology. A bit more than ten years ago, our team showed modulations of cardiolipin (CL) composition of the mitochondrial membrane in cardiac left ventricle (LV) of a global and constitutive Ampka2 knockout mouse model [17]. In this KO animal, Ampka2 suppression led to significant decrease in mitochondrial oxidative capacities that were surprisingly not associated with alterations of mitochondrial biogenesis or changes in activity of various energy metabolism enzymes; but clear decreases in CL content and in the expression of several enzymes involved in CL homeostasis were evidenced. This suggested a link between AMPK and the mitochondrial membrane components; knowing the importance of mitochondrial phospholipid composition for suitable mitochondrial functions [18-20], a potential impact of AMPK activity on mitochondrial respiratory function through a regulation of CL biosynthesis/maturation could be proposed. Intriguingly, a more recent work also highlighted a concomitant decrease in AMPK activity and in CL content in LV of male rats treated with doxorubicin [21]. In this study, doxorubicin treated female rats exhibited lesser alterations in cardiac function and mitochondrial oxidative capacities than male and showed preserved AMPK activity and CL content. Beyond the relationship between AMPK, CL and mitochondrial function, these interesting results could evoke a possible role for AMPK in the sexual dimorphism extensively reported in cardiovascular diseases [22].

This last decade, AMPK has often been presented as a potential therapeutic target in many cardiovascular diseases since its pharmacological stimulation has been shown to be beneficial for the pathological heart under many circumstances such as ischemia/reperfusion, diabetic cardiomyopathy, pathological hypertrophy or heart failure (HF) [23-26]. ATP production deficiency has been extensively demonstrated in these pathologies [27] and, given the role of AMPK in energy metabolism, it is quite rational to consider the activation of AMPK as a plausible strategy to improve myocardial energetics in patients affected by these diseases. Yet, before going further in the development of such a therapy, a better understanding of AMPK role in cardiomyocyte homeostasis is required. The clarification of the connection between AMPK and CLs is of particular interest since knowledge of this phenomenon is almost nonexistent in the one hand and the AMPK/CL axis could be a part of the mechanisms responsible for the higher resistance of the female heart on the other hand.

Currently, the inducible and tissue specific deletion of a given protein is one of the most powerful tools to understand its roles in mature organs. Thus, we generated an original model of cardiac-specific *Ampka2* knockout mouse inducible in adult by tamoxifen injection 1) to study the consequences of cardiomyocyte specific *Ampka2* deletion on cardiac function and cardiac energy metabolism, 2) to investigate the interplay between AMPK and cardiac CL and 3) to identify sex-specific AMPK-dependent regulations.

Materials and Methods

Animals

Ampka2^{floxAE/floxAE6} (AMPKa2^{ff}) homozygous mice and α -MHC-MerCreMer (α -MHC-Cre) mice were crossed to create cardiac-specific and inducible knock-out (ciKO) mice (α -MHC-MerCreMer x *Ampk^{floxAE6/floxAE6}* (α -MHC-Cre/*Ampka2^{ff}*)). Male α -MHC-Cre/*Ampka2^{ff}* mice were injected with tamoxifen (40mg/kg i.p daily x 2 days) at the age of 8 weeks to induce *Ampka2* deletion, thereby generating *Ampka2* cardiac-specific inducible mice called *Ampka2ciKO* or KO in this study. Littermate *Ampka2^{floxAE6/floxAE6}* mice not carrying α -MHC-MerCreMer transgene were subjected to the same tamoxifen treatment and were used as control mice (*Ampka2^{ff}* or CT). Mice were euthanized 16 weeks after tamoxifen injection and heart were rapidly excised, rinsed in cold calcium-free Krebs solution and weighed. A part of the left ventricle (LV) was immediately used for mitochondrial function assessment and another part was flash frozen in liquid nitrogen for further biochemical determinations. All animal experimental procedures were approved by animal ethics committee of Paris-Sud University, authorized by French government (authorization number: B9201901) and complied with directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes.

Echocardiography

Echocardiography was done using a 12 Mhz transducer (Vivid 7, General Electric Healthcare) under 2.5% isoflurane gas anaesthesia to assess cardiac function. The body temperature was maintained with a heating pad. M-mode echocardiography was used to determine left ventricular mass, fractional shortening and left ventricular ejection fraction.

Histological analysis

Hearts were fixed in 4% paraformaldehyde, paraffin embedded and serially sectioned (5 µm). Sections were stained with Sirius red. Fibrosis quantification was performed on 3-4 sections (5-10 fields/section) per animal using Image J software.

Mitochondrial functional assays in permeabilized cardiac fibres

Fibres prepared from the left ventricle were permeabilized with saponin as previously described [28] and kept on ice until use in S buffer (in mM: 2.77 CaK₂ ethyleneglycol tetraacetic acid (EGTA), 7.23 K₂EGTA [100 nM free Ca²⁺], 6.56 MgCl₂ [1 mM free Mg²⁺], 5.7 Na₂ATP, 15 phosphocreatine, 20 taurine, 0.5 dithiothreitol (DTT), 50 K-methane sulfonate [160 mM ionic

strength], 20 imidazole, pH 7.1). Measurements aimed at determining mitochondrial parameters were expressed per gram of dry fibre weight.

Mitochondrial respiration

Mitochondrial respiratory function was studied *in situ* in saponin-permeabilized cardiac muscle fibres using a Clarke electrode as previously described [28]. A protocol was designed to measure oxygen consumption after successive addition of ADP (2 mM), malate (4 mM), L-glycerol-3phosphate (4 mmol/L), palmitoyl-CoA and carnitine (100 μ M and 2 mM), pyruvate (1 mM), glutamate (10 mM), succinate (15 mM), amytal (an inhibitor of complex I, 1 mM) and the complex IV substrates N, N', N'-tetramethyl-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)ascorbate (0.5 mM) (activator of complex IV) to respiration solution (in mM: 2.77 CaK₂ ethyleneglycol tetraacetic acid (EGTA), 7.23 K₂EGTA [100 nM free Ca²⁺], 1.38 MgCl₂, 3 K₂HPO₄, 20 taurine, 0.5 dithiothreitol (DTT), 90 K-methane sulfonate and 10 Na-methane sulfonate, 20 imidazole, pH 7.1) at 23 °C. Rates of respiration are given in μ moles O₂/min/g dry weight.

Enzyme activity

Frozen tissue samples were weighed, homogenized (Bertin Precellys 24) in ice-cold buffer (50 mg/ml) containing 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 5 mM (pH 8.7), EGTA 1 mM, DTT 1 mM and 0.1% Triton X-100. Activities of citrate synthase (CS), cytochrome c oxidase (COX) and complex I were determined using standard spectrophotometric assays [29, 30].

Immunoblotting

Frozen tissue samples were homogenized (Bertin Precellys 24) in ice cold buffer containing HEPES 50 mM, KCl 50 mM, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 1 mM, β -glycerophosphate 5 mM, Triton X-100 0.1%, orthovanadate 1 mM, dithithreitol 1 mM, sodium fluoride 50 mM, Na pyrophosphate 5 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride 0.2 mM and antiprotease cocktail set (Calbiochem 539134). Protein extracts were separated on SDS-polyacrylamide gel (8 to 12%) and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes for Western blot. After 1 hour of blocking in PBS containing TWEEN20 (0.1%) and non-fat milk (5%), the membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibody (Table 1). After washing, the membranes were incubated with a secondary antibody coupled with horseradish peroxidase for 1 hour at room temperature and visualized using chemiluminescent substrate

(LuminataTM Western Chemiluminescent HRP Substrates, Millipore). Light emission was detected by autoradiography and quantified using an image-analysis system (iBright FL1000, Invitrogen).

Blue-Native Page

Mitochondria and mitochondrial electron transfer chain complexes were isolated from heart tissue using digitonin 5% (from Native Page Sample Prep Kit, Invitrogen) [31]. Fifty micrograms of proteins were loaded on a 3-16% acrylamide native gel (Invitrogen). After electrophoresis, proteins were transferred to a PVDF membrane. Immunoblotting was performed with Grim-19 antibody (Abcam) raised against NDUFA13 complex I subunit.

Real-Time Quantitative RT-PCR Analysis

Frozen tissue samples were weighed, homogenized (Bertin Precellys 24) in ice-cold buffer. Total ventricular RNA was extracted using standard procedure with Trizol reagent (Invitrogen). cDNA were synthesized from 2µg total RNA according to the protocol provided with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, France). Real-time PCR was performed using TaqMan Low Density Array (TLDA) technology as previously described [32]. Predesigned TaqMan probe and primer sets for target genes were chosen from an on-line catalog (Applied Biosystems, France). TLDA were designed to amplify 41 cDNA for each sample as follows: 36 target genes involved in energy metabolism, mitochondrial function and cardiac remodeling and 5 housekeeping genes (Table 2). Each PCR reaction was performed on 4ng of cDNA in a volume of 1µl. The thermal cycling conditions were 2min at 50°C and 10min at 95°C, followed by 40 cycles of 15s at 95°C and 1min at 60°C. Quantification was achieved using the $\Delta\Delta C_t$ method. The average C_t obtained in CT group was used as a calibrator and the geometric mean of the 5 housekeeping genes was used as the reference for normalization. The amplification efficiency of each probe is estimated maximal as described by the manufacturer.

Quantification of Colla (forward 5'-CTCAAGATGTGCCACTCTGACT-3', reverse 5'-CTCCATGTTGCAGTAGACCTTG-3'), and Col3a (5'-GAT GGAAACCCTGGATCAGA -3', 5'-GCACCAGGAGAACCATTTTC-3') mRNA was assessed using the SYBR®Green method on a LightCycler rapid thermal cycler (Roche Diagnostics) as previously described [33]. For each target gene a standard curve was constructed from the analysis of a fivefold cDNA serial dilution and used for samples concentration calculation. Ywhaz (5'-AGACGGAAGGTGCTGAGAAA-3', 5'-GAAGCATTGGGGATCAAGAA-3') was used as housekeeping gene as its expression did not differ between groups.

Electron Microscopy

Left ventricular papillary muscles were isolated from three control and three KO mouse hearts, fixated with 2% glutaraldehyde in cacodylate buffer (in mM: 150 Na-Cacodylate, 2CaCl2, pH 7.3) for 1 h, post-fixated 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 (58–60 nm) longitudinal sections were cut using an ultramicro-tome (Power-Tome MT-XL, RMC/Sorvall, Tucson, AZ, 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 15000 and analyzed using Graphic Cell Analyzer14.

Cardiolipin content

Cardiolipin analysis was performed by liquid chromatography using corona-CAD detector as previously described [21]. As cardiolipins are almost exclusively located in the inner mitochondrial membrane, lipids were extracted from 10 to 20 mg of heart homogenized in PBS using the Folch method [34]. Total lipids were extracted by adding 1.5mL of methanol and 3mL of chloroform to the tissue suspension. After centrifugation at 1000g for 10 min, the lower phase containing total lipids was collected and evaporated to dryness at room temperature under nitrogen gas. The samples were resuspended in 100µL of chloroform per 10 mg of heart and subsequently analyzed. Quantification of cardiolipin was performed on a Dionex system (ThermoFisher Scientific) equipped with a Corona-CAD Ultra U-3000 **RSLC** (ThermoFisher Scientific). The separation of lipids was performed with a PVA-Sil column (150 x 2.1 mm I.D., 120 A) (YMC Europe GmbH) at 35°C. Chromatographic method was inspired from the method developed by Imbert et al. [35]. The flow rate was set at 0.400mL/min and 5µL of sample were injected. The corona-CAD nebulizer was set at 30°C and the nitrogen pressure was set at 5 bar. Standard curve from 0.5 to 0.025mg/mL of cardiolipin sodium salt from bovine heart (98% purity from Sigma-Aldrich) was used.

Results

Cardiac specific tamoxifen-induced loss of Ampka2 in α -MHC-Cre/flox male and female mice

At 8 weeks of age, α -MHC-Cre/*Ampka2*^{ff} mice were given tamoxifen to induce exon 6 excision from the floxed *Ampka2* alleles. After 16 weeks of *Ampka2* deletion, AMPKa2 protein level in LV homogenates exhibited reductions of 95±1% in male and 90±3% in female when compared with the respective *Ampk*^{ff} mice (Figure 1A). This drastic decrease in AMPKa2 content was not compensated by any changes in AMPKa1 expression (Figure 1A) and led to an important decrease in total AMPKa subunit content in the LV in both sex (Figure 1B). Whether in male or female, this was associated with a lower amount of phosphorylated AMPKa (Thr 172), the active form of AMPK. Even though this set of data could suggest a decrease in AMPKa2, was not significantly different between the all groups while the total amount of ACC was unchanged in *Ampka2ciKO* mice (Figure 1B). The cardiac specificity of *Ampka2* deletion in the present animal model was confirmed by the similar protein level of AMPKa2 and AMPKa1 in skeletal muscle of *Ampka2ciKO* and *Ampk*^{ff} male mice (Figure 1C).

Ampka2ciKO male mutants develop a mild left ventricular systolic dysfunction

After 16 weeks of AMPK α 2 deletion, mutant mice did not display any changes in heart weight as judged by absolute organ weight and heart weight-to-body weight ratio (Figure 2A and B). The expression of the gene encoding brain natriuretic peptide (Bnp) was significantly increased after Ampk α 2 deletion and was lower in females than in males (Figure 2C). Cardiac function of Ampka2ciKO mice and their control littermates was assessed by serial echocardiography 3, 7, 10, 13 and 16 weeks after the first tamoxifen injection in males and by a single echocardiography (before sacrifice) in females. In males, while echocardiography parameters did not show any difference between control and mutant mice 3 weeks after induction of $Ampka^2$ deletion, significant decreases in LV ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) as well as a significant increase in end-systolic left ventricular internal diameter (LVIDs) were observed from 7 weeks after tamoxifen treatment (Figure 2D-G and Table 3). However, these alterations of cardiac systolic function were still slight after 16 weeks and no significant impact on cardiac output was noticed at this time point (Table 3). In these animals, diastolic function seemed to be more preserved since most of the diastolic echocardiography parameters were similar in CT and Ampka2ciKO mice at 16 weeks. Nevertheless, left ventricular telediastolic volume was significantly increased in Ampka2 deleted male mice at this time point (Table 3) and LVIDd

tended to be higher in this group, even showing a significant difference with $Ampk^{ff}$ at 7 weeks (Figure 2G). In females, echocardiography did not reveal any significant modifications between CT and KO in LV ejection fraction (Figure 2H), fractional shortening (Figure 2I) and ventricular internal diameters (Figure 2J-K and Table 4). This is in contrast with the mild left ventricular systolic dysfunction observed in KO male mice and suggests that female heart could be more resistant to $Ampk\alpha 2$ deletion.

Cardiac-specific Ampk α 2 deletion is associated with ventricular fibrosis and mitochondrial alterations in males

Inasmuch as ventricular dysfunction has been reported to be often associated with fibrosis which changes tissue properties and negatively affects contraction and/or relaxation, the consequences of *Ampka2* deletion on fibrosis have been assessed in males using Sirius red staining. Total fibrosis of LV was markedly increased in *Ampka2ciKO* mice after 16 weeks of deletion and collagen deposition was observed in the vicinity of the vessels (perivascular fibrosis) as well as around the cardiomyocytes (interstitial fibrosis) (Figure 3A). In line with these observations, the expression level of *Colla* was significantly increased and *Col3a* expression strongly tended to be higher in mutant male mice in comparison with CT mice (Figure 3B). Expression of the profibrotic miR-21 was significantly increased in *Ampka2ciKO* mice while the expression of anti-fibrotic miR133a was not impacted by genotype but was significantly higher in females (Figure 3C). Interestingly, a strong correlation between EF and percentage of total fibrosis has been highlighted (Figure 3D), thereby confirming that fibrosis strongly affects ventricular function.

The loss of AMPK α 2, known to be a major regulator of cellular energetics, negatively impacted mitochondrial energy production function only in males since respiration rates measured in permeabilized fibers in presence of malate, pyruvate and glutamate were largely decreased in *Ampka2ciKO* male mice (Figure 4A), these parameters were similar to control in female *Ampka2ciKO* mice (Figure 4A). In males, the subsequent addition of succinate with or without amytal (inhibitor of complex I) led to the normalization of mitochondrial O₂ consumption to control values in mutant mice (Figure 4A). This indicates that maximal mitochondrial oxidative capacities were comparable in both male groups, what was confirmed by the equivalent TMPD stimulated respiration rate (Figure 4A) and the similar activity of citrate synthase (CS) (Figure 4B) which is traditionally used as a marker of functional mitochondrial mass. In line with the latter, no significant difference in CS protein level was noticed in male mutant mice compared to *Ampk*^{##}*mice* either (Figure 4C). Although respiration under TMPD was absolutely normal in

Ampka2ciKO male mice (Figure 4A), cytochrome oxidase (COX) activity was slightly reduced in this group, confirming that COX is not limiting the phosphorylation oxidative process. Altogether, these results suggest that the decrease in mitochondrial respiration observed in male when malate, pyruvate and glutamate were added in the respiration chamber would be due to alterations of complex I of electron transfer chain (ETC). Yet, activity of complex I measured on protein homogenate of LV and the protein content of C-I-20 (a complex I subunit) were not changed by the loss of AMPKa2 (Figure 4B and D). Incidentally, none of the subunits of the five complexes of ETC showed alterations 16 weeks after $Ampk\alpha 2$ deletion in males (Figure 4D). Despite the fact that mitochondrial mass and maximal oxidative capacities seemed to be similar in both male groups, the significant decrease in Nrf2 and Cox1 expression and the strong trend towards lower expression of ERRa, Tfam and Cox4 displayed by male mutant mice in comparison with controls could suggest a slight alteration of mitochondrial biogenesis; even though Pgcla, $Pgc1\beta$ and $Ppar\alpha$ expression seemed not to be affected by the loss of AMPK\alpha2 (Figure 4E). Conversely, expression of all these genes was similar to control after 16 weeks of $Ampk\alpha 2$ deletion in females (Figure 4E). Note that the expression of $Pgc1\beta$, Nrf2 and $Ppar\alpha$ was significantly modulated by sex (Figure 4E).

In male, cytoarchitecture analysis of cardiomyocytes revealed that, beyond mitochondrial biogenesis, mitochondrial life cycle could be more largely disturbed by $Ampk\alpha 2$ deletion. Indeed, in LV of Ampka2ciKO mice, mitochondria were not as well organized along the myofilaments as CT ones (Figure 5Aa and 5Ab), exhibited a marked heterogeneity in size (Figure 5Ab and 5Ac) and were frequently organized in clusters (Figure 5Ac). Important disorganization of cristae (Figure 5Ad and 5Ae) and "giant" mitochondria (Figure 5Af) were also frequently noticed in male mutant mice. The latter point could be partly explained by a potential alteration of mitochondrial dynamics process since Drp1 expression tended to be lower when AMPKa2 is not expressed while the expressions of Mfn1, Mfn2 and Opa1 were not significantly changed by the deletion (Figure 5B). Of note, no alteration in the expression of all these genes were noticed in female (Figure 5B) The major intracellular architectural modulations observed in males were not accompanied by any alteration of energy transfer between mitochondria and sarcoplasmic reticulum since mitochondria were able to supply SERCA with energy as efficiently in Ampka2ciKO mice as in $Ampk^{f/f}$ mice (Figure 5C). It is interesting to note that creatine kinase (CK) as energy supplier was unaltered in mutant mice (Figure 5C) which, along with comparable mitochondrial CK (miCK) protein content in both groups (Figure 4C), suggest functional CK shuttle in these mice.

The aforementioned mitochondrial alterations were not combined with clear changes in the expression profile of various important players of energy metabolism. In male, expression of genes involved in carbohydrate metabolism (Glut4, Hk2 and Pdk4) was not significantly modified 16 weeks after $Ampk\alpha^2$ deletion although Hk2 and Pdk4 showed a strong trend towards a reduction and an increase in their expression respectively (Figure 6A). No consequences of AMPK loss were noticed regarding the expression of these three genes in females (Figure 6A). Expression of key players of fatty acid utilization (Cpt1b, Cd36, Hadha, Acadm) was not significantly modified by 16 weeks of $Ampk\alpha 2$ deletion in both sexes, but these genes were significantly less expressed in females than in males (Figure 6 B). Expression of Sirt1, a major regulator of cellular energetics, and other important actors of energy metabolism (Sirt3 and Nampt) were not different in mutant when compared to CT mice either (Figure 6C). Regarding antioxidant defenses, mRNA level of Sod2 tended to be lower in Ampka2ciKO male mice but SOD2 protein content was not significantly different between both male groups (Figure 6D and E). Expression of Cat and Gpx1 was respectively unchanged and significantly decreased in mutant male mice (Figure 6D). In females, $Ampk\alpha^2$ deletion did not impact the expression of these genes (Figure 6D.

Inner mitochondrial membrane is altered in male Ampka2ciKO mice

Whereas the alteration of ETC after 16 weeks of $Ampk\alpha^2$ deletion was one of the most noticeable result, the apparent discrepancy between the respiration data indicating a complex I deficiency and the biochemical data showing normal complex I activity and protein content (subunit C-I-20) brought confusion. We thus sought to determine whether the microenvironment surrounding complex I within the inner mitochondrial membrane could be different in mutant mice and could explain its lack of efficiency within the ETC. Sixteen weeks after tamoxifen induction, Ampka2ciKO male mice clearly showed a radical rearrangement in the mitochondrial membrane cardiolipin (CL) profile. Although the total CL content in KO was similar to the Ampk^{ff} mice in both sex (Figure 7A and B), the amount of several CL species was affected by the loss of AMPKα2 in males only (Figure 7C and D). The proportion of CL containing 20-carbon acyl chains was significantly changed in Ampka2ciKO since a large reduction of CL with eicosadienoic acid (20:2) and an increase in CL containing eicosatrienoic acid (20:3) or eicosatetraenoic acid (20:4) were observed (Figure 7C). Male KO mice also exhibited a much larger part of CL containing docosahexanoenoic (22:6) or docosapentaenoic (22:5) acyl chains. Interestingly, these alterations in mitochondrial membrane composition were associated with significant decreases in expression of Cds1 and Fads2 as well as a strong trend towards a lower

expression of *Crls1* in males only (Figure 7E), these three genes encoding important enzymes involved in CL synthesis. None of the enzymes involved in the production of CL was significantly impacted in the female $Ampk\alpha 2ciKO$ mice 16 weeks after deletion. Of note, the expression of many genes encoding enzymes involved in CL biosynthesis/maturation were significantly impacted by sex.

As complexes of the respiratory chain are usually arranged in supercomplexes, we thought to investigate the assembly of complex I in supercomplexes. In males, the CL remodeling was associated with a lower propensity of complex I to interact physically with the other complexes of ETC. Indeed, a lower proportion of complex I took part in the organization of mitochondrial supercomplexes and a higher part of complex I was found isolated (Figure 8A); no such changes have been revealed in female mice (Figure 8B).

Discussion

Although the role of AMPK has largely been studied for many years, its role in cardiac physiology and pathophysiology is still not completely understood. With the aim of clarifying the place of this enzyme in cardiomyocyte homeostasis, an original inducible cardiac-specific *Ampka2* knockout mouse model has been generated by our team. Using this model, the present study shows that specific cardiac deficiency of *Ampka2* in males 1) did not induce cardiac hypertrophy 2) led to a left ventricular systolic dysfunction associated with a slight dilation of LV 3) resulted in the development of cardiac fibrosis 4) reduced complex I-driven respiration without any significant changes in mitochondrial mass or *in vitro* complex I activity 5) was associated with a rearrangement of the cardiolipin species and an increase in the amount of complex I that is not integrated into the supercomplexes. Importantly, the effects of the cardiac specific *Ampka2* deletion observed in males were not found in females, suggesting no major impact of this deletion in KO female mice at basal state.

Owing to the AMPK structure based on the assembly of several subunits, suppression of AMPK activity in genetically modified animal models can result from different strategies. Many Ampk null mice have already been generated using KO or dominant negative technologies targeting one or the other subunit of AMPK and gave variable results on AMPK activity and compensatory mechanisms between the diverse isoforms [24, 36-38]. In the present murine model of cardiac specific and inducible $Ampk\alpha 2$ deletion, the AMPK $\alpha 2$ protein content in LV was drastically decreased and was associated with a reduction in phosphorylated AMPK level. Yet, phosphorylation of ACC, a direct target of AMPK, was not modified. This indicates that the tiny residual amount of AMPKa2 as well as AMPKa1, the expression of which was not changed in the present model, could maintain the amount of phosphorylated ACC at basal level. Indeed, ACC is a common target of both AMPKa isoforms and a small amount of AMPKa1/2 could be sufficient to ensure phosphorylation status of this enzyme when the animal is not subjected to stress [39]. Even so AMPK phosphorylates many other proteins and the affinity of AMPKa1 and AMPKa2 for their targets differs and gives them a relative specificity [6]. The Ampka2ciKO male mice phenotype reported in the present work proves that the drastic decrease in AMPK α 2 content impacts the signaling pathways downstream of AMPK somehow. One can suggest that the action of various AMPKa2 preferential targets could be impacted in this model because the residual AMPKa2 could not ensure their phosphorylation and moreover they would not be phosphorylated by AMPK α 1 as efficiently as by AMPK α 2.

In male Ampka2ciKO mice, the modest alterations of several cardiac contractile parameters (EF, FS, LVIDd, LVIDs) suggest a mild left ventricular systolic dysfunction which is in accordance with the cardiac impairment described in global and constitutive Ampka2 deletion [17, 25, 37]. The degradation of cardiac function was clearly evidenced 7 weeks after deletion, got worst as the mice deleted for Ampka2 got older, but was not associated with important anatomical changes when compared to control. Several studies showed narrow links between AMPK and protein synthesis regulation [40, 41] and suggested an anti-hypertrophic action of AMPK under various stresses [37, 42, 43]. However, the present work did not show any modifications of the cardiac mass neither in Ampka2ciKO male nor in Ampka2ciKO female mice when the animals are not subjected to any stress. This result, which incidentally reminds what was observed in other dominant negative or global Ampka2 KO mice [17, 37], suggests that AMPK does not play critical role in cardiac hypertrophy/growth at basal state.

Interestingly, the ventricular dysfunction observed in males was associated with an important increase of myocardial fibrosis that was strongly correlated with EF, thereby indicating that AMPK is involved in fibrosis and that fibrosis affects ventricular mechanical properties and function. The cardiac fibrotic response is essentially mediated by cardiac fibroblasts. In this cardiac specific Ampka2 KO model, Ampka2 was only deleted in cardiomyocytes which evidently stimulated cardiac fibrotic phenomena driven by cardiac fibroblasts, suggesting communication between both cell types. Although the link between AMPK and cardiac fibrosis has already been suggested since the activation of AMPK can suppress fibrosis induced by various stresses (for review see [16]), regulation of the fibrotic response by AMPKa2 is still poorly understood contrary to the role of AMPKa1, the major AMPK isoform in cardiac fibroblasts, which has clearly been demonstrated to induce the proliferation of cardiac fibroblasts and the development of fibrosis especially through the TGF- β 1/p38 axis [15]. It is now known that the molecular pathways involved in cardiac fibrosis are largely regulated by microRNAs (miRs) [44, 45], amongst which miR-21 and miR-133a have been reported as pro-fibrotic and anti-fibrotic factors respectively. In rat cardiac fibroblasts, it has been shown that the activation of AMPK promotes the expression of the anti-fibrotic miR-29 family ([46], proving that AMPK could take part in the complex regulation of fibrosis through the modulation of miR expression. In our study, miR-21 expression is significantly increased in Ampka2ciKO mice and, while the higher expression of the 17β-estradiol-regulated miR-133 [47] in female could counteract the pro-fibrotic action of miR-21, the latter miR could partly be responsible for the myocardial collagen deposition observed in KO male. The underlying mechanisms at the root of the higher

miR-21 expression after $Ampk\alpha 2$ deletion were not deciphered in this study and should be the subject of further works.

Surprisingly, given the role of AMPK in the regulation of energy metabolism, Ampka2ciKO female mice did not show any mitochondrial alterations. This correlates with the better maintenance of mitochondrial functions observed in females when the heart is under stress, especially because of the involvement of 17 β -estradiol in the regulation of mitochondrial biogenesis pathways [48]. Incidentally, the gene expression analysis performed in the present study confirmed that sex impacts the transcription level of several genes of mitochondrial biogenesis cascade (*Pgc-16*, *Erra* and *Ppara*).

In this study, cardiac $Ampk\alpha 2$ deletion provoked mitochondrial complex I-driven respiration dysfunction only in male LV. This was not associated with any significant changes in maximal mitochondrial oxidative capacity and mitochondrial mass, even though gene expression of several markers of mitochondrial biogenesis were significantly reduced (*Nrf-2* and *Cox1*) or strongly tended to be lower (*ERRa*, *Tfam*, and *Cox4*) in KO. This is in accordance with the observation made in the mouse model of global and constitutive deletion of *Ampka2* [17] and suggests that this kinase would only play a minor role in mitochondrial biogenesis regulation in the non-stressed heart. Just like it was shown in this global and constitutive KO model, deletion of *Ampka2* in our study led to complex I-driven respiration impairment without any decrease in complex I enzymatic activity measured in total heart extract, thereby suggesting an alteration of *in situ* regulation of this complex.

It is known that the *in situ* activity of ETC complexes can be affected by the phospholipid content of inner mitochondrial membrane and that complex I is particularly sensitive to its microenvironment [49]. In global and constitutive $Ampk\alpha 2$ KO mice, the alteration of complex I-driven respiration was associated with a clear reduction in LV cardiolipin (CL) content, a phospholipid which represents 15 to 20% of total mitochondrial phospholipid and is essentially found in the inner membrane of the mitochondria. Given that CLs play a key role in many processes of mitochondrial metabolism [50], this suggests that these alterations in mitochondrial membrane CL composition could partly explain the ETC defects observed in this model. In the present work, cardiac specific $Ampk\alpha 2$ deletion in male induced a decrease in the expression of several key enzymes of CL biosynthesis (Cds1 and Fads2) and substantial CL rearrangement even though the total CL content was similar to control. This evidences the impact of AMPK loss on mitochondrial CL profile, thereby reminding what our group showed in the past [17, 21]. The reduction in Cds1 expression in Ampka2ciKO mice is a quite interesting lead to decipher the role of AMPK in CL biosynthesis. Indeed, the expression of this enzyme has been shown to be under the control of PGC-1 α /ERR α axis [51]. As a major regulator of PGC-1 α , AMPK could thus modulate CL metabolism through this pathway. The strong trend towards a reduction in ERR α expression in *Ampka2ciKO* males in comparison with *Ampk*^{f/f} males is in favor of this hypothesis. Again, this alteration of mitochondrial membrane CL composition was not observed in female KO mice in which complex I-driven respiration was similar to control. This once again highlights the connection between complex I activity and mitochondrial membrane CL composition [52, 53] and also suggests a sexual dimorphism in the regulation of mitochondrial membrane composition. At this stage, it is not really understood why females did not show any alteration in the proportion of each CL species, but it seems that the regulation of CL biosynthesis/maturation could be slightly different between both sexes since the expression of the majority of the enzymes involved in these processes was affected by sex in this cardiac specific $Ampka^2$ KO model. The impact of hormonal status on the CL biosynthesis pathways has recently been shown in the brain [54] and this undeniably requires further investigations in the heart. In the latter organ, the profound disparities in CL content/species between male and female rat subjected to doxorubicin treatment pleads in favor of a sexual dimorphism in CL metabolism [55]. So far, the role of AMPK in the sexual dimorphism of CL metabolism is still elusive. The present study seems to imply that AMPK could be differently involved in this process in males and females. It cannot be excluded that the CL alteration noticed in this animal model would only be the consequence of cardiac damage in which CL alterations would be indirectly related to AMPK loss; the differences between males and females would then be due to the higher sensitivity of the males to stress. Nevertheless, the results obtained by Athea et al. using the global and constitutive $Ampka^2$ KO model in which reduction in cardiac CL content was not associated with any major cardiac defect strongly suggest a link between AMPK loss and CL modulations [17]. A study designed to follow the temporality of the cardiac dysfunctions and the CL alterations in this cardiac specific $Ampk\alpha 2$ KO model would be of great interest to shed light on the involvement of AMPK in CL metabolism.

CLs play many roles in mitochondrial membrane organization and are crucial for mitochondrial supercomplex formation [56]. Rather than existing as individual complexes, complexes physically interact in highly organized structures which allow functional linkage between ETC components resulting in a more efficient electron transfer. In male Ampka2 KO mice, the proportion of complex I not enclosed in supercomplexes was increased and these mice displayed

less cardiac complex-I-containing supercomplexes. When considering the fact that neither mitochondrial respiration nor CLs profile nor the amount of complex-I-containing supercomplexes were significantly modulated in female KO mice, one can suggest that the concomitant alterations of ETC functioning, mitochondrial membrane CL composition and supercomplexes disorganization in males are in no way coincidental. In Barth syndrome induced by a mutation in the gene encoding Taffazin, an enzyme responsible for CL maturation, mature CL are lost and this leads to an instability of respiratory chain supercomplexes which affects complex I activity [57], thereby highlighting the importance of CL for complex I-containing supercomplexes formation and function. In male Ampka2 KO mice, the alterations of CL profile and complex I-containing supercomplexes formation undeniably affects the ETC functioning and this at least explains in part the alteration of complex-I driven respiration observed in this model.

In summary, cardiac-specific inducible $Ampk\alpha 2$ deletion model proved helpful in deciphering the role of AMPK in basal conditions. In this model, Ampk deletion induced a progressive cardiac dysfunction associated with cardiac fibrosis and cardiolipin remodeling of cardiac mitochondrial membrane in males only, thereby suggesting a role of AMPK $\alpha 2$ in these processes. Although the involvement of AMPK $\alpha 2$ in the regulation of myocardial fibrosis and cardiolipin biosynthesis and maturation will require further studies, the differences observed between both sexes clearly imply important sex differences in the participation of AMPK in these processes in males and females.

Fundings

Our laboratory is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT and is supported by grants from "Fondation pour la Recherche Médicale" (to AG, #DPM20121125546), université Paris-Sud (ERM) and CORDDIM (to RVC, #cod110153). RVC is emeritus scientist at CNRS.

Acknowledgments

We thank Valérie Domergue and Pauline Robert for preparation of the animals as well as Claudine Deloménie for her expertise in molecular biology (IFR141-IPSIT). We thank Rodolphe Fischmeister and Ana-Maria Gomez for continuous support and Maryline Moulin for her valuable help which has been of great value to perform and interpret cardiolipin profiling. We thank Ladislav Novota for his help during TEM experiments.

Disclosure:

No potential conflicts of interest were disclosed

Bibliography

1. Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? Eur J Biochem. 1997;246:2:259-73; doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00259.x.

2. Cheung PCF, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. Biochemical Journal. 2000;346:659-69; doi:Doi 10.1042/0264-6021:3460659.

3. Sambandam N, Lopaschuk GD. AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. Prog Lipid Res. 2003;42:3:238-56; doi:10.1016/S0163-7827(02)00065-6.

4. Dolinsky VW, Dyck JRB. Role of AMP-activated protein kinase in healthy and diseased hearts. Am J Physiol-Heart C. 2006;291:6:H2557-H69; doi:10.1152/ajpheart.00329.2006.

5. Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, et al. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. The Journal of biological chemistry. 1996;271:44:27879-87; doi:10.1074/jbc.271.44.27879.

6. Woods A, Salt I, Scott J, Hardie DG, Carling D. The alpha1 and alpha2 isoforms of the AMPactivated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro. FEBS Lett. 1996;397:2-3:347-51; doi:10.1016/s0014-5793(96)01209-4.

7. Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA. The Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. Journal of Biological Chemistry. 2005;280:32:29060-6; doi:10.1074/jbc.M503824200.

8. Hardie DG, Ashford ML. AMPK: regulating energy balance at the cellular and whole body levels. Physiology (Bethesda). 2014;29:2:99-107; doi:10.1152/physiol.00050.2013.

9. Russell RR, Bergeron R, Shulman GI, Young LH. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. Am J Physiol-Heart C. 1999;277:2:H643-H9; <Go to ISI>://WOS:000081865800026.

10. Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF, et al. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. Current Biology. 2000;10:20:1247-55; doi:Doi 10.1016/S0960-9822(00)00742-9.

11. Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, Lopaschuk GD. High-Rates of Fatty-Acid Oxidation during Reperfusion of Ischemic Hearts Are Associated with a Decrease in Malonyl-Coa Levels

Due to an Increase in 5'-Amp-Activated Protein-Kinase Inhibition of Acetyl-Coa Carboxylase. Journal of Biological Chemistry. 1995;270:29:17513-20; doi:DOI 10.1074/jbc.270.29.17513.

12. Hue L, Beauloye C, Bertrand L, Horman S, Krause U, Marsin AS, et al. New targets of AMPactivated protein kinase. Biochem Soc T. 2003;31:213-5; doi:DOI 10.1042/bst0310213.

13. Song P, Zou MH. Regulation of NAD(P)H oxidases by AMPK in cardiovascular systems. Free Radic Biol Med. 2012;52:9:1607-19; doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.025.

14. Balteau M, Van Steenbergen A, Timmermans AD, Dessy C, Behets-Wydemans G, Tajeddine N, et al. AMPK activation by glucagon-like peptide-1 prevents NADPH oxidase activation induced by hyperglycemia in adult cardiomyocytes. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2014;307:8:H1120-33; doi:10.1152/ajpheart.00210.2014.

15. Noppe G, Dufeys C, Buchlin P, Marquet N, Castanares-Zapatero D, Balteau M, et al. Reduced scar maturation and contractility lead to exaggerated left ventricular dilation after myocardial infarction in mice lacking AMPKalpha1. Journal of molecular and cellular cardiology. 2014;74:32-43; doi:10.1016/j.yjmcc.2014.04.018.

16. Daskalopoulos EP, Dufeys C, Bertrand L, Beauloye C, Horman S. AMPK in cardiac fibrosis and repair: Actions beyond metabolic regulation. Journal of molecular and cellular cardiology. 2016;91:188-200; doi:10.1016/j.yjmcc.2016.01.001.

17. Athea Y, Viollet B, Mateo P, Rousseau D, Novotova M, Garnier A, et al. AMP-activated protein kinase alpha2 deficiency affects cardiac cardiolipin homeostasis and mitochondrial function. Diabetes. 2007;56:3:786-94; doi:10.2337/db06-0187.

18. He Q, Wang M, Harris N, Han XL. Tafazzin knockdown interrupts cell cycle progression in cultured neonatal ventricular fibroblasts. Am J Physiol-Heart C. 2013;305:9:H1332-H43; doi:10.1152/ajpheart.00084.2013.

19. He QA. Tafazzin knockdown causes hypertrophy of neonatal ventricular myocytes. Am J Physiol-Heart C. 2010;299:1:H210-H6; doi:10.1152/ajpheart.00098.2010.

20. Jussupow A, Di Luca A, Kaila VRI. How cardiolipin modulates the dynamics of respiratory complex I. Sci Adv. 2019;5:3; doi:ARTN eaav1850

10.1126/sciadv.aav1850.

21. Moulin M, Piquereau J, Mateo P, Fortin D, Rucker-Martin C, Gressette M, et al. Sexual dimorphism of Doxorubicin-mediated cardiotoxicity: potential role of energy metabolism remodeling. Circ Heart Fail. 2015;8:1:98-108; doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001180.

22. Regitz-Zagrosek V, Kararigas G. Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease. Physiological reviews. 2017;97:1:1-37; doi:10.1152/physrev.00021.2015.

23. Russell RR, 3rd, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, et al. AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. The Journal of clinical investigation. 2004;114:4:495-503; doi:10.1172/JCI19297.

24. Zarrinpashneh E, Carjaval K, Beauloye C, Ginion A, Mateo P, Pouleur AC, et al. Role of the alpha2-isoform of AMP-activated protein kinase in the metabolic response of the heart to no-flow ischemia. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2006;291:6:H2875-83; doi:10.1152/ajpheart.01032.2005.

25. Carvajal K, Zarrinpashneh E, Szarszoi O, Joubert F, Athea Y, Mateo P, et al. Dual cardiac contractile effects of the alpha2-AMPK deletion in low-flow ischemia and reperfusion. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2007;292:6:H3136-47; doi:10.1152/ajpheart.00683.2006.

26. Sasaki H, Asanuma H, Fujita M, Takahama H, Wakeno M, Ito S, et al. Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. Circulation. 2009;119:19:2568-77; doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.798561.

27. Siasos G, Tsigkou V, Kosmopoulos M, Theodosiadis D, Simantiris S, Tagkou NM, et al. Mitochondria and cardiovascular diseases-from pathophysiology to treatment. Ann Transl Med. 2018;6:12:256; doi:10.21037/atm.2018.06.21.

28. 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;3:6:965-76; 18536644.

29. Wharton DC, Tzagoloff A. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. Methods in Enzymology. 1967;10:245-50.

30. Veksler VI, Kuznetsov AV, Anflous K, Mateo P, van Deursen J, Wieringa B, et al. Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. The Journal of biological chemistry. 1995;270:34:19921-9; 7650007.

31. Wittig I, Braun HP, Schagger H. Blue native PAGE. Nat Protoc. 2006;1:1:418-28; doi:10.1038/nprot.2006.62.

32. Rimbaud S, Ruiz M, Piquereau J, Mateo P, Fortin D, Veksler V, et al. Resveratrol improves survival, hemodynamics and energetics in a rat model of hypertension leading to heart failure. PloS one. 2011;6:10:e26391; 22028869.

33. Rimbaud S, Sanchez H, Garnier A, Fortin D, Bigard X, Veksler V, et al. Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. Journal of molecular and cellular cardiology. 2009;46:6:952-9; 19452634.

34. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. The Journal of biological chemistry. 1957;226:1:497-509; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13428781.

35. Imbert L, Ramos RG, Libong D, Abreu S, Loiseau PM, Chaminade P. Identification of phospholipid species affected by meltifosine action in Leishmaniadonovani cultures using LC-ELSD, LC-ESI/MS, and multivariate data analysis. Anal Bioanal Chem. 2012;402:3:1169-86; 10.1007/s00216-011-5520-3.

36. Viollet B, Foretz M. Animal Models to Study AMPK. EXS. 2016;107:441-69; doi:10.1007/978-3-319-43589-3_18.

37. Zhang P, Hu X, Xu X, Fassett J, Zhu G, Viollet B, et al. AMP activated protein kinase-alpha2 deficiency exacerbates pressure-overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. Hypertension. 2008;52:5:918-24; doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.114702.

38. Sung MM, Zordoky BN, Bujak AL, Lally JS, Fung D, Young ME, et al. AMPK deficiency in cardiac muscle results in dilated cardiomyopathy in the absence of changes in energy metabolism. Cardiovasc Res. 2015;107:2:235-45; doi:10.1093/cvr/cvv166.

39. Chen S, Zhu P, Guo HM, Solis RS, Wang Y, Ma Y, et al. Alpha1 catalytic subunit of AMPK modulates contractile function of cardiomyocytes through phosphorylation of troponin I. Life Sci. 2014;98:2:75-82; doi:10.1016/j.lfs.2014.01.006.

40. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. Cell. 2003;115:5:577-90; doi:10.1016/s0092-8674(03)00929-2.

41. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. Molecular cell. 2008;30:2:214-26; doi:10.1016/j.molcel.2008.03.003.

42. Tian R, Musi N, D'Agostino J, Hirshman MF, Goodyear LJ. Increased adenosine monophosphate-activated protein kinase activity in rat hearts with pressure-overload hypertrophy. Circulation. 2001;104:14:1664-9; doi:10.1161/hc4001.097183.

43. Turdi S, Kandadi MR, Zhao J, Huff AF, Du M, Ren J. Deficiency in AMP-activated protein kinase exaggerates high fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction. Journal of molecular and cellular cardiology. 2011;50:4:712-22; doi:10.1016/j.yjmcc.2010.12.007.

44. Yang C, Zheng SD, Wu HJ, Chen SJ. Regulatory Mechanisms of the Molecular Pathways in Fibrosis Induced by MicroRNAs. Chinese Med J-Peking. 2016;129:19:2365-72; doi:10.4103/0366-6999.190677.

45. Chen C, Ponnusamy M, Liu C, Gao J, Wang K, Li P. MicroRNA as a Therapeutic Target in Cardiac Remodeling. Biomed Res Int. 2017;2017:1278436; doi:10.1155/2017/1278436.

46. Qi H, Liu Y, Li S, Chen Y, Li L, Cao Y, et al. Activation of AMPK Attenuated Cardiac Fibrosis by Inhibiting CDK2 via p21/p27 and miR-29 Family Pathways in Rats. Mol Ther Nucleic Acids. 2017;8:277-90; doi:10.1016/j.omtn.2017.07.004.

47. Medzikovic L, Aryan L, Eghbali M. Connecting sex differences, estrogen signaling, and microRNAs in cardiac fibrosis. J Mol Med (Berl). 2019;97:10:1385-98; doi:10.1007/s00109-019-01833-6.

48. Ventura-Clapier R, Moulin M, Piquereau J, Lemaire C, Mericskay M, Veksler V, et al. Mitochondria: a central target for sex differences in pathologies. Clin Sci (Lond). 2017;131:9:803-22; doi:10.1042/CS20160485.

49. Schlame M, Rua D, Greenberg ML. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. Prog Lipid Res. 2000;39:3:257-88; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799718.

50. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Cells. 2019;8:7; doi:10.3390/cells8070728.

51. Lai L, Wang M, Martin OJ, Leone TC, Vega RB, Han X, et al. A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 (PGC-1) in the regulation of cardiac mitochondrial phospholipid biosynthesis. The Journal of biological chemistry. 2014;289:4:2250-9; doi:10.1074/jbc.M113.523654.

52. Drose S, Zwicker K, Brandt U. Full recovery of the NADH:ubiquinone activity of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from Yarrowia lipolytica by the addition of phospholipids. Biochimica et biophysica acta. 2002;1556:1:65-72; doi:10.1016/s0005-2728(02)00307-9.

53. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. Gene. 2002;286:1:135-41; doi:10.1016/s0378-1119(01)00814-9.

54. Acaz-Fonseca E, Ortiz-Rodriguez A, Lopez-Rodriguez AB, Garcia-Segura LM, Astiz M. Developmental Sex Differences in the Metabolism of Cardiolipin in Mouse Cerebral Cortex Mitochondria. Sci Rep. 2017;7:43878; doi:10.1038/srep43878.

55. Moulin M, Solgadi A, Veksler V, Garnier A, Ventura-Clapier R, Chaminade P. Sex-specific cardiac cardiolipin remodelling after doxorubicin treatment. Biology of sex differences. 2015;6:20; doi:10.1186/s13293-015-0039-5.

56. Mileykovskaya E, Dowhan W. Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. Chem Phys Lipids. 2014;179:42-8; doi:10.1016/j.chemphyslip.2013.10.012.

57. McKenzie M, Lazarou M, Thorburn DR, Ryan MT. Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. J Mol Biol. 2006;361:3:462-9; doi:10.1016/j.jmb.2006.06.057.

A Left ventricle - 16 weeks



§ genotype effect

Figure 1. Cardiac-specific *Ampk* α 2 inactivation in adult mice 16 weeks after tamoxifen injection in males and females.

A. Protein content of AMPK α 2 and AMPK α 1 in LV homogenates. Tubulin is used as a loading control. **B.** Immunoblotting of total AMPK (tAMPK), total ACC (tACC), phosphorylated-AMPK (pAMPK) and phosphorylated-ACC (pACC). Tubulin is used as a loading control. **C.** Protein content of AMPK α 2 and AMPK α 1 in skeletal muscle. Actin is used as a loading control. ANOVA: $P\leq 0.05$, $P\leq 0.01$, $P\leq 0.01$, $P\leq 0.01$ for the genotype effect. Post hoc Newman-Keuls test: p<0.05; p<0.01, p<0.01, p<0.01 Ampk^{f/f} vs Ampk α 2ciKO.



Figure 2. Progression of cardiac function of cardiac-specific knockout mice during 16 weeks after $Ampk\alpha 2$ deletion induction in males and females.

A. Heart weight. B. Heart weight-to-body weight ratio. C. brain natriuretic peptide gene expression in left ventricle. D. Progression of left ventricular ejection fraction in male. E. Progression of left ventricular fractional shortening. F. Progression of left ventricular internal dimension at end-systolic (LVIDs). G. Progression of left ventricular internal dimension at end-diastolic (LVIDd). H. Left ventricular ejection fraction after 16 weeks of $Ampk\alpha 2$ deletion. I. Left ventricular fractional shortening after 16 weeks of $Ampk\alpha 2$ deletion. J. Left ventricular
internal dimension at end-systolic (LVIDs) after 16 weeks of $Ampk\alpha 2$ deletion. **K.** Left ventricular internal dimension at end-diastolic (LVIDd) after 16 weeks of $Ampk\alpha 2$ deletion. ANOVA: $p\leq 0.05$, for the genotype effect; $\mu p\leq 0.05$, for the sex effect. Post hoc Newman-Keuls test: * p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001 $Ampk^{ff}$ vs $Ampk\alpha 2ciKO$ (same sex).



Figure 3. Myocardial Fibrosis 16 weeks after $Ampk\alpha^2$ deletion induction in males and females.

A. Representative pictures of fibrosis analysis by Sirius red staining of subequatorial heart section. **B.** mRNA expression level of collagen 1 (*Col1a*) and collagen 3 (*Col3a*). **C.** mRNA expression level of miR-133a and miR-21 **D.** Correlation curve between ejection fraction and total fibrosis in male. ANOVA: $p \leq 0.05$, for the genotype effect; $\mu\mu\mu p \leq 0.001$, for the sex effect; Post hoc Newman-Keuls test: * p < 0.05; **p < 0.01, *** $p < 0.001 Ampk^{ff}$ vs Ampka2ciKO (same sex).



Figure 4. Cardiac mitochondrial phenotype of cardiac-specific knockout mice after 16 weeks of *Ampka2* deletion in males and females.

A. Rate of respiration after successive addition pyruvate (1 mM) (pyr), glutamate (10 mM) (glu), succinate (15 mM) (succ), amytal and TMPD-ascorbate (0.5 mM). B. Citrate synthase (CS), cytochrome c oxidase (COX) and complex I enzymatic activity. C. Immunoblotting of citrate synthase (CS) and mitochondrial creatine kinase (miCK) in LV homogenates. Vinculin is used as a loading control. D. Total protein content of 5 subunits of oxydative phosphorylation complexes: C-I-20(complex I), C-II-30 (complex II), C-III-Core 2 (complex III), C-IV-COXI (complex IV) and C-V- α (complex V). E. mRNA expression level of *Pgc-1\alpha*, *Pgc-16*, *Nrf2*, *Erra*, *Ppara*, *Tfam*, *Cox1* and *Cox4*. ANOVA: $p \leq 0.05$, for the genotype effect; $\mu\mu\mu$ p ≤ 0.001 , for the sex effect; Post hoc Newman-Keuls test: * p<0.05, *Ampk^{ff}* vs *Ampka2ciKO* (same sex); α p ≤ 0.05 males vs females (same genotype).

А



Figure 5. Cardiomyocyte cytoarchitecture and mitochondria morphology after 16 weeks of Ampka2 deletion in males.

A. Transmission electron micrograph of left ventricle of $Ampk^{ff}$ (Aa) and $Ampk\alpha 2ciKO$ (Ab-Af) mice. **B.** mRNA expression level of genes encoding mitochondrial dynamics proteins: optic atrophy protein 1 (Opa1), Mitofusin 1 and 2 (Mfn1 and Mfn2) and dynamin-related protein 1 (Drp1). **C.** SR calcium loading under different energetic conditions in permeabilized cardiac fibres. Calcium uptake at pCa 6.5 in the presence of different ATP sources were assessed: external (ATP), and endogenous, namely bound CK (CK), mitochondria (Mito) or both (Mito+CK). Results were expressed relatively to optimal energy supply (Mito+CK) which corresponded to 100%. ANOVA: $P \leq 0.05$, for the genotype effect; $\mu\mu \geq 0.01$, for the sex effect; Post hoc Newman-Keuls test: * p < 0.05, **p < 0.01, $Ampk^{ff}$ vs AmpkciKO (same sex).



Figure 6. Effect of *Ampka2* deletion on expression of genes involved in several facets of energy metabolism in males and females.

A. Expression of genes related to carbohydrate metabolism: glucose transporter 4 (*Glut4*), Hexokinase 2 (*Hk2*) and Pyruvate dehyfrogenase kinase (*Pdk4*). **B.** Expression of genes related to fatty acid metabolism: carnitine palmitoyltransferase 1 (*Cpt1*), fatty acid translocase (*Cd36*), Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (*Hadha*) and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (*Acadm*). **C.** Expression of genes encoding important actors of energy metabolism: Sirtuin 1 (*Sirt1*), sirtuin (*Sirt3*) and nicotinamide phosphoribosyltransferase (*Nampt*). **D.** Expression of genes related to antioxidant defense system: superoxide dismutase 2 (*Sod2*), catalase (*Cat*) and gluthatione peroxidase 1 (*Gpx1*). **E.** Immunoblotting of superoxide dismutase (SOD2) in LV homogenates in males. ANOVA: $\mu P \le 0.05$, $\mu \mu P \le 0.01$, $\mu \mu \mu P \le 0.001$ for the sex effect; Post hoc Newman-Keuls test: * p<0.05, **p <0.01, *Ampkff* vs *AmpkciKO* (same sex); $\square p \le 0.05$ males vs females (same genotype).



Figure 7. Cardiolipin profile in males and females after 16 weeks of *Ampkα2* deletion.

A. Total cardiolipin content in male left ventricules. **B.** Total cardiolipin content in female left ventricles. **C.** Relative content of each identified cardiolipin species in male left ventricles. **D.** Relative content of each cardiolipin species in female left ventricles. **E.** Expression of genes encoding enzymes involved in cardiolipin bioynthesis and maturation in mle and female left ventricles: acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (Acsl1), CDP-diacylglycerol synthase 1 (Cds1), cardiolipin synthase 1 (Crls1), tafazzin (Taz), elongation of very long chain fatty acids-like 2 (Elovl2), elongation of long chain fatty acids (Elovl5), fatty acid desaturase 1 (Fads1) and fatty acid desaturase 2 (Fads2). * p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001 *Ampk*^{f/f} vs *Ampka2ciKO* (same sex); $\alpha p \leq 0.05$, $\alpha \alpha p \leq 0.01$ males vs females (same genotype).



Figure 8. Integration of ETC complex I within the mitochondrial supercomplexes 16 weeks after $Ampk\alpha 2$ deletion induction in males and females.

A. Mitochondrial supercomplexes were first separated by BN-PAGE (panels on the left), then transferred to PVDF membrane and incubated with complex I antibody (panels on the right) in Ct and KO males (upper panels) and females (lower panels). **B.** Quantification of amount of isolated complex I and complex I including supercomplexes in males (panel on the left) and females (panel on the right). * p<0.05 $Ampk^{f/f}$ vs $Ampk\alpha 2ciKO$ (same sex)

Table 1. antibodies

Antibody	Supplier reference		Dilution	
Actin	Santa Cruz	sc47778	1/10000	
ACC	Cell Signaling	3676	1/1000	
Phospho ACC	Cell Signaling	3661	1/1000	
AMPKa1	Santa Cruz	sc19126	1/1000	
ΑΜΡΚα2	Santa Cruz	Sc19129	1/1000	
Phospho AMPK	Cell signaling	2531	1/500	
AMPK total	Cell signaling	2532	1/500	
CS	Abcam	Ab96600	1/1000	
Grim19 (NDUFA13)	Abcam	ab110240	1/1000	
miCK	Kuchua		1/2000	
Opa1	BECTON DICKINSON	612606	1/1000	
Oxphos	Mitoscience	Ms604	1/500	
SOD2	Abcam	ab16956		
Tubulin	Abcam	Ab7291	1/10000	
Vinculin	Sigma	V9131	1/900	

Table 2. Primers

Gene Name	Gene symbol	Function	Identification number (Applied Biosystems)
natriuretic peptide type B	Nppb	Hypertrophy	Mm01255770_g1
collagen, type I, alpha 1	Col1a1	Fibrosis	Mm00801666_g1
collagen, type III, alpha 1	Col3a1	Fibrosis	Mm01254476_m1
peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha	Ppargc1a	Mitochondrial biogenesis	Mm00447181_m1
peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta	Ppargc1b	Mitochondrial biogenesis	Mm00504730 m1
GA repeat binding protein, alpha	Gabpa	Mitochondrial biogenesis	Mm00484598_m1
estrogen related receptor, alpha	Esrra	Mitochondrial biogenesis	Mm00433143 m1
peroxisome proliferator activated receptor alpha	Ppara	Mitochondrial biogenesis	Mm00440939 m1
transcription factor A, mitochondrial	Tfam	Mitochondrial biogenesis	Mm00447485_m1
mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I	COX1	Mitochondrial biogenesis	Mm04225243_g1
cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	Cox4i1	Mitochondrial biogenesis	Mm01250094_m1
optic atrophy 1	Opal	Mitochondrial dynamics	Mm00453879_m1
mitofusin 1	Mfn1	Mitochondrial dynamics	Mm00612599 m1
mitofusin 2	Mfn2	Mitochondrial dynamics	Mm00500120_m1
dynamin 1-like	Dnm11	Mitochondrial dynamics	Mm01342903_m1
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	Slc2a4	Carbohydrates metabolism	Mm00436615 m1
hexokinase 2	Hk2	Carbohydrates metabolism	Mm00443385_m1
pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	Pdk4	Carbohydrates metabolism	Mm00443325 m1
carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle	Cpt1b	FA metabolism	Mm00487191_g1
CD36 antigen	Cd36	FA metabolism	Mm01135198_m1
hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, alpha subunit	Hadha	FA metabolism	Mm00805228 m1
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain	Acadm	FA metabolism	Mm00431611 m1
sirtuin 1	Sirt1	Energetic signaling	Mm01168521_m1
sirtuin 3	Sirt3	Energetic signaling	Mm00452131 m1
nicotinamide phosphoribosyltransferase	Nampt	Energetic signaling	Mm00451938 m1
superoxide dismutase 2, mitochondrial	Sod2	Oxydative stress	Mm01313000_m1
catalase	Cat	Oxydative stress	Mm00437992_m1
glutathione peroxidase 1	Gpx1	Oxydative stress	Mm00656767_g1
acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	Acs11	Cardiolipins biosynthesis	Mm00484217_m1
CDP-diacylglycerol synthase 1	Cds1	Cardiolipins biosynthesis	Mm01208328 m1
cardiolipin synthase 1	Crls1	Cardiolipins biosynthesis	Mm00503002_m1
tafazzin	Taz	Cardiolipins biosynthesis	Mm00504978 m1
elongation of very long chain fatty acids-like 2	Elovl2	Cardiolipins biosynthesis	Mm00517086 m1
ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids	Elovl5	Cardiolipins biosynthesis	Mm00506717_m1
fatty acid desaturase 1 (delta 5 desaturase)	Fads1	Cardiolipins biosynthesis	Mm00507605 m1
fatty acid desaturase 2 (delta 6 desaturase)	Fads2	Cardiolipins biosynthesis	Mm00517221_m1
beta-2 microglobulin	B2m	Reference genes	Mm00437764_m1
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	Ywhaz	Reference genes	Mm03950126 s1

ribosomal protein, large P2	Rplp2	Reference genes	Mm00782638_s1
polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A	Polr2a	Reference genes	Mm00839493_m1
	18S	Reference genes	Hs99999901_s1

Table 3. Echocardiographic parameters in male 16 weeks after induction of $Ampk\alpha 2$ deletion by tamoxifen injection. HR, Heart rate. IVSd, Interventricular septal thickness at enddiastole. IVSs, Interventricular septal thickness at end-systole. LVIDd, Left ventricular internal dimension at end-diastole. LVIDs, Left ventricular internal dimension at end-systole. LVWPd, Left ventricular posterior wall thickness at end-diastole. LVWPs, Left ventricular posterior wall thickness at end-diastole. LVWPs, End-diastole volume. ESV, End-systolic volume. EF, Left ventricular ejection fraction. SV, Stroke volume. FS, Left ventricular fractional shortening. CO, Cardiac output. * p<0.05 $Ampk^{ff}$ vs $Ampk\alpha 2ciKO$.

Echocardiographic parameters	Ampk ^{f/f}	AmpkciKO
HR (beats/min)	519 ± 42	533 ± 47
IVSd (mm)	0.781 ± 0,158	0.831 ± 0.148
IVSs (mm)	1.276 ± 0.191	1.330 ± 0.191
LVIDd (mm)	3.84 ± 0.30	4.13 ± 0.38
LVIDs (mm)	2.26 ± 0.28	2.67 ± 0.49*
LVPWd (mm)	0.738 ± 0.219	0.741 ± 0.192
LVPWs (mm)	1.286 ± 0.153	1.196 ± 0.181
EDV (ml)	0.14 ± 0.03	$0.18 \pm 0.05*$
ESV (ml)	0.03 ± 0.01	$0.06 \pm 0.04*$
EF (%)	78.3 ± 4.53	71.1 ± 8.61*
SV (ml)	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.02
FS (%)	41.32 ± 4.10	35.62 ± 6.48*
CO (ml/min)	58.3 ± 12.5	65.9 ± 11.7

Table 4. Echocardiographic parameters in female 16 weeks after induction of *Ampkα2* deletion by tamoxifen injection. HR, Heart rate. IVSd, Interventricular septal thickness at end-diastole. IVSs, Interventricular septal thickness at end-systole. LVIDd, Left ventricular internal dimension at end-diastole. LVIDs, Left ventricular internal dimension at end-systole. LVWPd, Left ventricular posterior wall thickness at end-diastole. LVWPs, Left ventricular posterior wall thickness at end-diastole volume. ESV, End-systolic volume. EF, Left ventricular ejection fraction. SV, Stroke volume. FS, Left ventricular fractional shortening. CO, Cardiac output.

Echocardiographic parameters	Ampk ^{f/f}	AmpkciKO
HR (beats/min)	384 ± 30	447 ± 35
IVSd (mm)	0.97 ± 0.12	0.99 ± 0.09
IVSs (mm)	1.49 ± 0.12	1.56 ± 0.15
LVIDd (mm)	2.76 ± 0.21	2.55 ± 0.16
LVIDs (mm)	1.50 ± 0.16	1.30 ± 0.12
LVPWd (mm)	1.10 ± 0.07	1.03 ± 0.03
LVPWs (mm)	1.48 ± 0.08	1.46 ± 0.10
EDV (ml)	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01
ESV (ml)	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.01
EF (%)	81.1 ± 4.4	82.4 ± 0.4
SV (ml)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
FS (%)	45.4 ± 4.7	47.1 ± 1.0
CO (ml/min)	18.4 ± 4.3	21.2 ± 3.6

CHAPITRE I

III. Résultats complémentaires

Présentation

Notre laboratoire utilise plusieurs lignées de souris transgénique générées avec le système Cre-Lox et afin de vérifier que les effets observées suite aux délétions sont bien dus à la perte du gène cible et non à l'activation de la Cre recombinase, le phénotype cardiaque des souris mâles α -MHC-MerCreMer (α -MHC-Cre) a été évalué à 16 semaines après injection de la même dose de tamoxifène (40 mg/kg i.p. par jour sur 2 jours).Les résultats ont été comparés à des souris mâles sauvages (WT) ayant reçu le même traitement au tamoxifène.

Résultats

A 16 semaines après injection, la fonction cardiaque (représentée par la fraction d'éjection du VG, la fraction de raccourcissement du VG, le diamètre interne du VG ainsi que son volume télésystolique) est normale chez les souris mâles α -MHC-Cre (Figure 52A., B., C. et D.). Les capacités oxydatives mitochondriales évaluées par mesure de consommation d'oxygène sur fibres perméabilisées ne sont pas significativement différentes entre les deux groupes de souris (Figure 52E). L'analyse histologique de coupes transversales de cœur colorées au rouge-sirius n'a pas non plus révélé de fibrose (Figure 52F).

Discussion

Pour l'étude de la régulation du métabolisme cardiaque, notre laboratoire utilise plusieurs modèles de souris invalidées pour des gènes cibles (SIRT1 et AMPK α 2) spécifiquement dans le cœur et inductible à l'âge adulte. Pour générer ces modèles, des souris portant le transgène α -MHC-MerCreMer ont été utilisées permettant l'expression de la cre recombinase induite par le tamoxifène et sous le contrôle du promoteur de l' α -MHC (uniquement exprimée dans les cardiomyocytes). Plusieurs études ont montré une toxicité cardiaque de la Cre recombinase en fonction de son niveau d'expression et de la durée de son expression. Les souris portant le transgène α -MHC-MerCreMer ont plus de risque de développer une dysfonction cardiaque associée à de la fibrose, une infiltration cellulaire et de l'inflammation lorsqu'elles sont traitées avec des doses répétées de tamoxifène [444-447]. Cependant, Lewox et al ont démontré qu'une seule injection de tamoxifène (40mg/kg) était suffisante pour induire une recombinaison dépendante de la Cre sans induire de cardiotoxicité. En nous basant sur cette étude et sur des tests préliminaires, une dose de tamoxifène de 40mg/kg/j sur 2 jours consécutifs a été choisie comme protocole standard afin d'induire l'activation de la Cre-recombinase chez les souris adultes α -MHC-Cre/flox. L'absence totale de dysfonction cardiaque et de fibrose chez les souris mâles α -MHC-MerCreMer traitées avec la même dose de tamoxifène a confirmé que les altérations observées chez les souris invalidées pour l'AMPK α 2 de

Résultats

manière spécifique au cœur et inductible à l'âge adulte sont dues à la perte d'AMPK et non à l'activation excessive de la Cre recombinase.

Ces résultats ont été inclus dans une publication acceptée : Maria-Nieves Sanz, Lucile Grimbert, Maryline Moulin, Mélanie Gressette, Catherine Rucker-Martin, Christophe Lemaire, Mathias Mericskay, Vladimir Veksler, Renée Ventura-Clapier, Anne Garnier and Jérôme Piquereau, Inducible cardiac-specific deletion of Sirt1 in male mice reveals progressive cardiac dysfunction and sensitization of the heart to pressure overload, Int. J. Mol. Sci., 2019 (cf annexe).



Figure 52. Phénotype cardiaque des souris α-MHC-MerCreMer 16 semaines après injection de tamoxifène. (A) fraction d'éjection du VG. (B) Fraction de raccourcissement du VG. (C) Diamètre interne du VG en fin de systole. (D)Volume télésytolique du VG. (E) Niveaux de respiration mitochondriale après ajout successif de pyruvate (1mM) (pyr), glutamate (10mM) (glu), succinate (15mM) (succ), amytal (1mM) et TMPD-asc (0,5mM). (F) Analyse de la fibrose cardiaque par marquage au rouge-sirius sur coupes transversales de

CHAPITRE II : ETUDE DU DIMORPHISME SEXUEL DE LA DELETION CARDIOSPECIFIQUE ET INDUCTIBLE DE L'AMPK α 2

I. Présentation

L'étude du phénotype basal des souris mâles et femelles AMPKciKO a permis de mettre en évidence un dimorphisme des effets de la délétion de l'AMPKα2 dans le cœur adulte. En effet, il a été observé chez les mâles KO une dysfonction cardiaque systolique, une augmentation de la fibrose, une diminution de la respiration mitochondriale par le complexe l associée à un réarrangement du profil des cardiolipides et une plus grande proportion de complexe l non associé en supercomplexes, ce qui pourrait être à l'origine de cette altération de la respiration mitochondriale. Ces effets n'ont pas été retrouvés chez les souris femelles KO. Il semblerait donc qu'il y ait un dimorphisme sexuel dans la régulation par l'AMPK de la fibrose et du métabolisme des CL. Il a été démontré précédemment un rôle du statut hormonal sur la synthèse des CL dans le cerveau [442]. De plus, Il a été retrouvé une profonde disparité de la biosynthèse des CL entre rats mâles et femelles traités à la doxorubicine [138].

Ceci nous a poussé à explorer les mécanismes de ce dimorphisme et à determiner le rôle potentiel des œstrogènes dans cette régulation. Pour ce faire, nous avons soumis des souris femelles à des ovariectomies, nous avons ainsi constitué 4 groupes : un groupe de CT-Sham, un groupe CT-OVX, un groupe KO-Sham, et un groupe KO-OVX. Les souris CT et KO-Sham ont subis le même protocole de chirurgie que les souris CT et KO-OVX à l'exception du retrait des ovaires. Les souris ont été soumises à l'ovariectomie à 7 semaines, elles ont été ensuite injectées avec du tamoxifène (40mg/kg/j sur 2 jours) afin d'induire la délétion à 8 semaines. 16 semaines après l'injection, elles ont subi une échocardiographie et elles ont été sacrifiées pour les expériences qui ont suivi.





II. Résultats





(A) Poids du corps. (B) Poids du cœur. (C) Poids de l'utérus D) Mesures d'expression relative d'ARMm de β-mhc et bnp par qPCR. (E) Fraction d'éjection du VG. (F) Fraction de raccourcissement du VG. (G) Diamètre interne du VG en fin de systole. (H) Diamètre interne du VG en fin de diastole.



Figure 55. Analyse de la fibrose cardiaque et de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique cardiaque des souris 16 semaines après induction de la délétion de l'AMPKα2.

(A) Images représentatives de l'analyse de la fibrose par marquage au rouge Sirius sur coupes transversales de cœur. (B) Mesures d'expression relative d'ARNm de gènes du métabolisme des glucides : le transporteur membranaire Glut4, l'hexokinase 2 (Hk2), et la pyruvate deshydrogénase kinase (Pdk4). (C) Mesures d'expression relative d'ARNm de gènes du métabolisme des acides gras : les transporteurs membranaires Cpt1b et Cd36, l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase / 3-cétoacyl-CoA thiolase / énoyl-CoA hydratase (HADHA) et l'acyl-coenzyme A déshydrogénase (Acadm). (D) Mesures d'expression relative de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique : la sirtuine 1 (sirt1), la sirtuine 3 (sirt3) et la Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt).

CHAPITRE II



Figure 56. Evaluation de la fonction, de la biogenèse et de la dynamique mitochondriale des cœurs de souris 16 semaines après induction de la délétion de l'AMPKα2.

(A) Niveaux de respiration mitochondriale après ajout successif de pyruvate (1mM), glutamate (10mM), succinate (15mM), amytal (1mM).
(B) Mesures d'expression relative d'ARNm de gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale : PGC1α, PGC-1β, NRF2 (gabpa), ERRa (Esrralpha), PPARa, Tfam, Cox1 et Cox4. (C) Mesures d'expression relative d'ARNm de gènes impliqués dans la dynamique mitochondriale : Opa1, Mitofusine 1, Mitofusine 2, Drp1 (Dnml1). (D) Mesures d'expression relative d'ARNm de gènes impliqués dans la production et la dégradation des ROS : Superoxide dismutase 2 (SOD2), Catalase (Cat), Gluthation Peroxidase 1 (GPX1).



Figure 57. Analyse du contenu en cardiolipides des cœurs de souris 16 semaines après injection de tamoxifène par spéctrométrie de masse couplée à une HPLC.

(A) Concentrationen cardiolipides issus d'extraction de phospholipides réalisée sur VG. (B) Pourcentage d'intensité de m/z des espèces majoritaires de cardiolipide en fonction de l'intensité totale des m/z (1447,9; 1449,9; 1451,9). (C) Pourcentage d'intensité de m/z des espèces de cardiolipide en fonction de l'intensité totale des m/z. (D) Mesures d'expression relative d'ARNm de gènes impliqués dans la biosynthèse des cardiolipides : Acyl-CoA Synthetase Long Chain 1 (Acsl), CDP-diacylglycérol synthase 1 (Cds1), Cardiolipin synthase (Crls1), Taffazine (Taz), Elongase 2 (Elovl 2), Elongase 5 (Elovl 5), Fatty Acid desaturase 1 (Fads1), Fatty Acid desaturase 2 (Fads2).

Nous observons une augmentation du poids corporel chez les souris OVX (effet OVX) et une diminution du poids de l'utérus comme attendu dans les groupes OVX, mais pas de modification du poids du cœur pas de modification du poids du cœur (Figure 54A, B et C). Les niveaux d'expression de β -mhc et de Bnp ne sont pas significativement différents. Ceci indique qu'il n'y a pas d'hypertrophie du cœur chez ces souris OVX (Figure 54D). La fonction cardiaque a été évaluée par échocardiographie et il n'y a pas de différence significative au niveau de la fraction d'éjection, la fraction de raccourcissement, ainsi qu'au niveau des diamètres internes du ventricule gauche entre les groupes (Figure 54E, F, G et H).

L'analyse histologique des coupes transversales de VG colorées au rouge sirius a montré une augmentation de la fibrose de +67% dans le cœur des souris KO-OVX par rapport au groupe KO-Sham (Figure 55A). L'expression des enzymes du métabolisme du glucose n'est pas modifiée entre les groupes (Figure 55B), tandis que pour les gènes du métabolisme des acides gras, il y a un effet génotype pour *Cd36* et *Hadha* avec une tendance à la baisse dans les groupes KO mais pas de modification de l'expression de *Cpt1b* et *Acadm* (Figure 55C). Concernant les enzymes qui régulent le métabolisme énergétique, il n'y a pas de différence au niveau de l'expression de *Sirt1* et *Sirt3* entre les groupes, mais il y a un effet génotype au niveau de la *Nampt* avec une diminution de son expression dans les groupes KO (Figure 55D).

L'évaluation de la fonction mitochondriale a été réalisée par mesure de consommation d'oxygène sur fibres cardiaques perméabilisées. Les mesures n'ont pas révélé de différence entre les groupes au niveau du complexe I mais il y a un effet OVX au niveau de l'amytal qui inhibe le complexe I. Il y a donc une respiration plus faible dans les groupes OVX mais particulièrement dans le groupe KO-OVX au niveau du complexe II de la chaine respiratoire (Figure 56A). Il n'y a pas de différence significative entre les groupes au niveau de l'expression des gènes de la biogenèse mitochondriale, hormis un effet génotype pour la *Cox IV*, ou sous-unité IV de la cytochrome oxydase codée par le génome nucléaire (Figure 56B). Concernant l'expression des protéines de la dynamique mitochondriale, on retrouve un effet OVX pour *Opa1* avec une augmentation dans les groupes OVX, une augmentation significative de *Mfn2* dans le groupe KO-OVX, ainsi qu'un effet OVX pour *Drp1* où les niveaux d'expression sont plus importants dans les groupes OVX (Figure 56C). Il semblerait que la dynamique mitochondriale soit augmentée dans les groupes OVX. Les niveaux d'expression des enzymes pro-oxydantes et anti-oxydantes ont également été évalués par qPCR (Figure 56D). Il n'y a pas d'effet significatif du génotype sur l'expression de *Sod2, Cat* ou *Gpx1*, en revanche on observe un effet OVX pour la catalase avec une augmentation de son expression dans les groupes OVX.

Le profil phospholipique du tissu cardiaque a été évalué par spectrométrie de masse couplé à une HPLC. Les résultats montrent que la concentration en cardiolipides n'est pas modifiée entre les groupes (Figure 57 A). Les intensités des principales cardiolipides ne sont pas non plus modifiées (Figure 57 B). Toutefois, il apparait des différences dans la répartition des autres espèces de CL entre les groupes (Figure 57 C), avec de manière intéressante, des variations opposées entre les groupes CT-OVX et KO-OVX. Il semblerait que les chaînes longues et saturées soient plus présentes dans les CL des membranes mitochondriales des KO-OVX. Les mesures d'expression des enzymes de la biosynthèse des cardiolipides montrent un effet OVX pour les enzymes *Crls1* et *ElovI5* avec une augmentation de leur expression dans les groupes OVX. Il y a également un effet génotype pour *Crls1*.

III. Discussion

Dans cette étude, notre modèle de souris Ampka2 KO a été combiné à une ovariectomie dans le but de comprendre le rôle de l'AMPK dans le myocarde sain de souris femelles ainsi que l'influence des hormones femelles dans cette régulation et notamment au niveau des adaptations compensatoires que peut engendrer la perte d'AMPK dans le cœur. Nos résultats montrent de légères modifications au niveau moléculaire et cellulaire.

Les résultats majeurs qui ont été observés lors de cette étude sont :

Comme dans la précédente étude (Partie Résultats, Chapitre I), nous n'avons pas observé d'effet majeur de la délétion de l'AMPK α 2 chez les souris femelles KO-Sham. Il n'y a pas d'altération de la fonction cardiaque ni mitochondriale. Nous n'avons pas non plus observé de fibrose et conformément à l'étude précédente, l'analyse de la composition en cardiolipides de la membrane mitochondriale n'a pas révélé de différence majeure entre le groupe CT-Sham et le groupe KO-Sham. Une mesure de concentration plasmatique d'œstradiol est en cours.

Comme attendu, les souris OVX présentent une atrophie de l'utérus. Elles présentent également une augmentation du poids corporel mais pas d'hypertrophie du coeur. Les souris CT-OVX ne présentent aucune altération de la fonction cardiaque et ne présentent pas de fibrose comparées aux souris CT-Sham. Nous n'avons pas observé de modification majeure au niveau de l'expression des gènes cibles du métabolisme énergétique. Concernant la respiration mitochondriale, une diminution significative de la respiration par le complexe II a été observée dans les groupes OVX. Une tendance à la baisse est également présente pour le glutamate et le succinate dans les groupes OVX (CT et KO). Nous pouvons noter que la diminution de respiration par le complexe II (après ajout d'amytal) est plus élevée dans le groupe KO-OVX. Il n'y a pas de différence au niveau de la biogenèse mitochondriale dans les groupes OVX. En revanche, nous observons une augmentation de l'expression de certains gènes de la dynamique mitochondriale dans les groupes OVX, notamment au niveau de *Opa1* et de *Drp1*. Nos résultats révèlent

également une légère augmentation de l'expression de la *Catalase* dans les groupes OVX. L'analyse du profil des cardiolipides de la membrane des mitochondries montre un remodelage des espèces minoritaires de CL différent entre les groupes de souris CT et KO-OVX. On retrouve également une augmentation de l'expression d'enzymes de la biosynthèse des CL comme *Crls1* et *ElovI5* dans les groupes OVX.

La délétion de l'AMPK α 2 et l'OVX n'ont induit aucune modification du poids du cœur et aucune modification de la fonction cardiaque. L'analyse des coupes transversales de cœur colorées au rouge sirius montre une augmentation importante de la fibrose dans le groupe KO-OVX, de même niveau que celle observée dans le groupe mâle KO. Il n'y a pas de modification majeure de l'expression des gènes cibles du métabolisme énergétique, ni au niveau de la biogenèse et de la dynamique mitochondriale dans le groupe KO-OVX. En revanche, de manière intéressante, en retrouve un remodelage au niveau des espèces minoritaires de CL qui est opposé à celui des CT-OVX mais identique à celui observé dans les mâles KO

Effets de l'ovariectomie sur le phénotype cardiaque des souris femelles

Nous avons observé chez les souris OVX des deux groupes CT et KO une augmentation du poids corporel, ce qui est conforme aux résultats d'études précédentes montrant une augmentation du poids corporel chez les rongeurs femelles OVX [448]. En effet, les changements hormonaux durant la ménopause contribueraient à une augmentation du tissu adipeux abdominal central chez les femmes [449]. Nous n'avons observé aucune altération de la fonction cardiague ni aucune augmentation de la fibrose ce qui corrobore les résultats d'études précédentes [450]. L'expression de gènes cibles du métabolisme énergétique et de la biogenèse mitochondriale n'est pas modifiée. En revanche, on observe une augmentation de l'expression de certaines protéines de la fusion mitochondriale comme Opa-1 et de la fission comme Drp1 ce qui suggère que les hormones femelles pourraient influencer la dynamique mitochondriale. L'expression des enzymes du métabolisme énergétique n'est pas modifiée. Cependant, on retrouve une diminution significative de la respiration mitochondriale via le complexe II de la chaîne respiratoire ainsi qu'une tendance à la diminution en glutamate et succinate. Cette diminution de la respiration a été également retrouvée dans un modèle de rats OVX au niveau des mitochondries intermyofibrillaires [451]. Malgré l'absence de changement au niveau de l'expression des gènes de la biogenèse mitochondriale, ces altérations pourraient être dues à une diminution de l'expression ou de l'activité du complexe II. L'activité des complexes de la chaîne respiratoire est également dépendante de leur environnement phospholipidique et on observe dans les groupes OVX un remodelage du profil des CL minoritaires. Ceci suggère une régulation possible par les hormones femelles de la composition en lipides de la membrane interne mitochondriale qui reste à être confirmé.

Effets combinés de l'ovariectomie et de la délétion de l'*Ampk* α 2 sur le phénotype cardiaque des souris femelles

Dans notre étude précédente, nous avons utilisé un modèle de KO pour l'AMPKα2 de manière spécifique au cœur et inductible à l'âge adulte afin d'étudier le rôle de l'AMPK sur le métabolisme mais également sur le remodelage du cœur. Nous avons étudié le phénotype de souris mâles et femelles afin de comprendre le dimorphisme sexuel de la régulation par l'AMPK et nous avons vu des différences notables entre ces deux sexes. En effet, les mâles présentaient une fibrose importante associée à une légère dysfonction systolique ainsi qu'une diminution de la respiration par le complexe I de la chaîne respiratoire et un remodelage du profil des cardiolipides associé à un niveau de complexe I hors des supercomplexes plus important. Ces résultats n'ayant pas été retrouvés chez les femelles, nous avons donc voulu comprendre quel était le rôle des hormones femelles dans cette différence de phénotype.

Dans cette étude, les souris KO-OVX ne présentent pas de modification du poids du cœur, ni d'altération significative de la fonction cardiague même si on peut observer une légère tendance à la diminution pour la fraction d'éjection et la fraction de raccourcissement. En revanche, on observe une augmentation significative de la fibrose chez les souris KO-OVX. On remarque que cette augmentation est similaire à celle observée chez les mâles KO. Il est connu que les récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β régulent le développement de la fibrose notamment par la voie des MMPs et la voie MAPK/ERK1/2 [289-292]. Il serait alors intéressant de savoir si ces voies sont mises en jeu dans notre modèle. Nous savons également que les miARNs sont des régulateurs importants de la fibrose cardiague [67], et dans notre étude précédente nous avons observé que le miR-21 pro-fibrosant avait une expression augmentée chez les KO mâles et femelles mais seules les femelles avaient une expression augmentée du miR-133 qui est antifibrosant. Ceci laisse penser que l'expression du miR-21 pourrait être compensée par celle du miR-133, ce qui permettrait une protection des femelles contre l'activation des voies pro-fibrosantes induites par la délétion de l'AMPK. Nous notons que chez les mâles, il y avait une corrélation entre la fraction d'éjection et la fibrose qui n'a pas été retrouvée chez les femelles, ce qui peut laisser penser qu'il pourrait y avoir un autre mécanisme de compensation qui n'est pas dû aux hormones femelles mais qui pourrait être induit par le chromosome X ou un phénomène d'épigénétique qui sont les autres causes de dimorphisme sexuel dans les pathologies [436]. Chez les souris KO-OVX, nous avons également observé un remodelage du profil des cardiolipides extraits de ventricules gauches qui ressemble à celui des mâles KO de notre précédente étude, ce remodelage est aussi observé dans le groupe CT-OVX mais avec un le profil est opposé par rapport aux souris KO. On note que deux enzymes de la voie de biosynthèse des CL ont une expression augmentée, cependant leur régulation est très peu connue dans la littérature. Les effets contraires observés dans les deux groupes OVX permettent d'envisager une régulation complexe de la

biosynthèse des CL à la fois par l'AMPK et par les hormones femelles. Des études complémentaires sur les enzymes de la biosynthèse des CL et leur régulation pourraient nous permettre de mieux comprendre ces voies complexes. Le profil de CL obtenu chez les souris KO-OVX ressemble à celui des mâles KO. Chez ces mâles, nous avons émis l'hypothèse que le profil de CL pourrait influencer l'activité des complexes de la chaîne respiratoire comme cela a été observé dans plusieurs modèles [437, 438]. Cependant nous n'avons pas retrouvé chez les femelles KO-OVX la diminution de respiration mitochondriale par le complexe I observée chez les mâles KO. Il se pourrait que les altérations au niveau des CL observées chez les femelles ne soient pas suffisantes pour induire une dysfonction au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire en raison d'une imprégnation des œstrogènes avant l'ablation des ovaires, il se pourrait également qu'il y ait un effet de la testostérone sur la respiration mitochondriale chez les mâles QVX.

Pour conclure, nous avons observé dans cette étude des similitudes dans le phénotype des souris femelles KO-OVX avec les souris mâles KO, notamment au niveau de la fibrose et du remodelage des cardiolipides. Il semblerait que l'AMPK et les œstrogènes régulent ces processus. D'autres études seraient nécessaires afin de connaitre en détail les mécanismes de ces régulations.

Figure supplémentaire

Echocardiography parameters	units	CT-Sham	CT-OVX	KO-Sham	κο-ονχ
Heart Rate (HR)	bpm	517 ± 35	569 ± 40	505 ± 37	486 ± 24
Interventricular septal thickness at end-diastole (IVSd)	mm	1.07 ± 0.05	1.17 ± 0.05	1.07 ± 0.09	1.04 ± 0.06
Interventricular septal thickness at end-systole (IVSs)	mm	1.52 ± 0.06	1.69 ± 0.04	1.54 ± 0.09	1.44 ± 0.07
Left ventricular internal dimension at end-diastole (LVIDd)	mm	3.03 ± 0.05	3.19 ± 0.23	$\textbf{3.05} \pm \textbf{0.16}$	$\textbf{3.26} \pm \textbf{0.12}$
Left ventricular internal dimension at end-systole (LVIDs)	mm	1.89 ± 0.06	1.98 ± 0.19	1.90 ± 0.12	2.06 ± 0.14
Left ventricular posterior wall thickness at end- diastole (LVPWd)	mm	1.31 ± 0.08	1.42 ± 0.13	1.26 ± 0.11	1.31 ± 0.08
Left ventricular posterior wall thickness at end- systole (LVPWs)	mm	1.65 ± 0.07	1.75 ± 0.08	1.69 ± 0.14	1.63 ± 0.08
Left ventricular telediastolic volume (LVTDV)	ml	$\textbf{0.08} \pm \textbf{0.00}$	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01
Left ventricular telesystolic volume (LVTSV)	ml	0.20 ± 0.02	0.23 ± 0.05	$\textbf{0.15}\pm\textbf{0.06}$	0.25 ± 0.06
Ejection fraction (EF)	%	74.4 ± 2.1	75.0 ± 2.0	$\textbf{77.4} \pm \textbf{2.0}$	70.8 ± 3.0
Stroke volume (SV)	ml	0.06 ± 0.00	$\textbf{0.07} \pm \textbf{0.01}$	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Fractional shortening (FS)	%	37.8 ± 2.0	$\textbf{38.2}\pm\textbf{2.0}$	40.3 ± 1.0	35.0 ± 2.0
Cardiac output (CO)	ml/min	28.3 ± 2.6	$\textbf{38.6} \pm \textbf{6.9}$	34.5 ± 5.4	28.1 ± 1.7

Figure supplémentaire 58

CHAPITRE III

CHAPITRE III : Etude des effets de la délétion de l'AMPK α 2 spécifiquement dans le cœur et inductible à l'âge adulte chez les souris mâle et femelle lors d'un stress cardiaque

I. Présentation

L'insuffisance cardiaque (IC) est une cause majeure de mortalité dans les pays développés et la recherche de nouveaux traitements plus ciblés reste une priorité. De plus, il existe une moindre incidence de cette pathologie chez les femmes avant la ménopause. Il a été démontré que l'IC est associée à une dérégulation des propriétés fonctionnelles de la mitochondrie et que celle-ci occupe un rôle central dans le développement de l'IC [452]. Des résultats récents suggèrent que la dysfonction mitochondriale pourrait être impliquée dans les différences de susceptibilité entre les hommes et les femmes [1]. L'étude de la régulation de la fonction de la mitochondrie et de l'influence des hormones pourrait aider à identifier l'origine de sa dysfonction et des différences mâles/femelles, permettant ainsi la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques, d'autant plus que les traitements actuels ne ciblent pas les altérations métaboliques de l'IC.

La kinase dépendante de l'AMP (AMPK), senseur métabolique activé par une hausse du rapport AMP-ADP/ATP, constitue une voie essentielle dans la signalisation énergétique cardiaque [318]. Plusieurs études utilisant des modèles de pathologies cardiaques d'ischémie/reperfusion [391-393, 397], d'hypertrophie [404, 407], d'insuffisance cardiaque [407, 411] ou de délétion globale de l'AMPKα2 [392, 394, 407] ont montré un rôle protecteur de l'AMPK dans le cœur ce qui suggère que l'AMPK pourrait être une cible thérapeutique potentielle. Cependant, les mécanismes des effets cardioprotecteurs de l'AMPK n'ont pas été complètement élucidés. Nous avons donc mis au point chez la souris un modèle expérimental de surcharge de travail induite par une perfusion d'angiotensine II (Ang II) à l'aide de mini-pompes osmotiques. Nous avons choisi ce modèle de stress cardiaque car une élévation de la concentration plasmatique en Ang II est un facteur de risque caractéristique de l'IC et celle-ci mène à un remodelage cellulaire et métabolique du myocarde [413].

Pour cette étude, 8 groupes ont été constitués : un groupe de souris mâles CT, un groupe de souris femelles CT, un groupe de souris mâles KO, un groupe de souris femelles KO. Après injection de tamoxifène (40mg/kg/j sur 2 jours) à l'âge de 8 semaines, chacun de ces groupes recevant soit une dose quotidienne d'angiotensine II (A9525, Sigma-Aldrich) de 1 mg/kg, soit du sérum physiologique pour les

souris contrôles. Quatre semaines après implantation des mini-pompes, les souris ont subi une mesure de pression artérielle par pléthysmographie et une échocardiographie, puis ont été sacrifiées.



Figure 59 : Schéma d'expérience des souris implantées avec des mini-pompes à angiotensine II

Les expériences réalisées sur chaque groupe de souris ont été les suivantes :

- Analyse histologique de coupes transversales de cœur colorées au rouge sirius,
- Mesure de respiration mitochondriale sur fibres cardiaques perméabilisées,
- Mesure de l'activité d'enzymes du métabolisme énergétique cardiaque
- Analyse transcriptomique de gènes clés impliqués dans diverses voies cellulaires (hypertrophie, fibrose, métabolisme des glucides, métabolisme des acides gras, signalisation énergétique, biogenèse mitochondriale, dynamique mitochondriale, stress oxydatif, biosynthèse des cardiolipides).

J'ai réalisé l'ensemble de cette 3^{ème} étude en fin de thèse et compte tenu de nombre important d'animaux dédiés à ce travail, l'analyse et la mise en forme des résultats a pris plus de temps que prévu et sont encore en cours. C'est pourquoi les résultats ne pourront être présentés dans ce manuscrit.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'AMPK est un senseur métabolique connu pour être activé lors d'un stress énergétique. Dans ce travail de thèse, nous avons montré un rôle de l'AMPK en conditions basales, notamment dans la régulation de la fibrose cardiaque et de la biosynthèse/maturation des cardiolipides. Notre étude a montré une différence sexuelle dans la régulation de ces processus qui semblent être régulés en partie par les œstrogènes chez les femelles.

Phénotype cardiaque	<i>.</i>				
(16 sem)		¥ NO		¥ KO-OVX	
Fonction cardiaque	↓ (7 sem)	=	=	=	
Fibrose	++	=	=	++	
Poids du cœur / Poids corps	=	=	=	=	
Respiration mitochondriale	↓ (CI)	=	↓ (CII)	↓ (CII)	
Biogenèse mitochondriale	=	=	=	=	
Cardiolipides (CL)	Remodelage CL	=	Remodelage CL	Remodelage CL	

Tableau 2 : Récapitulatif des effets de la délétion spécifique au cœur et inductible de l'AMPKα2 observés chez les souris mâles et femelles à l'état basal, 16 semaines après la délétion.

Chez les souris KO mâles, un nouveau lien entre AMPK et biosynthèse des CL dans le cœur a été mis en évidence. La diminution de la respiration mitochondriale pourrait s'expliquer par un changement de l'environnement phospholipidique des complexes et/ou des supercomplexes de la chaîne respiratoire. Pour mieux comprendre ce lien, nous pourrions étudier la composition en cardiolipides de la membrane interne mitochondriale dans un modèle cellulaire après activation pharmacologique de l'AMPK. Puis, nous pourrions transposer les modifications de la composition en CL observés dans un système biomimétique afin d'observer les effets sur les divers complexes de la chaîne respiratoire. Chez la souris femelle KO, ce lien entre AMPK et cardiolipides pourrait être absent ou compensé par d'autres voies de signalisation. Des modèles cellulaires pourraient également nous permettre d'étudier plus en détail les différences entre mâles et femelles ainsi que l'effet protecteur des hormones femelles en absence d'AMPK. Chez les souris femelles KO-OVX le remodelage des CLs est proche de celui des mâles KO mais ceci ne semble pas suffisamment marqué pour induire une atteinte du fonctionnement du complexe I. Ceci pourrait être expliqué par une imprégnation des œstrogènes avant l'ablation des ovaires, mais aussi par un taux résiduel

d'œstrogène malgré l'ovariectomie (un dosage plasmatique d'œstrogènes est en cours) ou encore par un effet de la testostérone chez les mâles KO sur la respiration du complexe I. En revanche, nous pu observer chez les groupes OVX une atteinte significative du fonctionnement du complexe II ainsi qu'un moindre atteinte du complexe I. Afin de comprendre l'origine de ces dysfonctionnements, il serait intéressant de mesurer l'activité d'enzymes clés du métabolisme énergétique (CS/COX) qui sont des bons marqueurs de la masse mitochondriale. Il serait également intéressant d'étudier l'impact du remodelage des cardiolipides chez les souris CT et KO-OVX sur l'assemblage en supercomplexe des complexes de la chaîne respiratoire. La restitution de 17β-œstradiol, qui est l'hormone majoritaire chez la femelle, après OVX pourrait nous permettre de déterminer quels sont les processus cellulaires et moléculaires régulés par cette hormone et impliqués dans le métabolisme énergétique de cœur. Nous pourrions également envisager d'étudier le phénotype cardiaque de souris mâles ayant subis une orchidectomie afin d'étudier le rôle de la testostérone dans les différences observés chez les mâles KO (notamment au niveau du remodelage des CL).

Chez les souris KO mâles, le développement de la fibrose est associé à une dysfonction contractile et ces effets sont absents chez les KO femelles, mais le fait de diminuer les œstrogènes a permis le développement d'une fibrose chez les souris femelles KO-OVX. Il se pourrait que l'absence de dysfonction contractile chez ces souris soit due au fait qu'elles aient une moindre atteinte altération du statut énergétique que les souris KO mâles. Il serait intéressant de mesurer l'expression du miR-133 anti-fibrosant chez les femelles KO-OVX car son expression été augmentée chez les femelles KO et il se pourrait qu'il soit en partie responsable de l'absence de fibrose chez ces souris. Les mesures d'expression des mir-29 et 30 seraient également à envisager dans les différents groupes de souris, ceux-ci jouant un rôle important dans la régulation du développement de la fibrose.

Nos résultats mettent en avant un lien entre l'AMPK et la dynamique mitochondriale ainsi que des différences sexuelles dans la régulation de la dynamique mitochondriale, puisque chez les mâles KO nous avons observé une diminution de l'expression de *Drp1*, alors que chez les femelles CT et KO-OVX, celleci tout comme celle d'*Opa1* est augmentée. L'analyse de la dynamique du réseau mitochondrial de cardiomyocytes isolés par microscopie confocale et par marquage des mitochondries nous permettrait d'avoir des informations plus précises sur le nombre de mitochondries par cardiomyocyte et la distribution de leur volume. De cette façon, on pourrait également étudier l'effet des œstrogènes sur la dynamique mitochondriale de cardiomyocytes isolés. Drp1 est régulé par de nombreuses modification post-traductionnelles parmi lesquelles, la phosphorylation sur deux sites possibles, l'un conduisant à son activation (Ser616) et son recrutement à la mitochondrie pour le processus de fission et l'autre conduisant
à son inactivation (Ser637). Il serait donc intéressant d'analyser l'état de phosphorylation de Drp1 par western blot.

Toutes ces données ont été établies sur des souris à l'état basal, seize semaines après induction de l'AMPKa2 par injection de tamoxifène. Elles n'ont pas permis de mettre en évidence un effet majeur de l'absence d'AMPK sur la biogenèse mitochondriale. Il est donc important de soumettre ces animaux à un stress cardiaque afin de révéler d'autres effets potentiels de la délétion d'AMPK et de vérifier si la protection des femelles est aussi efficace. En effet, l'AMPK étant activée en réponse à une surcharge de travail cardiaque et participant à la cardioprotection, on peut s'attendre à un effet plus délétère de l'absence d'AMPK suite à un stress cardiaque. C'est dans ce contexte que j'ai mis au point un modèle de surcharge de pression par perfusion d'angiotensine II et réaliser l'analyse du phénotype cardiaque sur des souris mâles et femelles, CT et KO..

ANNEXE

Article

Inducible cardiac-specific deletion of Sirt1 in male mice reveals progressive cardiac dysfunction and sensitization of the heart to pressure overload

Maria-Nieves Sanz¹, Lucile Grimbert¹, Maryline Moulin¹, Mélanie Gressette¹, Catherine Rucker-Martin², Christophe Lemaire^{1,3}, Mathias Mericskay¹, Vladimir Veksler¹, Renée Ventura-Clapier¹, Anne Garnier^{1,†} and Jérôme Piquereau^{1,†}

¹ UMR-S 1180, Inserm, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

² INSERM UMR_S 999, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, France

³Université Versailles St. Quentin, Université Paris-Saclay, Versailles, France

* Correspondence: jerome.piquereau@u-psud.fr; Tel.: +33-1-46-83-53-25

+ These authors contributed equally to this work.

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Heart failure is associated with profound alterations of energy metabolism thought to play a major role in the progression of this syndrome. SIRT1 is a metabolic sensor of cellular energy and exerts essential functions on energy metabolism, oxidative stress response, apoptosis or aging. Importantly, SIRT1 deacetylates the peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 α (PGC-1 α), the master regulator of energy metabolism involved in mitochondrial biogenesis and fatty acid utilization. However, the exact role of SIRT1 in controlling cardiac energy metabolism is still incompletely understood and conflicting results have been obtained. We generated a cardio-specific inducible model of Sirt1 gene deletion in mice (Sirt1ciKO) to decipher the role of Sirt1 in control conditions and following cardiac stress induced by pressure overload. Sirt1 deficiency induced a progressive cardiac dysfunction, without overt alteration in mitochondrial content or properties. Sixteen weeks after Sirt1 deletion an increase in mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production/detoxification balance. Following pressure overload, cardiac dysfunction and alteration in mitochondrial properties were exacerbated in Sirt1ciKO mice. Overall the results demonstrate that SIRT1 plays a cardioprotective role on cardiac energy metabolism and thereby on cardiac function.

Keywords: Sirtuin 1, heart, mitochondria, cardiac function.

1. Introduction

Heart failure (HF), defined as the inability of the heart to provide adequate blood flow to meet the needs of the organism, is often the terminal end-point of different chronic cardiovascular diseases (CVD). Despite the advances of pharmaceutical therapeutic approaches over the past two decades, long term survival of HF patients still remains limited. This syndrome is thus a major cause of death worldwide and its prevalence is expected to rise in the ageing world population, prompting the research community to decipher the pathophysiology of HF. It has been demonstrated that HF is associated with profound modulations of energy metabolism of the heart; this altered energetics is thought to play major roles in the progression of the disease [1]. The failing heart is especially characterized by severe dysfunctions of the mitochondria, the main energy producers of the myocardium, and by an important

decrease in fatty acid utilization in favour of carbohydrates at least at the beginning of the disorder. These alterations lead to an organ towards a state of depleted energy with lower concentrations of highenergy phosphate compounds (ATP, phosphocreatine) associated with elevated ADP in the myocardium that is often described as an "engine out of fuel" [1]. Yet, this metabolic aspect of the disease is still not often taken into consideration by current standard HF therapies due to a lack of therapeutic targets.

The role of sirtuin 1 (SIRT1) in HF pathophysiology and its potential place in future therapies of this syndrome have aroused interest in recent years. This enzyme is a class III histone/protein deacetylase, whose activity depends on intracellular NAD+ level, presenting SIRT1 as a metabolic sensor of cellular energy [2] linking metabolic status of the cells to the regulation of gene expression. It is part of a family of highly conserved protein modifying enzymes firstly described in yeast. Mammals possess 7 sirtuins (SIRT1-7) and SIRT1 is the closest mammalian ortholog of silent mating type information regulation 2 (SIR2) described in yeast, drosophila melanogaster and caenorhabditis elegans for its role in life extension in particular under caloric restriction [3-5]. SIRT1 deacetylates a large variety of substrates located in the nucleus or in the cytosol including histones, enzymes, transcriptional factors and cofactors and consequently exerts essential functions in wide-ranging cellular processes such as energy metabolism, oxidative stress response, apoptosis or aging [6]. It especially regulates energy metabolism by direct interaction with the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α (PGC- 1α), a master regulator of metabolism [7]. The SIRT1-mediated deacetylation of the latter results in the stimulation of its ability to co-activate a number of transcription factors controlling various facets of energy metabolism like mitochondrial biogenesis and fatty acid utilization [8, 9]. The expression of PGC-1 α has been shown to be largely reduced in various animal models of HF [10], as well as in cardiac tissue from HF human patients [11] especially in heart failure with reduced ejection fraction (Chaanine *et al.*, 2019). Knowing that a decrease in PGC-1 α activity is associated with alterations of mitochondrial biogenesis and functions [12, 13], stimulation of the SIRT1/PGC-1 α axis could consequently be of great interest to restore cardiac energetics in a therapeutic context of CVD.

It has already been demonstrated that SIRT1 plays important roles in the maintenance of heart function and that it can be protective when the heart is subjected to stress like oxidative injury, hypertrophic stimuli or ischemia/reperfusion injury (for review see [14]). In rodent, pharmacological activation of SIRT1 in the context of CVD can be beneficial [15, 16]. This deacetylase could protect the heart through various mechanisms impacting processes like inflammation, fibrosis, apoptosis, energy metabolism or calcium homeostasis [15-17]; however, the multitude of its targets renders the interpretation of cardiac protection by SIRT1 complex. In HF, the role of SIRT1 is still not perfectly understood. Its level is increased in the early stage of HF in animal models, especially in the nuclear fraction [18-20], while a clear reduction in SIRT1 protein content has been reported in advanced HF in rodents and humans [15, 16, 21-23]. Whereas a high SIRT1 content could be considered as an adaptive mechanism to face the increase in cardiac workload, studies have in contrast demonstrated that the increase in SIRT1 protein level observed in the hypertrophic stage of pressure overload-induced myocardial dysfunction could be harmful [19, 20]. Likewise, transgenic mouse models with constitutive high levels of SIRT1 overexpression develop cardiac dysfunctions associated with energy metabolism alterations [18-20, 24]. Although the vast majority of the studies argues for the beneficial effect of SIRT1 in CVD, these contradictory results highlight the complexity of SIRT1 mechanism of actions in the cardiomyocyte and it seems necessary to clarify the roles of SIRT1 in the heart before considering this enzyme as a therapeutic target in such diseases, especially in HF.

Thus, the aim of the present study was to elucidate the role of SIRT1 under conditions of cardiac stress. For that, we used an original model of cardiac-specific knockout mice inducible in adult by tamoxifen injection.

2. Results

2.1. Cardiac specific tamoxifen-induced loss of Sirt1 in α -MHC-Cre/flox mice



Figure 1. Cardiac-specific *Sirt1* inactivation in adult mice 4 weeks after tamoxifen injection. (**A**) Protein content of SIRT1 and its downstream acetylated targets (acetylated-Histone H1 (Ac-H1), acetylated-FoxO1 (Ac-FoxO1) and acetylated-p53 (Ac-p53) in left ventricle homogenates. (**B**) Protein content of SIRT1 in isolated cardiomyocytes. (**C**) Protein content of SIRT1 in skeletal muscle and liver homogenates. (n=3 to 4 per experimental group), * p<0.05; **p <0.01 *Sirt1*^{fif} vs *Sirt1*^{GKO}.

At 8 weeks of age, *Sirt1*^{*ciKO*} mice were given tamoxifen to induce exon 4 excision from the floxed *Sirt1* alleles. Four weeks later, assessment of SIRT1 protein level from LV homogenates revealed a reduction of 54±11% in *Sirt1*^{*ciKO*} mice in comparison with *Sirt1*^{*ff*} ones (Figure 1A). This was associated with a significant higher acetylation level of histone H1 (H1) and tumour suppressor p53 protein (p53)

as well as a strong trend towards an increase in acetylated forkhead box protein O1 (FoxO1) in *Sirt1*^{ciKO} mice (p=0.055). Inasmuch as the cardiomyocytes are not the only cell type encountered in the heart, SIRT1 level was investigated in isolated cardiomyocytes to prove down-regulation of SIRT1 in these cells. Indeed, the SIRT1 level drastically dropped to 64±8 % in cardiomyocytes isolated from *Sirt1*^{ciKO} mice heart, although this protein did not completely disappear in this cell population (Figure 1B). Protein level of SIRT1 in skeletal muscle and liver was similar in *Sirt1*^{ciKO} and *Sirt1*^{ff} groups (Figure 1C). Altogether, the data confirmed the cardiac specificity of Sirt1 deletion in the present animal model and a strong decrease in level/activity of this enzyme even though a small part of the cardiomyocyte population of *Sirt1*^{ciKO} mice heart escapes the deletion process.

2.2. Sirt1^{ciKO} mutants develop a mild left ventricular systolic dysfunction



Figure 2. Progression of body weight and cardiac function of cardiac-specific knockout mice during 14 weeks after *Sirt1* deletion induction. (**A**) Body weight. (**B**) Left ventricular ejection fraction. (**C**) Left ventricular fractional shortening. (**D**) Left ventricular internal dimension at end-systole (LVIDs). (**E**) Left ventricular posterior wall thickness at end-systole (LVPWs). (**F**) Representative M-mode images of the left ventricle (14 weeks after induction of *Sirt1* deletion). (n=12 to 14 per experimental group), * p<0.05; **p <0.01; ***p <0.001 *Sirt1*^{ff} versus *Sirt1*^{ciKO}.

Sirt1^{*ciKO*} mice body weight was similar to the controls during 14 weeks of observation (Figure 2A). Cardiac function of *Sirt1*^{*ciKO*} mice and their control littermates was assessed by serial echocardiography just before (0 week) and after (3, 5, 7, 9, 11 and 14 weeks) the first tamoxifen injection. While echocardiography parameters did not show any difference between control and mutant mice until 9 weeks after *Sirt1* deletion, significant decreases in LV ejection fraction (LVEF), fractional shortening (LVFS) and end-systolic left posterior wall thickness (LVPWs) as well as a significant increase in end-systolic left ventricular internal diameter (LVIDs) were observed 11 and 14 weeks after *Sirt1* deletion (Figure 2B-F and Table 1). However, these alterations of cardiac systolic function remained moderate after 14 weeks and no significant impact on cardiac output was noticed at this time point (Table 1). After 14 weeks, no difference in diastolic LV parameters was reported between *Sirt1*^{*ciKO*} and *Sirt1*^{*fi*} mice (Table 1), and similar heart weight-to-body weight (HW/BW) and heart weight-to-tibia length (HW/TL) ratios in both groups indicated the absence of cardiac hypertrophy in *Sirt1*^{*ciKO*} mice (Table 1).

Table 1. Anatomical and echocardiographic parameters 14 weeks and 11 months after induction of *Sirt1* deletion by tamoxifen injection. BW, Body weight. TL, Tibia length. HW, Heart weight. HW/BW, Heart weight-to-body weight ratio. HW/TL, Heart weight-to-tibia length ratio. LW/BW, Lung weight-to-body weight ratio. LW/TL, Lung weight-to-tibia length ratio. KW/BW, Kidney weight-to-body weight ratio. KW/TL, Kidney weight-to-tibia length ratio. HR, Heart rate. IVSd, Interventricular septal thickness at end-diastole. IVSs, Interventricular septal thickness at end-systole. LVIDd, Left ventricular internal dimension at end-diastole. LVIDs, Left ventricular internal dimension at end-diastole. LVIDs, Left ventricular internal dimension at end-systole. LVWPd, Left ventricular posterior wall thickness at end-diastole. LVWPs, Left ventricular posterior wall thickness at end-systole. EDV, Left ventricular telediastolic volume. ESV, Left ventricular telesystolic volume. LVEF, Left ventricular ejection fraction. LVFS, Left ventricular fractional shortening. SV, Stroke volume. LV, left ventricular mass. CO, Cardiac output. ANOVA: $\P P \le 0.05$, $\Pi P \le 0.01$, $\Pi \P P \le 0.01$ for the genotype effect; $\$ P \le 0.05$, $\$ P \le 0.05$, \$ P

	14 weeks		11 months		2 way
	Sirt1 ^{##}	Sirt1 ^{ciKO}	Sirt1 ^{##}	Sirt1 ^{ciKO}	_ ANOVA
BW (g)	30.4 ± 0.4	29.9 ± 0.3	33.4 ± 1.5 ^{\$\$}	29.6 ± 0.6**	¶¶, i
TL (mm)	17.2 ±0.2	17.2 ± 0.1	18.8 ± 0.3 ^{\$\$}	18.6 ± 0.7 ^{\$}	§§§
HW (mg)	143.2 ± 4.4	144.8 ± 3.1	173.6 ± 3.9 ^{\$\$}	162.6 ± 10.4 ^{\$}	§§§
HW/BW (mg/g)	4.7 ± 0.1	4.8 ± 0.1	5.2 ± 0.2	5.5 ± 0.3 ^{\$}	§§
HW/TL (mg/mm)	8.3 ± 0.2	8.6 ± 0.1	9.2 ± 0.2	8.8 ± 0.2	
LW/BW (mg/g)	4.5 ± 0.1	4.9 ± 0.2	5.2 ± 0.2 ^{\$\$}	5.3 ± 0.1	§§§
LW/TL (mg/mm)	8.1 ± 0.2	8.6 ± 0.3	9.3 ± 0.5	8.7 ± 0.4	
KW/BW (mg/g)	11.8 ± 0.2	12.1 ± 0.3	12.6 ± 0.9	12.2 ± 0.6	
KW/TL (mg/mm)	20.9 ± 0.4	21.5 ± 0.5	22.2 ± 0.9	18.7 ± 1.2 ^{\$,*}	i

HR (bpm)	506 ± 7	498 ± 11	542 ± 13	549 ± 16	§§
IVSd (mm)	1.04 ± 0.04	0.93 ± 0.03	0.82 ± 0.12	0.82 ± 0.07	§§
IVSs (mm)	1.64 ± 0.03	1.44 ± 0.03**	1.44 ± 0.06 ^{\$\$}	1.28 ± 0.03 ^{\$,*}	¶¶¶, §§§
LVIDd (mm)	3.36 ± 0.06	3.39 ± 0.06	3.82 ± 0.15 ^{\$}	3.81 ± 0.13 ^{\$\$}	§§§
LVIDs (mm)	1.78 ± 0.04	2.06 ± 0.06*	2.09 ± 0.12 ^{\$}	2.58 ± 0.12 ^{\$\$\$,***}	¶¶¶, §§§
LVPWd (mm)	0.95 ± 0.04	0.81 ± 0.05	0.81 ± 0.04	0.84 ± 0.11	
LVPWs (mm)	1.55 ± 0.06	1.28 ± 0.06	1.53 ± 0.11	1.27 ± 0.02	¶¶
EDV (ml)	0.098 ± 0.005	0.102 ± 0.006	0.142 ± 0.016 ^{\$}	0.14 ± 0.014 ^{\$\$}	\$\$\$
ESV (ml)	0.016 ± 0.001	$0.024 \pm 0.002^{*}$	0.025 ± 0.004 ^{\$}	0.046 ± 0.006 ^{\$\$\$,***}	¶¶¶, §§§, i
LVEF (%)	84.1 ± 0.5	76.3 ± 1.1*	82.6 ± 1.4	66.7 ± 5 ^{\$\$\$,***}	¶¶¶, §§§, i
LVFS (%)	46.9 ± 0.6	39.4 ± 1**	45.6 ± 1.5	32.2 ± 3.3 ^{\$\$\$,***}	¶¶¶, §§§, ii
SV (ml)	0.083 ± 0.005	0.77 ± 0.004	0.117 ± 0.012 ^{\$\$}	0.094 ± 0.013 ^{\$,*}	§§
LV (mg)	109 ± 6	94 ± 7	98 ± 5	102 ± 14	
CO (ml/min)	42.0 ± 2.4	38.0 ± 2.1	63.3 ± 6.9 ^{\$\$}	51.1 ± 5.8 ^{\$,*}	¶, §§§

Eleven months after tamoxifen injection, LV systolic parameters of *Sirt1*^{ciKO} mice were much more altered. Clear decreases in LVEF and LVSF were observed and LVIDs was increased when mice were deleted for *Sirt1* (Table 1). These alterations were associated with an increase in LV end-systolic volume (ESV) and a decrease in cardiac output which is indicative of a cardiac dysfunction (Table 1). At this time point, the mutant mice had significantly lower weight than their littermates (Table 1). Despite alterations of cardiac function, heart weight, HW/BW and HW/TL of these mice were not significantly different from control ones (Table 1). The comparable lung weight-to-tibia length (LW/TL) ratio between both mice groups suggests that *Sirt1*^{ciKO} mice did not suffer from congestive heart failure yet (Table 1). These results indicate that this inducible cardiac-specific knockout mouse model developed a cardiac dysfunction with slow progression and, even though SIRT1 is known to regulate many cellular pathways, cardiac pump alterations were still mild 11 months after induction of *Sirt1* deletion.

2.3. Mitochondrial oxidative capacities are preserved in cardiac-specific Sirt1 mutant mice



Figure 3. Cardiac mitochondrial phenotype of cardiac-specific knockout mice after 16 weeks of Sirt1 deletion. (**A**) SIRT1 protein content in left ventricle (LV) homogenates. (**B**) Rate of respiration after successive addition of L-glycerol-3-phosphate (4 mM) (g3p), palmitoyl-CoA and carnitine (100 μ M and 2 mM) (p-CoA), pyruvate (1 mM) (pyr), glutamate (10 mM) (glu), succinate (15 mM) (succ), amytal (1 mM) and TMPD-ascorbate (0.5 mM). (**C**) Ratio between Km without creatine and Km with creatine. (**D**) Citrate synthase (CS), cytochrome c oxidase (COX), adenylate kinase (AK) and creatine kinase (CK) enzymatic activities. (**E**) Immunoblotting of citrate synthase (CS) and voltage-dependent anion channel (VDAC) in LV homogenates. (**F**) Immunoblotting of total acetyl-CoA carboxylase (ACC),

phosphorylated-ACC (pACC), total AMP-activated protein kinase (AMPK) and phosphorylated-AMPK (pAMPK) in LV homogenates. (G) Representative of fibrosis analysis by Sirius red staining of subequatorial heart sections. (H) Net rate of H₂O₂ release by the mitochondrial electron transport chain measured following sequential addition of succinate (5 mM), and ADP (1 mM). (I) SOD2 protein content in LV homogenates. (J) Carbonylation of LV proteins. (n=6 to 7 per experimental group), * p<0.05; **p <0.01 *Sirt11^{ft}* versus *Sirt1^{ciKO}*.

Knowing the role of SIRT1 in cellular energetics and the high reliance of heart function on mitochondrial energy production, the consequences of Sirt1 deletion on the cardiac mitochondria have been assessed. After 16 weeks of Sirt1 deletion, while SIRT1 level was drastically reduced (Figure 3A), mitochondrial respiration rates after cumulative addition of L-glycerol-3-phosphate, palmitoyl-CoA/carnitine, pyruvate, glutamate, succinate, amytal and TMPD were not significantly changed in Sirt1^{ciKO} mice (Figure 3B), thereby indicating no impact of this deletion on mitochondrial substrate preferences and maximal mitochondrial oxidative capacities at this time point. Likewise, the comparable decrease by creatine in the Km ADP for respiration (Km/KmCr ratio) in both groups suggests that mitochondrial creatine kinase in Sirt1ciko heart was fully functional (Figure 3C). This is associated with unchanged adenylate kinase (AK) and total creatine kinase (CK) enzymatic activity in both types of mice (Figure 3D), which suggests preserved energy transfers within the cardiomyocyte. The activity of citrate synthase (CS), traditionally used as a marker of functional mitochondrial mass, as well as cytochrome c oxidase (COX) activity were unchanged in mutant mice (Figure 3D). In accordance with these results, CS protein level was similar in both groups (Figure 3E). Although voltage-dependent anion channel (VDAC) protein levels showed a significant decrease after 16 weeks of Sirt1 deletion (Figure 3E), the aforementioned results suggest that energy production function of cardiac mitochondria was not markedly altered in the mutants at this stage. A potential compensatory role of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the maintenance of mitochondrial oxidative capacities in the Sirt1^{ciKO} mice was not observed as phosphorylation of AMPK (Thr 172) and acetyl-CoA carboxylase (ACC) (Ser 79), used as markers of AMPK activity, were unchanged in comparison with Sirt1^{ff} (Figure 3F). Of note, no increase in total fibrosis was observed in mutant mice at this time point (Figure 3G).

The loss of *Sirt1* in the heart during 16 weeks was not without impact on mitochondrial functions since cardiac mitochondria of *Sirt1*^{ciKO} mice released significantly more H₂O₂ than control mice when respiration was stimulated by succinate (Figure 3H). This was observed even though MnSOD2 level was decreased in mutant mice (Figure 3I), indicating a higher propensity for mitochondria to produce superoxide anions during electron transfer within mitochondrial respiratory chain. In accordance with this increase in mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production, assessment of protein carbonylation, a consequence of oxidative modifications of protein by ROS, revealed a higher level of oxidative damage in mutants (Figure 3J), suggesting disruption of the balance between ROS production and detoxification systems.

Even eleven months after tamoxifen injection, when cardiac function alterations were much more pronounced, mitochondrial respiration still did not show any significant difference between *Sirt1*^{ff} and *Sirt1*^{ciKO} mice (Figure 4A). The activity of CS was significantly reduced in *Sirt1*^{ciKO} heart (Figure 4B) despite the fact that *Sirt1*^{ciKO} mice exhibited mitochondrial oxidative capacities and CS protein content similar to control mice (Figure 4C). In contrast, COX activity was not impacted by *Sirt1* deletion as well as VDAC protein level (Figure 4C). No difference in mitochondrial electron transfer chain complexes between both groups of mice was evidenced by immunoblotting (Figure 4D). Whereas *Sirt1* deletion was associated with higher ROS production 16 weeks after tamoxifen injection (Figure 3H)., this seemed to be normalized after 11 months since mitochondrial H₂O₂ release in presence of succinate was not significantly increased in the mutant mice (Figure 4E). Likewise, MnSOD2 level was not reduced 11 months after induction of *Sirt1* deletion (Figure 4F).

In order to confirm that cardiac alterations observed in this model were due to the loss of *Sirt1* and not to activation of the Cre-recombinase, the cardiac phenotype of α -MHC-MerCreMer mice treated with the same dose of tamoxifen (40mg/kg i.p daily x 2 days) was investigated. Sixteen weeks after injection, cardiac functions were normal as judged by LVEF, LVFS, LVIDs and ESV (Figure 5A, B, C and



D). Mitochondrial oxidative capacities were not significantly different (Figure 5E) and no sign of fibrosis was evidenced by Sirius red staining (Figure 5F).

Figure 4. Cardiac mitochondrial phenotype of cardiac-specific knockout mice after 11 months of Sirt1 deletion. (**A**) Rate of respiration after successive addition of L-glycerol-3-phosphate (4 mM) (g3p), palmitoyl-CoA and carnitine (100 μ M and 2 mM) (p-CoA), pyruvate (1 mM) (pyr), glutamate (10 mM) (glu), succinate (15 mM) (succ), amytal (1 mM) and TMPD-ascorbate (0.5 mM). (**B**) Citrate synthase (CS) and cytochrome c oxidase (COX) enzymatic activities. (**C**) Immunoblotting of citrate synthase (CS) and voltage-dependent anion channel (VDAC) in LV homogenates. (**D**) Total protein content of 5 subunits of oxidative phosphorylation complexes: C-I-20 (complex I), C-II-30 (complex II), C-III-Core 2 (complex III), C-IV-COXI (complex IV) and C-V- α (complex V). Protein content for CI, CII, CII and CIV was normalized using CV as internal control. (**E**) Net rate of H₂O₂ release by the mitochondrial electron transport chain measured following sequential addition of succinate (5 mM), and ADP (1 mM). (**F**) SOD2 protein content in LV homogenates. (A-B and E: n=6 to 7 per experimental group, C-D and F: n=4 per experimental group), * p<0.05 *Sirt1*^{t/f} versus *Sirt1*^{c/KO}.



Figure 5. Cardiac phenotype of α -MHC-MerCreMer mice 16 weeks after tamoxifen injection. (**A**) Left ventricular ejection fraction. (**B**) Left ventricular fractional shortening. (**C**) Left ventricular internal dimension at end-systole (LVIDs). (**D**) Telesystolic LV volume (ESV). (**E**) Rate of respiration after successive addition of pyruvate (1 mM) (pyr), glutamate (10 mM) (glu), succinate (15 mM) (succ), amytal (1 mM) and TMPD-ascorbate (0.5 mM). (**F**) Representative pictures of fibrosis analysis by Sirius red staining of subequatorial heart section.

2.4. Sirt1^{ciKO} mice are more sensitive to cardiac pressure overload

Many studies have indicated that SIRT1 activation could be beneficial when the heart is subjected to various kinds of stress [7]. We thus investigated how cardiac-specific inducible *Sirt1* deletion triggered in adult impacted the response to TAC-induced cardiac pressure overload. To do so, mice underwent surgery 2 weeks after tamoxifen injection and were sacrificed 8 weeks later (Figure 6A). At sacrifice, mice of both TAC groups displayed an increase in heart weight compared to their respective sham group, as judged by absolute weight and HW/BW ratio (Table 2). However, the HW/BW ratio after TAC was much higher when mice did not express *Sirt1* (Table 2 and Figure 6B). No impact of pressure overload was observed on body and lung weights in any group while TAC induced a decrease in kidney weight independently of the genotype (Table 2). Echocardiography parameters determined

just before sacrifice indicate that the decreases in left ventricular ejection fraction (LVEF) and fractional shortening (LVFS) after 8 weeks of TAC were exacerbated by Sirt1 deletion (Table 2 and Figures 6C-D). The clear increases in LVIDs and ESV observed in both TAC groups were also significantly higher in Sirt1^{ciKO} mice (Table 2 and Figures 6E-F). Mitochondrial respiration rates after addition of p-CoA, pyruvate, glutamate succinate and amytal were reduced by pressure overload (Figure 6G). However, only Sirt1ciko mice group showed statistically significant decrease in all these parameters when compared with its respective sham values. Respiration rates measured from permeabilized cardiac fibres prepared from TAC Sirt1[#] mice exhibited a lower mean value than sham Sirt1[#] mice after the addition of these substrates but a significant difference between these groups was only observed after succinate addition (Figure 6G). Although not significant, respiration rates displayed the same trend towards lower values in TAC Sirt1^{ciKO} group in comparison with TAC Sirt1^{ff} mice. Analysis of mitochondrial respiration assay combined with large drops of CS and COX activities only in TAC mutant Sirt1ciko mice (Figures 6H and I) strongly suggests that, in the context of cardiac pressure overload, mitochondrial oxidative capacities were more severely altered when SIRT1 was deleted in cardiomyocytes. Pressure overload is also associated with fibrosis in Sirt1^{#f} and Sirt1^{ciKO} mice as revealed by Sirius red staining. Perimyocyte interstitial fibrosis was not significantly different in TAC Sirt1ciKO mice compared to TAC controls (Figure 7A), but perivascular fibrosis was significantly more marked in this group than in controls (Figure 7B).

Table 2. Anatomical and echocardiographic parameters 8 weeks after induction of pressure overload in *Sirt1^{tikO}* mice. BW, Body weight. TL, Tibia length. HW, Heart weight. HW/BW, Heart weight-to-body weight ratio. HW/TL, Heart weight-to-tibia length ratio. LW/BW, Lung weight-to-body weight ratio. LW/TL, Lung weight-to-tibia length ratio. KW/BW, Kidney weight-to-body weight ratio. KW/TL, Kidney weight-to-tibia length ratio. HR, Heart rate. IVSd, Interventricular septal thickness at end-diastole. IVSs, Interventricular septal thickness at end-systole. LVIDd, Left ventricular internal dimension at end-diastole. LVIDs, Left ventricular internal dimension at end-systole. LVIDs, Left ventricular internal dimension at end-systole. EDV, Left ventricular telediastolic volume. ESV, Left ventricular posterior wall thickness at end-systole. EDV, Left ventricular telediastolic volume. ESV, Left ventricular telesystolic volume. LVEF, Left ventricular mass. CO, Cardiac output. ANOVA: $\P P \le 0.05$, $\P \P P \le 0.01$, $\P \P \P P \le 0.05$, $\$ P \le 0.05$,

	Sirt1 ^{##}		Sirt1 ^{ciKO}		2 way ANOVA
	SHAM	TAC	SHAM	TAC	
BW (g)	28.3 ± 0.4	28.5 ± 0.7	28.7 ± 0.5	28.7 ± 0.8	
TL (mm)	17.6 ±0.1	17.8 ± 0.1	17.6 ± 0.1	18.2 ± 0.1	
HW (mg)	153.4 ± 4.4	217.7 ± 12.8 ^{\$}	158.9 ± 4.0	249.6 ± 24.7 ^{\$\$\$}	§§§
HW/BW (mg/g)	5.4 ± 0.1	7.6 ± 0.3 ^{\$\$\$}	5.5 ± 0.1	8.7 ± 0.7 ^{\$\$\$,*}	§§§
HW/TL (mg/mm)	8.7 ± 0.2	12.2 ± 0.7 ^{\$\$}	9.0 ± 0.3	13.7 ± 1.3 ^{\$\$\$}	§§§
LW/BW (mg/g)	5.2 ± 0.1	5.4 ± 0.2	5.1 ± 0.1	6.2 ± 0.9	
LW/TL (mg/mm)	8.3 ± 0.2	8.7 ± 0.5	8.4 ± 0.2	9.9 ± 1.6	

KW/BW (mg/g)	123 ± 0.3	11.2 ± 0.3 ^{\$}	12.1 ± 0.2	11.5 ± 0.3	§
KW/TL (mg/mm)	19.8 ± 0.6	17.9 ± 0.6	19.7 ± 0.6	18.2 ± 0.7	§
HR (bpm)	542 ± 19	541 ± 13	514 ± 23	543 ± 14	
IVSd (mm)	0.72 ± 0.05	0.93 ± 0.07	0.71 ± 0.04	0.83 ± 0.04	§§
IVSs (mm)	1.36 ± 0.05	1.39 ± 0.07	1.34 ± 0.03	1.21 ± 0.04 [*]	
LVIDd (mm)	3.79 ± 0.09	4.03 ± 0.17	3.88 ± 0.1	4.14 ± 0.11	ş
LVIDs (mm)	2.11 ± 0.08	2.79 ± 0.16 ^{\$\$\$}	2.24 ± 0.08	3.19 ± 0.11 ^{\$\$\$,*}	¶, §§§
LVPWd (mm)	0.71 ± 0.03	0.81 ± 0.08	0.67 ± 0.03	0.87 ± 0.04 ^{\$}	§§
LVPWs (mm)	1.25 ± 0.04	1.23 ± 0.06	1.21 ± 0.04	1.14 ± 0.02	
EDV (ml)	0.140 ± 0.009	0.152 ± 0.014	0.149 ± 0.011	0.179 ± 0.012	
ESV (ml)	0.026 ± 0.003	0.061 ± 0.011 ^{\$\$}	0.031 ± 0.003	0.086 ± 0.008 ^{\$\$\$,*}	¶, §§§
LVEF (%)	81.7 ± 0.9	65.0 ± 2.2 ^{\$\$\$}	79.5 ± 1.1	52.5 ± 2.4 ^{\$\$\$,***}	¶¶¶, §§§, ii
LVFS (%)	44.5 ± 1.0	30.8 ± 1.4 ^{\$\$\$}	42.4 ± 1.0	23.0 ± 1.3 ^{\$\$\$,***}	¶¶¶, §§§, i
SV (ml)	0.11 ± 01	0.11 ± 0.01	0.12 ±0.01	0.09 ± 0.01	
LV (mg)	92 ± 4	136 ± 17 ^{\$\$}	91 ± 5	135 ± 10 ^{\$\$\$}	§§§
CO (ml/min)	61.3 ± 3.9	54.3 ± 5.3	60 ± 4.6	50.8 ± 4	



Figure 6. Cardiac phenotype of cardiac-specific knockout mice after 8 weeks of cardiac pressure overload. (**A**) Two weeks after tamoxifen injection, mice were subjected to surgery (TAC and sham) and were sacrificed 8 weeks later. (**B**) Heart weight-to-body weight ratio at sacrifice. (**C**) Left ventricular ejection fraction just before sacrifice. (**D**) Left ventricular fractional shortening just before sacrifice. (**E**) Left ventricular internal dimension at end-systole (LVIDs) just before sacrifice. (**F**) Telesystolic LV volume (ESV) just before sacrifice. (**G**) Rate of respiration after successive addition of L-glycerol-3-phosphate (4 mM) (g3p), palmitoyl-CoA and carnitine (100 µM and 2 mM) (p-CoA), pyruvate (1 mM) (pyr), glutamate (10 mM) (glu), succinate (15 mM) (succ), amytal (1 mM) and TMPD-ascorbate (0.5 mM). (**H**) Citrate synthase (CS) enzymatic activity. (**I**) Cytochrome c oxidase (COX) enzymatic activity. (**n=8** to

12 per experimental group), ANOVA: $P \le 0.05$, $P \le 0.01$, $P \le 0.01$ for the genotype effect; $P \le 0.05$, $P \le 0.01$, $P \le 0.01$ for the TAC effect; i $P \le 0.05$, ii $P \le 0.01$ for the interaction effect. Post hoc Newman-Keuls test: $P \le 0.05$, $P \le 0.01$, $P \le 0.01$ *Sirt1* for ersus *Sirt1* (same surgery); $P \le 0.05$, $P \le 0.01$, $P \le 0$



Figure 7. Myocardial Fibrosis after 8 weeks of pressure overload. (A) Perimyocyte fibrosis analysis by Sirius red staining of subequatorial heart sections. (B) Perivascular fibrosis analysis by Sirius red staining of subequatorial heart sections.

3. Discussion

Despite the extensive study of SIRT1 and its role in the heart over the past twenty years, the consequences of a cardiomyocyte-specific and inducible loss of *Sirt1* at adult stage have been poorly addressed. We thus generated a murine model with a truncation of a part of the catalytic domain of Sirt1 (Exon 4) specifically in cardiomyocytes. At baseline, the specific loss of SIRT1 in cardiomyocytes of young adult mice leads to a slight and progressive drop in the left ventricular systolic function. Sixteen weeks after deletion, this cardiac dysfunction was associated with a higher mitochondrial ROS production and marked oxidative damage whereas no alteration in mitochondrial oxidative capacities was noticed. Strikingly, this left ventricular systolic dysfunction gets worst in old KO mice (11 months after tamoxifen injection) even though the mitochondrial propensity to produce more ROS and protein oxidative alterations observed after 16 weeks were not found in these elderly *Sirt1* deficient mice. Beyond these results obtained in young and aged mice at basal conditions, we show that the specific loss of *Sirt1* in adults exacerbates the cardiac dysfunction induced by pressure overload. This dysfunction is accompanied by more pronounced mitochondrial alterations as well as a more severe perivascular fibrosis.

Sirt1 deletion was induced when mice reached an adult and mature state. This model is attractive since it has been shown that the total and constitutive deficiency of SIRT1 is associated with a very high perinatal mortality and a severe dilated cardiomyopathy when animals survive and reach adult age [25]. Unlike the constitutive deficient models, it makes possible to investigate the consequences of a late loss of functional SIRT1 on heart function and to study the development and progression of HF in the absence of SIRT1. To generate the present specific transgenic mouse line, mouse carrying the α -MHC-MerCreMer transgene were used, thereby allowing the expression of a tamoxifen-inducible Crerecombinase under the control of the mouse alpha-myosin heavy chain promoter (only expressed in the cardiomyocytes of heart). Of note, several studies have reported a cardiac toxicity of the Crerecombinase depending on the duration and the level of Cre expression [26-28]. Thus, mice carrying α -MHC-MerCreMer transgene are likely to develop cardiac dysfunction associated with fibrosis, cell infiltration and inflammation when treated with repetitive doses of tamoxifen [26, 29]. Nevertheless, Lewox and collaborators have demonstrated that a single tamoxifen injection (40 mg/kg) successfully induces robust α -MHC-MerCreMer-dependent recombination without exhibiting any cardiotoxicity. Based on this study and preliminary tests led in our lab (data not shown), a 40 mg/kg/day tamoxifen intraperitoneal injection for 2 consecutive days has been chosen as standard protocol to induce Crerecombinase activation in adult α -MHC-Cre/flox mice. The total absence of cardiac dysfunction and fibrosis in α -MHC-MerCreMer mice treated with this same dose of tamoxifen confirmed that the alterations observed in the present study were due to the loss of Sirt1 and not to an excessive activation of the Cre-recombinase.

In KO mice under basal conditions, the modest alterations of several cardiac contractile parameters (LVEF, LVFS, IVSs, LVIDs and LVPWs) suggest a mild ventricular systolic dysfunction. This degradation of cardiac function appears 11 weeks after tamoxifen injection, becomes more important after 11 months of *Sirt1* deletion and was not associated with major anatomical changes when compared to control mice. Importantly, the echocardiography analysis revealed that diastolic function is normal and in particular no significant dilatation has been observed during the relaxation of the left ventricle when *Sirt1*^{ciKO} mice are compared to *Sirt1*^{ff}. Interestingly, mice displaying a non-tissue specific complete (homozygous) or partial (heterozygous) constitutive SIRT1 deficiency exhibit a dilated cardiomyopathy at 5 months of age that is not associated with cardiomyocyte hypertrophy [25]; the cross-sectional area of cardiomyocytes was even reduced in this model.

Surprisingly, given that SIRT1 has been extensively studied for its role in energy metabolism [6], the specific cardiac inducible deletion of SIRT1 does not provoke major mitochondrial dysfunction even after 11 months of deletion. This could be explained by the fact that SIRT1 is an enzyme activated by an increase in NAD⁺ level that is a hallmark of energetic stress. Under standard conditions and in absence of stress, the consequence of the loss of SIRT1 functions could thus be modest, practically imperceptible and too mild to be evidenced when investigating mitochondrial functions. Moreover, even though the

deletion is induced at adult stage, chronic compensatory mechanisms cannot be excluded and could progressively be established, explaining for instance the normalization of mitochondrial ROS production in old mice whereas mitochondria significantly produce more ROS after 16 weeks of *Sirt1* deletion. Of note, this increase in ROS production in absence of *Sirt1* expression was expected given the role of this enzyme in antioxidant defences, in particular through FoxOs activation [7]. On the other hand, the mechanism allowing the normalization of these parameters in old mice has not been identified in this study though we could eliminate the hypothesis a compensatory activation of AMPK. The requirement of SIRT1 for AMPK activation via Liver Kinase B1 (LKB1) deacetylation could explain this absence of AMPK stimulation [30].

In the aforementioned study using constitutive Sirt1 KO mice, cardiac alterations were associated with important mitochondrial alterations such as aberrant mitochondrial structure, lesser mitochondrial content or reduced mitochondrial-DNA encoded genes [25], suggesting that the myocardium is more damaged in this model. The differences with the present study could be attributed to peripheral disorders caused by a total loss of SIRT1 in other cell types inducing for example a vascular dysfunction that could affect the heart [31, 32] or to the roles of SIRT1 in the prenatal and postnatal development of the heart and cardiomyocyte differentiation [33-35], thereby inducing mitochondrial defects that will exacerbate cardiac dysfunction. The cardiac specific non-inducible Sirt1 KO murine model developed by Hsu and collaborators in which the expression of the Cre-recombinase is under the control of α myosin heavy chain promoter (α MHC-Cre) is in line with these hypotheses [36]. Indeed, these cardiac specific KO Sirt1 mice exhibit a normal cardiac phenotype at 3 months of age. This could be explained not only by the fact that *Sirt1* ablation is restricted to the heart but also by the low induction of α -MHC expression during the foetal life and early postnatal development in rodent [37]. Therefore, SIRT1 protein level and activity could be sufficiently maintained during prenatal development, thereby giving newborns with normal heart. The expression of *Sirt1* would then progressively decline during postnatal development, a period during which α -MHC-Cre expression progressively increases [37, 38]. Everything goes as if *Sirt1* deletion was progressively induced in the days following birth in this model and the normal cardiac function displayed by these mice at 3 months of age could be due to the slowness of the development of cardiac dysfunction after Sirt1 loss. This is in accordance with the absence of cardiac dysfunction during several weeks after tamoxifen injection in our model. Incidentally, this noninducible cardiac-specific Sirt1 deletion under α -MHC promoter control makes the mice more sensitive to stress and leads to an increase in oxidative damage in 6-month old mice and to a progressive impaired left ventricle contractility that becomes significant in 12-month old mice [36, 39]. This sequence marked by an oxidative stress followed by a more severe degradation of cardiac function in old mice strongly evokes what is observed in our inducible cardiac-specific Sirt1 knockout model, highlighting some similarities between both animal models.

Given the important role of SIRT1 in aging [18, 39], a particular attention was paid to the inducible cardiac-specific Sirt1 knockout mice at an advanced age. Eleven months after tamoxifen injection, the systolic dysfunction is worsened, as revealed by greater LVIDs and reduced IVSs in comparison with younger mice (14 weeks after tamoxifen injection). Interestingly and as it has been reported in humans [40], old mice show incipient diastolic dysfunction (as shown by higher LVIDd); however, it is not affected by the loss of SIRT1. The slow onset of systolic dysfunction in this model raises questions that will need further investigations. Indeed, although a very slight dysfunction is observed after 11 weeks of Sirt1 ablation, one can wonder to what extent the significant alterations reported in 11-month old mice are the result of small and early cellular homeostasis modifications that slowly impact cardiac function as time goes by, or if they are the consequences of the impairment of phenomena requiring SIRT1 during aging, such as the regulation of endoplasmic reticulum (ER) stress induced by aging [39]. The fact that cardiac dysfunction in elderly mice is not associated with clear degradation in mitochondrial respiration and/or higher oxidative stress is quite unexpected since SIRT1 has largely been described as an important actor of cellular energetics and antioxidant defences [6]. Nevertheless, the noticeable decrease in CS activity in these old $Sirt1^{ciKO}$ mice suggest perturbations of energy metabolism even though they are not revealed by the assessment of maximal mitochondrial oxidative

capacities in permeabilized fibres or mitochondrial protein content. In the light of this study, it seems that alterations of the mitochondria as main energy producer of the cardiomyocyte would not be the major cause of the cardiac dysfunction following the cardiac-specific deletion of *Sirt1* in adult. Additional analysis are required to better understand the profound modulations of energy metabolism in this *Sirt1ciKO* mice and to determine if other processes could be involved in the establishment of the systolic dysfunction. For instance SIRT1 is known to be involved in regulation of apoptosis, autophagy, calcium homeostasis or ER stress [15, 41, 42], processes that have to be tightly balanced in the healthy heart. Indeed, using a constitutive model of *Sirt1* deletion, we have shown recently that SIRT1 is a novel regulatory mechanism for protecting cardiac cells from ER stress [43]. Thus, the potential dysregulation of these processes in this inducible cardiac-specific *Sirt1* KO model will be the subject of further studies.

Different models of *Sirt1* deficient mouse have been described in the past few years and they all evidenced an increased sensitivity to cardiac stress when the expression of this protein is reduced or abolished (for review see [7]). Again, in this inducible cardiac-specific *Sirt1* KO model, the loss of SIRT1 function exacerbates cardiac dysfunction induced by pressure overload. This result reinforces the idea that SIRT1 plays a protective role when the heart is subjected to a stress. Although a few studies have created doubt regarding the cardioprotective effect of SIRT1 [19, 20], the observations made in the present study are perfectly in line with numerous studies showing that SIRT1 is beneficial in the heart facing various stresses such as oxidative stress or ischemia/reperfusion [18, 30, 36]. As already shown [44], TAC-induced cardiac dysfunction is associated with decreases in mitochondrial respiration rates stimulated by different substrates; these alterations tend to be more pronounced in the absence of Sirt1. The exacerbation of CS and COX activity drop in *Sirt1*^{ciKO} subjected to TAC clearly demonstrates that SIRT1 is required to maintain cellular energetics under stress conditions. However, although the energy metabolism alterations induced by TAC are more severe in *Sirt1*^{ciKO} mice, mitochondrial oxidative capacities are not drastically reduced when compared to TAC *Sirt1*^{ff} mice, suggesting that the much higher sensitivity to cardiac pressure overload of these mutant mice might be multifactorial.

For instance, it clearly appears that TAC induces fibrosis. It is well known that fibrosis changes tissue properties and negatively affects heart function. Although the loss of *Sirt1* was not associated with fibrosis under basal conditions or with higher perimyocyte fibrosis after TAC, the fact that *Sirt1ciKO* mice heart subjected to TAC developed more perivascular fibrosis could be in part responsible for the hypersensitivity of these mice to pressure overload. The link between Sirt1 and fibrosis has already been studied and it has especially been shown that Sirt1 regulates fibrosis though the TGF- β 1/Smad2/3 axis and stimulation of SIRT1 by SRT1720 reduces cardiac fibrosis and improves cardiac function [16]; this could thus be one of the facets of the protective role of SIRT1. In the present genetically modified mice, the specific increase in perivascular fibrosis was unexpected and raises questions. Indeed, concern still persists about how the deletion of *Sirt1* in cardiomyocytes results in the higher collagen deposition specifically in the vicinity of the vessels when the heart is stressed. The answer may have to be sought on the side of the complex interplay between the different cell types of the heart.

Our study also shows that cardiac hypertrophy in response to pressure overload is possible in the absence of SIRT1 even though the hypertrophic role of SIRT1 has been documented [17, 19, 25, 45]. This points out the intricate role of SIRT1 in a process in which it has sometimes been described as a pro-hypertrophic or anti-hypertrophic factor [16, 46, 47]. This paradoxical effect of SIRT1 in a given process highlights the complexity of its functions that may be modulated according to its activation level. The generation of several models of SIRT1 overexpression illustrates this remark since the phenotype is intimately dependent on the level of SIRT1 [24], thereby highlighting that this deacetylase could act in a dose-effect manner.

Cardiac-specific inducible *Sirt1* deletion model proved helpful in deciphering the role of Sirt1 in basal and TAC conditions. Although *Sirt1* deletion induced a progressive cardiac dysfunction, this was observed without overt mitochondrial dysfunction. However, the role of Sirt1 in mitochondrial and cardiac function defects was evidenced following pressure overload induced by aortic constriction showing the importance of this pathway in cardioprotection.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

Sirt1floxAE4/floxAE4 (Sirt1f/f) homozygous mice (kindly provided by David A Sinclair's group) and heterozygous Myh6-MerCreMer^{+/-} (α -MHC-Cre) mice were crossed to create cardiac-specific and inducible knock-out (Sirt1^{ciKO}) mice (α-MHC-Cre/Sirt1^{f/f}). Male Sirt1^{ciKO}mice were injected with tamoxifen (40mg/kg i.p daily x 2 days) at the age of 8 weeks to induce Sirt1 deletion, thereby generating Sirt1 cardiac-specific inducible mice called Sirt1^{ciKO} in this study. Littermate Sirt1^{t/t} mice not carrying α -MHC-MerCreMer transgene were subjected to the same tamoxifen treatment and were used as control mice. While some of these mice were sacrificed 16 weeks or 11month after tamoxifen injection with no intervention other than the latter injection, others underwent surgery to induce pressure overload by transverse aortic constriction (TAC) 2 weeks after injection. Anaesthesia was induced by intraperitoneal injection of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg) and silk suture were placed around the aorta using a blunted 27 gauge needle to generate aortic stenosis. Animals were euthanized 8 weeks after surgery by cervical dislocation and heart were rapidly excised, rinsed in cold calcium-free Krebs solution and weighed. A part of the left ventricle (LV) was immediately used for mitochondrial function assessment and another part was flash frozen in liquid nitrogen for further biochemical determinations. All animal experimental procedures were approved by animal ethics committee of Paris-Sud University, authorized by French government (authorization number: B9201901) and complied with directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes.

4.2. Echocardiography

Echocardiography was done using a 12 Mhz transducer (Vivid 7, General Electric Healthcare) under 2.5% isoflurane gas anaesthesia to assess cardiac function. M-mode echocardiography was used to determine left ventricular mass, fractional shortening and left ventricular ejection fraction.

Ventricular cardiomyocyte isolation

Immediately after sacrifice, heart from Sirt1^{*i*/*i*} or Sirt1^{*c*/*k*0} mice four weeks after tamoxifen injection was washed and aorta cannulated in washing buffer (in mM: 113 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄, 0.6 KH₂PO₄, 0.6 NaH₂PO₄, 10 HEPES, 1.6 NaHCO₃, 30 Taurine, 20 Glucose) as previously described [48]. Heart was then retrogradely perfused at a constant hydrostatic pressure with digestion buffer (washing buffer added with 80µg/ml LiberaseTM TM research grade (Roche)) for 6 to 9 minutes at 37°C. The ventricles of the digested heart were excised, shredded into small pieces in the collecting buffer (washing buffer added with 0.2 mM CaCl₂ and 5mg/ml BSA) and gently mechanically shaken to release the cardiomyocytes. After filtration and 10 minutes of decantation, only cardiomyocyte pellet was kept and resuspended in selecting buffer 1 (washing buffer added with 0.5 mM CaCl₂ and 5mg/ml BSA). After 10 minutes period of decantation, a new resuspension/decantation step was carried out in selecting buffer 2 (washing buffer added with 1 mM CaCl₂). Finally, the cardiomyocytes pellet obtained was frozen in liquid nitrogen for further analysis.

Mitochondrial functional assays in permeabilized cardiac fibres

Fibres prepared from the left ventricle were permeabilized with saponin as previously described [49] and kept on ice until use in S buffer (in mM: 2.77 CaK₂ ethyleneglycol tetraacetic acid (EGTA), 7.23 K₂EGTA [100 nM free Ca²⁺], 6.56 MgCl₂ [1 mM free Mg²⁺], 5.7 Na₂ATP, 15 phosphocreatine, 20 taurine, 0.5 dithiothreitol (DTT), 50 K-methane sulfonate [160 mM ionic strength], 20 imidazole, pH 7.1). Measurements aimed at determining mitochondrial parameters were expressed per gram of dry fibre weight.

4.3. Mitochondrial respiration

Mitochondrial respiratory function was studied in situ in saponin-permeabilized cardiac muscle fibres using a Clarke electrode as previously described (Kuznetsov 2008). A protocol was designed to measure oxygen consumption after successive addition of ADP (2 mM), malate (4 mM), L-glycerol-3-phosphate (4 mM), palmitoyl-CoA and carnitine (100 µM and 2 mM), pyruvate (1 mM), glutamate (10

mM), succinate (15 mM), amytal (an inhibitor of complex I, 1 mM) and the complex IV substrates N, N', N'-tetramethyl-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)-ascorbate (0.5 mM) (activator of complex IV) to respiration solution (in mM: 2.77 CaK₂ ethyleneglycol tetraacetic acid (EGTA), 7.23 K₂EGTA [100 nM free Ca²⁺], 1.38 MgCl₂, 3 K₂HPO₄, 20 taurine, 0.5 dithiothreitol (DTT), 90 K-methane sulfonate and 10 Na-methane sulfonate, 20 imidazole, pH 7.1) at 23 °C. Rates of respiration are given in µmoles O₂/min/g dry weight. A second protocol was designed to determine ADP sensitivity of mitochondria and functioning of mitochondrial creatine kinase. For that, respiration was stimulated by the addition of 100 µM ADP in the presence of glutamate (10 mM) and malate (4 mM). Creatine (11mM) was then added to the chamber and finally the maximal respiration rate (Vmax) was measured by adding 2 mM ADP. The apparent Km values in the presence and absence of creatine were calculated as previously described [38].

4.4. Mitochondrial H2O2 release

 H_2O_2 released by respiring mitochondria was determined in permeabilized cardiac fibres as previously described [50]. Before measurement, fibres were removed from S buffer and washed in Z1 buffer (in mM: 35 KCl, 1 EGTA, 3 MgCl₂, 10 K₂HPO₄, 10 K-MES, 0.5mg/ml BSA, pH7.3 at 4°C) on ice. Fibres were then incubated in Z2 buffer (in mM: 35 KCl, 1 EGTA, 3 MgCl₂, 10 K₂HPO₄, 10 K-MES, 0.5mg/ml BSA, pH7.3 at 37°C) containing horseradish peroxidase (1.2 U/ml) and Amplex red (20 μ M: excitation-emission: 563 to 587 nm) at 37°C in a fluorescence spectrophotometer (F-2710, Hitachi) under gentle agitation. Baseline fluorescence was measured in the absence of any exogenous respiratory substrates before sequential addition of succinate (5 mM) and ADP (1 mM). Rates of H₂O₂ production were calculated using a standard curve established under the same experimental conditions.

4.5. Enzyme activity

Frozen tissue samples were weighed, homogenized (Bertin Precellys 24) in ice-cold buffer (50 mg/ml) containing 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 5 mM (pH 8.7), EGTA 1 mM, DTT 1 mM and 0.1% Triton X-100. Activity of citrate synthase (CS) and cytochrome c oxidase (COX) was determined using standard spectrophotometric assays [51, 52].

4.6. Immunoblotting

Frozen tissue samples were homogenized (Bertin Precellys 24) in ice cold buffer containing HEPES 50 mM, KCl 50 mM, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 1 mM, β -glycerophosphate 5 mM, Triton X-100 0.1%, orthovanadate 1 mM, dithithreitol 1 mM, sodium fluoride 50 mM, Na pyrophosphate 5 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride 0.2 mM and antiprotease cocktail set (Calbiochem 539134). Protein extracts were separated on SDS-polyacrylamide gel (8 to 12%) and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes for Western blot. After 1 hour of blocking in PBS containing TWEEN20 (0.1%) and non-fat milk (5%), the membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibody (Table 3). After washing, the membranes were incubated with a secondary antibody coupled with horseradish peroxidase for 1 hour at room temperature and visualized using chemiluminescent substrate (LuminataTM Western Chemiluminescent HRP Substrates, Millipore). Light emission was detected by autoradiography and quantified using an image-analysis system (iBright FL1000, Invitrogen).

Table 3. Antibodies. SIRT1, sirtuin 1. Ac-H1, acetylated histone 1. FoxO1, forkhead box O protein 1. Ac-FoxO1, acetylated forkhead box O protein 1. Ac-p53, acetylated tumor protein 53. CS, citrate synthase. VDAC1, voltage-dependent anion channel 1. ACC, acetyl-CoA carboxylase. pACC, phosphorylated acetyl-CoA carboxylase. AMPK, AMP-activated protein kinase. pAMPK, phosphorylated AMP-activated protein kinase. SOD2, superoxide dismutase 2.

Antibody	Company	Catalog No	Dilution

SIRT1	Abcam	ab110304	1000
Ac-H1	Sigma	H7789	1000
FoxO1	Cell signaling	2880S	250
Ac-FoxO1	Santa Cruz	sc49437	1000
Ac-p53	Cell signaling	2570	250
CS	Abcam	ab96600	1000
VDAC1	Cell signaling	4866	1000
ACC	Cell signaling	3676	1000
pACC	Cell signaling	3661	1000
AMPK	Cell signaling	2532	500
рАМРК	Cell signaling	2531	500
SOD2	Abcam	ab16956	500
Total OXPHOS	MitoSciences	MS604	250
Actin	Santa Cruz	SC-8432	200
Tubulin	Sigma	T6199	1000

4.7. Histological analysis

Hearts were fixed in 4% paraformaldehyde, paraffin embedded and serially sectioned (5 μ m). Sections were stained with Sirius red. Fibrosis quantification was performed on 3-4 sections (5-10 fields/section) per animal using Image J software.

4.8. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical differences were analyzed using two-way ANOVA; Newman-Keuls post-hoc tests were used to identify significant differences between means. When experiments were made with only two groups, the statistical analysis was done using t-test.

Author Contributions: Study conception and design: M.-N.S., M.Me., V.V., R.V.-C., A.G. and J.P.; Acquisition of data: M.-N.S., L.G., M.Mo., M.G., C.R.-M., and J.P.; Analysis and interpretation of data: M.-N.S., L.G., M.Mo., M.G., C.R.-M., C.L., M.Me., V.V., R.V.-C., A.G. and J.P.; Drafting of manuscript and critical revision: M.-N.S., L.G., M.Mo., M.G., C.R.-M., C.L., M.Me., V.V., R.V.-C., A.G. and J.P.

Funding: Our laboratory is member of the Laboratory of Excellence LERMIT and is supported by grants from "Fondation pour la Recherche Médicale" (to AG, #DPM20121125546), université Paris-Sud (ERM) and CORDDIM (to RVC, #cod110153). RVC is emeritus scientist at CNRS.

Acknowledgments: We thank Valérie Domergue for preparation of the animals and Claudine Deloménie for her expertise in molecular biology (IFR141-IPSIT). We thank Rodolphe Fischmeister and Ana-Maria Gomez for continuous support. Maryline Moulin's current address: Université de Paris, BFA, UMR 8251, CNRS, F-75013 Paris, France. Maria-Nieves Sanz's current address : Department of Cardiovascular Surgery, Inselspital, Bern University Hispital, Bern, Switzerland and Department for BioMedical Research, University of Bern, Bern, Switzerland.

Conflicts of Interest: No potential conflicts of interest were disclosed.

Abbreviations

HF	Heart failure
CVD	Cardiovascular Diseases
SIRT	Sirtuin
PGC-1a	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α
MHC	Myosin heavy chain
TAC	Tranverse aortic constriction
LV	Left ventricle

CS	Citrate synthase
COX	Cytochrome c oxidase
p53	Tumour suppressor p53 protein
H1	Histone H1
FoxO1	Forkhead box protein O1
LVEF	Left ventricular ejection fraction
LVFS	Left ventricular fractional shortening
LVPWs	End-systolic left ventricular posterior wall thickness
LVIDs	End-systolic left ventricular internal diameter
ESV	End-systolic volume
IVSs	End-systolic interventricular spetal thickness
HW	Heart weight
BW	Body weight
TL	Tibia length
AK	Adenylate kinase
СК	Creatine kinase
VDAC	Voltage-dependent anion channel
AMPK	AMP-activated protein kinase
ACC	Acetyl-Coa carboxylase
ROS	Reactive oxygen species
ER	Endoplasmic reticulum

References

- 1. Neubauer, S., The failing heart--an engine out of fuel. N Engl J Med 2007, 356, (11), 1140-51.
- 2. Li, X., SIRT1 and energy metabolism. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2013, 45, (1), 51-60.
- 3. Blander, G.; Guarente, L., The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 2004, 73, 417-35.
- 4. Rogina, B.; Helfand, S. L., Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, (45), 15998-6003.
- 5. Wood, J. G.; Rogina, B.; Lavu, S.; Howitz, K.; Helfand, S. L.; Tatar, M.; Sinclair, D., Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* **2004**, 430, (7000), 686-9.
- 6. Tanno, M.; Kuno, A.; Horio, Y.; Miura, T., Emerging beneficial roles of sirtuins in heart failure. *Basic Res Cardiol* **2012**, 107, (4), 273.
- 7. Matsushima, S.; Sadoshima, J., The role of sirtuins in cardiac disease. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **2015**, 309, (9), H1375-89.
- 8. Lin, J.; Handschin, C.; Spiegelman, B. M., Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell metabolism* **2005**, 1, (6), 361-70.
- 9. Patten, I. S.; Arany, Z., PGC-1 coactivators in the cardiovascular system. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **2012**, 23, (2), 90-7.
- Garnier, A.; Fortin, D.; Delomenie, C.; Momken, I.; Veksler, V.; Ventura-Clapier, R., Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *The Journal of physiology* 2003, 551, (Pt 2), 491-501.
- 11. Sihag, S.; Cresci, S.; Li, A. Y.; Sucharov, C. C.; Lehman, J. J., PGC-1alpha and ERRalpha target gene downregulation is a signature of the failing human heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* **2009**, 46, (2), 201-12.
- Arany, Z.; Novikov, M.; Chin, S.; Ma, Y.; Rosenzweig, A.; Spiegelman, B. M., Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103, (26), 10086-91.
- 13. Ventura-Clapier, R.; Garnier, A.; Veksler, V., Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res* **2008**, *79*, (2), 208-217.
- 14. D'Onofrio, N.; Servillo, L.; Balestrieri, M. L., SIRT1 and SIRT6 Signaling Pathways in Cardiovascular Disease Protection. *Antioxidants & redox signaling* **2018**, *28*, (8), 711-732.

- Gorski, P. A.; Jang, S. P.; Jeong, D.; Lee, A.; Lee, P.; Oh, J. G.; Chepurko, V.; Yang, D. K.; Kwak, T. H.; Eom, S. H.; Park, Z. Y.; Yoo, Y. J.; Kim, D. H.; Kook, H.; Sunagawa, Y.; Morimoto, T.; Hasegawa, K.; Sadoshima, J.; Hajjar, R. J.; Park, W. J.; Kho, C., Role of SIRT1 in Modulating Acetylation of the Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca(2+)-ATPase in Heart Failure. *Circulation research* 2019, 124, (9), e63-e80.
- 16. Bugyei-Twum, A.; Ford, C.; Civitarese, R.; Seegobin, J.; Advani, S. L.; Desjardins, J. F.; Kabir, G.; Zhang, Y.; Mitchell, M.; Switzer, J.; Thai, K.; Shen, V.; Abadeh, A.; Singh, K. K.; Billia, F.; Advani, A.; Gilbert, R. E.; Connelly, K. A., Sirtuin 1 activation attenuates cardiac fibrosis in a rodent pressure overload model by modifying Smad2/3 transactivation. *Cardiovasc Res* 2018, 114, (12), 1629-1641.
- 17. Alcendor, R. R.; Kirshenbaum, L. A.; Imai, S.; Vatner, S. F.; Sadoshima, J., Silent information regulator 2alpha, a longevity factor and class III histone deacetylase, is an essential endogenous apoptosis inhibitor in cardiac myocytes. *Circulation research* **2004**, *95*, (10), *971-80*.
- Alcendor, R. R.; Gao, S.; Zhai, P.; Zablocki, D.; Holle, E.; Yu, X.; Tian, B.; Wagner, T.; Vatner, S. F.; Sadoshima, J., Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circulation research* 2007, 100, (10), 1512-21.
- 19. Oka, S.; Alcendor, R.; Zhai, P.; Park, J. Y.; Shao, D.; Cho, J.; Yamamoto, T.; Tian, B.; Sadoshima, J., PPARalpha-Sirt1 complex mediates cardiac hypertrophy and failure through suppression of the ERR transcriptional pathway. *Cell metabolism* **2011**, 14, (5), 598-611.
- 20. Oka, S.; Zhai, P.; Alcendor, R.; Park, J. Y.; Tian, B.; Sadoshima, J., Suppression of ERR targets by a PPARalpha/Sirt1 complex in the failing heart. *Cell Cycle* **2012**, *11*, (5), 856-64.
- 21. Pillai, J. B.; Isbatan, A.; Imai, S.; Gupta, M. P., Poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD+ depletion and reduced Sir2alpha deacetylase activity. *The Journal of biological chemistry* **2005**, 280, (52), 43121-30.
- 22. Lu, T. M.; Tsai, J. Y.; Chen, Y. C.; Huang, C. Y.; Hsu, H. L.; Weng, C. F.; Shih, C. C.; Hsu, C. P., Downregulation of Sirt1 as aging change in advanced heart failure. *J Biomed Sci* **2014**, 21, 57.
- 23. Akkafa, F.; Halil Altiparmak, I.; Erkus, M. E.; Aksoy, N.; Kaya, C.; Ozer, A.; Sezen, H.; Oztuzcu, S.; Koyuncu, I.; Umurhan, B., Reduced SIRT1 expression correlates with enhanced oxidative stress in compensated and decompensated heart failure. *Redox Biol* **2015**, *6*, 169-173.
- 24. Kawashima, T.; Inuzuka, Y.; Okuda, J.; Kato, T.; Niizuma, S.; Tamaki, Y.; Iwanaga, Y.; Kawamoto, A.; Narazaki, M.; Matsuda, T.; Adachi, S.; Takemura, G.; Kita, T.; Kimura, T.; Shioi, T., Constitutive SIRT1 overexpression impairs mitochondria and reduces cardiac function in mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* **2011**, 51, (6), 1026-36.
- 25. Planavila, A.; Dominguez, E.; Navarro, M.; Vinciguerra, M.; Iglesias, R.; Giralt, M.; Lope-Piedrafita, S.; Ruberte, J.; Villarroya, F., Dilated cardiomyopathy and mitochondrial dysfunction in Sirt1-deficient mice: a role for Sirt1-Mef2 in adult heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* **2012**, *53*, (4), 521-31.
- 26. Hall, M. E.; Smith, G.; Hall, J. E.; Stec, D. E., Systolic dysfunction in cardiac-specific ligand-inducible MerCreMer transgenic mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2011, 301, (1), H253-60.
- 27. Buerger, A.; Rozhitskaya, O.; Sherwood, M. C.; Dorfman, A. L.; Bisping, E.; Abel, E. D.; Pu, W. T.; Izumo, S.; Jay, P. Y., Dilated cardiomyopathy resulting from high-level myocardial expression of Cre-recombinase. *J Card Fail* **2006**, 12, (5), 392-8.
- Bersell, K.; Choudhury, S.; Mollova, M.; Polizzotti, B. D.; Ganapathy, B.; Walsh, S.; Wadugu, B.; Arab, S.; Kuhn, B., Moderate and high amounts of tamoxifen in alphaMHC-MerCreMer mice induce a DNA damage response, leading to heart failure and death. *Dis Model Mech* 2013, 6, (6), 1459-69.
- 29. Lexow, J.; Poggioli, T.; Sarathchandra, P.; Santini, M. P.; Rosenthal, N., Cardiac fibrosis in mice expressing an inducible myocardial-specific Cre driver. *Dis Model Mech* **2013**, *6*, (6), 1470-6.
- 30. Wang, L.; Quan, N.; Sun, W.; Chen, X.; Cates, C.; Rousselle, T.; Zhou, X.; Zhao, X.; Li, J., Cardiomyocyte-specific deletion of Sirt1 gene sensitizes myocardium to ischaemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **2018**, 114, (6), 805-821.
- 31. Mattagajasingh, I.; Kim, C. S.; Naqvi, A.; Yamamori, T.; Hoffman, T. A.; Jung, S. B.; DeRicco, J.; Kasuno, K.; Irani, K., SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, 104, (37), 14855-60.

- 32. Maizel, J.; Xavier, S.; Chen, J.; Lin, C. H.; Vasko, R.; Goligorsky, M. S., Sirtuin 1 ablation in endothelial cells is associated with impaired angiogenesis and diastolic dysfunction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **2014**, 307, (12), H1691-704.
- 33. Shin, A. N.; Han, L.; Dasgupta, C.; Huang, L.; Yang, S.; Zhang, L., SIRT1 increases cardiomyocyte binucleation in the heart development. *Oncotarget* **2018**, *9*, (8), 7996-8010.
- 34. Sakamoto, J.; Miura, T.; Shimamoto, K.; Horio, Y., Predominant expression of Sir2alpha, an NAD-dependent histone deacetylase, in the embryonic mouse heart and brain. *FEBS Lett* **2004**, *556*, (1-3), 281-6.
- 35. Cheng, H. L.; Mostoslavsky, R.; Saito, S.; Manis, J. P.; Gu, Y.; Patel, P.; Bronson, R.; Appella, E.; Alt, F. W.; Chua, K. F., Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, (19), 10794-9.
- 36. Hsu, C. P.; Zhai, P.; Yamamoto, T.; Maejima, Y.; Matsushima, S.; Hariharan, N.; Shao, D.; Takagi, H.; Oka, S.; Sadoshima, J., Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion. *Circulation* **2010**, 122, (21), 2170-82.
- 37. Lompre, A. M.; Nadal-Ginard, B.; Mahdavi, V., Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *The Journal of biological chemistry* **1984**, 259, (10), 6437-46.
- 38. Piquereau, J.; Novotova, M.; Fortin, D.; Garnier, A.; Ventura-Clapier, R.; Veksler, V.; Joubert, F., Postnatal development of mouse heart: formation of energetic microdomains. *The Journal of physiology* **2010**, 588, (Pt 13), 2443-2454.
- Hsu, Y. J.; Hsu, S. C.; Hsu, C. P.; Chen, Y. H.; Chang, Y. L.; Sadoshima, J.; Huang, S. M.; Tsai, C. S.; Lin, C. Y., Sirtuin 1 protects the aging heart from contractile dysfunction mediated through the inhibition of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in cardiac-specific Sirtuin 1 knockout mouse model. *Int J Cardiol* 2017, 228, 543-552.
- 40. Dai, D. F.; Chen, T.; Johnson, S. C.; Szeto, H.; Rabinovitch, P. S., Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling* **2012**, *16*, (12), 1492-526.
- 41. Yamamoto, T.; Sadoshima, J., Protection of the heart against ischemia/reperfusion by silent information regulator 1. *Trends Cardiovasc Med* **2011**, 21, (1), 27-32.
- 42. Luo, G.; Jian, Z.; Zhu, Y.; Zhu, Y.; Chen, B.; Ma, R.; Tang, F.; Xiao, Y., Sirt1 promotes autophagy and inhibits apoptosis to protect cardiomyocytes from hypoxic stress. *Int J Mol Med* **2019**, 43, (5), 2033-2043.
- 43. Prola, A.; Silva, J. P.; Guilbert, A.; Lecru, L.; Piquereau, J.; Ribeiro, M.; Mateo, P.; Gressette, M.; Fortin, D.; Boursier, C.; Gallerne, C.; Caillard, A.; Samuel, J. L.; Francois, H.; Sinclair, D. A.; Eid, P.; Ventura-Clapier, R.; Garnier, A.; Lemaire, C., SIRT1 protects the heart from ER stress-induced cell death through eIF2alpha deacetylation. *Cell death and differentiation* **2016**.
- 44. Piquereau, J.; Moulin, M.; Zurlo, G.; Mateo, P.; Gressette, M.; Paul, J. L.; Lemaire, C.; Ventura-Clapier, R.; Veksler, V.; Garnier, A., Cobalamin and folate protect mitochondrial and contractile functions in a murine model of cardiac pressure overload. *Journal of molecular and cellular cardiology* **2017**, 102, 34-44.
- 45. Sundaresan, N. R.; Pillai, V. B.; Wolfgeher, D.; Samant, S.; Vasudevan, P.; Parekh, V.; Raghuraman, H.; Cunningham, J. M.; Gupta, M.; Gupta, M. P., The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy. *Sci Signal* **2011**, *4*, (182), ra46.
- 46. Waldman, M.; Nudelman, V.; Shainberg, A.; Abraham, N. G.; Kornwoski, R.; Aravot, D.; Arad, M.; Hochhauser, E., PARP-1 inhibition protects the diabetic heart through activation of SIRT1-PGC-1alpha axis. *Exp Cell Res* **2018**, 373, (1-2), 112-118.
- 47. Geng, B.; Cai, Y.; Gao, S.; Lu, J.; Zhang, L.; Zou, J.; Liu, M.; Yu, S.; Ye, J.; Liu, P., PARP-2 knockdown protects cardiomyocytes from hypertrophy via activation of SIRT1. *Biochem Biophys Res Commun* **2013**, 430, (3), 944-50.
- 48. Shioya, T., A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. *J Physiol Sci* **2007**, 57, (6), 327-35.
- 49. Kuznetsov, A. V.; Veksler, V.; Gellerich, F. N.; Saks, V.; Margreiter, R.; Kunz, W. S., Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* **2008**, *3*, (6), 965-976.
- 50. Piquereau, J.; Godin, R.; Deschenes, S.; Bessi, V. L.; Mofarrahi, M.; Hussain, S. N.; Burelle, Y., Protective role of PARK2/Parkin in sepsis-induced cardiac contractile and mitochondrial dysfunction. *Autophagy* **2013**, *9*, (11).
- 51. Wharton, D. C.; Tzagoloff, A., Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods in Enzymology* **1967**, 10, 245-250.

52. Veksler, V. I.; Kuznetsov, A. V.; Anflous, K.; Mateo, P.; van Deursen, J.; Wieringa, B.; Ventura-Clapier, R., Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. *The Journal of biological chemistry* **1995**, 270, (34), 19921-19929.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 1. Ventura-Clapier, R., et al., *Mitochondria: a central target for sex differences in pathologies.* Clin Sci (Lond), 2017. **131**(9): p. 803-822.
- 2. Neubauer, M.S., *The Failing Heart An Engine Out of Fuel*. The New England Journal of Medicine, 2007.
- 3. Ventura-Clapier, R., et al., *Bioenergetics of the failing heart*. Biochim Biophys Acta, 2011. 1813(7): p. 1360-72.
- 4. Stanley, W.C., F.A. Recchia, and G.D. Lopaschuk, *Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart*. Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 1093-129.
- 5. Szablewski, L., *Glucose transporters in healthy heart and in cardiac disease*. Int J Cardiol, 2017. 230: p. 70-75.
- Zhou, L., et al., Human cardiomyocytes express high level of Na+/glucose cotransporter 1 (SGLT1). J Cell Biochem, 2003. 90(2): p. 339-46.
- 7. Banerjee, S.K., et al., SGLT1 is a novel cardiac glucose transporter that is perturbed in disease states. Cardiovasc Res, 2009. **84**(1): p. 111-8.
- 8. Hecketsweiler, B.H., P., Voyage en biochimie. 2012.
- Kodde, I.F., et al., Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2007. 146(1): p. 26-39.
- 10. Schwenk, R.W., et al., *Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease.* Cardiovasc Res, 2008. **79**(2): p. 249-58.
- 11. Kerner, J.H., C., Fatty acid import into mitochondria. 2000.
- 12. Lee, J.K. and K.H. Kim, Roles of acetyl-CoA carboxylase beta in muscle cell differentiation and in mitochondrial fatty acid oxidation. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 254(3): p. 657-60.
- 13. Czibik, G., et al., Citric acid cycle intermediates in cardioprotection. Circ Cardiovasc Genet, 2014. 7(5): p. 711-9.
- 14. Acin-Perez, R., et al., Respiratory active mitochondrial supercomplexes. Mol Cell, 2008. 32(4): p. 529-39.
- 15. Lapuente-Brun, E., et al., Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. Science, 2013. **340**(6140): p. 1567-70.
- 16. Frey, T.G.M., C.A., *The internal structure of mitochondria*. Trends Biochem Sci, 2000.
- 17. Baker, M.J., et al., *Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function.* Trends Cell Biol, 2007. **17**(9): p. 456-64.
- 18. Hatch, G.M., Cell biology of cardiac mitochondrial phospholipids. Biochem Cell Biol, 2004. 82(1): p. 99-112.
- 19. Chen, L.K., A. A., Mitochondrial Dynamics in Heart Failure. Congest Heart Failure, 2011.
- 20. Shokolenko, I.N. and M.F. Alexeyev, *Mitochondrial transcription in mammalian cells*. Front Biosci (Landmark Ed), 2017. 22: p. 835-853.
- Ventura-Clapier, R., A. Garnier, and V. Veksler, Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. Cardiovasc Res, 2008. 79(2): p. 208-17.
- 22. Schaeffer, P.J., et al., Calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase activate distinct metabolic gene regulatory programs in cardiac muscle. J Biol Chem, 2004. 279(38): p. 39593-603.
- 23. Akimoto, T., B.S. Sorg, and Z. Yan, Real-time imaging of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha promoter activity in skeletal muscles of living mice. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(3): p. C790-6.
- 24. Wu, Z., et al., Transducer of regulated CREB-binding proteins (TORCs) induce PGC-1alpha transcription and mitochondrial biogenesis in muscle cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(39): p. 14379-84.
- 25. Nisoli, E. and M.O. Carruba, A benefit-risk assessment of sibutramine in the management of obesity. Drug Saf, 2003. 26(14): p. 1027-48.
- 26. Momken, I., et al., Endothelial nitric oxide synthase (NOS) deficiency affects energy metabolism pattern in murine oxidative skeletal muscle. Biochem J, 2002. 368(Pt 1): p. 341-7.
- 27. Lagouge, M., et al., Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. Cell, 2006. **127**(6): p. 1109-22.
- Nisoli, E., et al., Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. Science, 2005. 310(5746): p. 314-7.
- 29. Jager, S., et al., AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(29): p. 12017-22.
- 30. Puigserver, P., et al., Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. Mol Cell, 2001. 8(5): p. 971-82.
- 31. Rodgers, J.T. and P. Puigserver, *Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(31): p. 12861-6.
- 32. Rytinki, M.M. and J.J. Palvimo, SUMOylation attenuates the function of PGC-1alpha. J Biol Chem, 2009. 284(38): p. 26184-93.
- 33. Vona, R., et al., Mitochondria and Sex-Specific Cardiac Function. Adv Exp Med Biol, 2018. 1065: p. 241-256.
- 34. Guzun, R., et al., *Modular organization of cardiac energy metabolism: energy conversion, transfer and feedback regulation.* Acta Physiol (Oxf), 2015. **213**(1): p. 84-106.
- 35. Pucar, D., et al., Cellular energetics in the preconditioned state: protective role for phosphotransfer reactions captured by 180assisted 31P NMR. J Biol Chem, 2001. 276(48): p. 44812-9.
- 36. Dzeja, P.P., et al., Rearrangement of energetic and substrate utilization networks compensate for chronic myocardial creatine kinase deficiency. J Physiol, 2011. 589(Pt 21): p. 5193-211.
- Nemutlu, E., et al., Dynamic phosphometabolomic profiling of human tissues and transgenic models by 180-assisted (3)(1)P NMR and mass spectrometry. Physiol Genomics, 2012. 44(7): p. 386-402.
- 38. Hansford, R.G., Role of calcium in respiratory control. Med Sci Sports Exerc, 1994. 26(1): p. 44-51.
- 39. Balaban, R.S., *Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium.* J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(10): p. 1259-71.

- 40. Brandes, R. and D.M. Bers, Intracellular Ca2+ increases the mitochondrial NADH concentration during elevated work in intact cardiac muscle. Circ Res, 1997. **80**(1): p. 82-7.
- 41. Weiss, J.N. and P. Korge, The cytoplasm: no longer a well-mixed bag. Circ Res, 2001. 89(2): p. 108-10.
- 42. Weiss, J. and B. Hiltbrand, *Functional compartmentation of glycolytic versus oxidative metabolism in isolated rabbit heart.* J Clin Invest, 1985. **75**(2): p. 436-47.
- 43. Saks, V.A., Y.O. Belikova, and A.V. Kuznetsov, *In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP.* Biochim Biophys Acta, 1991. **1074**(2): p. 302-11.
- 44. Saks, V.A., et al., Functional coupling as a basic mechanism of feedback regulation of cardiac energy metabolism. Mol Cell Biochem, 2004. **256-257**(1-2): p. 185-99.
- 45. Guzun, R. and V. Saks, Application of the principles of systems biology and Wiener's cybernetics for analysis of regulation of energy fluxes in muscle cells in vivo. Int J Mol Sci, 2010. **11**(3): p. 982-1019.
- 46. Tanai, E. and S. Frantz, *Pathophysiology of Heart Failure*. Compr Physiol, 2015. 6(1): p. 187-214.
- 47. Mosterd, A. and A.W. Hoes, Clinical epidemiology of heart failure. Heart, 2007. 93(9): p. 1137-46.
- 48. Wu, Q.Q., et al., *Mechanisms contributing to cardiac remodelling*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(18): p. 2319-2345.
- 49. Swynghedauw, B., *Molecular mechanisms of myocardial remodeling.* Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 215-62.
- 50. Swynghedauw, B., Phenotypic plasticity of adult myocardium: molecular mechanisms. J Exp Biol, 2006. 209(Pt 12): p. 2320-7.
- 51. Lompre, A.M., Sarcoplasmic reticulum in vascular cells in hypertension and during proliferation. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999. 26(7): p. 553-7.
- 52. Hayakawa, T., et al., Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: distinct molecular domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 16): p. 3327-38.
- 53. Olivetti, G., et al., Apoptosis in the failing human heart. N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1131-41.
- 54. Kong, P., P. Christia, and N.G. Frangogiannis, *The pathogenesis of cardiac fibrosis*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(4): p. 549-74.
- 55. Eddy, A.A., Progression in chronic kidney disease. Adv Chronic Kidney Dis, 2005. 12(4): p. 353-65.
- 56. Lee, A.A., et al., Angiotensin II stimulates the autocrine production of transforming growth factor-beta 1 in adult rat cardiac fibroblasts. J Mol Cell Cardiol, 1995. 27(10): p. 2347-57.
- 57. Campbell, S.E. and L.C. Katwa, Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(7): p. 1947-58.
- 58. Kim, S., et al., Angiotensin II type I receptor antagonist inhibits the gene expression of transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats. J Pharmacol Exp Ther, 1995. **273**(1): p. 509-15.
- 59. Hao, J., et al., *Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing.* J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(3): p. 667-78.
- 60. Kulkarni, A.B. and S. Karlsson, *Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease.* Am J Pathol, 1993. **143**(1): p. 3-9.
- 61. Bottinger, E.P., J.J. Letterio, and A.B. Roberts, *Biology of TGF-beta in knockout and transgenic mouse models*. Kidney Int, 1997. **51**(5): p. 1355-60.
- 62. Chen, M.M., et al., CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(10): p. 1805-19.
- 63. Koitabashi, N., et al., Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis. Hypertension, 2007. **49**(5): p. 1120-7.
- 64. Morikawa, H., et al., *Expression of connective tissue growth factor in the human liver with idiopathic portal hypertension*. Mol Med, 2007. **13**(5-6): p. 240-5.
- 65. Watsky, M.A., et al., *New insights into the mechanism of fibroblast to myofibroblast transformation and associated pathologies.* Int Rev Cell Mol Biol, 2010. **282**: p. 165-92.
- 66. Daniels, A., et al., Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. Acta Physiol (Oxf), 2009. 195(3): p. 321-38.
- 67. Wang, H. and J. Cai, The role of microRNAs in heart failure. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017. 1863(8): p. 2019-2030.
- 68. Abonnenc, M., et al., Extracellular matrix secretion by cardiac fibroblasts: role of microRNA-29b and microRNA-30c. Circ Res, 2013. 113(10): p. 1138-47.
- 69. Zhang, Y., et al., *miR-29b as a therapeutic agent for angiotensin II-induced cardiac fibrosis by targeting TGF-beta/Smad3 signaling*. Mol Ther, 2014. **22**(5): p. 974-85.
- 70. Liu, N., et al., microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. Genes Dev, 2008. 22(23): p. 3242-54.
- 71. Matkovich, S.J., et al., MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts. Circ Res, 2010. **106**(1): p. 166-75.
- 72. Shan, H., et al., Downregulation of miR-133 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodelling in canines. Cardiovasc Res, 2009. 83(3): p. 465-72.
- 73. Castoldi, G., et al., *MiR-133a regulates collagen 1A1: potential role of miR-133a in myocardial fibrosis in angiotensin II-dependent hypertension.* J Cell Physiol, 2012. **227**(2): p. 850-6.
- 74. Wei, C., et al., NF-kappaB mediated miR-26a regulation in cardiac fibrosis. J Cell Physiol, 2013. 228(7): p. 1433-42.
- 75. Qi, X.Y., et al., *Fibroblast inward-rectifier potassium current upregulation in profibrillatory atrial remodeling.* Circ Res, 2015. **116**(5): p. 836-45.
- 76. Zou, M., et al., Autophagy inhibition of hsa-miR-19a-3p/19b-3p by targeting TGF-beta R II during TGF-beta1-induced fibrogenesis in human cardiac fibroblasts. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24747.
- 77. Wang, J., et al., *MicroRNA-24 regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction.* J Cell Mol Med, 2012. **16**(9): p. 2150-60.
- 78. Pan, Z., et al., MicroRNA-101 inhibited postinfarct cardiac fibrosis and improved left ventricular compliance via the FBJ osteosarcoma oncogene/transforming growth factor-beta1 pathway. Circulation, 2012. 126(7): p. 840-50.
- 79. Zhao, X., et al., *MicroRNA-101a inhibits cardiac fibrosis induced by hypoxia via targeting TGFbetaRI on cardiac fibroblasts.* Cell Physiol Biochem, 2015. **35**(1): p. 213-26.

- 80. Thum, T., et al., *MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts.* Nature, 2008. **456**(7224): p. 980-4.
- 81. Patrick, D.M., et al., Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. J Clin Invest, 2010. **120**(11): p. 3912-6.
- 82. Tham, Y.K., et al., *Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets.* Arch Toxicol, 2015. **89**(9): p. 1401-38.
- 83. Kawase, Y., et al., Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(11): p. 1112-9.
- 84. Bers, D.M., Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. Annu Rev Physiol, 2014. **76**: p. 107-27.
- 85. Ibrahim, M., et al., *The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease.* Proc Biol Sci, 2011. **278**(1719): p. 2714-23.
- 86. Murdoch, C.E., et al., NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 208-15.
- 87. Laskowski, A., et al., Antioxidant actions contribute to the antihypertrophic effects of atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiomyocytes. Cardiovasc Res, 2006. 72(1): p. 112-23.
- Takimoto, E. and D.A. Kass, *Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling.* Hypertension, 2007. 49(2): p. 241-8.
- 89. Dai, D.F., et al., Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpressioninduced heart failure. Circ Res, 2011. **108**(7): p. 837-46.
- 90. Aker, S.B., S.; Konietzka, I.; Duschin, A.; Martin, C.; Heusch, G.; Schulz, R.;, Serum but not myocardial TNF-a concentration is increased in pacing-induced heart failure in rabbits. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003.
- 91. Marin-Garcia, J., M.J. Goldenthal, and G.W. Moe, *Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure*. Cardiovasc Res, 2001. **52**(1): p. 103-10.
- 92. Gullestad, L., et al., Effect of high-versus low-dose angiotensin converting enzyme inhibition on cytokine levels in chronic heart failure. J Am Coll Cardiol, 1999. **34**(7): p. 2061-7.
- 93. Petretta, M., et al., *Circulating levels of cytokines and their site of production in patients with mild to severe chronic heart failure.* Am Heart J, 2000. **140**(6): p. E28.
- 94. Mann, D.L., The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. Circ Res, 2011. **108**(9): p. 1133-45.
- 95. izumiya, Y., et al., Vascular endothelial growth factor blockade promotes the transition from compensatory cardiac hypertrophy to failure in response to pressure overload. Hypertension, 2006. **47**(5): p. 887-93.
- 96. Friehs, I., et al., Vascular endothelial growth factor delays onset of failure in pressure-overload hypertrophy through matrix metalloproteinase activation and angiogenesis. Basic Res Cardiol, 2006. **101**(3): p. 204-13.
- 97. Lee, S.P., et al., Association of myocardial angiogenesis with structural and functional ventricular remodeling in aortic stenosis patients with normal ejection fraction. J Cardiovasc Ultrasound, 2014. **22**(2): p. 72-9.
- 98. Rengo, G., et al., Vascular endothelial growth factor blockade prevents the beneficial effects of beta-blocker therapy on cardiac function, angiogenesis, and remodeling in heart failure. Circ Heart Fail, 2013. **6**(6): p. 1259-67.
- 99. Neubauer, S., et al., 31P magnetic resonance spectroscopy in dilated cardiomyopathy and coronary artery disease. Altered cardiac high-energy phosphate metabolism in heart failure. Circulation, 1992. **86**(6): p. 1810-8.
- 100. Hardy, C.J., et al., *Altered myocardial high-energy phosphate metabolites in patients with dilated cardiomyopathy.* Am Heart J, 1991. **122**(3 Pt 1): p. 795-801.
- 101. Beer, M., et al., Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with 31P-SLOOP magnetic resonance spectroscopy. Journal of the American College of Cardiology, 2002. **40**(7): p. 1267-1274.
- 102. Rimbaud, S., et al., *Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2009. **46**(6): p. 952-959.
- 103. Stanley, S., et al., Hormonal regulation of food intake. Physiol Rev, 2005. 85(4): p. 1131-58.
- 104. van Bilsen, M., "Energenetics" of heart failure. Ann N Y Acad Sci, 2004. 1015: p. 238-49.
- 105. Krishnan, J., et al., Activation of a HIF1alpha-PPARgamma axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. Cell Metab, 2009. **9**(6): p. 512-24.
- 106. Opie, L.H. and J. Knuuti, The adrenergic-fatty acid load in heart failure. J Am Coll Cardiol, 2009. 54(18): p. 1637-46.
- 107. Sharma, N., et al., Regulation of pyruvate dehydrogenase activity and citric acid cycle intermediates during high cardiac power generation. J Physiol, 2005. 562(Pt 2): p. 593-603.
- 108. Wende, A.R. and E.D. Abel, *Lipotoxicity in the heart*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(3): p. 311-9.
- 109. Goldberg, I.J., C.M. Trent, and P.C. Schulze, Lipid metabolism and toxicity in the heart. Cell Metab, 2012. 15(6): p. 805-12.
- 110. Lei, B., et al., *Paradoxical downregulation of the glucose oxidation pathway despite enhanced flux in severe heart failure.* J Mol Cell Cardiol, 2004. **36**(4): p. 567-576.
- 111. Leong, H.S., et al., *Glycolysis and pyruvate oxidation in cardiac hypertrophy—Why so unbalanced?* Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2003. **135**(4): p. 499-513.
- 112. Taegtmeyer, H., Switching Metabolic Genes to Build a Better Heart. Circulation, 2002. 106(16): p. 2043-2045.
- 113. Ide, T., et al., *Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction.* Circ Res, 2001. **88**(5): p. 529-35.
- 114. De Sousa, E., et al., Subcellular creatine kinase alterations. Implications in heart failure. Circ Res, 1999. 85(1): p. 68-76.
- 115. Garnier, A., et al., Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. J Physiol, 2003. **551**(Pt 2): p. 491-501.

- 116. Garnier, A., et al., Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle. FASEB J, 2005. **19**(1): p. 43-52.
- 117. Garnier, A., et al., Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II. Circ Heart Fail, 2009. **2**(4): p. 342-50.
- 118. Jarreta, D., et al., *Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.* Cardiovasc Res, 2000. **45**(4): p. 860-5.
- 119. Liu, J., et al., *Mitochondrial ATPase and high-energy phosphates in failing hearts.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(3): p. H1319-26.
- 120. Quigley, A.F., et al., *Mitochondrial respiratory chain activity in idiopathic dilated cardiomyopathy.* J Card Fail, 2000. **6**(1): p. 47-55.
- 121. Cieniewski-Bernard, C., et al., Proteomic analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart failure. J Proteome Res, 2008. 7(11): p. 5004-16.
- 122. Heinke, M.Y., et al., *Changes in myocardial protein expression in pacing-induced canine heart failure.* Electrophoresis, 1999. **20**(10): p. 2086-93.
- 123. Murray, A.J., et al., Increased mitochondrial uncoupling proteins, respiratory uncoupling and decreased efficiency in the chronically infarcted rat heart. J Mol Cell Cardiol, 2008. 44(4): p. 694-700.
- 124. Di Lisa, F. and P. Bernardi, A CaPful of mechanisms regulating the mitochondrial permeability transition. J Mol Cell Cardiol, 2009. 46(6): p. 775-80.
- 125. Sharov, V.G., et al., Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(12): p. 2361-7.
- Nascimben, L., et al., *Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium*. Circulation, 1996. 94(8): p. 1894-901.
 Weiss, R.G., *ATP flux through creatine kinase in the normal, stressed, and failing human heart*. PNAS, 2005.
- 128. Sun, C.K., et al., Losartan preserves integrity of cardiac gap junctions and PGC-1 alpha gene expression and prevents cellular apoptosis in remote area of left ventricular myocardium following acute myocardial infarction. Int Heart J, 2007. 48(4): p. 533-46.
- Sihag, S., et al., PGC-1alpha and ERRalpha target gene downregulation is a signature of the failing human heart. J Mol Cell Cardiol, 2009. 46(2): p. 201-12.
- 130. Sebastiani, M., et al., Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(14): p. 1362-9.
- 131. Dhalla, N.S., et al., *Effects of some L-carnitine derivatives on heart membrane ATPases.* Cardiovasc Drugs Ther, 1991. **5 Suppl** 1: p. 25-30.
- 132. Kloner, R.A., No reflow revisited. J Am Coll Cardiol, 1989. 14(7): p. 1814-5.
- 133. Paradies, G., et al., *Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion.* Free Radic Biol Med, 1999. **27**(1-2): p. 42-50.

134. Paradies, G., et al., Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. Circ Res, 2004. **94**(1): p. 53-9.

- 135. Petrosillo, G., et al., Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. FASEB J, 2003. **17**(6): p. 714-6.
- 136. Kagan, V.E., et al., Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. Nat Chem Biol, 2005. 1(4): p. 223-32.
- 137. Saini-Chohan, H.K., et al., Cardiolipin biosynthesis and remodeling enzymes are altered during development of heart failure. J Lipid Res, 2009. **50**(8): p. 1600-8.
- 138. Moulin, M., et al., Sex-specific cardiac cardiolipin remodelling after doxorubicin treatment. Biol Sex Differ, 2015. 6: p. 20.
- 139. Mileykovskaya, E. and W. Dowhan, *Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes.* Chem Phys Lipids, 2014. **179**: p. 42-8.
- 140. Fry, M., Clearing up a complaint. Health Soc Serv J, 1981. 91(4741): p. 503-4.
- 141. Fry, M. and D.E. Green, Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. J Biol Chem, 1981. 256(4): p. 1874-80.
- 142. Zhang, M., E. Mileykovskaya, and W. Dowhan, Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29403-8.
- 143. Gohil, V.M., et al., *Cardiolipin biosynthesis and mitochondrial respiratory chain function are interdependent.* J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42612-8.
- 144. Ranieri, A., et al., Immobilized cytochrome c bound to cardiolipin exhibits peculiar oxidation state-dependent axial heme ligation and catalytically reduces dioxygen. J Biol Inorg Chem, 2015. **20**(3): p. 531-40.
- 145. Gebert, N., et al., *Mitochondrial cardiolipin involved in outer-membrane protein biogenesis: implications for Barth syndrome*. Curr Biol, 2009. **19**(24): p. 2133-9.
- 146. Rouzes, C., et al., Surface modification of poly(lactic acid) nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in an o/w emulsion/evaporation technique. J Biomed Mater Res, 2000. **50**(4): p. 557-65.
- 147. Regitz-Zagrosek, V. and G. Kararigas, *Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease*. Physiol Rev, 2017. **97**(1): p. 1-37.
- 148. Berger, J.S., et al., Sex differences in mortality following acute coronary syndromes. JAMA, 2009. 302(8): p. 874-82.
- 149. Thygesen, K., et al., *Third universal definition of myocardial infarction*. Circulation, 2012. **126**(16): p. 2020-35.
- 150. Salama, G. and G.C. Bett, Sex differences in the mechanisms underlying long QT syndrome. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014. **307**(5): p. H640-8.
- 151. Pham, T.V., et al., Impact of sex and gonadal steroids on prolongation of ventricular repolarization and arrhythmias induced by *I(K)*-blocking drugs. Circulation, 2001. **103**(17): p. 2207-12.
- 152. Zhang, Y., et al., Sex-steroid hormones and electrocardiographic QT-interval duration: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey and the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. Am J Epidemiol, 2011. **174**(4): p. 403-11.

- 153. Nwankwo, T., et al., Hypertension among adults in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey, 2011-2012. NCHS Data Brief, 2013(133): p. 1-8.
- 154. Aurigemma, G.P., et al., Impact of chamber geometry and gender on left ventricular systolic function in patients > 60 years of age with aortic stenosis. Am J Cardiol, 1994. **74**(8): p. 794-8.
- 155. Cramariuc, D., et al., Factors influencing left ventricular structure and stress-corrected systolic function in men and women with asymptomatic aortic valve stenosis (a SEAS Substudy). Am J Cardiol, 2008. **101**(4): p. 510-5.
- 156. Cramariuc, D., et al., Sex differences in cardiovascular outcome during progression of aortic valve stenosis. Heart, 2015. **101**(3): p. 209-14.
- 157. Douglas, P.S., et al., *Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload.* J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(4): p. 1118-25.
- 158. Villari, B., et al., Sex-dependent differences in left ventricular function and structure in chronic pressure overload. Eur Heart J, 1995. **16**(10): p. 1410-9.
- 159. Cleland, J.G., et al., *The EuroHeart Failure survey programme-- a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis.* Eur Heart J, 2003. **24**(5): p. 442-63.
- 160. Levy, D., et al., Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. N Engl J Med, 2002. 347(18): p. 1397-402.
- 161. Martinez-Selles, M., et al., Gender and survival in patients with heart failure: interactions with diabetes and aetiology. Results from the MAGGIC individual patient meta-analysis. Eur J Heart Fail, 2012. **14**(5): p. 473-9.
- 162. De Bellis, A., et al., Gender-related differences in heart failure: beyond the "one-size-fits-all" paradigm. Heart Fail Rev, 2019.
- 163. Moulin, M., et al., Sexual dimorphism of doxorubicin-mediated cardiotoxicity: potential role of energy metabolism remodeling. Circ Heart Fail, 2015. 8(1): p. 98-108.
- 164. Charchar, F.J., et al., Y is there a risk to being male? Trends Endocrinol Metab, 2003. 14(4): p. 163-8.
- 165. Charchar, F.J., et al., Association of the human Y chromosome with cholesterol levels in the general population. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. 24(2): p. 308-12.
- 166. Charchar, F.J., et al., Inheritance of coronary artery disease in men: an analysis of the role of the Y chromosome. Lancet, 2012. 379(9819): p. 915-922.
- 167. Shungin, D., et al., New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution. Nature, 2015. 518(7538): p. 187-196.
- 168. Isensee, J., et al., Sexually dimorphic gene expression in the heart of mice and men. J Mol Med (Berl), 2008. 86(1): p. 61-74.
- 169. Boheler, K.R., Sex- and age-dependent human transcriptome

variability: Implications for chronic heart failure. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003.

- 170. Fermin, D.R., et al., Sex and age dimorphism of myocardial gene expression in nonischemic human heart failure. Circ Cardiovasc Genet, 2008. 1(2): p. 117-25.
- 171. Haddad, G.E., et al., *Human cardiac-specific cDNA array for idiopathic dilated cardiomyopathy: sex-related differences.* Physiol Genomics, 2008. **33**(2): p. 267-77.
- 172. Heidecker, B., et al., The gene expression profile of patients with new-onset heart failure reveals important gender-specific differences. Eur Heart J, 2010. **31**(10): p. 1188-96.
- 173. Kararigas, G., et al., Sex-dependent regulation of fibrosis and inflammation in human left ventricular remodelling under pressure overload. Eur J Heart Fail, 2014. **16**(11): p. 1160-7.
- 174. Fliegner, D., et al., *Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **298**(6): p. R1597-606.
- 175. Kararigas, G., et al., *Comparative proteomic analysis reveals sex and estrogen receptor beta effects in the pressure overloaded heart.* J Proteome Res, 2014. **13**(12): p. 5829-36.
- 176. Kararigas, G., et al., Role of the estrogen/estrogen-receptor-beta axis in the genomic response to pressure overload-induced hypertrophy. Physiol Genomics, 2011. **43**(8): p. 438-46.
- 177. Weinberg, E.O., Sex dependence and temporal dependence of the left ventricular genomic response to pressure overload. Physiol Genomics, 2002.
- 178. Witt, H., et al., Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice. J Mol Med (Berl), 2008. 86(9): p. 1013-24.
- 179. Diedrich, M., et al., Heart protein expression related to age and sex in mice and humans. Int J Mol Med, 2007. 20(6): p. 865-74.
- 180. Kaneda, R., et al., Genome-wide histone methylation profile for heart failure. Genes Cells, 2009. 14(1): p. 69-77.
- 181. Trivedi, C.M., et al., *Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3 beta activity.* Nat Med, 2007. **13**(3): p. 324-31.
- 182. Zhang, C.L., et al., Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. Cell, 2002. 110(4): p. 479-88.
- 183. Queiros, A.M., et al., Sex- and estrogen-dependent regulation of a miRNA network in the healthy and hypertrophied heart. Int J Cardiol, 2013. **169**(5): p. 331-8.
- 184. Sanchez-Ruderisch, H., et al., Sex-specific regulation of cardiac microRNAs targeting mitochondrial proteins in pressure overload. Biol Sex Differ, 2019. **10**(1): p. 8.
- 185. Blouin, K., et al., Androgen inactivation and steroid-converting enzyme expression in abdominal adipose tissue in men. J Endocrinol, 2006. **191**(3): p. 637-49.
- 186. Miller, W.L. and R.J. Auchus, *The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders.* Endocr Rev, 2011. **32**(1): p. 81-151.
- 187. Ahtiainen, J.P., et al., Heavy resistance exercise training and skeletal muscle androgen receptor expression in younger and older men. Steroids, 2011. 76(1-2): p. 183-92.
- 188. Dart, D.A., et al., Visualising androgen receptor activity in male and female mice. PLoS One, 2013. 8(8): p. e71694.
- 189. Marsh, J.D., et al., Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. Circulation, 1998. 98(3): p. 256-61.
- Azzouni, F. and J. Mohler, Role of 5alpha-reductase inhibitors in prostate cancer prevention and treatment. Urology, 2012. 79(6): p. 1197-205.

- Stoner, E., The clinical development of a 5 alpha-reductase inhibitor, finasteride. J Steroid Biochem Mol Biol, 1990. 37(3): p. 375-8.
- 192. Yamana, K., F. Labrie, and V. Luu-The, Human type 3 5alpha-reductase is expressed in peripheral tissues at higher levels than types 1 and 2 and its activity is potently inhibited by finasteride and dutasteride. Horm Mol Biol Clin Investig, 2010. 2(3): p. 293-9.
- 193. Mahendroo, M.S., et al., Unexpected virilization in male mice lacking steroid 5 alpha-reductase enzymes. Endocrinology, 2001. **142**(11): p. 4652-62.
- 194. Windahl, S.H., et al., *Reduced bone mass and muscle strength in male 5alpha-reductase type 1 inactivated mice.* PLoS One, 2011. **6**(6): p. e21402.
- 195. Thum, T. and J. Borlak, Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. FASEB J, 2002. 16(12): p. 1537-49.
- 196. Malkin, C.J., et al., Testosterone therapy in men with moderate severity heart failure: a double-blind randomized placebo controlled trial. Eur Heart J, 2006. 27(1): p. 57-64.
- 197. Oskui, P.M., et al., Testosterone and the cardiovascular system: a comprehensive review of the clinical literature. J Am Heart Assoc, 2013. **2**(6): p. e000272.
- 198. Toma, M., et al., Testosterone supplementation in heart failure: a meta-analysis. Circ Heart Fail, 2012. 5(3): p. 315-21.
- 199. Baggish, A.L., et al., Long-term anabolic-androgenic steroid use is associated with left ventricular dysfunction. Circ Heart Fail, 2010. **3**(4): p. 472-6.
- 200. Borst, S.E., et al., Musculoskeletal and prostate effects of combined testosterone and finasteride administration in older hypogonadal men: a randomized, controlled trial. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014. **306**(4): p. E433-42.
- 201. Konhilas, J.P. and L.A. Leinwand, *The effects of biological sex and diet on the development of heart failure*. Circulation, 2007. **116**(23): p. 2747-59.
- 202. Arnal, J.F., et al., Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. Physiol Rev, 2017. 97(3): p. 1045-1087.
- 203. Gruber, C.J., et al., Production and actions of estrogens. N Engl J Med, 2002. 346(5): p. 340-52.
- 204. Stocco, C., *Tissue physiology and pathology of aromatase*. Steroids, 2012. **77**(1-2): p. 27-35.
- 205. Bell, J.R., et al., Aromatase deficiency confers paradoxical postischemic cardioprotection. Endocrinology, 2011. **152**(12): p. 4937-47.
- 206. Walter, P., et al., Cloning of the human estrogen receptor cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(23): p. 7889-93.
- 207. Kuiper, G.G., et al., Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(12): p. 5925-30.
- 208. Schuit, S.C., et al., *Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with estradiol levels in postmenopausal women.* Eur J Endocrinol, 2005. **153**(2): p. 327-34.
- 209. Shearman, A.M., et al., Estrogen receptor alpha gene variation is associated with risk of myocardial infarction in more than seven thousand men from five cohorts. Circ Res, 2006. 98(5): p. 590-2.
- 210. Peter, I., et al., Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with left ventricular mass and wall thickness in women. Am J Hypertens, 2005. **18**(11): p. 1388-95.
- 211. Lind, J.M., et al., Sex hormone receptor gene variation associated with phenotype in male hypertrophic cardiomyopathy patients. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(2): p. 217-22.
- 212. Grohe, C., et al., Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. FEBS Lett, 1997. 416(1): p. 107-12.
- 213. Karas, R.H., B.L. Patterson, and M.E. Mendelsohn, *Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor.* Circulation, 1994. **89**(5): p. 1943-50.
- 214. Kim-Schulze, S., et al., *Expression of an estrogen receptor by human coronary artery and umbilical vein endothelial cells.* Circulation, 1996. **94**(6): p. 1402-7.
- 215. Losordo, D.W., et al., Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. Circulation, 1994. 89(4): p. 1501-10.
- 216. Meyer, R., et al., *Rapid modulation of L-type calcium current by acutely applied oestrogens in isolated cardiac myocytes from human, guinea-pig and rat.* Exp Physiol, 1998. **83**(3): p. 305-21.
- 217. Venkov, C.D., A.B. Rankin, and D.E. Vaughan, *Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function.* Circulation, 1996. **94**(4): p. 727-33.
- 218. Nordmeyer, J., et al., Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. Circulation, 2004. **110**(20): p. 3270-5.
- 219. Chen, J.Q., et al., *Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **286**(6): p. E1011-22.
- 220. Yang, S.H., L. Prokai, and J.W. Simpkins, *Correspondence regarding Schwend and Gustafsson, "False positives in MALDI-TOF detection of ERbeta in mitochondria"*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(3): p. 917-8.
- 221. Mahmoodzadeh, S., et al., *Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure*. FASEB J, 2006. **20**(7): p. 926-34.
- 222. Mahmoodzadeh, S., et al., Nuclear factor-kappaB regulates estrogen receptor-alpha transcription in the human heart. J Biol Chem, 2009. **284**(37): p. 24705-14.
- 223. Mahmoodzadeh, S., et al., 17beta-Estradiol-induced interaction of ERalpha with NPPA regulates gene expression in cardiomyocytes. Cardiovasc Res, 2012. 96(3): p. 411-21.
- 224. Adams, W., The Normal Duration of the Electrocardiographic Ventricular Complex. J Clin Invest, 1936. 15(4): p. 335-42.
- 225. Merri, M., et al., *Electrocardiographic quantitation of ventricular repolarization*. Circulation, 1989. **80**(5): p. 1301-8.
- 226. Rautaharju, P.M., et al., Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. Can J Cardiol, 1992. 8(7): p. 690-5.
- 227. Drici, M.D., et al., Cardiac actions of erythromycin: influence of female sex. JAMA, 1998. 280(20): p. 1774-6.
- 228. Lehmann, M.H., et al., JTc prolongation with d, I-sotalol in women versus men. Am J Cardiol, 1999. 83(3): p. 354-9.
- 229. Reinoehl, J., et al., *Probucol-associated tachyarrhythmic events and QT prolongation: importance of gender.* Am Heart J, 1996. **131**(6): p. 1184-91.
- Buxton, A.E., et al., A randomized study of the prevention of sudden death in patients with coronary artery disease. Multicenter Unsustained Tachycardia Trial Investigators. N Engl J Med, 1999. 341(25): p. 1882-90.
- 231. Kannel, W.B., et al., Sudden coronary death in women. Am Heart J, 1998. 136(2): p. 205-12.
- 232. Chen, J., et al., *Gender differences in sarcoplasmic reticulum calcium loading after isoproterenol.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(6): p. H2657-62.
- Vizgirda, V.M., et al., Mechanisms of sex differences in rat cardiac myocyte response to beta-adrenergic stimulation. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. 282(1): p. H256-63.
- 234. Parks, R.J., et al., Sex differences in SR Ca(2+) release in murine ventricular myocytes are regulated by the cAMP/PKA pathway. J Mol Cell Cardiol, 2014. **75**: p. 162-73.
- 235. Curl, C.L., et al., *Effects of ovariectomy and 17 beta-oestradiol replacement on [Ca2+]i in female rat cardiac myocytes.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003. **30**(7): p. 489-94.
- 236. Fares, E., et al., Ovariectomy enhances SR Ca(2)(+) release and increases Ca(2)(+) spark amplitudes in isolated ventricular myocytes. J Mol Cell Cardiol, 2012. 52(1): p. 32-42.
- 237. Ma, Y., et al., Oestrogen confers cardioprotection by suppressing Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. Br J Pharmacol, 2009. **157**(5): p. 705-15.
- Sun, J., et al., Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca2+ channel alpha1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury. Circ Res, 2006. 98(3): p. 403-11.
- 239. Chu, S.H., et al., Effect of estrogen on calcium-handling proteins, beta-adrenergic receptors, and function in rat heart. Life Sci, 2006. **79**(13): p. 1257-67.
- 240. Nuedling, S., et al., 17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 666-74.
- 241. Thawornkaiwong, A., J. Pantharanontaga, and J. Wattanapermpool, *Hypersensitivity of myofilament response to Ca2+ in association with maladaptation of estrogen-deficient heart under diabetes complication.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(2): p. R844-51.
- 242. Wattanapermpool, J., T. Riabroy, and S. Preawnim, *Estrogen supplement prevents the calcium hypersensitivity of cardiac myofilaments in ovariectomized rats.* Life Sci, 2000. **66**(6): p. 533-43.
- 243. Johnson, M.S., R.L. Moore, and D.A. Brown, Sex differences in myocardial infarct size are abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in rat. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. 290(6): p. H2644-47.
- 244. Shimoni, Y. and X.F. Liu, Sex differences in the modulation of K+ currents in diabetic rat cardiac myocytes. J Physiol, 2003. 550(Pt 2): p. 401-12.
- 245. Wang, Y., et al., Protective effects of estrogen against reperfusion arrhythmias following severe myocardial ischemia in rats. Circ J, 2010. **74**(4): p. 634-43.
- 246. Borras, C., et al., *Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males.* Free Radic Biol Med, 2003. **34**(5): p. 546-52.
- 247. Vina, J., et al., *Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males.* Antioxid Redox Signal, 2003. **5**(5): p. 549-56.
- 248. Lagranha, C.J., et al., Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. Circ Res, 2010. 106(11): p. 1681-91.
- 249. Sbert-Roig, M., et al., GPER mediates the effects of 17beta-estradiol in cardiac mitochondrial biogenesis and function. Mol Cell Endocrinol, 2016. **420**: p. 116-24.
- 250. Liu, H., et al., *Mitochondrial p38beta and manganese superoxide dismutase interaction mediated by estrogen in cardiomyocytes.* PLoS One, 2014. **9**(1): p. e85272.
- 251. Zhang, L., S. Fujii, and H. Kosaka, Effect of oestrogen on reactive oxygen species production in the aortas of ovariectomized Dahl salt-sensitive rats. J Hypertens, 2007. 25(2): p. 407-14.
- 252. Ribeiro, R.F., Jr., et al., Sex differences in the regulation of spatially distinct cardiac mitochondrial subpopulations. Mol Cell Biochem, 2016. **419**(1-2): p. 41-51.
- 253. Milerova, M., et al., Sex difference in the sensitivity of cardiac mitochondrial permeability transition pore to calcium load. Mol Cell Biochem, 2016. **412**(1-2): p. 147-54.
- 254. Arieli, Y., et al., Gender modulation of Ca(2+) uptake in cardiac mitochondria. J Mol Cell Cardiol, 2004. 37(2): p. 507-13.
- Morkuniene, R., A. Jekabsone, and V. Borutaite, *Estrogens prevent calcium-induced release of cytochrome c from heart mitochondria*. FEBS Lett, 2002. 521(1-3): p. 53-6.
- 256. Tretter, L. and V. Adam-Vizi, Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005. **360**(1464): p. 2335-45.
- 257. Rakhilin, S.V., et al., A network of control mediated by regulator of calcium/calmodulin-dependent signaling. Science, 2004. **306**(5696): p. 698-701.
- 258. Tahara, É.B., et al., *Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in Saccharomyces cerevisiae aging.* FASEB J, 2007. **21**(1): p. 274-83.
- 259. Mayer, F.Q., et al., Effects of cryopreservation and hypothermic storage on cell viability and enzyme activity in recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase. Artif Organs, 2010. **34**(5): p. 434-9.
- 260. Colom, B., et al., Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H2O2 production and oxidative damage. Cardiovasc Res, 2007. **74**(3): p. 456-65.
- 261. Essop, M.F., W.Y. Chan, and H. Taegtmeyer, *Metabolic gene switching in the murine female heart parallels enhanced mitochondrial respiratory function in response to oxidative stress.* FEBS J, 2007. **274**(20): p. 5278-84.
- 262. Zhai, P., et al., Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-alpha knockout and wild-type mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(5): p. H1640-7.

- 263. Zhai, P., et al., *Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(6): p. H2766-75.
- 264. Irwin, R.W., et al., Selective oestrogen receptor modulators differentially potentiate brain mitochondrial function. J Neuroendocrinol, 2012. 24(1): p. 236-48.
- 265. Rettberg, J.R., J. Yao, and R.D. Brinton, *Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body*. Front Neuroendocrinol, 2014. **35**(1): p. 8-30.
- 266. Lin, J., et al., *Estrogen receptor-beta activation results in S-nitrosylation of proteins involved in cardioprotection.* Circulation, 2009. **120**(3): p. 245-54.
- 267. Chen, J.Q., et al., Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(10): p. 1540-70.
- 268. Yang, S.H., et al., Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(12): p. 4130-5.
- 269. Mattingly, K.A., et al., *Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis.* Mol Endocrinol, 2008. **22**(3): p. 609-22.
- 270. Fernandez-Vizarra, E., et al., *Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis*. Mitochondrion, 2011. **11**(1): p. 207-13.
- 271. Koricanac, G., et al., Estradiol enhances effects of fructose rich diet on cardiac fatty acid transporter CD36 and triglycerides accumulation. Eur J Pharmacol, 2012. 694(1-3): p. 127-34.
- 272. Tepavcevic, S., et al., Interaction between insulin and estradiol in regulation of cardiac glucose and free fatty acid transporters. Horm Metab Res, 2011. **43**(8): p. 524-30.
- Jensen, M.D., et al., Effects of estrogen on free fatty acid metabolism in humans. Am J Physiol, 1994. 266(6 Pt 1): p. E914-20.
- 274. Mendelsohn, M.E. and R.H. Karas, *The protective effects of estrogen on the cardiovascular system*. N Engl J Med, 1999. **340**(23): p. 1801-11.
- 275. Wakatsuki, A., Y. Okatani, and N. Ikenoue, *Effects of combination therapy with estrogen plus simvastatin on lipoprotein metabolism in postmenopausal women with type IIa hypercholesterolemia.* Atherosclerosis, 2000. **150**(1): p. 103-11.
- 276. Langfort, J., et al., *Testosterone affects hormone-sensitive lipase (HSL) activity and lipid metabolism in the left ventricle.* Biochem Biophys Res Commun, 2010. **399**(4): p. 670-6.
- 277. Peterson, L.R., et al., Impact of gender on the myocardial metabolic response to obesity. JACC Cardiovasc Imaging, 2008. 1(4): p. 424-33.
- 278. Foryst-Ludwig, A., et al., Sex differences in physiological cardiac hypertrophy are associated with exercise-mediated changes in energy substrate availability. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(1): p. H115-22.
- 279. Guerra, S., et al., Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. Circ Res, 1999. 85(9): p. 856-66.
- 280. Biondi-Zoccai, G.G., et al., *Reduced post-infarction myocardial apoptosis in women: a clue to their different clinical course?* Heart, 2005. **91**(1): p. 99-101.
- Gabel, S.A., et al., Estrogen receptor beta mediates gender differences in ischemia/reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol, 2005. 38(2): p. 289-97.
- 282. Wang, M., et al., 17-beta-Estradiol decreases p38 MAPK-mediated myocardial inflammation and dysfunction following acute ischemia. J Mol Cell Cardiol, 2006. **40**(2): p. 205-12.
- 283. Camper-Kirby, D., et al., Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males. Circ Res, 2001. 88(10): p. 1020-7.
- 284. Chen, C., et al., Apoptosis and autophagy contribute to gender difference in cardiac ischemia-reperfusion induced injury in rats. Life Sci, 2013. **93**(7): p. 265-70.
- 285. van Eickels, M., et al., 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. Circulation, 2001. **104**(12): p. 1419-23.
- 286. Yu, H.P., et al., The PI3K/Akt pathway mediates the nongenomic cardioprotective effects of estrogen following traumahemorrhage. Ann Surg, 2007. 245(6): p. 971-7.
- 287. Xu, Y., et al., Estrogen improves cardiac recovery after ischemia/reperfusion by decreasing tumor necrosis factor-alpha. Cardiovasc Res, 2006. **69**(4): p. 836-44.
- 288. Liu, H., A. Pedram, and J.K. Kim, Oestrogen prevents cardiomyocyte apoptosis by suppressing p38alpha-mediated activation of p53 and by down-regulating p53 inhibition on p38beta. Cardiovasc Res, 2011. 89(1): p. 119-28.
- 289. Petrov, G., et al., Maladaptive remodeling is associated with impaired survival in women but not in men after aortic valve replacement. JACC Cardiovasc Imaging, 2014. **7**(11): p. 1073-80.
- 290. Dubey, R.K., et al., 17Beta-estradiol, its metabolites, and progesterone inhibit cardiac fibroblast growth. Hypertension, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 522-8.
- 291. Zhou, L., et al., 17beta-estradiol inhibits angiotensin II-induced collagen synthesis of cultured rat cardiac fibroblasts via modulating angiotensin II receptors. Eur J Pharmacol, 2007. 567(3): p. 186-92.
- 292. Mahmoodzadeh, S., et al., 17beta-Estradiol inhibits matrix metalloproteinase-2 transcription via MAP kinase in fibroblasts. Cardiovasc Res, 2010. 85(4): p. 719-28.
- 293. Mahmoodzadeh, S., et al., Cardiomyocyte-specific Estrogen Receptor Alpha Increases Angiogenesis, Lymphangiogenesis and Reduces Fibrosis in the Female Mouse Heart Post-Myocardial Infarction. J Cell Sci Ther, 2014. 5(1): p. 153.
- 294. Ikeda, Y., et al., Androgen receptor gene knockout male mice exhibit impaired cardiac growth and exacerbation of angiotensin Ilinduced cardiac fibrosis. J Biol Chem, 2005. 280(33): p. 29661-6.
- 295. Noppe, G., et al., Reduced scar maturation and contractility lead to exaggerated left ventricular dilation after myocardial infarction in mice lacking AMPKalpha1. J Mol Cell Cardiol, 2014. **74**: p. 32-43.
- 296. Zaha, V.G. and L.H. Young, *AMP-activated protein kinase regulation and biological actions in the heart.* Circ Res, 2012. **111**(6): p. 800-14.

- 297. Suzuki, A., et al., Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the alpha2 form of AMP-activated protein kinase. Mol Cell Biol, 2007. 27(12): p. 4317-27.
- 298. Kazgan, N., et al., *Identification of a nuclear export signal in the catalytic subunit of AMP-activated protein kinase.* Mol Biol Cell, 2010. **21**(19): p. 3433-42.
- 299. McGee, S.L., et al., AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. Diabetes, 2008. 57(4): p. 860-7.
- 300. McGee, S.L., et al., Exercise increases nuclear AMPK alpha2 in human skeletal muscle. Diabetes, 2003. 52(4): p. 926-8.
- Oakhill, J.S., et al., beta-Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(45): p. 19237-41.
- 302. Sebbagh, M., et al., *Regulation of LKB1/STRAD localization and function by E-cadherin.* Curr Biol, 2009. **19**(1): p. 37-42.
- 303. Li, J., et al., AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart. Circ Res, 2005. 97(9): p. 872-9.
- 304. Xiao, B., et al., Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. Nature, 2007. 449(7161): p. 496-500.
- 305. Xiao, B., et al., Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. Nature, 2011. 472(7342): p. 230-3.
- 306. Rider, L.H.a.M.H., The AMP-activated protein kinase: more than

an energy sensor. Essays in Biochemistry, 2007. 43: p. 121.

- 307. Boudeau, J., et al., Emerging roles of pseudokinases. Trends Cell Biol, 2006. 16(9): p. 443-52.
- 308. Alessi, D.R., K. Sakamoto, and J.R. Bayascas, LKB1-dependent signaling pathways. Annu Rev Biochem, 2006. 75: p. 137-63.
- 309. Hemminki, A., *The molecular basis and clinical aspects of Peutz-Jeghers syndrome*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(5): p. 735-50.
- 310. Tomlinson, I.P. and R.S. Houlston, Peutz-Jeghers syndrome. J Med Genet, 1997. 34(12): p. 1007-11.
- 311. Westerman, A.M., et al., Peutz-Jeghers syndrome: 78-year follow-up of the original family. Lancet, 1999. 353(9160): p. 1211-5.
- 312. Ikeda, Y., et al., Cardiac-specific deletion of LKB1 leads to hypertrophy and dysfunction. J Biol Chem, 2009. 284(51): p. 35839-49.
- Shaw, R.J., et al., The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. Science, 2005. 310(5754): p. 1642-6.
- Jessen, N., et al., Ablation of LKB1 in the heart leads to energy deprivation and impaired cardiac function. Biochim Biophys Acta, 2010. 1802(7-8): p. 593-600.
- Hurley, R.L., et al., The Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. J Biol Chem, 2005. 280(32): p. 29060-6.
- 316. Hawley, S.A., et al., Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. Cell Metab, 2005. **2**(1): p. 9-19.
- 317. Woods, A., et al., C(Ca2+)/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. Cell Metab, 2005. 2(1): p. 21-33.
- 318. Herzig, S. and R.J. Shaw, AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. 19(2): p. 121-135.
- 319. Hong, S.P., M. Momcilovic, and M. Carlson, *Function of mammalian LKB1 and Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase kinase alpha as Snf1-activating kinases in yeast.* J Biol Chem, 2005.
- 320. Novikova, D.S., et al., *AMP-activated protein kinase: structure, function, and role in pathological processes.* Biochemistry (Mosc), 2015. **80**(2): p. 127-44.
- 321. Kulkarni, S.S., et al., Suppression of 5⁻nucleotidase enzymes promotes AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation and metabolism in human and mouse skeletal muscle. J Biol Chem, 2011. **286**(40): p. 34567-74.
- 322. Fryer, L.G., A. Parbu-Patel, and D. Carling, *The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways.* J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25226-32.
- Krentz, A.J., C.J. Bailey, and A. Melander, Thiazolidinediones for type 2 diabetes. New agents reduce insulin resistance but need long term clinical trials. BMJ, 2000. 321(7256): p. 252-3.
- 324. Corton, J.M., et al., 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? Eur J Biochem, 1995. **229**(2): p. 558-565.
- 325. Suter, M., et al., *Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase.* J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32207-16.
- Guigas, B., et al., Beyond AICA riboside: in search of new specific AMP-activated protein kinase activators. IUBMB Life, 2009.
 61(1): p. 18-26.
- 327. Scott, J.W., et al., *Thienopyridone drugs are selective activators of AMP-activated protein kinase beta1-containing complexes.* Chem Biol, 2008. **15**(11): p. 1220-30.
- 328. Kim, M. and R. Tian, *Targeting AMPK for cardiac protection: opportunities and challenges*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(4): p. 548-53.
- 329. Carling, D., V.A. Zammit, and D.G. Hardie, A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. FEBS Lett, 1987. 223(2): p. 217-22.
- Munday, M.R., et al., Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. Eur J Biochem, 1988. 175(2): p. 331-8.
- Bultot, L., et al., AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase. Biochem J, 2012. 443(1): p. 193-203.
- Eguchi-Ishimae, M., et al., Enhanced expression of the EVI1 gene in NUP98/HOXA-expressing leukemia cells. Int J Hematol, 2009. 89(2): p. 253-256.
- 333. Mihaylova, M.M., et al., Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. Cell, 2011. 145(4): p. 607-21.

- 334. Li, Y., et al., AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. Cell Metab, 2011. **13**(4): p. 376-388.
- 335. Denda, K., et al., Functional characterization of Kunitz domains in hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1. J Biol Chem, 2002. 277(16): p. 14053-9.
- 336. Hong, Y.H., et al., AMP-activated protein kinase regulates HNF4alpha transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. J Biol Chem, 2003. 278(30): p. 27495-501.
- 337. Guo, J., et al., Yin-Yang 1 activates interleukin-4 gene expression in T cells. J Biol Chem, 2001. 276(52): p. 48871-8.
- 338. Inoki, K., T. Zhu, and K.L. Guan, TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. Cell, 2003. **115**(5): p. 577-90.
- 339. Gwinn, D.M., et al., AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. Mol Cell, 2008. 30(2): p. 214-26.
- 340. Rotblat, B., et al., Anti-oxidative stress response genes: bioinformatic analysis of their expression and relevance in multiple cancers. Oncotarget, 2013. 4(12): p. 2577-90.
- 341. Wang, Z., et al., Connective tissue growth factor promotes interleukin-1beta-mediated synovial inflammation in knee osteoarthritis. Mol Med Rep, 2013. 8(3): p. 877-82.
- 342. Park, K.S., et al., Outer membrane vesicles derived from Escherichia coli induce systemic inflammatory response syndrome. PLoS One, 2010. 5(6): p. e11334.
- 343. Bando, H., et al., *Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(16): p. 5784-92.
- 344. Ahmadian, M., et al., *Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype.* Cell Metab, 2011. **13**(6): p. 739-48.
- 345. McGarry, J.D., G.F. Leatherman, and D.W. Foster, *Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA.* J Biol Chem, 1978. **253**(12): p. 4128-36.
- 346. Saggerson, D., Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. Annu Rev Nutr, 2008. 28: p. 253-72.
- 347. Jornayvaz, F.R. and G.I. Shulman, *Regulation of mitochondrial biogenesis*. Essays Biochem, 2010. 47: p. 69-84.
- 348. Garcia-Roves, P.M., et al., Gain-of-function R225Q mutation in AMP-activated protein kinase gamma3 subunit increases mitochondrial biogenesis in glycolytic skeletal muscle. J Biol Chem, 2008. **283**(51): p. 35724-34.
- 349. Zong, H., et al., AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(25): p. 15983-7.
- 350. Mottillo, E.P., et al., Lack of Adipocyte AMPK Exacerbates Insulin Resistance and Hepatic Steatosis through Brown and Beige Adipose Tissue Function. Cell Metab, 2016. **24**(1): p. 118-29.
- 351. Wiede, F., et al., *T cell protein tyrosine phosphatase attenuates T cell signaling to maintain tolerance in mice.* J Clin Invest, 2011. **121**(12): p. 4758-74.
- 352. Hasenour, C.M., et al., 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) effect on glucose production, but not energy metabolism, is independent of hepatic AMPK in vivo. J Biol Chem, 2014. **289**(9): p. 5950-9.
- 353. Wu, L., et al., *Pharmacodynamics and potential synergistic effects of Mai-Luo-Ning injection on cardiovascular protection, based on molecular docking.* Chin J Nat Med, 2015. **13**(11): p. 815-822.
- 354. Czubryt, M.P., et al., Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1711-6.
- 355. Canto, C., et al., *AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity.* Nature, 2009. **458**(7241): p. 1056-60.
- 356. Settembre, C., et al., *Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(5): p. 283-96.
- 357. Athea, Y., et al., AMP-activated protein kinase alpha2 deficiency affects cardiac cardiolipin homeostasis and mitochondrial function. Diabetes, 2007. 56(3): p. 786-94.
- 358. Toyama, E.Q., et al., Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. Science, 2016. **351**(6270): p. 275-281.
- 359. Ducommun, S., et al., *Motif affinity and mass spectrometry proteomic approach for the discovery of cellular AMPK targets: identification of mitochondrial fission factor as a new AMPK substrate.* Cell Signal, 2015. **27**(5): p. 978-88.
- 360. Feng, Y., Y. Zhang, and H. Xiao, AMPK and cardiac remodelling. Sci China Life Sci, 2018. 61(1): p. 14-23.
- 361. Lau, K.F., et al., *Dexras1 interacts with FE65 to regulate FE65-amyloid precursor protein-dependent transcription.* J Biol Chem, 2008. **283**(50): p. 34728-37.
- 362. Chen, B.L., et al., Activation of AMPK inhibits cardiomyocyte hypertrophy by modulating of the FOXO1/MuRF1 signaling pathway in vitro. Acta Pharmacol Sin, 2010. **31**(7): p. 798-804.
- Voelkl, J., et al., AMP-activated protein kinase alpha1-sensitive activation of AP-1 in cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol, 2016.
 97: p. 36-43.
- 364. Terai, K., et al., AMP-activated protein kinase protects cardiomyocytes against hypoxic injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress. Mol Cell Biol, 2005. 25(21): p. 9554-75.
- 365. Zhuo, X.Z., et al., Isoproterenol instigates cardiomyocyte apoptosis and heart failure via AMPK inactivation-mediated endoplasmic reticulum stress. Apoptosis, 2013. **18**(7): p. 800-10.
- 366. Lu, W.W., et al., Intermedin1-53 protects against cardiac hypertrophy by inhibiting endoplasmic reticulum stress via activating AMP-activated protein kinase. J Hypertens, 2015. **33**(8): p. 1676-87.
- 367. Amara, V.R., S.K. Surapaneni, and K. Tikoo, *Metformin attenuates cardiovascular and renal injury in uninephrectomized rats on DOCA-salt: Involvement of AMPK and miRNAs in cardioprotection.* Toxicol Appl Pharmacol, 2019. **362**: p. 95-104.
- 368. Chen, H., et al., *Micro-RNA-195 and -451 regulate the LKB1/AMPK signaling axis by targeting MO25.* PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41574.
- 369. Daskalopoulos, E.P., et al., *AMPK in cardiac fibrosis and repair: Actions beyond metabolic regulation.* J Mol Cell Cardiol, 2016. **91**: p. 188-200.

- 370. Chen, R., et al., Metformin attenuates angiotensin II-induced TGFbeta1 expression by targeting hepatocyte nuclear factor-4alpha. Br J Pharmacol, 2018. **175**(8): p. 1217-1229.
- 371. Mishra, R., et al., *AMP-activated protein kinase inhibits transforming growth factor-beta-induced Smad3-dependent transcription and myofibroblast transdifferentiation.* J Biol Chem, 2008. **283**(16): p. 10461-9.
- 372. Feng, D.W.H., et al., CTRP3 attenuates post-infarct cardiac fibrosis by targeting Smad3 activation and inhibiting myofibroblast differentiation. J Mol Med, 2015.
- 373. Brilla, C.G., et al., Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. Circ Res, 1990. 67(6): p. 1355-64.
- 374. Brilla, C.G., et al., Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. J Mol Cell Cardiol, 1994. 26(7): p. 809-20.
- 375. Hernandez, J.S., et al., Crosstalk between AMPK activation and angiotensin II-induced hypertrophy in cardiomyocytes: the role of mitochondria. J Cell Mol Med, 2014. **18**(4): p. 709-20.
- 376. Fujita, K., et al., Adiponectin protects against angiotensin II-induced cardiac fibrosis through activation of PPAR-alpha. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. 28(5): p. 863-70.
- 377. Chan, E.C., et al., *Nox4 modulates collagen production stimulated by transforming growth factor beta1 in vivo and in vitro.* Biochem Biophys Res Commun, 2013. **430**(3): p. 918-25.
- 378. Balteau, M., et al., AMPK activation by glucagon-like peptide-1 prevents NADPH oxidase activation induced by hyperglycemia in adult cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014. 307(8): p. H1120-33.
- 379. Ma, X., et al., Cardiac Fibrosis Alleviated by Exercise Training Is AMPK-Dependent. PLoS One, 2015. 10(6): p. e0129971.
- 380. Chong, Z.Z., et al., *Targeting cardiovascular disease with novel SIRT1 pathways*. Future Cardiol, 2012. 8(1): p. 89-100.
- 381. Lan, F., et al., SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMPactivated protein kinase activation. J Biol Chem, 2008. 283(41): p. 27628-35.
- 382. Ruderman, N.B., et al., AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. 298(4): p. E751-60.
- 383. Lombard, D.B. and B.M. Zwaans, SIRT3: as simple as it seems? Gerontology, 2014. 60(1): p. 56-64.
- 384. Wang, X.X., et al., SIRT6 protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury by augmenting FoxO3alpha-dependent antioxidant defense mechanisms. Basic Res Cardiol, 2016. **111**(2): p. 13.
- 385. Salt, I.P. and T.M. Palmer, Exploiting the anti-inflammatory effects of AMP-activated protein kinase activation. Expert Opin Investig Drugs, 2012. 21(8): p. 1155-67.
- 386. Soraya, H., et al., Short-term treatment with metformin suppresses toll like receptors (TLRs) activity in isoproterenol-induced myocardial infarction in rat: are AMPK and TLRs connected? Int Immunopharmacol, 2012. **14**(4): p. 785-91.
- 387. Soraya, H., et al., *Metformin attenuates myocardial remodeling and neutrophil recruitment after myocardial infarction in rat.* Bioimpacts, 2015. **5**(1): p. 3-8.
- 388. Peng, W., et al., *AMPK and TNF-alpha at the crossroad of cell survival and death in ischaemic heart.* Cardiovasc Res, 2009. **84**(1): p. 1-3.
- 389. Li, J., et al., Role of the Nitric Oxide Pathway in AMPK-mediated Glucose Uptake and GLUT4 Translocation in Heart Muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. 287(5): p. E834-41.
- 390. Chen, L.L., et al., Inhibition of MAPK signaling by eNOS gene transfer improves ventricular remodeling after myocardial infarction through reduction of inflammation. Mol Biol Rep, 2010. **37**(7): p. 3067-72.
- Russell, R.R., 3rd, et al., AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. J Clin Invest, 2004. 114(4): p. 495-503.
- 392. Zarrinpashneh, E., et al., Role of the alpha2-isoform of AMP-activated protein kinase in the metabolic response of the heart to no-flow ischemia. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(6): p. H2875-83.
- 393. Carvajal, K., et al., Dual cardiac contractile effects of the alpha2-AMPK deletion in low-flow ischemia and reperfusion. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 292(6): p. H3136-47.
- 394. Kim, A.S., et al., A small molecule AMPK activator protects the heart against ischemia-reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol, 2011. 51(1): p. 24-32.
- 395. Calvert, J.W., et al., Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. Diabetes, 2008. **57**(3): p. 696-705.
- 396. Foretz, M., et al., Metformin: from mechanisms of action to therapies. Cell Metab, 2014. 20(6): p. 953-66.
- 397. Zaha, V.G., et al., *AMPK is critical for mitochondrial function during reperfusion after myocardial ischemia.* J Mol Cell Cardiol, 2016. **91**: p. 104-13.
- 398. Wang, Y., et al., AMP-activated protein kinase deficiency enhances myocardial ischemia/reperfusion injury but has minimal effect on the antioxidant/antinitrative protection of adiponectin. Circulation, 2009. **119**(6): p. 835-44.
- 399. Gundewar, S., et al., Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. Circ Res, 2009. **104**(3): p. 403-11.
- 400. Cieslik, K.A., et al., AICAR-dependent AMPK activation improves scar formation in the aged heart in a murine model of reperfused myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol, 2013. **63**: p. 26-36.
- 401. Tian, R., et al., Increased adenosine monophosphate-activated protein kinase activity in rat hearts with pressure-overload hypertrophy. Circulation, 2001. **104**(14): p. 1664-9.
- 402. Horman, S., et al., *AMP-activated protein kinase in the control of cardiac metabolism and remodeling.* Curr Heart Fail Rep, 2012. **9**(3): p. 164-73.
- 403. Dolinsky, V.W., et al., *Resveratrol prevents the prohypertrophic effects of oxidative stress on LKB1*. Circulation, 2009. **119**(12): p. 1643-52.
- 404. Li, H.L., et al., *Long-term activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase attenuates pressure-overload-induced cardiac hypertrophy.* J Cell Biochem, 2007. **100**(5): p. 1086-99.
- 405. Li, Y., et al., AMPK inhibits cardiac hypertrophy by promoting autophagy via mTORC1. Arch Biochem Biophys, 2014. 558: p. 79-86.

- 406. Zarrinpashneh, E., et al., *AMPKalpha2 counteracts the development of cardiac hypertrophy induced by isoproterenol.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **376**(4): p. 677-81.
- 407. Zhang, P., et al., AMP activated protein kinase-alpha2 deficiency exacerbates pressure-overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. Hypertension, 2008. **52**(5): p. 918-24.
- 408. Fu, Y.N., et al., Metformin attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy via AMPK activation. Acta Pharmacol Sin, 2011. **32**(7): p. 879-87.
- 409. Xu, X., et al., Metformin protects against systolic overload-induced heart failure independent of AMP-activated protein kinase alpha2. Hypertension, 2014. **63**(4): p. 723-8.
- 410. Yin, M., et al., *Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(2): p. H459-68.
- 411. Sasaki, H., et al., *Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase.* Circulation, 2009. **119**(19): p. 2568-77.
- 412. Viollet, B., et al., *The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity.* J Clin Invest, 2003. **111**(1): p. 91-8.
- 413. Choi, Y.S., et al., Preservation of myocardial fatty acid oxidation prevents diastolic dysfunction in mice subjected to angiotensin Il infusion. J Mol Cell Cardiol, 2016. **100**: p. 64-71.
- 414. Scantlebury, D.C. and B.A. Borlaug, *Why are women more likely than men to develop heart failure with preserved ejection fraction?* Curr Opin Cardiol, 2011. **26**(6): p. 562-8.
- 415. Veksler, V.I., et al., *Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers.* Biochim Biophys Acta, 1987. **892**(2): p. 191-6.
- 416. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 2001. 25(4): p. 402-8.
- 417. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
- 418. Wittig, I., H.P. Braun, and H. Schagger, Blue native PAGE. Nat Protoc, 2006. 1(1): p. 418-28.
- 419. Jha, P., X. Wang, and J. Auwerx, Analysis of Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes Using Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE). Curr Protoc Mouse Biol, 2016. 6(1): p. 1-14.
- 420. Hardie, D.G. and D. Carling, *The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell*? Eur J Biochem, 1997. **246**(2): p. 259-73.
- 421. Cheung, P.C., et al., *Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding.* Biochem J, 2000. **346 Pt 3**: p. 659-69.
- 422. Sambandam, N. and G.D. Lopaschuk, AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. Prog Lipid Res, 2003. 42(3): p. 238-56.
- 423. Hue, L., et al., New targets of AMP-activated protein kinase. Biochem Soc Trans, 2003. 31(Pt 1): p. 213-5.
- 424. Song, P. and M.H. Zou, *Regulation of NAD(P)H oxidases by AMPK in cardiovascular systems*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(9): p. 1607-19.
- 425. He, Q., et al., *Tafazzin knockdown interrupts cell cycle progression in cultured neonatal ventricular fibroblasts.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **305**(9): p. H1332-43.
- 426. He, Q., *Tafazzin knockdown causes hypertrophy of neonatal ventricular myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(1): p. H210-6.
- 427. Jussupow, A., A. Di Luca, and V.R.I. Kaila, *How cardiolipin modulates the dynamics of respiratory complex I*. Science Advances, 2019. **5**(3).
- 428. Siasos, G., et al., *Mitochondria and cardiovascular diseases-from pathophysiology to treatment*. Ann Transl Med, 2018. **6**(12): p. 256.
- 429. Viollet, B. and M. Foretz, Animal Models to Study AMPK. Exp Suppl, 2016. 107: p. 441-469.
- Chen, S., et al., Alpha1 catalytic subunit of AMPK modulates contractile function of cardiomyocytes through phosphorylation of troponin I. Life Sci, 2014. 98(2): p. 75-82.
- 431. Woods, A., et al., Characterization of AMP-activated protein kinase beta and gamma subunits. Assembly of the heterotrimeric complex in vitro. J Biol Chem, 1996. 271(17): p. 10282-90.
- 432. Turdi, S., et al., *Deficiency in AMP-activated protein kinase exaggerates high fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction.* J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(4): p. 712-22.
- 433. Yang, C., et al., *Regulatory Mechanisms of the Molecular Pathways in Fibrosis Induced by MicroRNAs.* Chin Med J (Engl), 2016. **129**(19): p. 2365-72.
- 434. Chen, C., et al., MicroRNA as a Therapeutic Target in Cardiac Remodeling. Biomed Res Int, 2017. 2017: p. 1278436.
- 435. Qi, H., et al., Activation of AMPK Attenuated Cardiac Fibrosis by Inhibiting CDK2 via p21/p27 and miR-29 Family Pathways in Rats. Mol Ther Nucleic Acids, 2017. 8: p. 277-290.
- Ventura-Clapier, R., et al., Sex in basic research: concepts in the cardiovascular field. Cardiovasc Res, 2017. 113(7): p. 711-724.
 Schlame, M., D. Rua, and M.L. Greenberg, The biosynthesis and functional role of cardiolipin. Prog Lipid Res, 2000. 39(3): p.
- 257-88.
 438. Paradies, G., et al., Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. Cells. 2019. 8(7).
- 439. Lai, L., et al., A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 (PGC-1) in the regulation of cardiac mitochondrial phospholipid biosynthesis. J Biol Chem, 2014. 289(4): p. 2250-9.
- 440. Drose, S., K. Zwicker, and U. Brandt, Full recovery of the NADH:ubiquinone activity of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from Yarrowia lipolytica by the addition of phospholipids. Biochim Biophys Acta, 2002. **1556**(1): p. 65-72.
- 441. Paradies, G., et al., Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. Gene, 2002. 286(1): p. 135-41.

- 442. Acaz-Fonseca, E., et al., Developmental Sex Differences in the Metabolism of Cardiolipin in Mouse Cerebral Cortex Mitochondria. Sci Rep, 2017. 7: p. 43878.
- 443. McKenzie, M., et al., *Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients.* J Mol Biol, 2006. **361**(3): p. 462-9.
- 444. Hall, M.E., et al., Systolic dysfunction in cardiac-specific ligand-inducible MerCreMer transgenic mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(1): p. H253-60.
- 445. Buerger, A., et al., *Dilated cardiomyopathy resulting from high-level myocardial expression of Cre-recombinase*. J Card Fail, 2006. **12**(5): p. 392-8.
- 446. Bersell, K., et al., Moderate and high amounts of tamoxifen in alphaMHC-MerCreMer mice induce a DNA damage response, leading to heart failure and death. Dis Model Mech, 2013. 6(6): p. 1459-69.
- 447. Lexow, J., et al., Cardiac fibrosis in mice expressing an inducible myocardial-specific Cre driver. Dis Model Mech, 2013. 6(6): p. 1470-6.
- 448. Pimenta, M., et al., *High-intensity interval training beneficial effects on body mass, blood pressure, and oxidative stress in diet-induced obesity in ovariectomized mice.* Life Sci, 2015. **139**: p. 75-82.
- 449. Davis, S.R., et al., Understanding weight gain at menopause. Climacteric, 2012. 15(5): p. 419-29.
- 450. Rouet-Benzineb, P., R. Merval, and E. Polidano, *Effects of hypoestrogenism and/or hyperaldosteronism on myocardial remodeling in female mice*. Physiol Rep, 2018. 6(21): p. e13912.
- 451. Morra, E.A., et al., Endurance training restores spatially distinct cardiac mitochondrial function and myocardial contractility in ovariectomized rats. Free Radic Biol Med, 2019. **130**: p. 174-188.
- 452. Ventura-Clapier, R., A. Garnier, and V. Veksler, *Energy metabolism in heart failure*. J Physiol, 2004. 555(Pt 1): p. 1-13.



Titre : Régulation du métabolisme énergétique cardiaque par l'AMP kinase : Implication dans l'insuffisance

cardiaque et effet du sexe biologique

Mots clés : Myocarde sain et défaillant, AMP kinase, fibrose, mitochondrie, cardiolipides, dimorphisme sexuel.

Résumé : L'AMPK est un senseur métabolique qui phosphoryle de nombreux substrats afin de maintenir l'homéostasie énergétique cellulaire. Dans le cœur, un rôle protecteur de l'AMPK a été montré dans des modèles pathologiques, néanmoins la spécificité cardiaque, métabolique, et sexuelle des effets protecteurs de l'AMPK n'a pas été complètement élucidée. Nous avons donc généré un modèle de souris invalidées pour l'AMPKa2, l'isoforme majoritaire dans le cœur. Cette délétion est induite spécifiquement dans le cœur et à l'âge adulte après injection de tamoxifène. A l'état basal, la délétion de l'AMPK α 2 a induit une dysfonction systolique progressive du ventricule qauche et le développement d'une fibrose cardiague uniquement chez la souris mâle. Seize semaines après induction de la délétion, ces altérations cardiaques sont associées à une diminution de la respiration mitochondriale initiée par le complexe I de la chaîne

respiratoire qui pourrait être liée au réarrangement des espèces de cardiolipdes et à l'augmentation de la proportion de complexe I non intégré dans des supercomplexes observés chez ces souris mâles KO. Ces effets induits par la délétion de l'AMPKa2 ne sont pas observés chez les femelles KO mais la fibrose cardiaque et le remodelage des cardiolipdes ont été retrouvés chez des souris femelles KO avant subis une ovariectomie. Ces résultats montrent aussi une implication de l'AMPK dans la régulation de la fibrose cardiague et de la composition en cardiolipides de la membrane mitochondriale et mettent également en avant un dimorphisme sexuel qui pourrait être en partie dû aux hormones femelles. Une étude comparable dans un modèle pathologique est en cours d'analyse afin de préciser les effets cardioprotecteurs de l'AMPK.

Title: Regulation of cardiac energetic metabolism by AMP kinase: Regarding heart failure and biological sex

effect

Keywords: healthy and failure heart, AMP kinase, fibrosis, mitochondria, cardiolipin, sexual dimorphism

Abstract: AMPK is a metabolic sensor which phosphorylates a various number of substrates in order to maintain cellular energetic homeostasis. In the heart, a protective role of AMPK has been demonstrated in pathological models, nevertheless the tissus, the metabolic and the sexual specificity of those effects has not been fully investigated. Thus, we generated a mice model of AMPK α 2 deletion, the mjor cardiac isoform, specifically induced in the heart and at adult age after tamoxifen injection. At basal condition, AMPK α 2 deletion lead to a progressive systolic dysfunction of the left ventricle and to the development of fibrosis only in males. Sixteen weeks after the deletion induction, these alterations observed in these KO male mice were associated to

a decrease of the mitochondrial respiration initiated by complex I of the respiratory chain which could be linked to a cardiolipin species remodeling and to an increase of complex I proportion which is not integrated in supercomplexes. These effects induced by AMPK α 2 deletion, were not observed in KO female mice; however, the cardiac fibrosis and the cardiolipins remodeling were found in KO female mice with ovariectomy. These last results tend to confirm an involvement of AMPK in fibrosis regulation and membrane cardiolipin composition and highlight a sexual dimorphism which could be due to female hormones. Analysis of a similar study in a pathological model is ongoing in order to specify the AMPK cardioprotective effect.

