



**HAL**  
open science

# Rôle du canal calcique TRPV1 dans l'ischémie-reperfusion du myocarde

Nolwenn Tessier

► **To cite this version:**

Nolwenn Tessier. Rôle du canal calcique TRPV1 dans l'ischémie-reperfusion du myocarde. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1165 . tel-02954345

**HAL Id: tel-02954345**

**<https://theses.hal.science/tel-02954345>**

Submitted on 1 Oct 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.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1165

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de

**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**École Doctorale N° ED 205**

**École Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS)**

**Spécialité de doctorat** : Biologie, médecine et santé

**Discipline** : Physiologie

Soutenue publiquement le 30/09/2019, par :

**Nolwenn Tessier**

---

# **Rôle du canal calcique TRPV1 dans l'ischémie-reperfusion du myocarde**

---

Devant le jury composé de :

Ovize, Michel, PU-PH

Université Claude Bernard

Président

Belaidi, Élise, MCU

Université de Grenoble

Rapporteure

Moha Ou Maati, Hamid, MCU

Université de Montpellier

Rapporteur

Roudbaraki, Morad, Pr

Université de Lille

Rapporteur

Vergely-Vandriesse, Catherine, Pr

Université de Dijon

Examinatrice

Van Coppenolle, Fabien, Pr

Université de Lyon

Directeur de thèse

Ducreux, Sylvie, MCU

Université de Lyon

Co-directrice de thèse

## Résumé

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, en 2012, les maladies cardiovasculaires ont causé 17.5 millions de mort dans le monde occidental, soit 30% des décès. L'infarctus du myocarde (IDM), principale maladie cardiovasculaire, est causé par l'obstruction d'une artère coronaire entraînant un arrêt de l'approvisionnement sanguin du tissu en aval de cette obstruction. Ce phénomène est appelé ischémie. Cette zone non irriguée est dépourvue en oxygène et en nutriments, entraînant alors la mort cellulaire. Actuellement, le seul traitement possible est la désocclusion de l'artère coronaire permettant au sang d'irriguer *de novo* le tissu, ceci est appelé la reperfusion. Malheureusement, aussi bien l'ischémie que la reperfusion causent des dégâts irréversibles sur le muscle cardiaque.

Afin de diminuer les lésions cellulaires à la suite d'un épisode d'ischémie-reperfusion (I/R), des stratégies de cardioprotection ont vu le jour dans les années 1980. Parmi ces différentes stratégies, un certain nombre vise à contrebalancer les dérégulations de l'homéostasie calcique, symptômes délétères survenant à l'échelle cellulaire lors l'I/R et contribuant à la mort cellulaire. Parmi les membres de l'homéostasie calcique, nous nous intéressons au canal TRPV1 (pour Transient Receptor Vanilloid 1). TRPV1 est un canal cationique non-sélectif qui possède six domaines transmembranaires et un pore formé entre les domaines 5 et 6. Ce canal est principalement impliqué dans la nociception. Il est activé par la chaleur ( $> 42^{\circ}\text{C}$ ), l'acidose ( $\text{pH} < 6$ ) et des agonistes tels que la capsaïcine, la résinifératoxine et les anesthésiques volatils. En revanche, il est inhibé par des antagonistes tels que la capsazépine et la 5'-Iodorésinifératoxine. De nombreuses équipes se sont intéressées à l'implication de TRPV1 dans la cardioprotection. La modulation pharmacologique de TRPV1 s'est déjà avérée bénéfique vis-à-vis de l'IDM, mais l'effet cardioprotecteur a été attribué aux canaux TRPV1 présents dans le système nerveux périphérique. Aucune étude à ce jour n'a révélé le rôle de TRPV1 au sein du myocarde.

Ainsi, le but de cette étude est de mieux comprendre le rôle de TRPV1 dans la cardioprotection. Pour cela, afin d'utiliser des sondes génétiques ciblant les différents réservoirs calciques de la cellule, nous avons travaillé avec la lignée cellulaire de cardiomyoblastes de rats, les cellules H9C2.

Les principaux résultats de ma thèse sont les suivants :

- 1) TRPV1 est exprimé dans ce modèle cellulaire et semble être localisé à la membrane du réticulum endoplasmique.
- 2) TRPV1 est un canal de fuite calcique fonctionnel du réticulum endoplasmique.
- 3) La modulation pharmacologique de TRPV1 a un impact sur la concentration calcique dans le cytoplasme, dans la mitochondrie et dans les hot spots mitochondriaux.
- 4) L'activation de TRPV1 a des effets hétérogènes sur la mortalité cellulaire après une hypoxie-réoxygénation alors que l'inhibition de TRPV1 augmente systématiquement la survie cellulaire.

De façon annexe, mes travaux de thèse ont également contribué à :

- Compléter l'étude de TRPV1 sur les cardiomyocytes murins adultes de souris sauvages et de souris TRPV1 KO.
- Développer un nouveau protocole d'analyse en cytométrie de flux permettant de mesurer plusieurs paramètres en même temps (mort cellulaire, potentiel de membrane mitochondrial, ROS, et masse mitochondriale) après une séquence d'hypoxie-réoxygénation sur des cardiomyocytes adultes de souris.

Dans l'ensemble, ce projet de thèse vise à déterminer comment la modulation positive ou négative d'un canal de fuite calcique du réticulum endoplasmique dans les cardiomyocytes peut limiter les lésions cellulaires engendrées par l'ischémie-reperfusion.

## Abstract

According to the World Health Organization, in 2012, cardiovascular diseases are the reason behind 17.5 million deaths in western world (30% of deaths). Myocardial infarction (MI), one of the major cardiovascular diseases, is caused by coronary artery occlusion. This phenomenon is called ischemia, in which the non-irrigated area is devoid of oxygen and nutrients, inducing cell death. Currently, reperfusion, the coronary artery reflow, which resupplies the tissues with blood, is the only possible treatment. Yet, unfortunately, reperfusion exacerbates the deleterious effects observed during ischemia.

In order to reduce the cellular damage linked to an ischemia-reperfusion (I/R) episode, cardioprotection strategies have emerged in the 1980s. These latter include "remote", pre-, per- and post-conditioning. Among them, several strategies aim to counterbalance dysregulations of the calcium homeostasis, which are deleterious symptoms occurring at the cellular level during I/R and contributing to cell death. Among the  $\text{Ca}^{2+}$ -homeostasis members, we are interested in the TRPV1 channel (for Transient Receptor Vanilloid 1). TRPV1 is a non-selective cationic channel that has six transmembrane domains and a pore formed between domains 5 and 6. This channel is primarily involved in nociception. It is activated by heat ( $> 42^\circ \text{C}$ ), acidosis ( $\text{pH} < 6$ ) and agonists such as capsaicin, resiniferatoxin and volatile anesthetics. Antagonists such as capsazepine and 5'-iodoresiniferatoxin, inhibit TRPV1. Many teams have been interested in TRPV1 involvement in cardioprotection and the pharmacological modulation of TRPV1 has already been shown to be beneficial for MI, but the cardioprotective effect has been attributed to TRPV1 channels of the peripheral nervous system. To date, no studies have revealed the role of TRPV1 in the myocardium.

Thus, our aim is to understand better the role of TRPV1 in cardioprotection. For this purpose, in order to use genetic probes targeting the various cellular calcium stores, we worked with the rat cardiomyoblast cell line, H9C2.

The main results of my thesis are as follows:

- 1) TRPV1 is expressed in this cellular model and appears to be localized at the endoplasmic reticulum (ER) membrane.
- 2) TRPV1 is a functional ER calcium leak channel.
- 3) The pharmacological modulation of TRPV1 has an impact on the cytosolic, mitochondrial and mitochondrial hot spots  $\text{Ca}^{2+}$  concentration.
- 4) TRPV1 activation has heterogeneous effects on cell mortality after hypoxia-reoxygenation whereas TRPV1 inhibition systematically increases cell survival.

As an appendix, my thesis work also contributed to:

- Complete the study of TRPV1 on adult mouse cardiomyocytes from wild-type mice and TRPV1 KO mice.
- Develop a new flow cytometry protocol to measure simultaneously on adult mouse cardiomyocytes several parameters (cell death, mitochondrial membrane potential, ROS, and mitochondrial mass) after a hypoxia-reoxygenation sequence.

Overall, my PhD project aims to determine how the positive or negative modulation of an endoplasmic reticulum calcium leak channel can limit the cardiomyocyte damage caused by ischemia-reperfusion




## Remerciements

Tout d'abord, je remercie chaleureusement les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de donner de leur temps pendant les congés d'été. Merci à **Elise Belaidi-Corsat**, **Hamid Moha Ou Maati** et **Morad Roudbaraki** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et à **Catherine Vargely-Vandriessse** pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse de m'avoir conseillée au cours de ces trois années, **Stéphane Sebille** et **Olivier Soriani**, en espérant continuer de vous croiser aux canaux ioniques.

Je remercie vivement **Hubert Vidal**, directeur du laboratoire CarMeN, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je remercie également **Michel Ovize**, de m'avoir intégrée dans son équipe de recherche pendant trois années et de m'avoir donnée l'opportunité d'effectuer ma thèse dans de bonnes conditions. En espérant pouvoir partager d'autres « printemps de la cardiologie » avec vous !

Je remercie également mes directeurs de thèse **Fabien** et **Sylvie**, de m'avoir donnée l'opportunité d'effectuer mon stage de M2 avec vous, aboutissant à cette thèse. Merci pour vos différentes corrections pour le manuscrit de thèse, pour la formation de microscopie et vos différents conseils. Merci pour les bonbons pour la fin de thèse !

Aux anciens étudiants du bureau, **Lucille**, **Ribal** et **Camille**. Merci de m'avoir si bien accueillie au labo, merci de m'avoir formée, de m'avoir payée des coups quand j'oubliais ma carte, et d'avoir été présents cette première année ! 

Merci à **Murielle** pour toutes les commandes passées (notamment mes petites souris !) et pour l'organisation de la soutenance. Merci pour tes « doux Jésus » qui nous auront bien fait rire !

**Andréa** et **Christelle**, je vous remercie de vous être aussi bien occupées de mes souris pendant ces trois années, même si elles nous ont donné du fil à retordre. Merci **Andréa** pour le génotypage et **Christelle**, pour toutes ces dislocations ! Promis, je vous embête plus !

A **Delphine**, qui m'a fait découvrir plein de nouveaux thés et qui a décongelé des cellules à maintes reprises. A **René** qui a accepté d'être notre conférencier à la JEDISS2018, et merci pour ta gentillesse au quotidien. **JO**, allé le SCO, c'est la meilleure équipe du championnat, tu t'en rendras compte un jour ! La bise à Jean-Michel. A **Mégane**, merci pour ta bonne humeur, et ta joie de vivre. A **Marie**, merci pour tous les gels, et les solutions que nous a préparées ! Merci à **Lionel** pour toutes les souris que tu n'auras pas faites (ok, je rigole), merci de t'être impliqué dans ce projet malgré ton emploi du temps SURchargé.

**Fabrice**, même si on est souvent en désaccord, merci pour ta formation de microbiologie. Promis, je n'oublierai plus jamais de mettre du savon dans la javel. Merci de nous faire autant rire aux pauses café et le midi. **David**, le dernier arrivé dans l'équipe, bienvenu, je te souhaite plein de bonnes choses pour ce post-doc !

Aux médecins de passage dans notre bureau, **Margaux**, **Xavier**, **Maxime** et **Thomas**, merci de nous avoir fait autant rire. Merci de votre gentillesse. **Xavier**, tes plans de manip sont prêts pour finir ta thèse. **Margaux**, plein de bonheur pour la suite, tu es un médecin génial ! **Maxime**, nous serions ravis de t'accueillir en thèse ! Par contre, quand je serai plus là, tu feras attention à bien nettoyer ta tasse. **Thomas**, ce qui se passe au GRRC, reste au GRRC.

**Noëlle**, la maman des étudiants, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur quotidienne. A notre super équipe qualité, à la vérification des pipettes et à la métrologie ! J'ai adoré partager ces repas, restaurants,

bar avec toi, et **Rania** ! Merci à toutes les deux de votre soutien, de vos conseils, et de votre présence pendant ces trois années. 💜 **Noëlle**, merci de ta présence au labo, à nos discussions et de m'avoir fait tellement rire quand ton téléphone sonne sans arrêt ! Merci de m'avoir appris à pulser ! Je te souhaite plein de bonheur pour la retraite qui arrive à grands pas ! **Rania**, même si tu n'es plus au labo, tu as été un réel soutien, surtout cette dernière année. Merci d'avoir pris le temps de me donner des conseils. A tous nos verres partagés, et à tous ceux qui le seront ! 😊

**Bruno**, le chanteur, blagueur du labo ! Bonsoiiiiiiiiir ! Je suis déçue de ne pas avoir pu monter avec toi en voiture, je n'aurai pas eu ce privilège ! A nos discussions sur la merveilleuse ville de Nantes ! Oh tiens, il y a du gâteau ? Merci pour les conseils pour l'animalerie et les DAP !

**Christophe**, merci de t'être autant impliqué dans ce projet. Merci de ton soutien aussi bien au labo que pour les enseignements. Je suis triste de n'avoir pas surveillée un examen avec toi, tu as préféré Mallory... Pour ta bonne humeur constante, pour nos débriefing de foot le lundi matin, à toutes les étudiantes brillantes (j'étais obligée 😊), et puis Allez les verts ! A nos manips qu'il nous reste à faire et à ce papier que nous allons écrire !

A la B13 family, **Claire, Gabriel, Mélanie, Ludo, Yves, Mallory, Maya, Sally, Zeina** et **Alex**. Je pourrais écrire des pages sur vous, je vais essayer de faire court.

**Claire**, merci de m'avoir permis de soutenir cette thèse en temps et en heure. Tu sais ce que ça représente à mes yeux. Merci pour cette collaboration et j'espère en créer de nouvelles quand je serai au Canada (tu enverras ton étudiant 😊). A toutes nos discussions tardives et nos Mojitos en péniche. Merci pour ta bienveillance et ta gentillesse. Je suis heureuse d'avoir partagée cette période d'écriture avec toi. Tu as toujours été là pour répondre à mes questions, et pris le temps de partager ton savoir ! On commence quand les manips sur les anesthésiques ?

**Gabriel**, ou aussi dit « le coach » 🏃, tu auras réussi à me faire faire au moins un fractionné pendant ma thèse, Bravo ! Merci pour la motivation parce que sans toi, on aurait abandonné. Prochaine étape, le planning d'entraînement pour la SaintéLyon. Un grand merci pour ton implication dans le projet, tes conseils et l'élaboration de la lignée stable ! Et oui, j'ai fait de la culture avec **Gabriel** !! Malgré le design de 6 siRNA... J'espère pouvoir en faire fonctionner un 😊!

**Mélanie**, ma BFF, à toutes nos heures de course à pied ensemble. Merci pour ce chapeau de catherinette ! Parce que oui, même en courant on parle sciences ! Merci pour ces conseils et ce soutien ! A notre sortie en Jeep, la prochaine en triomphe (merci Ludo), aux prochaines courses, au dépassement de soi (je ne vais vraiment pas bien Mélanie... 🤔), à nos collaborations futures. J'espère pouvoir vous voir au Canada.

**Ludo**, autrement dit « papy », merci pour la formation de l'isolation des cardiomyocytes. L'élève a dépassée le maître non ? Merci pour les conseils de vie, le trépied et le vélo. Merci pour ton aide technique au labo quand on casse quelque chose (j'ai perdu la canule 😊). Je te souhaite de faire moins de 3h30, mais, accroches-toi. En tout cas, je t'attends avec la bière.

**Yves**, qui retrouve une jeunesse quand il sort avec nous, « on a qu'une vie ». Merci de nous avoir motivés à la course à pied. Désolée, je n'ai pas pris 15 kilos pendant la thèse, t'as perdu ton pari ! Tu détiens la palme d'or pour le sujet du groupe, tu auras compris 😊. Sien, à ton prochain anniversaire, on fera venir Marine ! Je te souhaite d'avoir un poste, parce que tu le mérites, t'es un champion !

Parce que dans la B13 family, il y a le “**bureau des Winners**”, vous ne saviez pas ça, c’est notre groupe Whats’app, oui, parce qu’on est des Winners ! A cette bande de 6, à mes libanaises préférées et mes amis ! A vous 5, merci d’avoir été mon défouloire pendant ces trois ans et merci de m’avoir écoutée (me plaindre, raler, non je dirais plutôt m’exprimer).

**Mallory**, la dernière arrivée dans ce groupe, et pas des moindres. Aussi appelée, Malolo, Pepe la tentatrice, Malo. Avec ton planning de ministre, j’espère pouvoir encore faire plein de sortie péniche avec toi ! Je te souhaite plein de bonnes choses pour ta thèse et une grande réussite, tu le mérites. Je serai toujours là pour te conseiller et t’aider, n’hésites pas. Merci de nous faire autant rire dans le bureau, ou même glousser par moment. Merci pour tous les cafés que tu m’as servis, les cellules que tu as repiquées et tous les blots que tu m’as faits !

**Maya**, la princesse, parce que j’adore t’embêter. Tu es tellement drôle à démarrer au quart de tour ! Merci d’avoir été présente ces dernières semaines d’écriture, et pour le départ des filles ! Heureusement que bébé Maya est encore là. A tous nos selfies et notre week-end à Bruxelles, merci pour les souvenirs. Tu es devenue Européenne « on va quand en péniche ? » 😊. Je te souhaite également une thèse réussie mais je ne me fais aucun souci. A toute à Beyrouth.

**Sally**, ma femme, tu sais quoi ? Tfou 3laikiiii ! Par où commencer ? A nos batailles de munitions, à nos Tfou 3laiki, et autres mots arabes que je ne citerai pas dans cette thèse (ahaha tu sais pourquoi). Merci de ta présence pendant ces trois années, à tous nos shawarma, nos pétages de cable dans le bureau, nos larmes à l’idée de ne plus se voir. A la prochaine, aux Seychelles, pour notre réunion annuelle. Majouni !  
🐱

**Zeina**, la force tranquille, Bhibbik Fara ! La plus calme du bureau, merci de nous avoir calmer quand il le fallait. A toutes nos parties de Dobble pour faire des pauses. Merci pour ta bienveillance, ta gentillesse, ta bonne humeur, et ton amitié. Tu es parfaite ! Merci pour tous ces bons repas préparés. Les filles, vous me manquez déjà trop ! A bientôt à Cambrige ! 🍕

A nos sorties, repas et week-end entre filles qui vont trop me manquer. A nos larmes de tristesse lors de ces différents départs. Les filles, on a traversé ça ensemble, vous êtes celles qui me comprennent le mieux. Merci pour toutes les corrections d’anglais. Oui les filles, j’aurai pu faire un effort et écrire en anglais mais maintenant, vous comprenez très bien le français ! ❤️

**Alex**, mon binôme de choc ! Je serai brève mais tu sais déjà tout ! Nous sommes deux étudiants en détresse qui resteront dans les annales pour le meilleur spectacle du repas de Noël en 2018. Merci de m’avoir écouté m’exprimer depuis que tu es en thèse. A toutes nos manip communes, à notre article qui sera bientôt publié et aux TP ensemble (tu me feras le plaisir de parler moins fort). **Claire**, j’essaie de lui faire changer de langage mais c’est trop dur ! A toi aussi, je souhaite une bonne fin de thèse (et oui tu vas entrer dans la 3<sup>ème</sup> année) mais je ne me fais aucun souci pour toi. Prends soin de **Maya**, **Mallory** et surtout, de **Claire** quand je ne serai plus là. 🐱

Merci à la B13 family pour ce que vous m’avez apporté pendant ces trois années, merci de m’avoir soutenue, conseillée, motivée, et aidée ! Comme son nom l’indique, vous êtes plus que des collègues, vous êtes une famille, des amis. Même si vous en avez douté (TRP quoi ?), en lisant cette thèse vous verrez que je n’ai pas travaillé sur une protéine inconnue 😊.

A la Master 2 family, à mes amis, **Arthur**, **Camille**, **Laure** et **Justine**. A nos moments en master 1 et surtout en master 2. A toutes nos sorties, soirées, anniversaires, mariages... Merci d’avoir été là ces cinq dernières années. Vous savez à quel point je vous aime et je suis fière de vous avoir ! **Arthur** et ses légendaires messages du dimanche soir. **Camille** et son insurmontable second degré. **Laure** et nos goûts

musicaux communs « Lean On » et **Justine** et ses gateaux à tomber par terre. Aux pièces rapportées, **Eric, Gaël, Anne-esther, Romain**, et mon amoureux **Raphaël**. Vous êtes plus que des +1, vous êtes devenus des amis ! A tous nos moments que nous allons partager.

Aux autres de Lyon Sud, **Florian** et sa gentillesse incomparable (non je déconne). **Agathe** et sa bonne humeur quoi qu'il arrive, même quand ses manips ne marchent pas. On t'a déjà dit **Agathe**, on t'accueille au B13 avec plaisir ! Surtout quand tu nous fais des gateaux.

A l'organisation de la JEDISS, **Violaine, Marine**, les anciennes présidentes, je vous souhaite de réussir pour vos projets futurs, **Violaine**, on se voit à Montréal ? **Romane**, occupes-toi bien des prochains étudiants 😊, Tic et Tac (**Julien** et **Johan**), qui est qui déjà ? Et tous les autres, je vous laisse l'organisation, je vous fais confiance vous allez gérer.

A mes amis de longue date, **Louise, Samuel, Basile** et **Victor**. Même si la distance fait que l'on ne se voit plus beaucoup, je vous aime toujours autant ! Merci pour nos week-end partagés ces dernières années (Marseille, Angers, Paris, Lyon) et notre fidèle soirée du mois d'Aout.

A toi, **Adèle**, qui a toujours été présente. Ça fait maintenant 24 ans qu'on se connaît, 24 ans que nous sommes amies. Je te serai à jamais reconnaissante.

A ma famille, en particulier, ma petite **maman**, qui malgré la distance m'a préparé de bons petits plats une semaine sur deux. Merci de me soutenir quoi qu'il arrive, même quand j'ai mon sale caractère. Merci pour ta présence. Je ne te le dis pas souvent, mais je t'aime ! A notre étoile ✨... Ma belle-famille, **Brigitte, Bruno, Fanny, Etienne, Fanny N** et **Romain**. Merci pour tous ces voyages et nos bons moments partagés tous ensemble. **Etienne** et **Fanny N**, désolée nous ne viendront pas à Stockholm, j'espère que vous ne nous en voudrez pas. **Fanny** et **Romain**, à bientôt à Niort, ou **Fanny**, au prochain concert de EdSheeran ? **Brigitte** et **Bruno**, à nos visites à Saint-Barthélemy d'Anjou, et tous les bons gateaux et confitures préparées. Merci à vous, tout simplement. Noël 2020 à Montréal ?

Et enfin, tu les attendais ces remerciements, à toi **Pierre**, qui partage ma vie depuis maintenant 9 ans. Ces trois dernières années n'étaient pas faciles, un à Nantes, l'autre à Lyon, mais malgré ça on n'a rien lâché et on a réussi ce pour quoi nous faisons ce sacrifice. On peut être fier de nous. Merci pour ta présence et ton soutien. Merci de me supporter au quotidien. Merci de partager ce nouveau projet avec moi, je sais que ça n'est pas facile. Je t'en serai éternellement reconnaissante. Je t'aime. ❤️

A ceux que je n'ai pas cité, mais à qui je pense très fort. Vous l'aurez probablement imaginé, c'était très dur de pas verser une petite larme en écrivant tout ça ! Parce que vous allez trop me manquer quand nous serons au Canada, mais c'est une belle aventure qui nous attend. Sachez-le, vous êtes les bienvenus ! Nous vous accueillerons à bras ouvert.

# Table des matières

.....	1
RESUME.....	1
ABSTRACT.....	2
REMERCIEMENTS.....	3
TABLE DES MATIERES.....	7
LISTE DES FIGURES.....	14
LISTE DES TABLEAUX.....	17
LISTE DES ABREVIATIONS.....	18
INTRODUCTION.....	1
<b>1- LA PHYSIOLOGIE DU MUSCLE CARDIAQUE.....</b>	<b>3</b>
1-1 LE CŒUR ET LA VASCULARISATION.....	3
1-2 LES CELLULES COMPOSANT LE MYOCARDE.....	5
1-3 LA CELLULE MUSCULAIRE CARDIAQUE.....	5
1-3.1 <i>Architecture cellulaire.....</i>	6
• <i>Le sarcolemme.....</i>	7
• <i>Le tubule transverse.....</i>	7
• <i>Le réticulum endo-sarcoplasmique.....</i>	7
• <i>Le noyau.....</i>	7
• <i>Le cytoplasme.....</i>	8
• <i>Les mitochondries.....</i>	8
• <i>Les myofibrilles et le sarcomère.....</i>	8
• <i>Autres organites.....</i>	9
1-4 PHYSIOLOGIE DE LA CONTRACTION CARDIAQUE.....	9
1-4.1 <i>Le couplage excitation-contraction.....</i>	9
1-5 LA SIGNALISATION CALCIQUE DANS LA CELLULE CARDIAQUE ET SA REGULATION.....	10
1-5.1 <i>Les Ca<sup>2+</sup>-binding proteins (CaBP).....</i>	11
• <i>La calmoduline.....</i>	12
• <i>La calcineurine et la calpaïne.....</i>	13
• <i>La troponine C.....</i>	13
• <i>Autres exemples de CaBP.....</i>	13
• <i>Les protéines tamponnant spécifiquement le Ca<sup>2+</sup> réticulaire.....</i>	13
➤ <i>La calséquestrine.....</i>	13
➤ <i>La calréticuline et la calnexine.....</i>	13
➤ <i>GRP78.....</i>	13
• <i>Conclusion.....</i>	14
1-5.2 <i>Les protéines localisées à la membrane plasmique permettant la régulation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique.....</i>	14
• <i>Les pompes plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase.....</i>	15
• <i>L'échangeur sodium/calcium.....</i>	15
• <i>Les récepteurs aux dihydropyridines.....</i>	16
1-5.3 <i>Les protéines à la membrane du réticulum sarcoplasmique permettant la régulation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique.....</i>	16
• <i>Les récepteurs à la ryanodine.....</i>	16
• <i>Les récepteurs inositol 1,4,5-trisphosphate.....</i>	18
• <i>Les pompes sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase.....</i>	18
• <i>Les canaux de fuite calcique.....</i>	19
1-5.4 <i>Les protéines à la membrane mitochondriale permettant la régulation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique.....</i>	19

•	<i>L'uniprot calcium mitochondrial (MCU)</i> .....	20
•	<i>L'échangeur sodium/calcium mitochondrial</i> .....	21
1-5.5	<i>Les enzymes dépendantes du Ca<sup>2+</sup></i> .....	21
1-5.6	<i>Les interactions réticulum sarcoplasmique-membrane plasmique : les SOCEs</i> .....	21
1-5.7	<i>Les interactions réticulum sarcoplasmique-mitochondrie : les MAMs</i> .....	22
•	<i>Les protéines présentes du réticulum sarcoplasmique</i> .....	24
•	<i>Les protéines présentes de la mitochondrie</i> .....	24
•	<i>Les protéines de soutien</i> .....	25
<b>2-</b>	<b>LA PHYSIOPATHOLOGIE DU MUSCLE CARDIAQUE</b> .....	<b>26</b>
2-1	LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES.....	26
2-1-1	<i>Incidence</i> .....	26
2-1-2	<i>Prévalence et contexte</i> .....	26
2-1-3	<i>Impact économique et prise en charge</i> .....	26
2-2	L'INFARCTUS DU MYOCARDE : DESCRIPTION.....	27
2-3	L'HYPOXIE ET SES CONSEQUENCES.....	29
2-4	LE PARADOXE DE LA REPERFUSION.....	30
2-5	LES DEREGULATIONS CALCIFIQUES AU COURS DE L'HYPOXIE/REOXYGENATION.....	31
2-5-1	<i>La surcharge calcique mitochondriale</i> .....	32
2-5-2	<i>Induction de la mort cellulaire dans le cytoplasme médiée par le calcium</i> .....	33
2-5-3	<i>Le stress du réticulum médié par la fuite calcique réticulaire</i> .....	34
•	<i>ATF6<math>\alpha</math></i> .....	35
•	<i>IRE1</i> .....	35
•	<i>PERK</i> .....	35
2-6	CONCLUSION.....	36
2-7	LES STRATEGIES DE CARDIOPROTECTION.....	36
2-7-1	<i>La prise en charge des patients</i> .....	36
2-7-2	<i>Les différents types de conditionnement</i> .....	37
•	<i>Le préconditionnement classique (PrC)</i> .....	37
•	<i>Les préconditionnements à distance</i> .....	38
•	<i>Le perconditionnement (PerC)</i> .....	38
•	<i>Le postconditionnement (PostC)</i> .....	39
•	<i>Les postconditionnements à distance</i> .....	39
2-7-3	<i>Bilan des stratégies de cardioprotection</i> .....	39
2-7-4	<i>Stratégies de cardioprotection au sein du laboratoire – l'histoire continue</i> .....	39
2-7-5	<i>Le réticulum endo-sarcoplasmique : une cible émergente dans l'ischémie-reperfusion cardiaque</i> 41	
<b>3-</b>	<b>LES CANAUX TRP</b> .....	<b>42</b>
3-1	DESCRIPTION ET ROLE SUCCINCT.....	42
3-1-1	<i>Les TRPC : Canoniques</i> .....	43
3-1-2	<i>Les TRPN : No mechanoreceptor potential C</i> .....	44
3-1-3	<i>Les TRPP : Polycystiques</i> .....	44
3-1-4	<i>Les TRPM : Mélastatines</i> .....	44
3-1-5	<i>Les TRPML : Mucolipines</i> .....	45
3-1-6	<i>Les TRPA : Ankyrines</i> .....	45
3-1-7	<i>Les TRPV : Vanilloïdes</i> .....	45
3-2	LES TRP DANS LE CŒUR.....	46
3-2-1	<i>Dans le nœud sinusal</i> .....	47
3-2-2	<i>Dans les oreillettes</i> .....	47
3-2-3	<i>Dans les ventricules</i> .....	47
3-2-4	<i>Dans les fibres de Purkinje, le système vasculaire et les cellules endothéliales</i> .....	48

3-2-5	<i>Dans les fibroblastes</i> .....	49
3-2-6	<i>Conclusion</i> .....	49
3-3	TRPV1 (TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID 1), DES DONNEES ACTUELLES SUR LE CANAL.....	49
3-3-1	<i>Description générale</i> .....	49
3-3-2	<i>Expression tissulaire de TRPV1</i> .....	51
3-3-3	<i>Localisation subcellulaire de TRPV1</i> .....	51
3-3-4	<i>Régulations de TRPV1</i> .....	52
	• Activation par la température.....	52
	• Activation par les protons .....	53
	• Activation par le voltage.....	53
	• Agonistes de TRPV1.....	53
	➤ Les agonistes endogènes .....	53
	➤ La caspaïcine.....	53
	➤ La résinifératoxine .....	54
	• Activation par les anesthésiques volatiles.....	54
	• Antagonistes de TRPV1 .....	54
	➤ Les antagonistes endogènes.....	55
	➤ La caspazépine, la 5'iodorésinifératoxine et le ruthénium red .....	55
3-3-5	<i>Rôles du canal ionique TRPV1</i> .....	56
	• Système nerveux .....	56
	• Muscle strié squelettique.....	56
3-3-6	<i>Implication du canal dans différentes pathologies</i> .....	56
	• L'obésité .....	57
	• Le diabète.....	57
	• Pathologies chroniques .....	57
	• L'hyperthermie maligne .....	57
3-3-7	<i>Implication de TRPV1 dans les maladies cardiovasculaires</i> .....	58
3-3-8	<i>Cardioprotection mais uniquement périphérique</i> .....	59
<b>HYPOTHESES</b> .....		<b>61</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....		<b>67</b>
<b>1- CELLULE CELLULAIRE DES CARDIOMYOBLATES DE RAT, DES HEK ET DES CARDIOMYOCYTES ADULTES DE SOURIS</b> .....		<b>69</b>
1-1	LA LIGNEE CELLULAIRE DE CARDIOMYOBLASTES DE RAT : LES CELLULES H9C2 .....	69
1-2	TEST DE SPECIFICITE DE L'ANTICORPS ANTI-TRPV1 : CREATION D'UNE LIGNEE STABLE HEK SUREXPRESSANT UN PLASMIDE HUMAIN TRPV1 COUPLE A MCHERRY .....	70
1-3	LES CARDIOMYOCYTES ADULTES DE SOURIS.....	70
1-3-1	<i>Technique d'isolation des cardiomyocytes</i> .....	70
<b>2- BIOLOGIE MOLECULAIRE</b> .....		<b>73</b>
2-1	TECHNIQUE DE TRANSFECTION PAR UN LIPOFACTANT SUR LES CELLULES H9C2.....	73
2-2	SEQUENCES DES SIRNA TESTES CONTRE LA PROTEINE TRPV1 .....	73
2-3	AMPLIFICATION DES PLASMIDES .....	73
2-4	EXTRACTION D'ARN.....	73
2-5	RT-PCR.....	74
2-6	AMPLIFICATION DES PLASMIDES .....	74
2-7	SELECTION DES CLONES .....	74
2-8	VALIDATION DES CLONES .....	75
2-9	UTILISATION D'ADENOVIRUS POUR LES CARDIOMYOCYTES ADULTES DE SOURIS .....	75
2-9-1	<i>Protocole pour rendre les bactéries compétentes</i> .....	75
2-9-2	<i>Insertion du plasmide ErGAP1, N33D1cpv et Ateam<sub>mito</sub> dans un plasmide V4</i> .....	76
2-9-3	<i>Création de l'adénovirus de la séquençage du plasmide obtenu, l'amplification du plasmide, la transformation en adénovirus, l'amplification de l'adénovirus à la titration</i> .....	76



<b>3-</b>	<b>IMAGERIE : MICROSCOPIE .....</b>	<b>77</b>
3-1	SONDES CHIMIQUES ET GENETIQUES UTILISEES .....	77
3-2	LA MICROSCOPIE .....	78
3-2-1	<i>Milieu de microscopie et les drogues utilisées.....</i>	78
3-2-2	<i>Microscope champ large .....</i>	79
	• La sonde chimique : Fura2-AM.....	80
	• Les sondes FRET : D4ER, 4mtD3CPV, N33D1cpv et Ateam <sub>mito</sub> .....	80
	• La sonde BRET : ErGAP1 .....	81
	• La sonde sépia : R-GECO.....	81
	• Les sondes pH.....	81
3-2-3	<i>Microscope confocal.....</i>	81
	• Immunofluorescence .....	81
	• Imagerie calcique .....	82
	• Transitoires calciques.....	82
3-2-4	<i>Mesure du pH intracellulaire.....</i>	83
<b>4-</b>	<b>IMAGERIE : CYTOMETRIE .....</b>	<b>84</b>
4-1	SEQUENCE D'HYPOXIE-REOXYGENATION .....	84
4-2	CYTOMETRIE .....	84
4-2.1	<i>Développement méthodologique sur des CMA en suspension .....</i>	85
4-2.2	<i>Sondes testées dans le modèle CMA .....</i>	85
4-2.3	<i>Mesure du potentiel de membrane en basal et de la mort cellulaire après H/R sur les cellules H9C2</i>	86
<b>5-</b>	<b>BIOCHIMIE.....</b>	<b>87</b>
5-1	FRACTIONNEMENT CELLULAIRE .....	87
5-2	WESTERN BLOT .....	88
5-2-1	<i>Extraction des protéines.....</i>	88
	• Protocole classique.....	88
	• Protocole pour les protéines membranaires.....	89
5-2-2	<i>Dosage des protéines et préparation des échantillons.....</i>	89
5-2-3	<i>Migration, transfert, blocage, anticorps et révélation.....</i>	89
5-3	IMMUNOFLUORESCENCE .....	90
5-3-1	<i>Sur cellules non fixées.....</i>	90
5-3-2	<i>Sur cellules fixées.....</i>	90
<b>6-</b>	<b>ELECTROPHYSIOLOGIE .....</b>	<b>92</b>
6-1	DIFFERENTS PRODUITS UTILISES.....	93
<b>7-</b>	<b>LES ETUDES <i>IN VIVO</i> PERMETTANT DE DETERMINER L'IMPACT DE LA MODULATION DE TRPV1 .....</b>	<b>94</b>
<b>7-1</b>	<b>CONDITIONS D'HEBERGEMENT ET ANIMAUX KO .....</b>	<b>94</b>
7-2	PROTOCOLE ETHIQUE.....	95
7-3	SEQUENCE MISE EN PLACE.....	95
7-4	PLANIMETRIE .....	96
<b>8-</b>	<b>LES ANALYSES STATISTIQUES .....</b>	<b>97</b>
<b>9-</b>	<b>IMPLICATION DES MEMBRES DU LABORATOIRE DANS LE PROJET DE THESE .....</b>	<b>97</b>
	<b>RESULTATS .....</b>	<b>100</b>
<b>1-</b>	<b>EXPRESSION ET LOCALISATION DE TRPV1 DANS LES CELLULES H9C2 .....</b>	<b>102</b>
1-1	EXPRESSION ET LOCALISATION DE TRPV1 DANS LES CELLULES H9C2 PAR WESTERN BLOT .....	102
1-1.1	<i>Mise au point de la fonctionnalité des anticorps, test de spécificité des anticorps anti-TRPV1 disponibles : utilisation de la lignée stable HEK-TRPV1 .....</i>	102



1-1.2	Western blot sur les cellules H9C2 .....	105
1-2	EXPRESSION DE TRPV1 DANS LES CELLULES H9C2 PAR RT-PCR .....	107
1-3	EXPRESSION ET LOCALISATION DE TRPV1 DANS LES CELLULES H9C2 PAR IMMUNOFUORESCENCE.....	107
1-3.1	Par surexpression de TRPV1 .....	107
1-3.2	Par immunofluorescence avec l'anticorps sélectioné : Abnova .....	108
1-4	EFFICACITE ET FONCTIONNALITE DES ARN INTERFERANT CIBLANT LE CANAL TRPV1, MISE AU POINT DE siRNA DE RAT	110
1-4.1	Vérification par RT-PCR.....	110
1-4.2	Vérification par Western blot .....	110
<b>2-</b>	<b>FONCTIONNALITE DE TRPV1 DANS LES CELLULES H9C2 .....</b>	<b>112</b>
2-1	MESURES DE CONCENTRATIONS $Ca^{2+}$ RETICULAIRE ( $[Ca^{2+}]_{RE}$ : ERGAP1.....	112
2-1-1	Dose réponse de CAP.....	112
2-1-2	Dose réponse de RTX.....	113
	.....	114
2-1-3	Incubation avec les antagonistes respectifs CPZ et iRTX .....	114
2-1-4	Effets a court terme de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques réticulaires.....	115
2-2	MESURES DES CONCENTRATIONS $Ca^{2+}$ CYTOSOLIQUES ( $[Ca^{2+}]_c$ ) : FURA2-AM.....	118
2-2-1	Effets aigus de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques cytosoliques	118
	.....	119
2-2-2	Effets à court terme de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques cytosoliques .....	119
2-3	MESURES DES CONCENTRATIONS $Ca^{2+}$ MITOCHONDRIALES ( $[Ca^{2+}]_{MITO}$ ) : R-GECO ET 4MTD3CPV.....	121
2-3-1	R-GECO.....	122
	• Effets aigus de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques mitochondriaux. ....	122
	• Effets à court terme de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques mitochondriaux.	123
2-3-2	4mtD3CPV.....	124
	• Effets aigus de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques mitochondriaux. ....	124
	• Effets à court terme de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques mitochondriaux.	124
2-4	MESURES DES CONCENTRATIONS DU $Ca^{2+}$ DANS LES HOT SPOT MITOCHONDRIAUX ( $[Ca^{2+}]_{HOT SPOT}$ ) : N33D1CPV .....	127
2-5	CONCLUSION DES EFFETS AIGUS ET A COURT TERME DE LA MODULATION PHARMACOLOGIQUE DE TRPV1 SUR LES STOCKS CALCIQUES INTRACELLULAIRES .....	130
2-6	MESURE DU pH INTRACELLULAIRE DES CELLULES H9C2 .....	130
2-7	MESURE DU POTENTIEL DE MEMBRANE ET DE LA MORTALITE CELLULAIRE SUITE A UN TRAITEMENT A COURT TERME VISANT TRPV1	132
<b>3-</b>	<b>EFFETS DE LA MODULATION DE TRPV1 SUR LA MORTALITE DES CELLULES H9C2 APRES UNE SEQUENCE D'HYPOXIE-REOXYGENATION .....</b>	<b>133</b>
3-1	EFFET DU CHANGEMENT DE MILIEU AU MOMENT DE LA REPERFUSION ET DU VEHICULE : DMSO .....	133
3-2	MODULATION DE TRPV1 AU COURS DE LA NORMOXIE .....	134
3-3	EFFET DU CONDITIONNEMENT AVEC LA CAPSAÏCINE .....	135
3-4	EFFET DU CONDITIONNEMENT AVEC LA CAPSAZEPINE.....	135
3-5	EFFET DU CONDITIONNEMENT AVEC LA RESINIFERATOXINE.....	136
3-6	EFFET DU CONDITIONNEMENT AVEC LA 5'-IODORESINIFERATOXINE .....	136
3-7	CONCLUSION DE L'EFFET DE LA MODULATION DE TRPV1 SUR LA MORTALITE DES CELLULES H9C2 APRES UNE SEQUENCE D'HYPOXIE-REOXYGENATION .....	137
<b>4-</b>	<b>ROLE DE TRPV1 DANS LES CARDIOMYOCYTES PRIMAIRES ADULTES DE SOURIS : SUITE D'UNE THESE PREALABLEMENT SOUTENUE AU LABORATOIRE .....</b>	<b>138</b>
4-1	EXPRESSION DE TRPV1 DANS LES CMA .....	138
4-1-1	RT-PCR.....	138
4-2	FONCTIONNALITE DE TRPV1 DANS LES CMA .....	139

4-2-1	<i>Imagerie calcique</i> .....	139
•	Mesure de la $[Ca^{2+}]$ réticulaire au cours de la stimulation de TRPV1 sur des CMA WT et KO : Fluo-5N AM ..	139
•	Mesure du $Ca^{2+}$ réticulaire : D4ER .....	140
4-2.2	<i>Transitoires calciques</i> .....	141
4-2.3	<i>Électrophysiologie</i> .....	142
•	Mesure des potentiels d'action.....	143
•	Mesure des courants calciques de type L.....	143
•	Mesure du courant NCX .....	144
<b>5-</b>	<b>DONNEES PRELIMINAIRES <i>IN VIVO</i></b> .....	<b>145</b>
<b>6-</b>	<b>DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE DES CMA EN SUSPENSION APRES UNE HYPOXIE-REOXYGENATION</b> .....	<b>145</b>
	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>146</b>
<b>1-</b>	<b>HYPOTHESE DE TRAVAIL</b> .....	<b>148</b>
<b>2-</b>	<b>RESULTATS PRELIMINAIRES OBTENUS SUR LES CARDIOMYOCYTES ADULTES DE SOURIS</b> .....	<b>148</b>
<b>3-</b>	<b>DISCUSSION DES RESULTATS DE CETTE ETUDE</b> .....	<b>149</b>
3-1	MODELE UTILISE .....	149
3-2	LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE TRPV1.....	150
3-3	FONCTIONNALITE DE TRPV1.....	150
3-3.1	<i>Différences de réponse entre CAP et RTX sur la <math>[Ca^{2+}]</math> réticulaire</i> .....	151
3-3.2	<i>Résultats obtenus pour la <math>[Ca^{2+}]</math> dans les différents compartiments</i> .....	153
•	Effets aigus de l'activation pharmacologique de TRPV1 .....	153
•	Effets à court terme de la modulation pharmacologique de TRPV1 .....	154
➤	Mesures des concentrations $Ca^{2+}$ réticulaires.....	154
➤	Mesures des concentrations $Ca^{2+}$ cytosoliques.....	154
➤	Mesures des concentrations $Ca^{2+}$ mitochondriales.....	155
➤	Mesures des concentrations $Ca^{2+}$ dans les hot spots mitochondriaux.....	155
3-3.3	<i>TRPV1 et mesure de la [ATP] mitochondriale</i> .....	155
3-3.4	<i>Absence d'effet de TRPV1 sur le potentiel de membrane mitochondrial</i> .....	156
3-4	ROLE DE TRPV1 LORS DE DE L'HYPOXIE-REOXYGENATION DES CELLULES H9C2 .....	156
3-5	CONCLUSION .....	157
<b>4-</b>	<b>LES ADENOVIRUS, UN COMPROMIS ENTRE LES DEUX MODELES, LIGNEE H9C2 ET CARDIOMYOCYTES PRIMAIRES ?</b> .....	<b>158</b>
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>160</b>
<b>1-</b>	<b>BILAN DES RESULTATS</b> .....	<b>162</b>
<b>2-</b>	<b>PERSPECTIVES DE L'ETUDE</b> .....	<b>163</b>
2-1	SUITE DES TRAVAUX SUR LA LIGNEE H9C2.....	163
2-1.1	<i>Poursuite de la localisation subcellulaire de TRPV1</i> .....	163
2-1.2	<i>Activation de potentielle de TRPV1 par l'acidose induite par l'hypoxie-réoxygénation</i> .....	163
2-1.3	<i>Roles de TRPV1 dans la synthèse d'ATP mitochondriale</i> .....	164
2-1.4	<i>Une autre lignée cellulaire d'intérêt ?</i> .....	164
2-2	PERSPECTIVES DE RECHERCHE SUR LE MODELE CARDIOMYOCYTES PRIMAIRES DE SOURIS. ....	164
2-2.1	<i>Caractérisation des cardiomyocytes primaires de souris WT et KO TRPV1</i> .....	164
2-2.2	<i>Etude de TRPV1 en cytométrie en flux</i> .....	164
2-3	EXPERIMENTATIONS <i>IN VIVO</i> DU ROLE DE TRPV1 DANS L'ISCHEMIE-REPERFUSION CARDIAQUE. ....	165
<b>ANNEXE 1</b>	.....	<b>172</b>
<b>ANNEXE 2</b>	.....	<b>173</b>
<b>ANNEXE 3</b>	.....	<b>174</b>

**ANNEXE 4 ..... 175**  
**ANNEXE 5 ..... 176**  
**ANNEXE 6 ..... 177**  
**ANNEXE 7 ..... 178**

## Liste des figures

Figure 1. Organisation structurelle interne du cœur. ....	3
Figure 2. Les différents types de tissus composant le myocarde. ....	4
Figure 3. Les artères coronaires. ....	4
Figure 4. L'organisation des différentes cellules myocardiques. ....	5
Figure 5. Cardiomyocytes adulte de souris. ....	6
Figure 6. Structure d'une cellule cardiaque. ....	6
Figure 7. Organisation d'un sarcomère. ....	9
Figure 8. Le couplage excitation-contraction au sein des cardiomyocytes. ....	10
Figure 9. La signalisation calcique dans la cellule cardiaque. ....	11
Figure 10. Les différents types de régulation du $Ca^{2+}$ sur ses effecteurs. ....	12
Figure 11. Structure des différents canaux impliqués dans la régulation du $Ca^{2+}$ cytosolique. ....	14
Figure 12. Evolution spatio-temporelle du $Ca^{2+}$ au cours de la contraction. ....	17
Figure 13. Structure du MCU. ....	20
Figure 14. Processus de réapprovisionnement de $Ca^{2+}$ dans le RS. ....	22
Figure 15. Structure et fonction des interactions RE-mitochondrie. ....	23
Figure 16. Libération de $Ca^{2+}$ entre le RS et la mitochondrie : rôle des MAMs. ....	23
Figure 17. Zoom sur le transfert calcique entre le RE et la mitochondrie. ....	24
Figure 18. Infarctus du myocarde. ....	28
Figure 19. Lésions d'ischémie-reperfusion. ....	28
Figure 20. Zone à risque et zone nécrosée. ....	29
Figure 21. Conséquences de l'ischémie et de la reperfusion au niveau cellulaire. ....	31
Figure 22. Conséquences d'un arrêt de l'approvisionnement en $O_2$ sur le cardiomyocyte. ....	31
Figure 23. Organisation hypothétique du mPTP. ....	32
Figure 24. Activation des caspases après libération du cytochrome c. ....	34
Figure 25. Les trois voies de signalisation impliquées dans la réponse UPR. ....	35
Figure 26. Stress du réticulum et impact sur la mort cellulaire. ....	36
Figure 27. Les différentes stratégies de cardioprotection. ....	37
Figure 28. La grande famille des TRPs. ....	42
Figure 29. Structure commune aux TRPs. ....	43
Figure 30. Structure spécifique de TRPs. ....	46
Figure 31. Structure de TRPV1. ....	50
Figure 32. Structure détaillée de TRPV1. ....	50
Figure 33. Structure des principaux régulateurs de TRPV1. ....	54
Figure 34. Structure des principaux inhibiteurs de TRPV1. ....	55
Figure 35. Implication de TRPV1 dans l'hyperthermie maligne. ....	58
Figure 36. Hypothèse de travail et implication du canal TRPV1. ....	64
Figure 37. Photo de microscopie optique des cellules H9C2. ....	69
Figure 38. Colonnes de dissociation des cardiomyocytes. ....	70
Figure 39. Principe du FRET. ....	80
Figure 40. Les différents conditionnements utilisés. ....	84
Figure 41. Répartition des groupes de souris dans le projet in vivo. ....	97
Figure 42. Photos prises au microscope confocal des différents clones de TRPV1-mCherry dans les HEK. ....	102
Figure 43. Courbe de réponse à la CAP après chargement au Fura2-AM sur les cellules HEK-293. ....	103
Figure 44. Expression de TRPV1 sur les différents clones HEK-TRPV1. ....	104
Figure 45. Expression de TRPV1 dans les cellules HEK-TRPV1. ....	104
Figure 46. Vérification de la pureté des fractions mitochondriales. ....	105
Figure 47. Vérification de la pureté des fractions réticulaires. ....	106
Figure 48. Expression et localisation de TRPV1 dans les cellules H9C2 par Western blot. ....	106

Figure 49. RT-PCR à partir d'échantillons de cerveau, de DRG, de cœur et de cellules H9C2. ....	107
Figure 50. Localisation de TRPV1-mCherry dans les cellules H9C2. ....	108
Figure 51. Localisation de TRPV1-mCherry dans les cellules H9C2. ....	108
Figure 52. Immunomarquage TRPV1 et IP3R.....	109
Figure 53. Immunomarquage TRPV1 et GRP75.....	109
Figure 54. Amplification de la PCR en temps réel afin d'évaluer l'efficacité des différents siRNA contre TRPV1. ....	110
Figure 55. Test de l'efficacité des siRNA dernièrement designés.....	111
Figure 56. Évolution de la concentration du Ca <sup>2+</sup> réticulaire ([Ca <sup>2+</sup> ] <sub>RE</sub> ) lors d'une stimulation avec la CAP, agoniste de TRPV1.....	113
Figure 57. Évolution de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>RE</sub> lors d'une stimulation avec la RTX, agoniste de TRPV1. ....	114
Figure 58. Évolution de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>RE</sub> lors d'un prétraitement avec les antagonistes de TRPV1. ....	115
Figure 59. Évolution de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>RE</sub> lors d'un prétraitement avec CAP, CPZ ou les deux en même temps. ....	116
Figure 60. Évolution de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>RE</sub> lors d'un prétraitement avec RTX, iRTX ou les deux en même temps. ....	117
Figure 61. Évolution de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> lors d'une stimulation avec la CAP et la RTX. ....	118
Figure 62. Évolution de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> lors d'un prétraitement avec CAP, CPZ ou les deux en même temps. ....	119
Figure 63. Évolution de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> lors d'un prétraitement avec RTX, iRTX ou les deux en même temps. ....	120
Figure 64. Évolution de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>mito</sub> au cours du temps avec la sonde R-GECO lors d'une stimulation avec la CAP ou la RTX.....	122
Figure 65. Évolution de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>mito</sub> (R-GECO) lors d'un prétraitement avec la CAP ou la CPZ.....	123
Figure 66. Évolution de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>mito</sub> au cours du temps avec la sonde 4mtD3CPV.....	124
Figure 67. Évolution de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>mito</sub> lors d'un prétraitement avec CAP, CPZ ou les deux en même temps. ....	125
Figure 68. Évolution de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>mito</sub> lors d'un prétraitement avec RTX, iRTX ou les deux en même temps. ....	126
Figure 69. Évolution de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>hot spot</sub> au cours du temps avec la sonde N33D1cpv.....	127
Figure 70. Évolution de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>hot spot</sub> lors d'un prétraitement avec CAP, CPZ ou les deux en même temps.....	128
Figure 71. Évolution de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>hot spot</sub> lors d'un prétraitement avec RTX, iRTX ou les deux en même temps.....	129
Figure 72. Évolution du pH intracellulaire en fonction du temps avec la sonde BCECF. ....	131
Figure 73. Mesure de la mortalité cellulaire et du potentiel de membrane mitochondrial après incubation de 30 minutes avec les différentes molécules pharmacologiques modulant TRPV1.....	132
Figure 74. Effet d'un changement de milieu au moment de la reperfusion et de l'hypoxie seule sur la mortalité cellulaire après une séquence d'hypoxie/réoxygénation. ....	133
Figure 75. Effet du véhicule (DMSO) sur la mortalité cellulaire après une séquence d'hypoxie/réoxygénation. ....	134
Figure 76. Effet de l'incubation de la CAP et la CPZ au cours de la normoxie sur la mortalité cellulaire après une séquence d'hypoxie/réoxygénation.....	134
Figure 77. Effet du conditionnement avec la CAP sur la mortalité cellulaire après une hypoxie/réoxygénation évalué par iodure de propidium par cytométrie en flux. ....	135
Figure 78. Effet du conditionnement avec la CPZ sur la mortalité cellulaire après une hypoxie/réoxygénation évalué par iodure de propidium par cytométrie en flux. ....	135
Figure 79. Effet du conditionnement avec la RTX sur la mortalité cellulaire après une hypoxie/réoxygénation évalué par iodure de propidium par cytométrie en flux. ....	136
Figure 80. Effet du conditionnement avec la iRTX sur la mortalité cellulaire après une hypoxie/réoxygénation évalué par iodure de propidium par cytométrie en flux. ....	136

Figure 81. Amplification de la PCR en temps réel afin d'évaluer le niveau d'expression de TRPV1.	138
Figure 82. Évolution de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ lors de la vidange du RE.	139
Figure 83. Évolution de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ lors de la vidange du RE.	140
Figure 84. Représentation d'un train de transitoires calciques obtenu avec une fréquence de stimulation à 1 Hz et illustration de la mesure des transitoires calciques.	141
Figure 85. Nuage de points représentant les différents paramètres mesurés au cours des transitoires calciques.	142
Figure 86. Mesure des potentiels d'action des CMA WT et KO TRPV1.	143
Figure 87. Courants calciques de type L des cardiomyocytes WT et KO TRPV1.	144
Figure 88. Mesure du courant NCX sur les CMA WT et TRPV1 KO.	144
Figure 89. Différence de structure entre la CAP et la RTX.	151
Figure 90. Positionnement hypothétique de TRPV1 sur la membrane plasmique et sur la membrane du RE.	152
Figure 91. Zoom sur l'effet de la modulation de TRPV1 sur le contenu calcique des différents compartiments cellulaires des cellules H9C2	162

## Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux activateurs et inhibiteurs de TRPV1. Liste non exhaustive.....	52
Tableau 2. Conditions d'ensemencement des cellules H9C2 en fonction des expériences réalisées ....	69
Tableau 3. Composition du tampon de perfusion.....	71
Tableau 4. Composition de la collagénase II.....	71
Tableau 5. Composition du tampon de "Stopping".....	71
Tableau 6. Composition du milieu de culture pour cardiomyocytes adultes de souris : MEM complet	72
Tableau 7. Liste des différents siRNA testés sur les cellules H9C2.....	73
Tableau 8. Liste des amorces pour TRPV1.....	74
Tableau 9. Liste des sondes chimiques et génétiques utilisées dans les H9C2, et les CMA.....	78
Tableau 10. Liste des sondes utilisées pour l'immunofluorescence sur cellules non fixées.....	78
Tableau 11. Composition du tampon EB 10X.....	78
Tableau 12. Composition du Calcium Containing Buffer (CCB).....	79
Tableau 13. Composition du Calcium Free Buffer (CFB).....	79
Tableau 14. Liste des différentes drogues utilisées pour l'imagerie.....	79
Tableau 15. Liste des anticorps secondaires fluorescents utilisés.....	82
Tableau 16. Field Stimulation Buffer, solution stock, pH = 7.4.....	83
Tableau 17. Field Stimulation Buffer, solution finale.....	83
Tableau 18. Composition des milieux pour la calibration du pH intracellulaire.....	83
Tableau 19. Composition du tyrode.....	84
Tableau 20. Liste des sondes testées sur les CMA.....	86
Tableau 21. Composition des solutions utilisées dans le protocole de fractionnement cellulaire.....	88
Tableau 22. Composition du RIPA non complet.....	88
Tableau 23. Préparation de la gamme étalon.....	89
Tableau 24. Composition des gels de séparation et concentration.....	89
Tableau 25. Liste des anticorps utilisés pour le WesternBlot.....	90
Tableau 26. Milieu physiologique de type extracellulaire.....	92
Tableau 27. Milieu physiologique de type intracellulaire pour l'enregistrement du PA.....	92
Tableau 28. Milieu physiologique de type intracellulaire pour l'enregistrement des courants calciques de type L.....	92
Tableau 29. Composition de la solution extracellulaire pour mesure des courants calciques de type L.....	93
Tableau 30. Liste des molécules pharmacologiques utilisées dans la partie Résultats.....	93
Tableau 31. Les différentes étapes du cycle de PCR pour le génotypage.....	94
Tableau 32. Implication des membres du laboratoire dans le projet de thèse.....	98
Tableau 33. Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors de la modulation de TRPV1 sur la [Ca <sup>2+</sup> ] cytotique, réticulaire, mitochondriale et dans les hot spots mitochondriaux.....	153
Tableau 34. Liste des étudiants encadrés au cours de ma thèse.....	177

## Liste des abréviations

Acétyl CoA	Acétyl-Coenzyme A
AM	Acetoxymethyl
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
ANT	Adenine nucleotide translocator
ATF6	Activating transcription factor 6
ATG5	Autophagy related 5
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BMP8b	Bone morphogenetic protein 8B
BRET	Bioluminescence resonance energy transfer
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaBP	Calcium Binding Protein
CaM	Calmoduline
CaMK	Calmoduline Kinase
CAP	Capsaicin
Ca <sub>v</sub>	Canaux Ca <sup>2+</sup> voltage-dépendants
CBE	Cl-/HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> exchange
CCB	Calcium Containing Buffer
CEC	Couplage excitation-contraction
CFB	Calcium Free Buffer
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CHE	Cl-/OH <sup>-</sup> exchange
CHOP	CCAAT/enhancer-binding homologous protein
CICR	Calcium-induced Calcium release
CMA	Cardiomyocytes adultes de souris
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CPZ	Capsazepin
CsA	Cyclosporin A
cTnC	Troponine C cardiaque
CyD	Cyclophylin D
DAP	Demande d'autorisation de Projet
DHPR	Récepteur aux dihydropyridines
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité Optique
DRG	Dorsal Root Ganglion
EB	Experimental Buffer
eIF2 $\alpha$	eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$
EMRE	Essential MCU regulator
Erk1/2	Extracellular signal-regulated kinases
FADH <sub>2</sub>	Flavine adénine dinucléotide forme réduite
FKBP12.6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1B
FRET	Förster resonance energy transfer



GAPDH	D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GRP	Glucose-regulated Protein
GSK3 $\beta$	Glycogène synthase kinase 3 beta
HCN-4	Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4
HEK	Human Embryonic Kidney
HM	Hyperthermie Maligne
HR	Hypoxie-reoxygénation
I/R	Ischémie-reperfusion
IDM	Infarctus du myocarde
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IP3R	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
IRE1	Inositol-requiring kinase 1
iRTX	5'-Iodoresiniferatoxin
IVA	Artère intraventriculaire antérieure
JAK	Janus Kinase
K <sup>+</sup>	Potassium
K <sub>v</sub>	Canaux K <sup>+</sup> voltage-dépendants
LB	Lysogeny Broth
LDL	Low-density Lipoprotein
MAM	Mitochondria-associated ER membranes
MCT	Monocarboxylate transporter
MCU	Mitochondrial Ca <sup>2+</sup> uniporter
MCV	Maladies CardioVasculaires
MEK1/2	Mitogen-activated protein kinase kinase
MEM	Minimum Essential Medium
Mg <sup>2+</sup>	Magnésium
mPTP	Mitochondria Permability transition pore
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
N <sub>2</sub>	Azote
Na <sup>+</sup>	Sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide forme réduite
Na <sub>v</sub>	Canaux Na <sup>+</sup> voltage-dépendants
NBC	Na <sup>+</sup> -HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> cotransport
NCLX	Mitochondrial Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchanger
NCX	Sodium-calcium exchanger
NF $\kappa$ -B	Nuclear factor-kappa B
NHE	Sodium-proton exchanger
NO	Nitric Oxide
O <sub>2</sub>	Dioxygène
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Potentiel d'Action
PBS	Phosphate buffered saline
PC-1	Polycystine-1
PC-2	Polycystine-2

PerC	Perconditionnement
PERK	dsRNA-activated protein kinase-like ER kinase
PGC-1a	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-a
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKD	Polycystic Kidney Disease
PKG	Protéine kinase G
PLB	Phospholamban
PMCA	Plasma membrane Ca <sup>2+</sup> ATPase
PostC	Postconditionnement
PPARg	Peroxisome proliferator-activated receptor g
PRDM16	PR domain containing 16
PréC	Préconditionnement
PSA	Prostate Specific Antigen
RE	Réticulum endoplasmique
RISK	Reperfusion injury salvage kinase
ROCE	Receptor-Operated Ca <sup>2+</sup> entry
ROS	Reactive Oxygen Species
RS	Réticulum sarcoplasmique
RTX	Resiniferatoxine
RyR	Ryanodine Receptor
SAFE	Survivor activating factor enhancement
SARAF	SOCE-associated regulatory factor
SB	Stopping Buffer
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> /ATPase
SOC	Super Optimal Medium
SOCE	Store Operated Ca <sup>2+</sup> entry
SP	Substance P
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
STIM	STromal Interaction Molecule 1
TG	Thapsigargin
TM	Transfection medium
TNF	Tumor necrosis factor
TOM	Translocase outer mitochondrial membrane
TRP	Transient Receptor Potential
TRPA	Transient Receptor Potential Ankyrin
TRPC	Transient Receptor Potential Canonical
TRPM	Transient Receptor Potential Melastatin
TRPML	Transient Receptor Potential Mucolipin
TRPN	Transient Receptor Potential NompC
TRPP	Transient Receptor Potential Polycystin
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1
TSPO	Translocase 18 kDa
UCP-1	Uncoupling protein 1
UPR	Unfolded protein response

VDAC	Voltage-dependent Anion Channel
VRL-1	Vanilloid-receptor-like protein1
XBP1	X-box binding protein 1
ZN	Zone nécrosée
ZR	Zone à risque



# Introduction

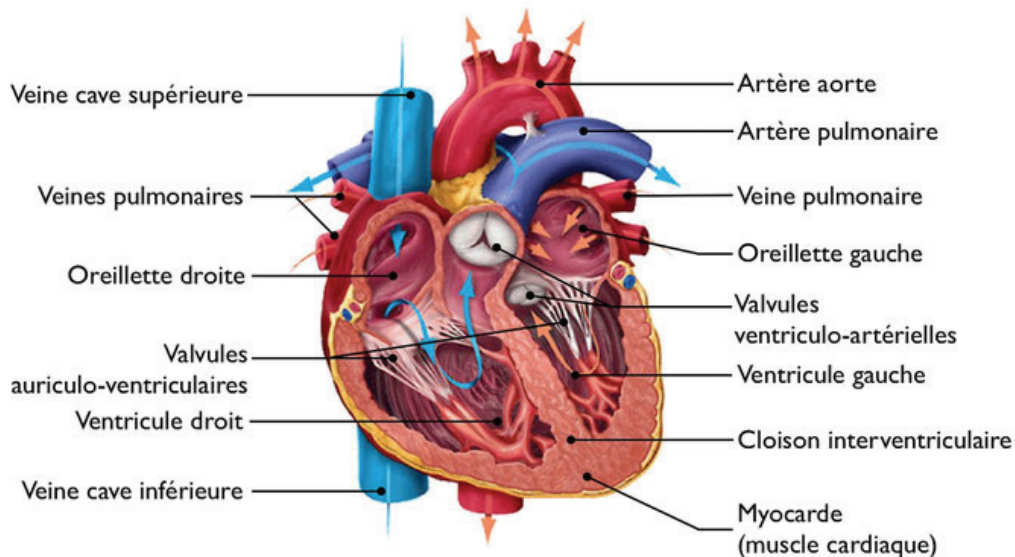


# 1- La physiologie du muscle cardiaque

## 1-1 Le cœur et la vascularisation

Localisé dans le médiastin, le cœur est un organe musculaire ayant deux grandes fonctions : collecter le sang des tissus et des autres organes, et le pomper vers les poumons (circulation pulmonaire), mais également de collecter le sang des poumons afin de l'envoyer vers les autres tissus (circulation systémique). Le rôle principal du cœur est d'approvisionner les organes et tissus en dioxygène ( $O_2$ ) et en nutriments et de permettre l'élimination des déchets métaboliques (le dioxyde de carbone ( $CO_2$ ), lactate...).

Le cœur, organe central de par sa localisation et son rôle, est composé de quatre cavités (oreillette droite et gauche, ventricule droit et gauche)<sup>1</sup>. Comme le montre la figure 1, la séparation entre les oreillettes et les ventricules est délimitée par les valves auriculo-ventriculaires. Les valves ventriculo-artérielles vont, quant à elles, séparer le ventricule droit de l'artère pulmonaire et le ventricule gauche de l'aorte. La cloison interventriculaire permet la séparation entre les deux ventricules.

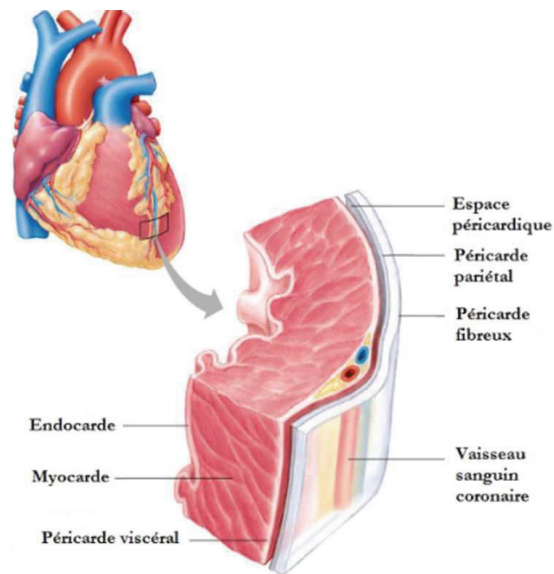


**Figure 1.** Organisation structurelle interne du cœur.

Source : <https://clercsvt.jimdo.com/lycee/seconde-2nde/fonctionnement-de-l-organisme-et-effort-physique/>

Les veines caves supérieures et inférieures vont drainer le sang désoxygéné provenant des organes et tissus situés au-dessus et en dessous du diaphragme, respectivement, vers l'oreillette droite. Les veines pulmonaires vont transporter le sang riche en oxygène des poumons vers l'oreillette gauche. Enfin, l'artère aorte va drainer le sang riche en oxygène vers les différents organes et tissus, et l'artère pulmonaire va transporter le sang pauvre en oxygène vers les poumons.

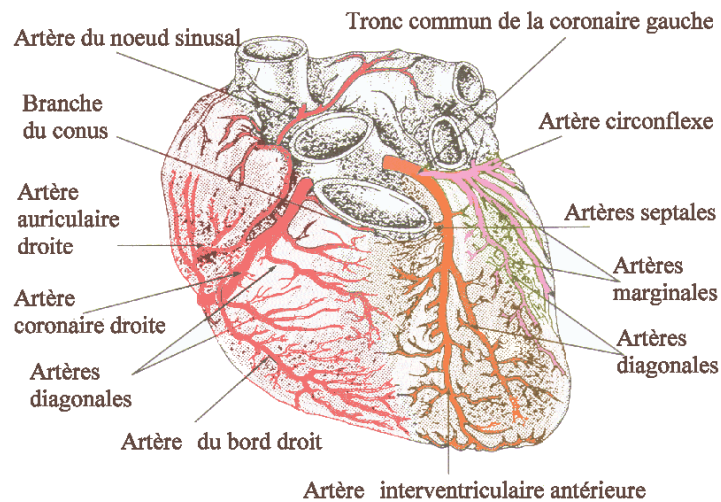
Concernant le muscle myocardique en lui-même, et sa structure macroscopique (figure 2), il est composé de différents feuillets : l'endocarde, le myocarde et le péricarde. Le péricarde est le sac fibreux dans lequel le cœur est contenu. La couche du péricarde la plus proche du cœur est le péricarde séreux, composé de l'épicarde (aussi appelé péricarde viscéral), de l'espace péricardique et du feuillet pariétal. Le feuillet le plus superficiel est le péricarde fibreux.



**Figure 2.** Les différents types de tissus composant le myocarde.

Source : <https://naturolistique.fr/le-tissu-du-myocarde/>

Les artères qui vont approvisionner le cœur en oxygène et en nutriments sont les artères coronaires. Il en existe plusieurs types ayant des différents noms en fonction de leur localisation, comme illustré sur la figure 3<sup>2</sup>. Ces artères, lorsqu'elles sont occluses, notamment l'artère intraventriculaire antérieure (IVA) sont peut-être entraîner des pathologies telles que l'infarctus du myocarde. Ce mécanisme sera plus précisément décrit dans la partie 2-2.



**Figure 3.** Les artères coronaires.

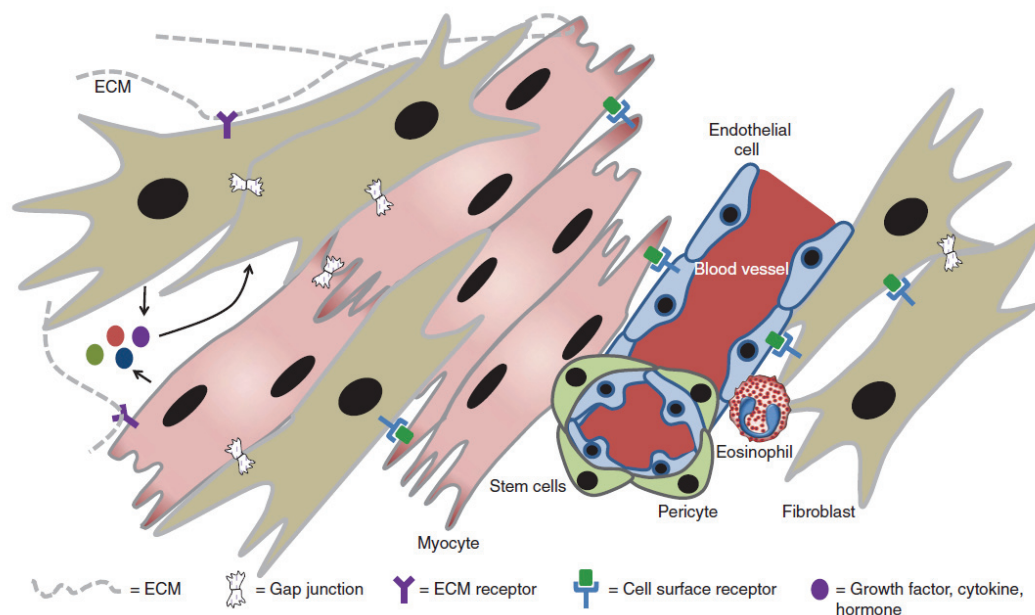
Source : <http://foulon.chez-alice.fr/Alie%202.000/DATAS/MODULE1/ArtCoro.htm>

Afin de mieux comprendre les conséquences délétères de l'IDM détaillées ultérieurement (paragraphe 2-3 et 2-4), les différentes cellules composant le myocarde seront brièvement décrites dans le paragraphe suivant seules les cellules musculaires cardiaques seront abordées en détail. Cette articulation de présentation a pour but de mieux appréhender l'approche cellulaire de la physiopathologie de l'IDM.



## 1-2 Les cellules composant le myocarde

Au sein du muscle cardiaque, il existe différents types de cellules (Figure 4). En effet, il est connu que chez le rat, le cœur est composé d'environ 30% de cardiomyocytes<sup>3</sup>, occupant 70 à 85% du volume total du cœur<sup>4</sup>. Le reste des cellules est appelé cellules « non-myocytes », de plus petite taille et s'insérant entre les cardiomyocytes. Parmi celles-ci, on dénombre 60% de cellules endothéliales, 5 à 10 % de cellules souches hématopoïétiques et 20 % de fibroblastes. Ces valeurs peuvent être modulées en fonction des espèces. Chez la souris, il y a ainsi davantage de cardiomyocytes (54%) et moins de fibroblastes (26%)<sup>5</sup>. Chez l'Homme, les proportions respectives ont été établies à partir de sections histologiques : les cardiomyocytes représentent 18%, les cellules endothéliales 24% et les cellules mésenchymateuses 58% du nombre total de cellules. A noter également que le nombre de cellules non-myocytes varie en fonction de l'âge<sup>6</sup>.



**Figure 4.** L'organisation des différentes cellules myocardiques

Source : Cardiac fibroblast physiology and pathology. D Dostal *et al.* 2015

Si certes les stratégies de cardioprotection visent à diminuer la mortalité cellulaire de tous les types cellulaires, la plupart se focalisent en priorité sur les cardiomyocytes dans le but de préserver l'activité contractile du cœur. C'est pourquoi, la suite de mon introduction sera centrée sur les cardiomyocytes et sur l'homéostasie calcique (déterminant de la contraction cardiaque).

## 1-3 La cellule musculaire cardiaque

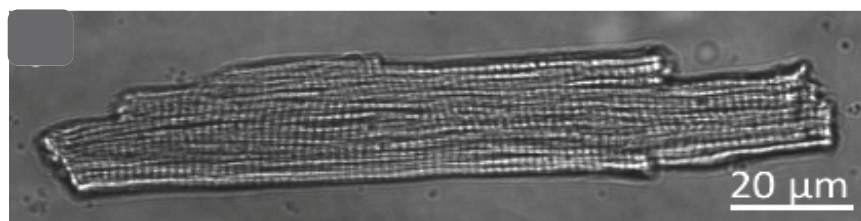
Au sein du myocarde, il existe trois types de cellules musculaires cardiaques<sup>7</sup> :

- Les cardiomyocytes contractiles présents dans les ventricules et les oreillettes, ces cellules seront décrites dans cette partie.
- Les cellules myoendocrines, pauvres en myofibrille vont sécréter le facteur natriurétique auriculaire (ANF). Cette hormone est impliquée dans la régulation de la pression artérielle. En effet, elle va augmenter la natriurèse (concentration de sodium dans les urines) et diminue la pression sanguine.

- Les cellules cardionectrices, elles sont pauvres en myofibrille et constituent le système cardionecteur du myocarde. Elles vont initier l'excitation et sa conduction à travers le muscle cardiaque. Elles comprennent les cellules nodales et les cellules de Purkinje.

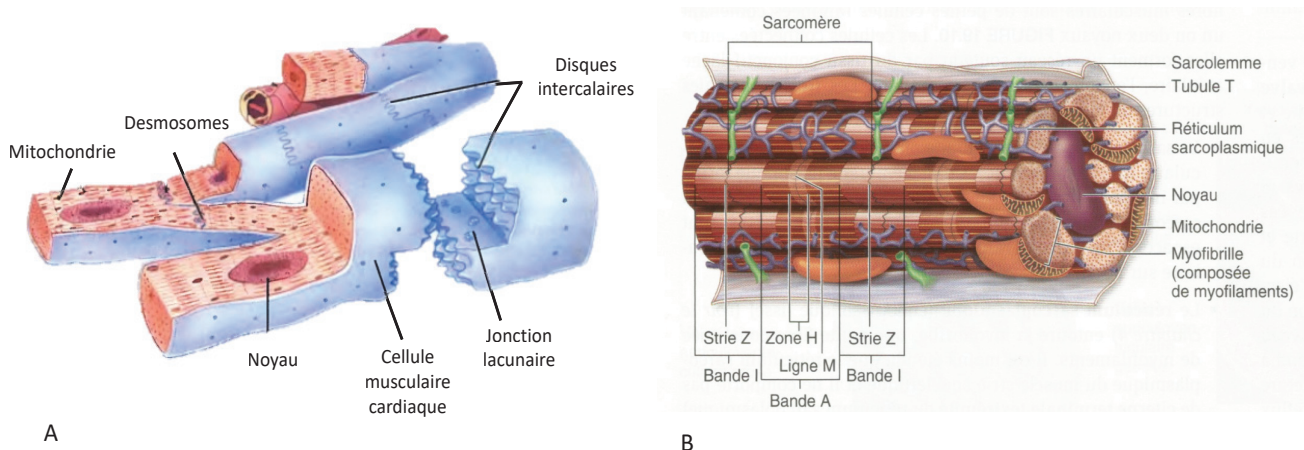
### 1-3.1 Architecture cellulaire

Les cardiomyocytes sont les cellules qui demandent un approvisionnement en énergie important et constant. En effet, afin de répondre à la fonction principale du cœur qui est de pomper le sang dans l'organisme, elles vont se contracter de façon synchrone et autonome de manière continue. Ces cellules ont une organisation très particulière : elles forment un réseau tridimensionnel de cardiomyocytes dans les oreillettes et dans les ventricules. Elles ont une structure cylindrique (Figure 5), une longueur d'environ 100  $\mu\text{m}$  et un diamètre de 10  $\mu\text{m}$ . Leurs bifurcations aux extrémités permettent aux cellules d'entrer en contact avec les cardiomyocytes périphériques. Comme l'illustre la figure 6A, les cardiomyocytes sont interconnectés entre eux via des disques intercalaires contenant des jonctions lacunaires et des desmosomes. Les jonctions lacunaires vont permettre le transfert des potentiels d'action tandis que les desmosomes vont lier les cellules entre elles. Il existe également des communications autocrines<sup>7,8</sup>. Ces processus de connexions mis en place par les cardiomyocytes auront pour but d'augmenter les interactions entre chaque cardiomyocyte mais également avec les cellules environnantes.



**Figure 5.** Cardiomyocytes adulte de souris

Concernant les cardiomyocytes à proprement parler, ils sont constitués d'un sarcolemme, de tubules transverses (moins développés que dans les fibres musculaires striées squelettiques), de réticulum endosarcoplasmique, d'un ou deux noyaux (seulement 2 % des cardiomyocytes possèdent deux noyaux, voire 4 en situation pathologique), d'un cytoplasme, de mitochondries, et enfin de l'appareil contractile.



**Figure 6.** Structure d'une cellule cardiaque.

(A) Organisation des fibres musculaires cardiaques (B) Organisation d'un cardiomyocyte, vue longitudinale.

Source : <http://recap-ide.blogspot.com/2016/10/anatomie-systeme-locomoteur-myologie.html>

<https://coeurmaladiescoronariennes.wordpress.com/2016/05/03/i-presentation-du-coeur/>

Les myofibrilles sont composées de sarcomères<sup>9</sup>. L'organisation des organites entre eux est illustrée sur la figure 6B.

- *Le sarcolemme*

Le sarcolemme est la membrane plasmique du cardiomyocyte. Elle va se creuser pour former des structures particulières appelées tubules transverses (ou tubules T) qui vont à proximité du réticulum endo-sarcoplasmique former les dyades.

- *Le tubule transverse*

Ce sont des invaginations du sarcolemme, proches des stries Z, qui pénètrent dans la profondeur des cellules<sup>10</sup>. Cette structure va permettre à la cellule la propagation du potentiel d'action (PA). Comme on peut le voir en vert sur la figure 6B, les tubules-T vont former un réseau continu le long des stries Z. Des protéines impliquées dans le couplage excitation-contraction (CEC) seront localisées sur cette membrane, ce phénomène sera défini dans la partie 1-4-1.

- *Le réticulum endo-sarcoplasmique*

De façon générale, et dans chaque cellule, on observe deux types de réticulum endoplasmique (RE) : le RE rugueux et le RE lisse, chacun ayant des fonctions bien distinctes. En effet, le RE rugueux aura un rôle dans l'assemblage et le transport des protéines. C'est également le site de la traduction et du repliement des protéines au cours de leur synthèse. Lorsque les protéines mal conformées s'accumulent dans le RE, celui-ci sera alors en stress, conduisant à la réponse UPR (Unfolded protein response). Ce processus sera décrit dans la partie 2-6-3. Le RE lisse a un rôle dans les processus métaboliques tels que la synthèse lipidique, la glycosylation, la détoxification et le stockage du calcium<sup>11</sup>.

Ce dernier, au sein des cardiomyocytes est appelé le réticulum sarcoplasmique (RS) et est localisé autour de chaque myofibrille. Il a pour fonction d'être le réservoir principal des ions calcium dans la cellule, essentiel pour la contraction musculaire. On distingue deux types de réticulum sarcoplasmique en fonction de leur localisation<sup>12</sup>. Le RS jonctionnel en forme de citerne est proche des tubules-T constituant alors ce qu'on l'appelle une dyade. Ce micro-espace permet une communication optimale entre les tubules-T et le RS, entraînant alors le processus de contraction.

En revanche, le RS qui est localisé le long des myofibrilles est appelé le RS longitudinal, reliant les citernes entre elles<sup>13</sup>. La dynamique de l'homéostasie calcique au sein du RS sera détaillée dans les chapitres 1-5.

A l'heure actuelle, il est difficile de faire une nette différence entre le RE lisse des cellules et le RS, des cellules musculaires. Michalak et Opas dans leur revue de 2009 discutent de ce débat et concluent que dans le muscle, le RE lisse est appelé le RS. Certaines questions restent en suspens telles que le RE lisse est-il en continuité avec le RS ? Le RE lisse est-il vraiment différent du RS ?<sup>13</sup> Dans ce manuscrit, je nommerai seulement le réticulum sarcoplasmique.

- *Le noyau*

Le noyau est généralement positionné au centre du cardiomyocyte et occasionnellement proche du sarcolemme. Il existe une continuité entre le réticulum sarcoplasmique et l'enveloppe nucléaire, appelé alors le réticulum péri-nucléaire<sup>14</sup>.

- *Le cytoplasme*

Dans les cardiomyocytes, il est comparable à celui des autres cellules. En revanche, il contient une très grande quantité de myoglobine, une protéine fixant l'oxygène de façon réversible et en permet le transport jusqu'à la mitochondrie<sup>15</sup>.

- *Les mitochondries*

Les mitochondries sont l'organite principal d'apport en énergie pour les cellules. Puisque le cœur ne cesse de battre, il a besoin d'un apport continu en énergie. 95% de cet apport provient du métabolisme oxydatif, et le contenu complet en ATP est renouvelé toutes les 10 secondes environ. 60 à 70% de l'ATP est utilisé pour la contraction, contre 30 à 40% pour les pompes ATPases du RS et pour le maintien de l'homéostasie calcique dans la cellule musculaire cardiaque.

En plus de leur rôle dans le métabolisme énergétique, elles participent à l'homéostasie calcique (partie traitée dans le chapitre 1-5-4), à la production et la régulation des ROS, la mort cellulaire, mais également dans le phénomène de fusion et fission (cf paragraphe 1-5-7) etc...

Les mitochondries dans les cardiomyocytes ont différentes localisations et sont très organisées, elles sont soit péri-nucléaires, soit le long du RS (subsarcolemmales), ou proches des myofibrilles (interfibrillaires). Lorsqu'elles sont le long des myofibrilles, elles seront organisées en rangées<sup>9</sup>. Les mitochondries occupent 20 à 40 % du volume total des cardiomyocytes. Au cours d'un arrêt cardiaque, les mitochondries interfibrillaires sont complètement désorganisées<sup>16</sup>.

- *Les myofibrilles et le sarcomère*

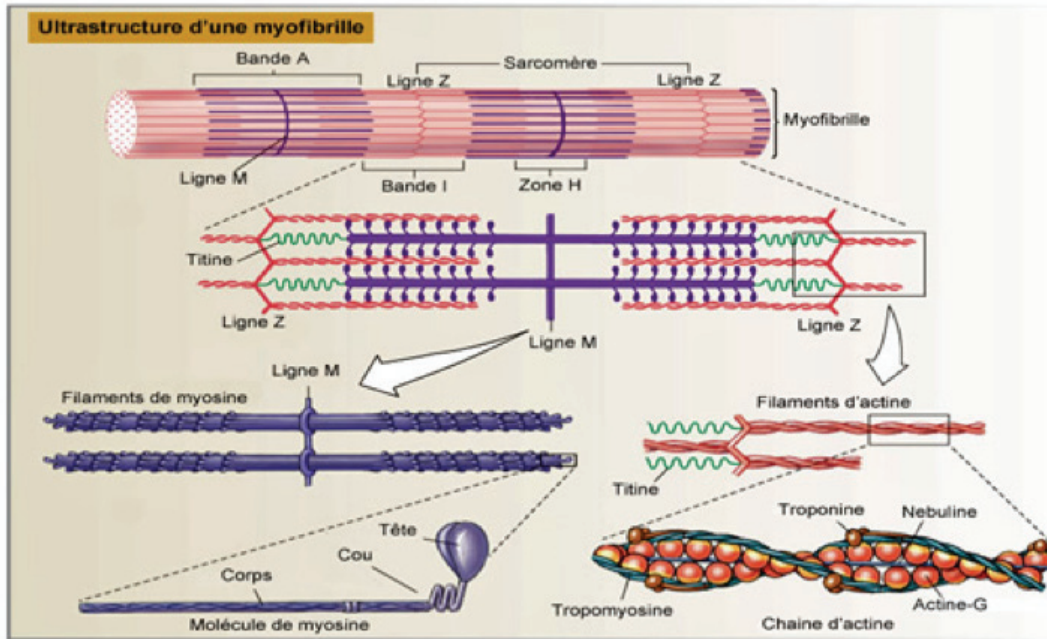
Les myofibrilles sont une succession d'une unité structurale répétitive appelée le sarcomère, donnant l'aspect strié du muscle squelettique et cardiaque. Comme l'indique la figure 6B, les sarcomères sont l'unité élémentaire de contraction des cardiomyocytes. La figure 8 illustre l'organisation d'un sarcomère. Ils sont constitués d'une alternance de bandes sombres A (pour anisotropique) et claires I (pour isotropique). En son centre, la bande A contient la ligne M et la bande I contient la ligne Z. La bande A est composée principalement de filament épais de myosine et la bande I de filament fin d'actine. Ces deux filaments sont reliés entre eux par la titine<sup>9</sup>.

Le myofilament épais, d'une longueur de 140 à 170 nm, est un assemblage d'environ 350 molécules de myosine, formé de six sous-unités (deux sous-unités lourdes, deux paires de sous-unités légères, une essentielle et une régulatrice). La molécule de myosine est composée d'un corps, d'un cou et d'une tête.

Le myofilament fin a un diamètre de 8nm et est constitué de deux chaînes hélicoïdales entrecroisées d'actine. Chaque filament d'actine F est formé par la polymérisation de nombreuses molécules d'actine globulaire (actine G). D'autres protéines accessoires sont fixées à l'actine : l'alpha actinine (pour lier 2 microfilaments entre eux), la nébuline (pour réguler la longueur du filament d'actine), de tropomyosine (pour stabiliser l'actine), et la troponine. Il existe trois types de troponine : C, I et T. La première est responsable de la liaison avec le  $Ca^{2+}$ , la troponine I est impliquée dans la liaison entre la myosine et l'actine, enfin, la troponine T crée des liaisons avec la tropomyosine. Cette protéine est dosée dans le sang en clinique humaine lorsqu'un risque d'IDM est détecté chez un patient. Son dosage est entré dans les recommandations de « l'american college of cardiology » en 2012. Sa concentration est élevée dans le cas d'un IDM, d'une myocardite ou d'une angine de poitrine<sup>17,18</sup>.

Enfin, le filament de titine est constitué de trois segments ayant des propriétés viscoélastiques<sup>19</sup>.





**Figure 7.** Organisation d'un sarcomère

Source : <http://svtmarcq.e-monsite.com/pages/cellule-musculaire-2.html>

- *Autres organites*

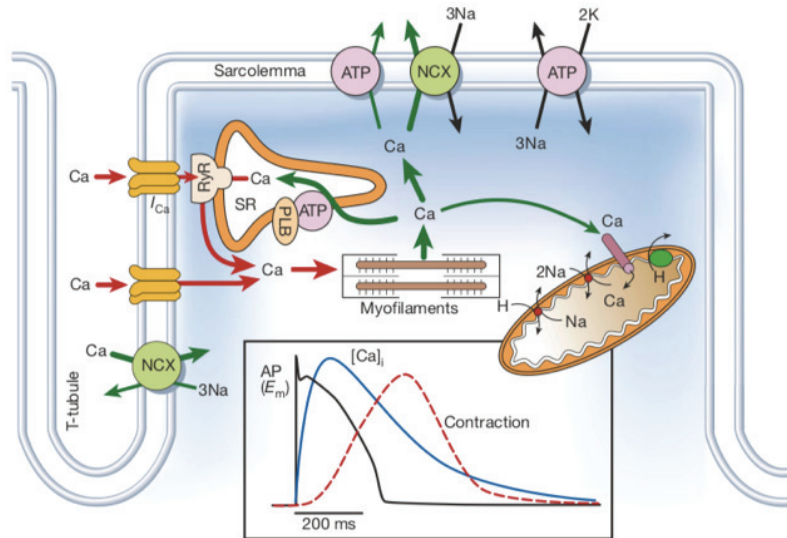
Enfin dans les cardiomyocytes, comme dans toutes cellules animales, d'autres organites sont présents tels que l'appareil de Golgi, les lysosomes et les peroxysomes, qui ne seront pas détaillés dans ce manuscrit. Toutefois, il existe une structure particulière entre le RS et les mitochondries appelés mitochondria-associated ER membranes (MAM)<sup>20-22</sup>. Cette région est une zone de communication privilégiée entre ces deux organites et sera détaillée dans la partie 1-5-7.

## 1-4 Physiologie de la contraction cardiaque

### 1-4.1 Le couplage excitation-contraction

Les potentiels d'action initiés par le nœud sinusal se propagent dans l'ensemble du tissu nodal jusqu'à atteindre le sarcolemme des cardiomyocytes. Les tubules-T riches en canaux ioniques sont importants pour le couplage excitation-contraction<sup>23</sup>. Au cours d'un PA la membrane des cardiomyocytes va être dépolarisée via l'ouverture des canaux  $\text{Na}^+$  (sodique) voltage-dépendant. La dépolarisation va se propager dans les tubules-T (figure 8).

Les canaux calciques de type L (DHPR ou récepteurs aux dihydropyridines) vont alors s'ouvrir et faire entrer des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le sarcoplasme. Par conséquent, les récepteurs à la Ryanodine (RyR), dans les dyades seront activés, entraînant alors une libération massive d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  du RS vers le cytoplasme. Ce phénomène est appelé le « calcium-induced calcium release » (CICR)<sup>24-26</sup>. La concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme sera alors élevée et permettra d'activer le système de contraction du sarcomère. D'un point de vue temporel, l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire précède la contraction, comme l'indique la figure 8.



**Figure 8.** Le couplage excitation-contraction au sein des cardiomyocytes.

Source : Bers, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling

Le  $\text{Ca}^{2+}$  va alors se fixer sur la troponine C. Il provoque un basculement du complexe troponine-tropomyosine démasquant le domaine de liaison de l'actine. Ceci permet à la myosine de se fixer sur l'actine. Suite à la libération de l'ADP sur la myosine, celle-ci change de conformation et glisse sur le filament d'actine, entraînant alors un raccourcissement du sarcomère, et donc la contraction du cardiomyocyte. L'hydrolyse de l'ATP, va permettre la libération de la myosine du site de fixation de l'actine. Elle reprendra ainsi sa conformation initiale, permettant une contraction ultérieure<sup>19</sup>.

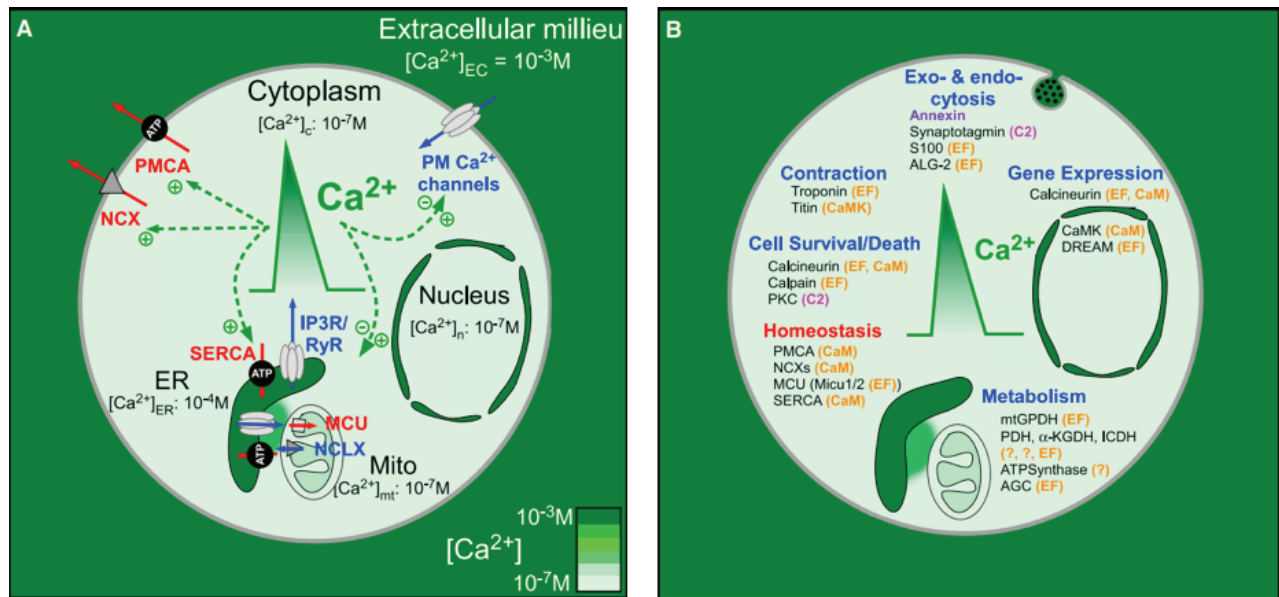
La relaxation des cardiomyocytes va être initiée par la recapture des ions  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol vers le RS, la mitochondrie et son extrusion vers le milieu extracellulaire. Dans un premier temps, le sarcomère va se relâcher dû au détachement du  $\text{Ca}^{2+}$  de la troponine. Par la suite, le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique est recapté en grande partie dans le RS par les pompes SERCA (Sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPase), environ 70%, mais il est également extrudé en parallèle de la cellule par l'échangeur sodium/calcium (NCX), à 28% et à 1% par les PMCA (Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase). Enfin, une partie du  $\text{Ca}^{2+}$  peut également être absorbé par la mitochondrie : seulement 1%, via l'uniport calcique mitochondrial (MCU). Ces pourcentages ont été évalués chez le lapin. Chez la souris et le rat ces valeurs sont 92%, 7 % et 1% respectivement<sup>24</sup>.

Le principal acteur du mécanisme d'excitation-contraction est l'ion calcium. Par conséquent, la régulation de cet ion est extrêmement importante. Il existe des modulations entre les canaux ioniques et les pompes, échangeurs, ou encore récepteurs, notamment pour la régulation de l'homéostasie calcique au sein de la cellule cardiaque. En effet, la signalisation calcique est finement régulée à la fois en amplitude, spatialement et temporellement (fréquence).

### 1-5 La signalisation calcique dans la cellule cardiaque et sa régulation

Lorsque la cellule cardiaque est au repos, il y a un équilibre entre les entrées et les sorties des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme. Cet équilibre est également respecté à la fin de chaque cycle cardiaque. La cellule a donc mis en place différents acteurs de type canaux, récepteurs, pompes et protéines afin de rendre possible cette homéostasie calcique. Comme l'illustre la figure 9A, la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  est très

différente d'un organite à l'autre<sup>27</sup>. Les protéines impliquées dans cette régulation du calcium cytosolique seront détaillées dans cette partie et classées en fonction de leur localisation.



**Figure 9.** La signalisation calcique dans la cellule cardiaque

(A) Concentration calcique dans les différents organites, et leur régulateur. (B) Les mécanismes dépendants du  $Ca^{2+}$  dans la cellule

Source : Intracellular  $Ca^{2+}$  Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling

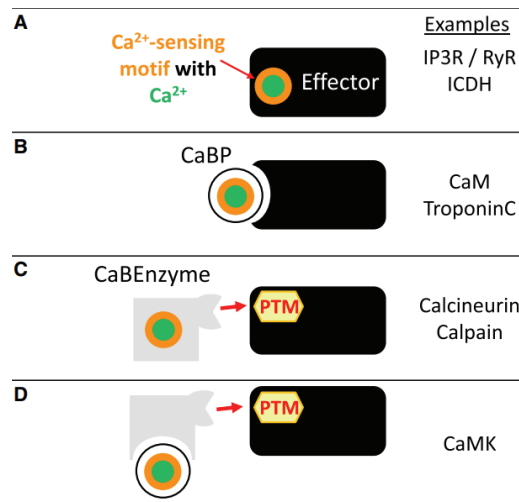
Comme décrit précédemment et comme illustré sur la figure 9B, le  $Ca^{2+}$  a pour principal rôle de participer à la contraction des cardiomyocytes mais, en tant que second messenger ubiquitaire, il participe à la régulation de la balance survie/mort cellulaire, à la signalisation cellulaire, à la sécrétion, à l'expression génique, au métabolisme... Dans cette partie, seuls les effecteurs participant à la contraction cardiaque, au métabolisme et à la mort cellulaire seront décrits.

### 1-5.1 Les $Ca^{2+}$ -binding proteins (CaBP)

Comme l'illustre la figure 10, le  $Ca^{2+}$  sera identifié via des motifs localisés sur les différents récepteurs, pompes et canaux mais également sur des protéines telles que des enzymes dont l'activité dépend du  $Ca^{2+}$ (Figure 9B)<sup>28</sup>.

Il existe quatre types de régulation par le  $Ca^{2+}$ , qui dépend du lieu de fixation de ce dernier. En effet, soit :

- i) le site de fixation du  $Ca^{2+}$  est directement sur l'effecteur (ex : les récepteurs),
- ii à iv) soit le site de fixation est sur une protéine régulatrice liant le  $Ca^{2+}$  ; ii) le  $Ca^{2+}$  régule directement la protéine sur son site de fixation (ex : calmoduline ou troponine C), puis cette protéine régule par exemple un récepteur
- iii) le  $Ca^{2+}$  active une enzyme qui aura un effet post-traductionnel sur une protéine (ex : calcineurine ou calpaïne)
- iv) le  $Ca^{2+}$  active une protéine sur un site de fixation mais la régulation est post-traductionnelle (ex : calmoduline kinase)<sup>28</sup>.



**Figure 10.** Les différents types de régulation du Ca<sup>2+</sup> sur ses effecteurs.

Source :Intracellular Ca<sup>2+</sup> Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling

Dans le cytoplasme, des protéines permettant de tamponner le Ca<sup>2+</sup> libre, vont être impliquées dans la régulation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Il en existe environ 200. Les protéines seront classées en trois familles, en fonction de leur motif de fixation : « EF Hand », les protéines avec un domaine C2 et annexines. Ces protéines auront des propriétés particulières.

Comme décrit précédemment, il existe une famille de protéines qui ont un domaine particulier (domaine le plus commun) leur permettant d'avoir un motif liant le Ca<sup>2+</sup>, ce sont les « EF-Hand » protéines. Elles regroupent la plupart des régulateurs du Ca<sup>2+</sup> cytosolique. Le site de fixation du Ca<sup>2+</sup> est compris entre deux hélices orientées de façon perpendiculaire entre elles (image du pouce et de l'index sur une main). En revanche, l'affinité de ce domaine va varier d'une protéine à l'autre allant de l'ordre du  $\mu\text{M}$  au mM, permettant à la cellule de s'adapter aux réponses physiologiques.

Il existe d'autres familles de protéines liant le Ca<sup>2+</sup> telles que les annexines et les protéines avec un domaine C2. Elles ont une architecture de liaison du Ca<sup>2+</sup> unique leur permettant de se fixer sur des surfaces de membrane plasmique chargées négativement lorsqu'elles sont fixées au Ca<sup>2+</sup>. Mais elles ne seront pas détaillées dans cette partie, puisqu'elles sont plutôt impliquées dans les phénomènes d'endo et d'exocytose ou encore dans la transduction du signal et le trafic membranaire.

Toutes ces protéines liant le Ca<sup>2+</sup> seront présentes soit au sein du milieu extracellulaire (avec un site de liaison de la matrice extracellulaire ou certaines enzymes extracellulaires), soit au niveau intracellulaire. Seules les CaBP intracellulaires seront détaillées dans les parties sur la régulation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique et réticulaire.

- *La calmoduline*

Une des protéines les plus connues de la famille des protéines possédant un domaine « EF Hand » est la calmoduline (CaM). Elle va permettre la régulation d'enzymes, d'autres protéines, etc... lorsque celle-ci sera activée par le Ca<sup>2+</sup>. En revanche, le magnésium (Mg<sup>2+</sup>) est aussi connu pour se fixer sur ces protéines et module les propriétés de fixation du Ca<sup>2+</sup><sup>29</sup>. Il a été montré que l'affinité du Ca<sup>2+</sup> diminue lorsque les concentrations de Mg<sup>2+</sup> sont physiologiques, montrant ainsi que le Mg<sup>2+</sup> entre en compétition avec le Ca<sup>2+</sup><sup>30</sup>. La CaM peut être activée lorsque le Ca<sup>2+</sup> cytosolique est élevé mais également en condition de repos où le Ca<sup>2+</sup> peut activer partiellement la CaM. Les principales cibles de la CaM sont les Calmoduline Kinases (CaMK), une kinase serine-thréonine-dépendante impliquée dans de nombreux



processus physiologiques tels que la contraction musculaire, la transmission de neurotransmetteur et la régulation de facteurs de transcription. Ceci permet d'amplifier la transduction du signal du  $\text{Ca}^{2+}$ .

- *La calcineurine et la calpaïne*

La calcineurine et la calpaïne peuvent directement lier le  $\text{Ca}^{2+}$  affectant leur fonction phosphatase et protéase respectivement. La calcineurine est également régulée par la CaM alors que la calpaïne est uniquement régulée par le  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>31</sup>.

- *La troponine C*

Comme précédemment cité, la troponine C cardiaque (cTnC) possède 4 sites de fixation avec le  $\text{Ca}^{2+}$  et régule la liaison entre l'actine et la myosine. En effet la cTnC lève l'action de la troponine I qui possède une activité inhibitrice de l'activité ATPasique de la myosine<sup>32</sup>.

- *Autres exemples de CaBP*

En effet, la calbindin D-28 et la calretinine sont des tampons rapides contrairement à la parvalbumine qui est plus lente mais qui a une meilleure affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>33</sup>. Cette dernière n'est pas exprimée dans le muscle cardiaque mais est utilisée *in vivo* sur des modèles surexprimant cette protéine afin de corriger des arythmies<sup>34,35</sup>. Ces protéines auront un rôle dans la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique.

- *Les protéines tamponnant spécifiquement le  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire*

Il existe également des protéines qui vont lier le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS telles que la calséquestrine, la calréticuline, la calnexine, et GRP78. Enfin, GRP74 est également liant le  $\text{Ca}^{2+}$  du RS. Elle a différents sites d'affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , lui permettant d'avoir à la fois une faible affinité et une forte affinité pour cet ion<sup>36</sup>.

- *La calséquestrine*

La calséquestrine est la protéine majeure qui va lier le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS. Elle a une faible affinité et lie environ 20-50 ions  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d$  de 1 mM<sup>37</sup>). Elle a un domaine « EF-Hand » comme la plupart de ce type de protéine. Elle est plutôt localisée dans la citerne du RS et donc dans la partie jonctionnelle. Elle va interagir avec deux protéines du RyR : triadine et junctine ainsi qu'avec le RyR directement. Elle permet de réguler la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  via les RyRs au cours de la contraction, en effet, elle va optimiser le relargage tout en maintenant des stocks suffisants. D'autres rôles de la calséquestrine ont été identifiés dans la littérature tels que des activités kinases, et la communication avec les processus afin de réapprovisionnement des stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire<sup>38</sup>.

- *La calréticuline et la calnexine*

La calréticuline et la calnexine sont des protéines similaires à la calséquestrine ayant les mêmes propriétés d'affinité et de liaison avec le  $\text{Ca}^{2+}$ . Ce sont des protéines chaperones qui vont se fixer à des protéines nouvellement synthétisées<sup>39</sup>.

- *GRP78*

La protéine GRP78 (ou BIP, ou HSPA5) pour « glucose-regulated protein » de 78 kDa est également une protéine qui sera régulée par le  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette protéine va permettre la régulation de la traduction dans le RE. En effet, elle va transloquer les nouvelles protéines à la membrane du RE, faciliter leur assemblage et la dégradation des protéines malconformées si nécessaire. De plus, GRP78 a un rôle dans l'homéostasie calcique. En effet, il a été montré, en 2013, que GRP78 interagit avec une protéine du RE : le translocon, modulant ainsi la fuite calcique réticulaire. L'expression de GRP78 est donc dépendante de l'activation ou de l'inhibition du translocon<sup>40</sup>. Cette protéine est également un senseur du

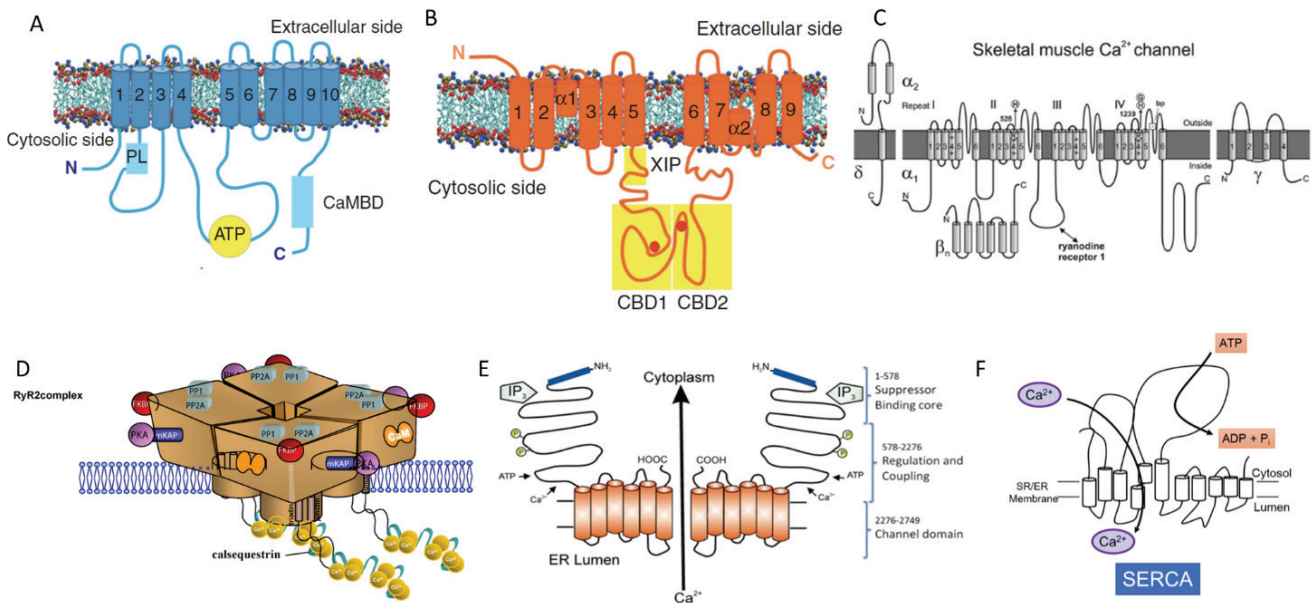
stress du RE et intervient notamment dans la réponse UPR<sup>41</sup>. Ceci sera détaillé dans la partie 3-4.9. Cette protéine ne va pas lier beaucoup de Ca<sup>2+</sup> (environ 1-2 par protéine) mais est responsable de 25% de la capacité de liaison au Ca<sup>2+</sup> du RS<sup>36</sup>.

- *Conclusion*

Cette régulation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire est très fine et est rythmée avec la contraction cardiaque. En effet, au cours de la systole, il y a une élévation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et au cours de la diastole, il y a une diminution du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Dans le cytosol et notamment à la membrane plasmique différents senseurs ont été mis en place afin de réguler le Ca<sup>2+</sup> dans ce compartiment. D'autres éléments sont également impliqués dans cette régulation et seront localisés dans le RS ou la mitochondrie.

### 1-5.2 Les protéines localisées à la membrane plasmique permettant la régulation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique

Au repos, il y a environ 10 000 fois plus de Ca<sup>2+</sup> à l'extérieur de la cellule qu'à l'intérieur. En effet, la concentration de Ca<sup>2+</sup> externe est d'environ 1,5 mM alors que dans le cytosol, elle est de 100 nM. Cette faible concentration de Ca<sup>2+</sup> cytosolique est maintenue grâce au fonctionnement de la pompe PMCA et de l'échangeur NCX, qui vont permettre la sortie du Ca<sup>2+</sup>. En revanche, l'entrée de Ca<sup>2+</sup> sera médiée par les DHPR, et dans certains cas, par NCX lorsqu'il change de conformation. La concentration calcique peut atteindre 1 μM au cours de la signalisation, en revanche dans certains microdomaines, cette concentration peut être jusqu'à 100 fois supérieure<sup>28</sup>.



**Figure 11.** Structure des différents canaux impliqués dans la régulation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique.

(A) Structure d'une PMCA et sa régulation. (B) Structure du NCX. (C) Structure du RyR. (D) Structure du IP3R. (E) Structure de la SERCA

Source : The Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium. Role of ryanodine receptor as a Ca<sup>2+</sup> regulatory center in normal and failing hearts. <https://www.pancreapedia.org/molecules/inositol-145-trisphosphate-receptors-insp3r>

Inhibitory action of linoleamide and oleamide toward sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase

- *Les pompes plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase*

La pompe PMCA va permettre de faire sortir les ions Ca<sup>2+</sup> du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Comme son nom l'indique, la pompe va permettre aux ions Ca<sup>2+</sup> d'être véhiculés contre leur gradient électrochimique, mais celle-ci nécessite de l'énergie sous forme d'ATP pour fonctionner. Elle appartient à la grande famille des ATPases de type-P.

Un ion Ca<sup>2+</sup> sera extrudé pour chaque molécule d'ATP hydrolysée. Cette pompe a une forte affinité avec les ions Ca<sup>2+</sup>, mais n'extrude pas les ions très rapidement. Ceci permet au cytosol de garder une très faible concentration de Ca<sup>2+</sup>. Son K<sub>d</sub> est entre 10 et 20 μM, mais descend en dessous de 1 μM lors d'une interaction avec la CaM. Cette pompe pèse 140 kDa<sup>42-44</sup>. Comme l'illustre la figure 11A, cette protéine est constituée de 10 domaines transmembranaires avec une grosse partie cytosolique qui peut être divisée en trois parties principales, avec des domaines de liaison à l'ATP et à la CaM. Le site catalytique est situé entre les domaines 4 et 5. Il contient le site de liaison de l'ATP et le second site de liaison de CaM. Le domaine terminal-C contient le principal site de liaison de CaM.

Le régulateur principal de cette pompe est la CaM<sup>43</sup>. En effet, cette dernière a un rôle d'auto-inhibition sur la première et la seconde boucle cytoplasmique de la pompe. Lorsque la CaM fixe le Ca<sup>2+</sup>, elle libère ces différents domaines et permet à la PMCA d'être active<sup>45</sup>. Par conséquent, le principal inhibiteur de cette pompe est la CaM, qui lorsqu'elle ne fixe pas le Ca<sup>2+</sup> laisse la pompe en configuration « fermée ». Il a été décrit quatre grandes familles de PMCA1-4 avec environ 20 isoformes. Les gènes prédominants dans le cœur sont PMCA1 et PMCA4. On trouve également les isoformes PMCA1b et 4b, par exemple<sup>46</sup>.

- *L'échangeur sodium/calcium*

Afin de réguler la concentration de Ca<sup>2+</sup> cytosolique, l'échangeur NCX a un rôle prédominant dans l'efflux des ions Ca<sup>2+</sup>. Il est plus exprimé dans le cœur que PMCA, et est très abondant dans les tubules-T. Contrairement aux PMCA, cet échangeur a une faible affinité vis-à-vis du Ca<sup>2+</sup>. En revanche, il a une forte efficacité, il va faire sortir 10 fois plus de Ca<sup>2+</sup> que les PMCA. C'est pourquoi c'est un des principaux contributeurs à la diminution de Ca<sup>2+</sup> cytosolique au cours de la relaxation des cardiomyocytes.

NCX va faire entrer trois ions Na<sup>+</sup> pour faire sortir un ion Ca<sup>2+</sup> (appelé « forward mode »). Cet échangeur va donc utiliser le gradient électrochimique du sodium afin de faire sortir le Ca<sup>2+</sup> contre son gradient électrochimique. L'échangeur fera sortir autant de Ca<sup>2+</sup> que les DHPR ont fait entrer de Ca<sup>2+</sup>. Comme l'illustre la figure 11B, cet échangeur possède 9 domaines transmembranaires. Une première partie est composée de 5 domaines transmembranaires et des boucles cytosoliques. La deuxième partie contient 4 domaines transmembranaires. Ces deux parties sont séparées par une boucle cytosolique comprenant les sites de régulation de NCX. Il possède également deux séquences répétées : α1 et α2 qui sont impliquées dans la liaison des ions et leur transport. Le poids moléculaire de la forme native de NCX est de 160 kDa<sup>45</sup>.

NCX appartient à la super famille des antiports Ca<sup>2+</sup>/cations, et est codé par le gène SLC8 où trois gènes ont été identifiés : SLC8A1 pour NCX1, SLC8A2 pour NCX2, SLC8A3 pour NCX3<sup>47</sup>. L'isoforme cardiaque est NCX1<sup>48</sup>. NCX génère un courant (I<sub>Na/Ca</sub>) et son activité peut être mesurée par des techniques d'électrophysiologie. En effet, au cours du PA et notamment lors de la phase de repolarisation, NCX entre en jeu. L'un des moyens de l'inhiber est de remplacer le Na<sup>+</sup> dans le milieu extracellulaire par du lithium.

En revanche, au cours de la contraction des cellules cardiaques, lorsque la membrane est dépolarisée et que les canaux Na<sup>+</sup> voltage dépendant sont activés, NCX va changer de conformation. Il va moduler

l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  (appelé « reverse mode »), permettant de faire sortir des ions  $\text{Na}^+$  (en faisant sortir des ions  $\text{Ca}^{2+}$ ) dans le but de revenir au potentiel de membrane au repos des cardiomyocytes mais également pour participer à la contraction des cellules. En d'autres termes, lorsque la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  est élevée dans le milieu intracellulaire, NCX sera en forward mode et lorsque la concentration de  $\text{Na}^+$  est élevée dans le milieu intracellulaire, NCX sera en reverse mode<sup>24</sup>.

- *Les récepteurs aux dihydropyridines*

L'élévation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique au cours de la contraction est due à l'activation des DHPR. Dans le cœur, il existe deux types de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants : les canaux de type L et les canaux de type T. Ils sont impliqués dans le phénomène de CICR. Les canaux de type L (long-lasting) aussi appelés récepteurs aux DHPR sont présents dans tout le cœur et notamment les cardiomyocytes. Ils sont activés à -40 mV. Les canaux de type T (transient) sont présents dans les cellules atriales, pacemaker et les fibres de Purkinje. Seuls les canaux de type L seront détaillés dans cette partie.

Comme l'illustre la figure 11C, les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L sont composés de plusieurs sous-unités dont  $\alpha 1$ ,  $\beta$ ,  $\alpha 2$ - $\delta$  et  $\gamma$ . Ces canaux ont une structure similaire des canaux  $\text{Na}_v$ , notamment la sous-unité  $\alpha 1$  (210 à 240 kDa, troncation ou non de la partie C-terminale). En effet, cette sous-unité possède six segments transmembranaires, avec le segment S4 sensible au voltage et une boucle pore localisée entre le segment 5 et 6. Les autres sous-unités ont plutôt des fonctions de régulation, notamment l'inactivation. Dans le cœur, il existe deux isoformes de ce canal,  $\text{Ca}_v 1.2$  et  $1.3$ . Deux autres isoformes ont été décrites :  $\text{Ca}_v 1.1$  dans le muscle squelettique et  $\text{Ca}_v 1.4$  dans la rétine<sup>49</sup>.  $\text{Ca}_v 1.1$  est le premier canal de type L à avoir été cloné. L'isoforme la plus exprimée dans les cardiomyocytes est le  $\text{Ca}_v 1.2$ . Cette protéine est encodée par le gène CACNA1C. Un des bloqueurs de ce canal est la dihydropyridine. La CaM est également un régulateur de ces protéines. Des mutations sur ce canal seront liées à un syndrome de Timothy, une maladie infantile avec de graves défauts d'électrophysiologie cardiaque<sup>50</sup>, à un raccourcissement de l'intervalle QT, des arythmies ou une mort subite<sup>51,52</sup>.

### **1-5.3 Les protéines à la membrane du réticulum sarcoplasmique permettant la régulation du $\text{Ca}^{2+}$ cytosolique**

Le réticulum sarcoplasmique est le principal réservoir de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. En effet, sa concentration au repos est d'environ 1 mM. En revanche, au cours de la contraction, la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  va diminuer de 50 à 75%. Comme décrit précédemment, dans les cardiomyocytes, on distingue deux types de RS : le RS jonctionnel et le RS longitudinal.

Le RS jonctionnel est proche du tubule-T et forme une dyade avec ce dernier. Il a une forme de citerne. Le RS longitudinal va permettre au  $\text{Ca}^{2+}$  de diffuser dans le cytoplasme, de lier les citernes entre elles et est le lieu de recapture du calcium via les pompes SERCA.

Au cours de la signalisation calcique, l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique peut être expliquée d'une part via l'activation des DHPR et, d'autre part par l'ouverture des récepteurs-canaux localisés sur la membrane du RS : RyR et IP3R (Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptor).

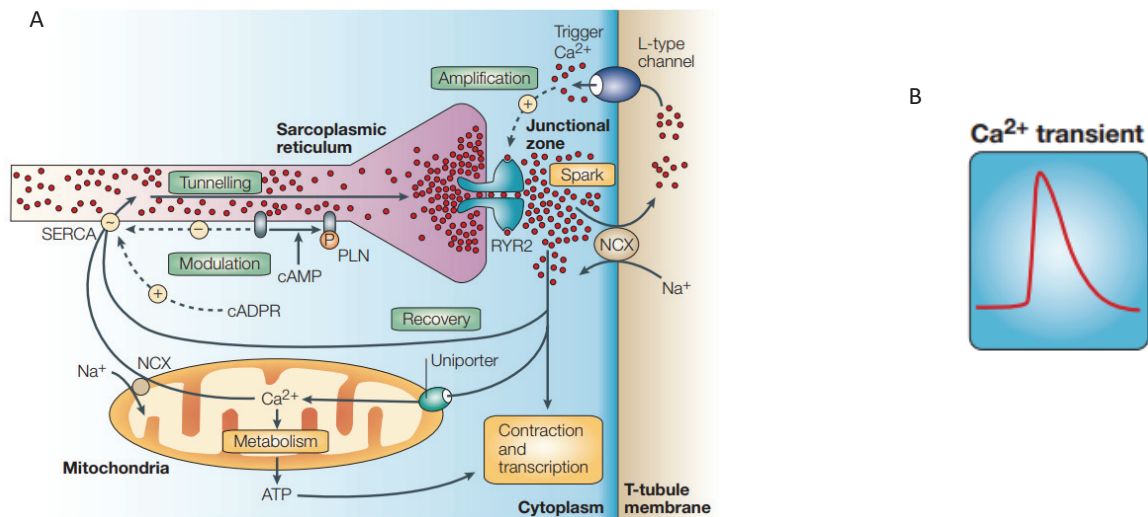
- *Les récepteurs à la ryanodine*

Le premier contributeur à l'élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique par le RS est le récepteur à la Ryanodine. Trois isoformes de RyR ont été identifiées (RyR1-3). Dans le cœur, la principale isoforme est RyR2. La protéine RyR est surtout localisée dans le RS jonctionnel et notamment dans les dyades. Comme l'illustre la figure 11D, RyR est une très grosse protéine exprimée sous forme homotétramérique. Chaque sous-unité a une taille de 560 kDa. La CaM et la calstaine2 (FKBP12.6), la protéine kinase A, la protéine phosphatase 1 et 2A sont les principaux partenaires de RyR au sein du macrocomplexe. Dans

la lumière du RS, la calséquetrine va avoir également un rôle dans la régulation de ce récepteur mais également le  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , l'adénine nucléotides, la nitrosylation et l'oxydo-réduction<sup>53</sup>.

La fixation de CaM sur le récepteur va entraîner son inhibition, en limitant son ouverture. De plus, lorsque la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS diminue, la calséquetrine aura pour rôle d'inhiber le récepteur. En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$  va se détacher de cette dernière et va se fixer sur le récepteur, via la triadine et la junctine, des protéines accolées au récepteur dans la lumière du RS. Ce mécanisme permet en partie d'arrêter la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  au cours de la contraction<sup>53</sup>.

La ryanodine est un alcaloïde végétal extrait de *Ryana speciosa*. La ryanodine à des concentrations proches du nM va activer le récepteur. En revanche, à des concentrations supérieures à 10  $\mu\text{M}$ , cette molécule va inhiber les RyRs. La caféine est un puissant activateur de ce récepteur et va entraîner une déplétion des stocks du RS jonctionnel. Enfin, dans le muscle cardiaque, l'ADP-ribose-cyclique est également un agoniste des RyRs<sup>54</sup>. Par ailleurs, le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique ( $\mu\text{M}$ ) va permettre l'activation du récepteur et son inhibition lorsque les concentrations sont trop élevées (mM) via une régulation biphasique<sup>55,56</sup>. Il existe également une période réfractaire des RyR modulée par la calséquetrine et la concentration en calcium lumineale<sup>57</sup>.



**Figure 12.** Evolution spatio-temporelle du  $\text{Ca}^{2+}$  au cours de la contraction.

(A) Mécanisme mis en place au cours d'un sparks. (B) Transitoire calcique.

Source : Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling

Comme l'illustre la figure 12A, lorsque les DPHR sont activés, le  $\text{Ca}^{2+}$  va pénétrer dans le cytosol. La concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les microdomaines (à la jonction entre les tubules-T et le RS jonctionnels = les dyades) sera très importante : environ 10  $\mu\text{M}$ . Cette forte augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  localisée et très brève est appelée un «  $\text{Ca}^{2+}$  sparklet ». En revanche, les sparklets ne sont pas suffisants seuls pour déclencher la contraction. Ceci va entraîner l'activation des RyRs dans un second temps via le mécanisme de CICR. Une fois que les RyRs ont à leur tour libéré du  $\text{Ca}^{2+}$ , la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans ces microdomaines est devenue très élevée ( $> 100 \mu\text{M}$ ), entraînant la formation de sparks. Les sparks seront le reflet de l'activation de cluster d'environ 6 à 20 RyRs. Au microscope confocal, cela est visible comme des étincelles de signaux lumineux.

Au cours du CEC, des milliers de sparks seront synchronisés en même temps dans la cellule rendant alors le transitoire calcique totalement uniforme (figure 12B). En effet, un spark à lui seul n'est pas



capable de déclencher un transitoire calcique, en revanche, l'addition de plusieurs spark va entraîner ce transitoire.

- *Les récepteurs inositol 1,4,5-trisphosphate*

Le second contributeur à l'élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique est le récepteur IP3. C'est une glycoprotéine à la membrane du RS activée par l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3). Ces récepteurs vont permettre notamment de réguler le  $\text{Ca}^{2+}$  du RS en réponse à un stimulus extracellulaire. En terme de proportion, dans les cardiomyocytes de souris, ce récepteur est moins exprimé que les RyRs (environ 50 fois moins<sup>59</sup>). Ils sont plutôt localisés sur le RS longitudinal et sur le RS péri-nucléaire<sup>60</sup>.

Il est actuellement connu que les IP3R ont trois isoformes IP3R1-3 encodées par trois gènes distincts ITPR1-3. L'isoforme cardiaque est IP3R2. Cette protéine fait environ 300 kDa et forme un homotétramère. Comme l'illustre la figure 11E, le domaine C-terminal contient 6 hélices  $\alpha$  transmembranaires formant le pore et d'une partie C-terminale qui va interagir avec les protéines régulatrices. La régulation d'IP3R se fait par  $\text{IP}_3$ , qui, lorsqu'il se fixe, entraîne une meilleure sensibilité du récepteur au  $\text{Ca}^{2+}$ . A faible concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, le récepteur peut être activé, en revanche lorsque la concentration est trop élevée après libération de  $\text{Ca}^{2+}$ , il sera inhibé par le  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>61</sup>. Donc le  $\text{Ca}^{2+}$  peut directement réguler le récepteur. La CaM va également le réguler en l'inhibant ou en l'activant. La régulation des IP3R au niveau luminal fait intervenir la calréticuline et la calnexine. Enfin, le récepteur peut être modulé par d'autres protéines telles que la CaMKII, la protéine kinase A et C<sup>60,62</sup>.

Le rôle de ces récepteurs est assez discuté dans la littérature. En effet, du fait de la très faible proportion d'IP3R, la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  lorsqu'ils sont activés est assez faible. Il a été montré que les récepteurs pouvaient être impliqués dans la régulation du rythme cardiaque<sup>63</sup>. Contrairement aux RyRs qui vont entraîner des sparks, les IP3Rs vont créer des « puffs ». Ils entraînent une plus faible augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, environ 600 nM et avec une plus faible étendue.

Enfin, le RS est en contact étroit avec les mitochondries, ceci est appelé les MAMs. Ces contacts vont entre-autre permettre le transfert du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS vers la mitochondrie via l'assemblage de différentes protéines telles qu'IP3R. Ceci sera défini dans les interactions réticulum sarcoplasmique – mitochondrie : les MAMs.

- *Les pompes sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase*

Lorsque la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  est trop élevée dans le cytosol, le premier régulateur est la pompe SERCA. Elle va permettre de réguler la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  au moment de la contraction. En effet, la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  par les SERCA va initier la relaxation et maintenir les stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  stables. Elle va hydrolyser de l'ATP afin de faire rentrer du  $\text{Ca}^{2+}$  au sein du RS. Comme la pompe PMCA, la pompe SERCA possède une forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  mais a une faible efficacité. Ces pompes sont localisées à la fois dans les dyades à proximité des RyRs mais également au sein du RS longitudinal<sup>25</sup>.

Trois isoformes de SERCA ont été identifiées (SERCA1-3). Dans le cœur, l'isoforme majoritaire exprimée est SERCA2a avec une taille de 110 kDa. Comme l'illustre la figure 11F<sup>64</sup>, la pompe SERCA a une structure similaire à celle de la pompe PMCA avec 10 segments transmembranaires. L'hydrolyse de l'ATP se fait sur la boucle cytosolique localisée entre les segments S4 et S5. La partie pore est également située entre les S4 et S5.

Le principal régulateur de la SERCA est le phospholamban (PLB). Cette phosphoprotéine va inhiber l'affinité de la pompe vis-à-vis du  $\text{Ca}^{2+}$ . Le PLB sera alors dephosphorylé. Lorsqu'il est phosphorylé via une stimulation adrénérge, se produit alors la levée de l'inhibition du PLB sur la pompe SERCA, augmentant alors l'affinité du  $\text{Ca}^{2+}$  sur les SERCA. Ce processus va entraîner la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  et

donc la relaxation. La CAMKII va également réguler cette pompe en améliorant sa capacité de transport du  $\text{Ca}^{2+}$ . Elle va phosphoryler SERCA, sans changer son affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>56,65,66</sup>. Un des inhibiteurs les plus utilisés de cette pompe est la thapsigargine (TG). La TG, PSA (Prostate Specific Antigen) et ses analogues sont pour information utilisées dans des essais cliniques contre le cancer de la prostate.

- *Les canaux de fuite calcique*

Malgré cette fine régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS, il existe à la membrane de cet organite des canaux dits « de fuite ». En effet, ils vont libérer de façon constante mais en petite quantité du  $\text{Ca}^{2+}$  induisant une diminution du contenu de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS. Il a été montré que cette fuite peut être de l'ordre du 1  $\mu\text{M}$  à 200  $\mu\text{M}$  par minute<sup>67</sup>.

Lorsque les pompes SERCA fonctionnent, cela ne pose aucun problème mais dès lors qu'elles sont inhibées, le RS peut se vider de son contenu à raison de 22% en 2 minutes. Les protéines impliquées sont le translocon, les TRPs (Transient Receptor Potential), les protéines liées à la maladie d'Alzheimer (les présénilines), Bcl-2, les inhibiteurs des Bax et les protéines formant des héli-canaux<sup>67</sup>.

Le translocon est un complexe protéique composé de Sec61 formant un canal avec des composants accessoires tels que SPC, OST, TRAM et TRAP. D'autres protéines peuvent s'associer telles que Sec63 et GRP78. Le rôle principal de cette protéine est de transloquer les polypeptides néosynthétisés du cytosol vers le RS. Certaines études, dont les nôtres, ont montré que ce complexe pouvait induire une fuite calcique réticulaire<sup>68,69</sup>.

Les canaux TRPs seront détaillés dans la partie 3.

Les protéines liées aux maladies neurodégénératives telles que les présénilines peuvent induire une fuite calcique. Les présénilines forment une famille de protéine ayant une activité catalytique intervenant dans l'activité de la gamma selectase. Une dérégulation de l'homéostasie calcique et un défaut de signalisation calcique ont été mis en évidence lors de la maladie d'Alzheimer. Un grand nombre de partenaires de cette homéostasie semblent impliqués dans la pathologie. Ces protéines peuvent agir directement sur RyR ou IP3R, en augmentant leur activité et d'autant plus sur la SERCA en ayant un pouvoir inhibiteur, menant à une fuite calcique<sup>70</sup>.

La famille des protéines pro ou anti-apoptotiques Bcl2 semble également impliquée dans la fuite calcique. En effet, une surexpression de Bcl2, la protéine anti-apoptotique, entraîne une diminution du contenu de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS<sup>71,72</sup>.

La famille des inhibiteurs-1 de Bax et les protéines formant un héli-canal telles que la pannexine peuvent également avoir un impact sur la signalisation calcique et la fuite de calcium. En effet, les pannexines sont localisées notamment à la membrane du RE et dans certains types cellulaires tels que les HEK ou des cellules de cancer de la prostate ? Ces protéines sont des canaux de fuite calcique entraînant alors une vidange de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE<sup>73,74</sup>.

#### **1-5.4 Les protéines à la membrane mitochondriale permettant la régulation du $\text{Ca}^{2+}$ cytosolique**

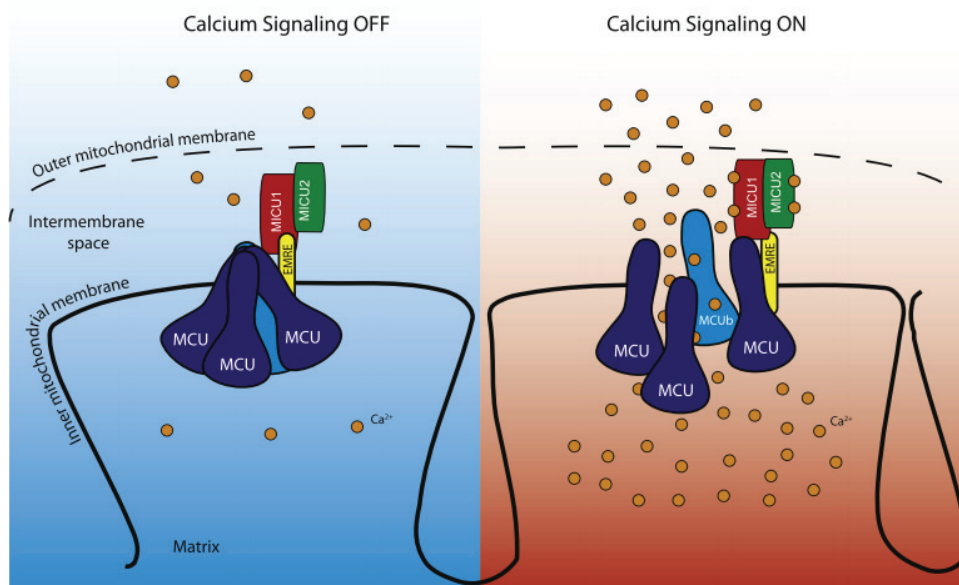
Au repos, la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie est équivalente à celle dans le cytoplasme. Bien que pendant quelques années, le rôle de la mitochondrie dans la signalisation calcique a été négligé, actuellement, il est connu qu'en parallèle d'une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, il y a une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial<sup>75</sup>.

A la membrane interne mitochondriale, la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  se fait via l'uniport calcique mitochondrial MCU mais également via un échangeur NCX mitochondrial (NCLX). Enfin, certaines enzymes impliquées dans le métabolisme et la respiration auront une activité dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>76</sup>.

- *L'uniport calcique mitochondrial (MCU)*

Comme détaillé précédemment, la diminution du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique au cours de la relaxation des cardiomyocytes est due au MCU à hauteur de 1%. En effet, cet uniport va faire entrer le  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie, puisque celle-ci est impliquée dans le tamponnage du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. En revanche, MCU a un rôle très important dans les échanges de  $\text{Ca}^{2+}$  entre la mitochondrie et le RS.

Comme l'indique la figure 13, MCU forme un complexe multiprotéique très sélectif responsable de la capture du  $\text{Ca}^{2+}$ . MCU seul, a une taille d'environ 40 kDa. Lorsque MCU forme le complexe protéique, sa taille est de 480 kDa. Il est composé d'un pore et de sous-unités régulatrices. Il a une affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  de 20 à 50  $\mu\text{M}$ . En plus de MCU, deux autres protéines : MCUb et EMRE (Essential MCU regulator) vont former le pore. MCU et MCUb sont deux structures très proches avec deux domaines en spirales (deux domaines transmembranaires). Les parties N et C-terminales sont situées dans la matrice mitochondriale. EMRE, est une protéine de 10 kDa. Cette protéine est essentielle pour l'activité canal de MCU et permet de garder attaché le dimère MICU1/MICU2. En effet, EMRE est un senseur du  $\text{Ca}^{2+}$  mais ce mécanisme requiert MICU1 et MICU2.



**Figure 13.** Structure du MCU.

Source : Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex

MICU1 est une protéine membranaire de 54 kDa ayant deux domaines « EF-hand ». Cette protéine est localisée dans l'espace intermembranaire. Deux paralogues de MICU1 ont été identifiés : MICU2 et MICU3, qui ont également deux domaines « EF-Hand ». MICU3 est strictement exprimé dans le système nerveux central alors que MICU2 a une distribution ubiquitaire comme MICU1 et est localisé à proximité de MICU1. Ces deux protéines, MICU1 et MICU2, seront les senseurs calciques de ce complexe entraînant son ouverture lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  dans les microdomaines sera élevé<sup>77-79</sup>.

En condition de repos, la capture du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie est inhibée malgré la force électrochimique des cations dans la matrice mitochondriale. Ceci est également expliqué par la faible



affinité de MCU pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Ce mécanisme empêche l'accumulation des cations, les altérations morphologiques et le relargage de facteurs pro-apoptotiques. En revanche, lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  augmente fortement dans les microdomaines proches des mitochondries, celles-ci vont capter le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique entraînant une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  mitochondriale pouvant atteindre  $10\ \mu\text{M}$ <sup>122</sup>. Dans des conditions où le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique est inférieur au  $\mu\text{M}$ , MICU1-2 vont garder le MCU fermé. En revanche, lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique est supérieur à  $10\ \mu\text{M}$ , le  $\text{Ca}^{2+}$  va se lier aux domaines de MICU1-2 et permettre un changement conformationnel entraînant l'ouverture du MCU<sup>28</sup>. Le complexe MCU peut être notamment inhibé par Ru360.

Le complexe MCU va interagir avec un complexe protéique formant ce qu'on appelle les MAMs. Ceux-ci seront détaillés dans la partie 1-5-7.

- *L'échangeur sodium/calcium mitochondrial*

Cet échangeur est localisé à la membrane interne mitochondriale et fonctionne en étroite collaboration avec un autre échangeur : l'échangeur  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Ces deux échangeurs vont permettre de faire sortir le  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitochondrie. Dans les cellules excitables, NCLX est l'échangeur principalement exprimé par rapport à l'échangeur  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ . La sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  est dépendante du gradient électrochimique et du potentiel de membrane mitochondrial : un potentiel négatif facilite l'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$ .

Lorsque NCLX forme un monomère, sa taille est de 50 kDa. Cette protéine peut également former des dimères, trimères... Il va échanger 3  $\text{Na}^+$  pour 1  $\text{Ca}^{2+}$ . Cet échangeur va permettre de faire sortir le  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitochondrie dans le but de recharger les stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire<sup>80,81</sup>.

### 1-5.5 Les enzymes dépendantes du $\text{Ca}^{2+}$

Bien que le  $\text{Ca}^{2+}$  ait un rôle dans le CEC, il a également un rôle dans le métabolisme. En effet, plusieurs enzymes de la chaîne respiratoire sont régulées par le  $\text{Ca}^{2+}$ . Il est actuellement connu qu'il existe plusieurs déshydrogénases du cycle de Krebs localisées dans la matrice mitochondriale qui sont activées par le  $\text{Ca}^{2+}$  mais également la  $\text{F}_1\text{-F}_0$  ATP synthase. Ce dernier va donc réguler la phosphorylation oxydative et la synthèse d'ATP. Les déshydrogénases sont les suivantes : la  $\text{FAD}^+$  glycérol phosphate déshydrogénase, la pyruvate déshydrogénase phosphatase, la  $\text{NAD}^+$  isocitrate déshydrogénase et 2-Oxoglutarate deshydrogenase<sup>76</sup>.

La signalisation calcique va également induire la mobilité mitochondriale le long des microtubules mais ceci ne sera pas détaillée.

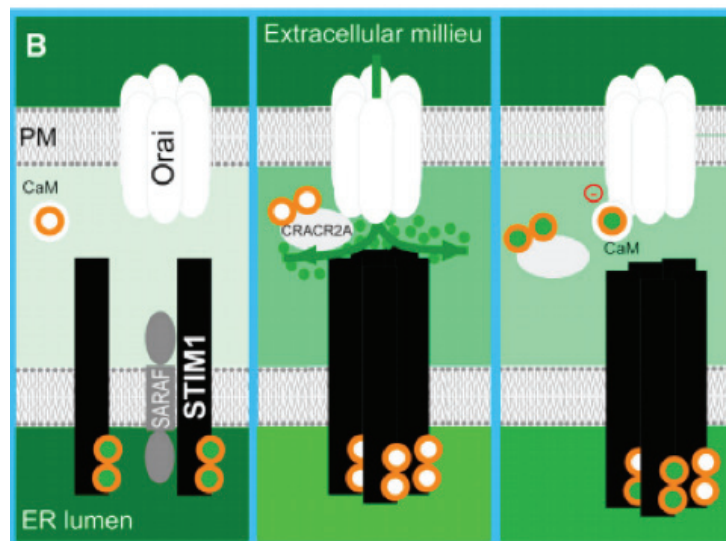
Il a été montré que sous stimulation avec un agoniste spécifique d'IP3R par exemple, l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondriale pouvait être plus importante que la hausse du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. Cette augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial et la faible affinité des transporteurs mitochondriaux suggèrent qu'il existe des contacts étroits entre la mitochondrie et la principale source d'accumulation du  $\text{Ca}^{2+}$  qui est le RS<sup>82</sup>.

### 1-5.6 Les interactions réticulum sarcoplasmique-membrane plasmique : les SOCEs

Lorsque la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum est trop basse, un système est mis en place afin de réapprovisionner cet organite appelé « Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry » ou SOCE. Ceci permet au RS de maintenir un stock intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  suffisant mais également de continuer les processus de conformation de protéines dans la lumière du RS. Pour cela, une protéine appelée STIM (STromal Interaction Molecule 1), considérée comme le senseur de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la lumière du RS via un domaine de type « EF-Hand », est présente sur la membrane de l'organite. Il existe deux isoformes de cette protéine : STIM1 et 2.

Comme l'illustre la figure 14, STIM est associée à un régulateur appelé SARAF (SOCE-associated regulatory factor). Lorsque la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire diminue fortement, le  $\text{Ca}^{2+}$  se dissocie de STIM et entraîne également la dissociation de SARAF de STIM. La protéine STIM sera alors oligomérisée et s'associe à d'autres protéines STIM afin de former des « puncta ». Cette super-protéine va alors interagir avec des régions spécifiques de la membrane plasmique, et notamment un canal calcique du sarcolemme appelé Orai. Il existe trois isoformes de cette dernière, Orai1, 2 et 3.

L'interaction entre STIM et Orai entraîne alors un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol. Cette interaction sera stabilisée par un senseur cytosolique : CRACR2A lorsque la concentration  $\text{Ca}^{2+}$  sera faible. Lorsque celle-ci sera importante, CRACR2A se dissocie et la CaM va inhiber Orai. Le RS pourra alors se remplir de  $\text{Ca}^{2+}$  via les pompes SERCA<sup>28,83</sup>.



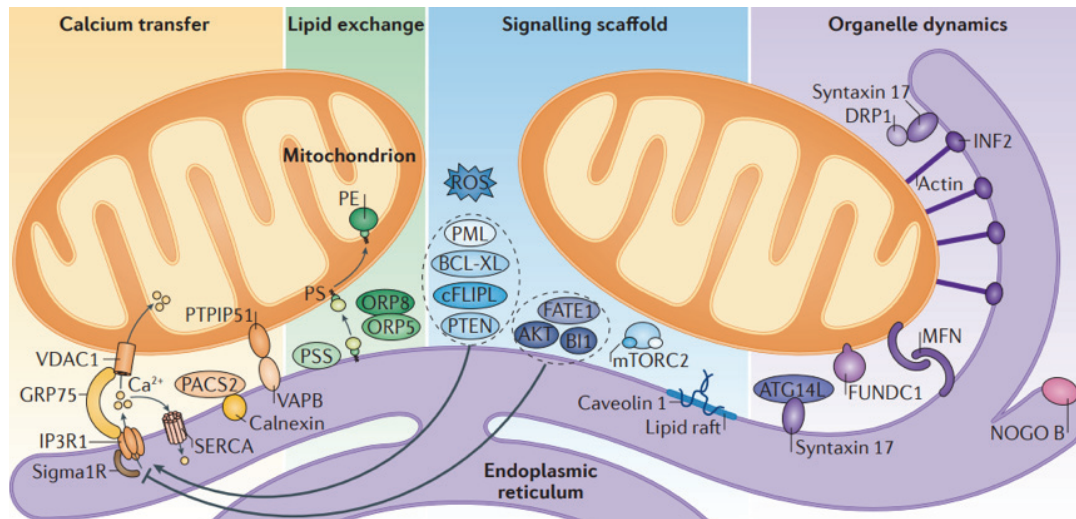
**Figure 14.** Processus de réapprovisionnement de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS

Source : Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling

De plus, certains TRP tels que les TRPC sont impliqués dans le phénomène des SOCEs mais ceci ne sera pas détaillé dans cette partie.

### 1-5.7 Les interactions réticulum sarcoplasmique-mitochondrie : les MAMs

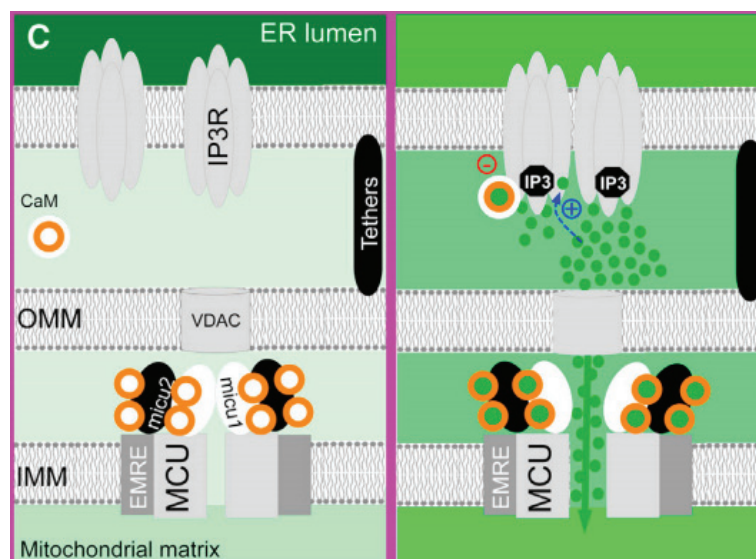
Les sites de contact entre le RS et la mitochondrie (figure 15) vont impacter plusieurs activités cellulaires incluant le métabolisme énergétique, la signalisation calcique (figure 16), l'homéostasie lipidique et d'autres régulations telles que la balance entre la mort cellulaire et la survie. A l'heure actuelle, environ 1000 protéines ont été localisées à proximité des MAMs<sup>84</sup>.



**Figure 15.** Structure et fonction des interactions RE-mitochondrie

Source : Sarcoplasmic reticulum–mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology

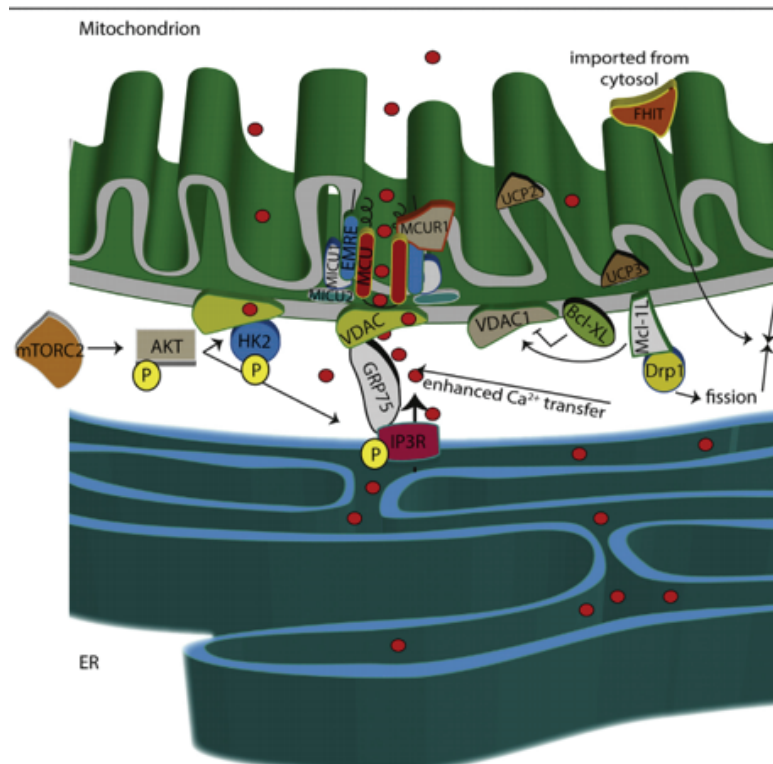
Dans cette partie, seul le transfert de calcium au sein des cardiomyocytes sera détaillé. Dans ces microdomaines, la concentration en Ca<sup>2+</sup> peut atteindre plus de 10 μM.



**Figure 16.** Libération de Ca<sup>2+</sup> entre le RS et la mitochondrie : rôle des MAMs.

Source : Intracellular Ca<sup>2+</sup> Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling

L'épaisseur de ce point de contact est comprise entre 10 et 25 nm. En revanche, malgré cette proximité, les membranes ne vont pas fusionner. Ce même type de contact est également caractérisé au sein des synapses chimiques et électriques, certains auteurs parlent par analogie de synapse RE-Mitochondrie<sup>85</sup>. Par conséquent, la cellule a mis en place un complexe protéique permettant de rendre les échanges faisables. Comme l'indique la figure 17, les protéines impliquées principalement dans ce transfert sont les suivantes : IP3R, SERCA, GRP75, VDAC (Voltage-dependent Anion Channel) et le complexe MCU<sup>86,87</sup>. Dans cette partie, seules les protéines précédemment citées seront détaillées.



**Figure 17.** Zoom sur le transfert calcique entre le RE et la mitochondrie

Source :Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death

- *Les protéines présentes du réticulum sarcoplasmique*

Les deux principales protéines impliquées sont les récepteurs IP3 et les pompes SERCA. D'autres protéines telles que GRP78, Sigma1 et des protéines chaperonnes auront un rôle de soutien.

IP3R est le principal récepteur connu, responsable de la libération de Ca<sup>2+</sup> dans ce complexe (cf. paragraphe 1-5-3). Il a également été montré que la diminution de la distance entre la mitochondrie et le RS (environ 5 nm) limite le transfert calcique. Le rôle principal d'IP3R est donc de réguler le Ca<sup>2+</sup> dans les MAMs entraînant la régulation du métabolisme cellulaire. En effet, cela permet de réguler la phosphorylation oxydative.

SERCA, localisée à proximité d'IP3R, va permettre la recapture du Ca<sup>2+</sup> dans le RS (cf. paragraphe 1-5-3). Une mutation de SERCA va entraîner une augmentation de transfert de Ca<sup>2+</sup> entre le RS et la mitochondrie révélant le rôle important de la pompe SERCA dans la régulation du Ca<sup>2+</sup> à proximité des MAMs<sup>88</sup>.

- *Les protéines présentes de la mitochondrie*

Les principales protéines impliquées sont celles composant le complexe MCU et VDAC. Le complexe MCU va permettre de faire entrer du Ca<sup>2+</sup> dans la mitochondrie. Cette protéine a été détaillée dans la partie « régulation du Ca<sup>2+</sup> mitochondrial ».

VDAC existe en trois isoformes. Au niveau des MAMs, l'isoforme VDAC 1 est majoritairement exprimée et interagit avec IP3R. La protéine est localisée au niveau de la membrane externe mitochondriale et permet de faire entrer le Ca<sup>2+</sup> jusqu'à MCU.

- *Les protéines de soutien*

Enfin, les protéines de soutien permettant de faire le lien avec le RS et la mitochondrie sont GRP75 et les mitofusines<sup>89</sup>.

GRP75 permet une liaison directe entre IP3R et VDAC. Cette protéine est essentielle, puisqu'il a été montré qu'en cas de délétion de ce gène, les échanges n'ont plus lieu, altérant alors la signalisation calcique au sein des MAMs. Cette protéine, comme son nom l'indique, a une taille de 75 kDa.

D'autres protéines telles que les mitofusines vont favoriser les interactions entre le RS et la mitochondrie. Il existe deux isoformes : mitofusine 1 et 2, localisées à la surface de la mitochondrie<sup>90</sup>. Elles vont former un pont entre ces deux organites. Les mitofusines vont former des dimères et seront impliquées dans les phénomènes de fusion des mitochondries. La fission mitochondriale est régulée par les protéines Drp1, Fis1 et Mff<sup>91</sup>.

La dérégulation de cette interaction ou la dérégulation de la signalisation calcique dans les différents organites va entraîner un changement métabolique mais également va déséquilibrer la balance entre la mort cellulaire et la survie menant à des pathologies telles que troubles du rythme, arythmie et hypertrophie cardiaque<sup>91</sup>... C'est pourquoi dans la partie suivante nous allons nous intéresser aux pathologies cardiaques et en particulier à l'infarctus du myocarde.

## 2- La physiopathologie du muscle cardiaque

### 2-1 Les maladies cardiovasculaires

#### 2-1-1 Incidence

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2012, les maladies cardiovasculaires (MCV) ont causé 17.5 millions de mort dans le monde, soit 30% des décès. Ce qui en fait une des premières causes de mortalité mondiale. En 2017, en Europe, on recense plus de 3.9 millions de décès, soit 45 % de la mortalité générale. En comparaison, le cancer cause 1.1 millions de décès. Sur la même période, en France, environ 140 000 personnes sont décédées de MCV<sup>92</sup>.

Au sein des MCV, on trouve les cardiopathies coronariennes (infarctus du myocarde (IDM)), les maladies cérébrovasculaires (accident vasculaire cérébral (AVC)), l'hypertension artérielle, les artériopathies périphériques, l'insuffisance cardiaque, les cardiopathies rhumatismales, congénitales et les cardiomyopathies<sup>93</sup>. La maladie cardiovasculaire la plus répandue est l'infarctus du myocarde, qui sera détaillé dans ce chapitre.

L'une des principales causes de MCV est l'athérosclérose qui est définie comme une obstruction progressive des vaisseaux sanguins causée par une plaque d'athérome. Cette pathologie est le reflet de l'oxydation et de l'inflammation des artères<sup>94</sup>. Le phénomène de mise en place de l'athérosclérose sera défini dans le deuxième chapitre. De plus, à l'échelle cellulaire, les dérégulations de l'homéostasie calcique sont la seconde cause de développement des MCV<sup>94</sup>, qui seront détaillées dans ce chapitre.

#### 2-1-2 Prévalence et contexte

En Europe, environ 85 millions de personnes vivent avec une MCV. Ces 25 dernières années, la prévalence de ces pathologies a augmenté de 30%, en partie expliqué avec l'accroissement de la population européenne et l'augmentation de l'âge moyen. En réalité, cette augmentation est partiellement contrebalancée grâce aux multiplications des campagnes de prévention et aux progrès thérapeutiques<sup>95</sup>.

Les facteurs comportementaux restent la cause majeure de déclenchement des MCV tels que le tabagisme, une mauvaise alimentation, l'obésité, la sédentarité, l'alcool et des facteurs psychosociaux comme le stress, mais également d'autres facteurs associés à des pathologies, tels que l'hypertension, le diabète, l'hyperlipidémie et le surpoids (évalué par l'indice de masse corporel). D'autres facteurs non modifiables sont également impliqués dans le développement des MCV comme l'âge, l'appartenance ethnique, le sexe et la génétique.

Il existe également une disparité régionale concernant l'apparition des MCV. La prévalence et les comorbidités sont plus importantes en Europe centrale et de l'est contrairement à l'Europe du nord, de l'ouest et du sud. Ceci est expliqué par les différents facteurs évoqués précédemment<sup>96</sup>.

#### 2-1-3 Impact économique et prise en charge

Comme le cancer, la mortalité due aux maladies cardiovasculaires telles que l'IDM et l'AVC ne cesse de croître. Il est prédit en effet que d'ici 2030, 23.6 millions de personnes en seront victimes. C'est pourquoi, les recherches sur ce sujet sont très nombreuses et les essais cliniques très abondants.

Ainsi, il a été estimé que les MCV coûtent, par an, à l'Europe environ 210 milliards d'euros et 15.2 millions d'euros à la France. Dans ce montant sont comptabilisés le coût du système de santé, les médicaments, les pertes de productivité, et toutes les campagnes de prévention.



En France, plusieurs programmes nationaux visent à diminuer les facteurs de risque comportementaux tels que ceux visant à la réduction du tabagisme et à promouvoir l'axe nutrition-santé (« manger bouger » ; « consommer 5 fruits et légumes par jour »), le plan santé sport bien-être, le plan national santé environnement ainsi que le plan de santé au travail 2016-2020<sup>97</sup>. Il existe également des campagnes de prévention plus ciblées telles que la campagne « OUP'S » qui sensibilise les femmes à prendre soin de leur cœur plus souvent<sup>98</sup> ou des campagnes de la fédération française de cardiologie telle que les parcours du cœur, visant à organiser des animations afin de réduire la sédentarité<sup>99</sup>.

Enfin, la prise en charge des patients s'est nettement améliorée ces dernières décennies avec une meilleure sensibilisation de la population aux premiers signes de survenue d'une MCV, la mise en place de défibrillateur automatisé externe, un meilleur accès aux structures de soins spécialisées et d'une rapidité de prise en charge. En revanche, à l'heure actuelle, avec le changement de style de vie des femmes, notamment de moins de 50 ans, le nombre d'IDM a triplé. En effet, elles sont concernées de plus en plus jeunes et ont des symptômes méconnus, réduisant leur prise en charge<sup>100</sup>. C'est pourquoi la prévention, la prise en charge et le suivi des patients reste un enjeu socio-économique très important.

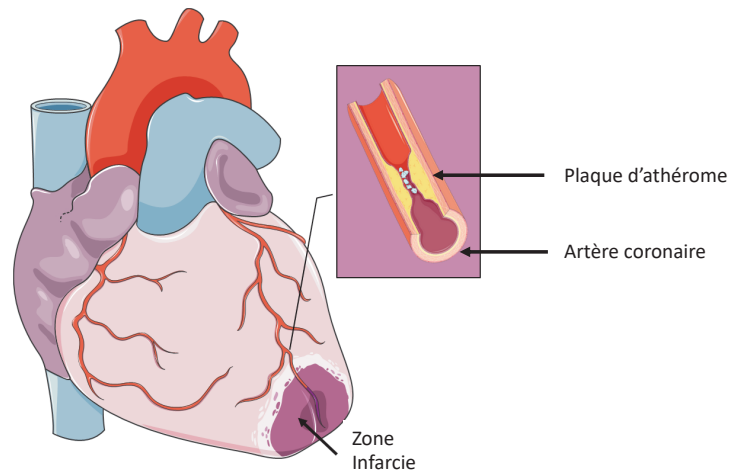
## 2-2L'infarctus du myocarde : description

Chez l'Homme, l'infarctus du myocarde est caractérisé par une forte douleur au milieu du sternum, donnant une sensation d'oppression soit de manière vague, soit de façon assez brutale. En quelques minutes, cette douleur va se propager dans le bras gauche, dans le cou et dans la mâchoire. D'autres symptômes vont s'y associer tels qu'une fatigue intense, des palpitations, des sueurs, une pâleur et/ou un malaise<sup>99</sup>... Il a récemment été décrit que les symptômes chez la femme étaient légèrement différents et qu'elles étaient touchées de plus en plus jeunes avec leur changement de style de vie<sup>100</sup>. En effet, les symptômes sont les suivants : la sensation d'épuisement, l'essoufflement à l'effort et les nausées, mais également des douleurs dans l'épaule gauche.

Malheureusement, dans certains cas, plus graves, la perte de connaissance arrive quelques minutes après l'arrivée des premiers symptômes, conduisant à l'arrêt cardiaque, aussi appelé la mort subite.

A l'échelle de l'organe (figure 18), l'IDM est décrit comme une obstruction d'une artère coronaire, induisant alors un arrêt de l'approvisionnement en sang du tissu en aval de cette obstruction<sup>101</sup>. Ceci est causé par la formation d'un thrombus, la plupart du temps issu d'une plaque d'athérome. Le tissu non approvisionné en oxygène et en nutriments sera alors en ischémie. Il y aura également un arrêt de l'élimination des déchets. A l'heure actuelle, le seul traitement possible est la désocclusion de l'artère, menant à un afflux important de sang dans la zone préalablement ischémisée, ce qui est communément appelé la reperfusion. Ceci est effectué par administration d'anti-thrombotique et/ou par angioplastie en faisant passer un ou plusieurs stents<sup>102</sup>. Malheureusement, aussi bien l'ischémie que la reperfusion va entraîner une mort cellulaire<sup>103</sup>. cette zone sera nommée la zone nécrosée<sup>104</sup>.



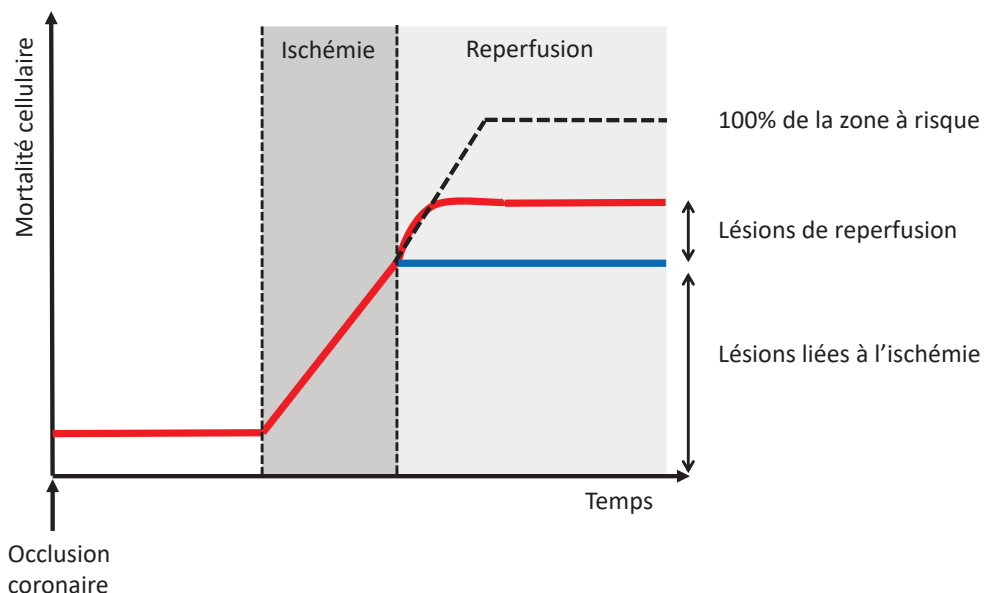


**Figure 18.** Infarctus du myocarde.

Source : Servier Medical Art

Comme l'illustre la figure 19, la courbe rouge représente l'évolution dans le temps des lésions suite à une séquence d'ischémie et de reperfusion. Étonnamment, il y a un rebond de la mortalité cellulaire au moment de la reperfusion. Ceci est appelé le paradoxe de l'oxygène, puisque l'afflux massif d'oxygène dans le tissu va entraîner des dommages<sup>105</sup>. Les lésions générées au cours de la reperfusion sont nommées « lésions de reperfusion ». Ainsi, une partie des stratégies de cardioprotection vont alors se focaliser sur cette fenêtre de protection puisque les lésions d'ischémie, elles, sont inévitables.

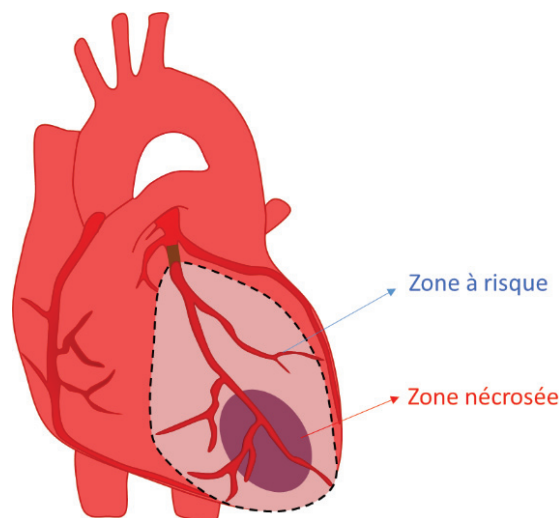
La courbe bleue, représente les lésions uniquement liées à l'ischémie. La courbe en pointillée représente ce qu'il se passerait si le tissu n'était pas reperfusé. La mortalité cellulaire atteindrait alors 100% de la zone ischémique<sup>104</sup>.



**Figure 19.** Lésions d'ischémie-reperfusion

(adapté de Garcia Dorado et Piper, 2006)

Pour évaluer l'importance des lésions d'ischémie-reperfusion (I/R), il est important de définir différentes zones au sein du tissu infarcté (figure 20) : (i) la zone à risque (ZR), qui est la partie du cœur non irriguée, (ii) et la zone nécrosée (ZN). Les lésions d'I/R seront ainsi proportionnelles à la taille de la ZR. La taille de la ZN, au sein de la zone infarctée, peut-être réduite dans un premier temps en reperfusion le tissu et dans un second temps en adoptant des stratégies de cardioprotection. En effet, il a été montré qu'après une ischémie-reperfusion, des cœurs de chiens « protégés » ont une taille d'infarctus plus faible que des cœurs de chien contrôles subissant seulement l'I/R. La cardioprotection utilisée ici est le préconditionnement ischémique consistant à effectuer de brèves séquences d'ischémie-reperfusion juste avant la longue séquence d'I/R. Ils ont également montré que des cœurs non reperfusionnés auront une taille d'infarctus maximale<sup>103</sup>. La partie 3-7 sera dédiée aux stratégies de cardioprotection dans le muscle cardiaque.



**Figure 20.** Zone à risque et zone nécrosée.

Source : Servier Medical Art

Il faut également retenir que le phénomène d'I/R n'a pas seulement lieu lors de l'IDM mais également lors de chirurgie cardiaque avec une circulation extracorporelle, par exemple ou lors d'une transplantation cardiaque.

### 2-3L'hypoxie et ses conséquences

Comme décrit précédemment, au cours de l'IDM, les cellules du cœur seront sujettes à l'hypoxie. A l'échelle cellulaire, la partie la plus impactée sera la production énergétique. En effet, la première conséquence de l'hypoxie sur les cardiomyocytes est l'arrêt de la chaîne respiratoire mitochondriale. Puisque ces cellules sont à haut niveau oxydatif, cet arrêt aura des conséquences délétères. En effet, la forte diminution de la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) entraîne alors une chute du potentiel de membrane mitochondriale<sup>106</sup>.

En parallèle à cette hypoxie, l'arrêt de l'approvisionnement en nutriments va entraîner un switch métabolique des cardiomyocytes, passant de l'oxydation des acides gras à la glycolyse anaérobie<sup>107</sup>. Malheureusement, cette dernière n'est pas suffisamment efficace, et ne permet pas de synthétiser les quantités d'ATP nécessaires au bon fonctionnement de la cellule. En contrepartie, la glycolyse anaérobie va entraîner une accumulation de lactate dans les cardiomyocytes et par conséquent, acidifier le milieu intracellulaire de ces cellules. Chez le rat, le pH sera alors proche de 6,4 alors que le pH physiologique

est de 7,4<sup>108</sup>. Cette acidification va entraîner une dérégulation de l'homéostasie ionique dans les cellules. Cette partie sera détaillée dans le point 3-4.

Toutes ces dérégulations vont entraîner une augmentation de la mortalité cellulaire. En effet, lors de l'hypoxie, les déchets métaboliques ne sont plus éliminés, entraînant alors une accumulation de lactate, de phosphates, de protons et d'ions ammonium causant ainsi un choc osmotique. La membrane des cellules sera alors lysée provoquant la mort cellulaire<sup>109</sup>. De plus, l'hypoxie va entraîner la production d'espèce radicalaire de l'oxygène (ROS)<sup>110</sup>.

## 2-4 Le paradoxe de la reperfusion

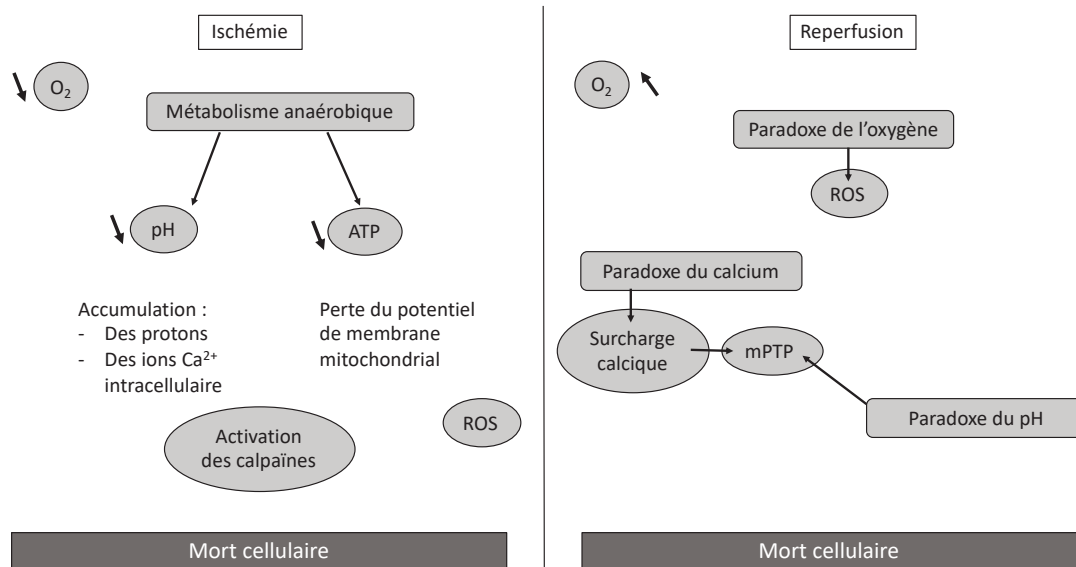
La reperfusion du tissu a lieu suite à la désocclusion de l'artère. Il se produit alors une arrivée massive de sang riche en oxygène et en nutriments dans le tissu. Comme décrit dans la partie 2-3, ceci engendre des conséquences délétères sur les cellules : une augmentation de la mortalité cellulaire, pour la première fois décrite en 1960 par Jennings *et al*<sup>111</sup>. L'une des premières lésions reportées est le « stunning » myocardique, faisant référence à une dysfonction mécanique mesurée même avec le retour de l'approvisionnement sanguin.

La reperfusion massive du tissu préalablement infarci provoque dans un premier temps un phénomène inattendu appelé « le paradoxe de l'oxygène ». En effet, cet apport brutal d'oxygène va générer un stress oxydatif. Ce stress va diminuer la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO). Cette dernière molécule en temps normal a pour effet d'inhiber l'accumulation des neutrophiles, d'inactiver des radicaux superoxydes et d'améliorer le flux sanguin coronaire<sup>112</sup>. Le paradoxe de l'oxygène participe donc activement à la production de ROS, tels que l'anion superoxyde mais également le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et les radicaux libres secondaires. Dans des conditions non-pathologiques, il y a une balance entre les processus pro- et anti-inflammatoires. Dans des conditions d'I/R, il y a donc une dérégulation de cette homéostasie. Cela explique pourquoi certaines thérapies utilisent des molécules anti-oxydantes.

Un second paradoxe est également décrit au cours de la reperfusion : le paradoxe du calcium (Ca<sup>2+</sup>). En effet, la concentration en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire reste élevée au cours des premières minutes de reperfusion, menant à une surcharge mitochondriale<sup>113</sup>. Ceci sera décrit dans une prochaine partie, 3-4.

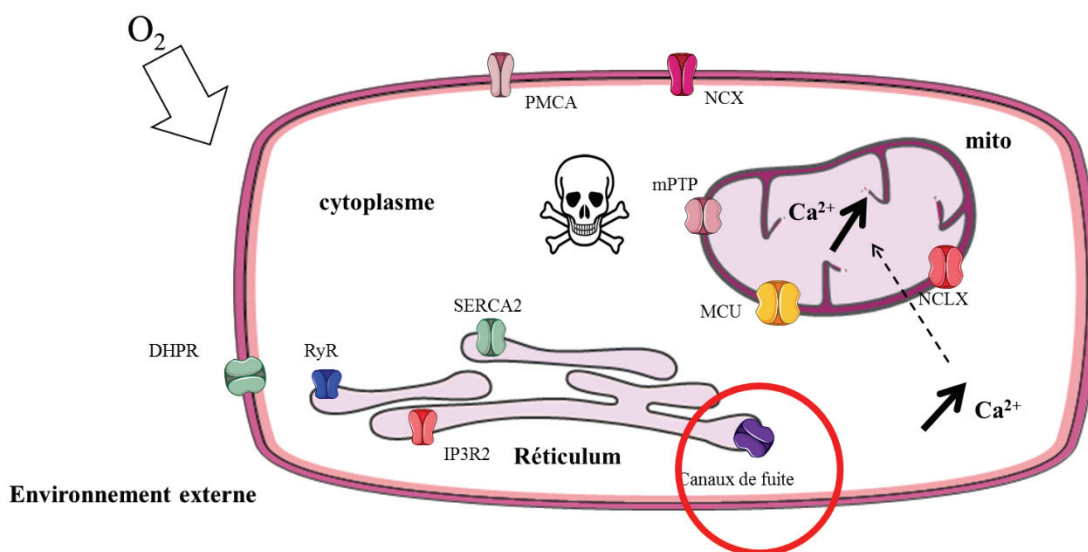
Enfin, le pH intracellulaire va également être restauré au cours de la reperfusion, mais la libération des protons de la cellule par le fonctionnement de l'échangeur sodium/proton (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>/NHE) aura des conséquences toutes autant délétères. En effet, le fonctionnement de cet échangeur entraîne une accumulation des ions Na<sup>+</sup> dans le milieu intracellulaire contre la sortie des ions H<sup>+</sup>, menant à une activation de l'échangeur sodium/calcium (Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>/NCX), celui-ci sera alors en configuration inversée. En effet, il va permettre de libérer les ions Na<sup>+</sup> mais en contrepartie, le calcium va s'accumuler dans le milieu intracellulaire, participant à la surcharge calcique cytoplasmique. La restauration du pH intracellulaire au moment de la reperfusion entraîne une augmentation de la concentration de Ca<sup>2+</sup> cytosolique<sup>114</sup>.

En conclusion, ces trois paradoxes (oxygène, calcium et pH) vont mener à une augmentation de la mortalité cellulaire. Comme le résume la figure 21, il a été montré qu'aussi bien l'ischémie que la reperfusion au cours de l'IDM a des conséquences délétères sur les cellules cardiaques (surcharge calcique, production de ROS, activation des calpaïnes, inflammation, et mort cellulaire<sup>115</sup>) qui mènent à long terme à l'insuffisance cardiaque. Plus l'IDM sera important, plus le remodelage sera étendu, entraînant ainsi une diminution de la fraction d'éjection ventriculaire<sup>116</sup>.



**Figure 21.** Conséquences de l'ischémie et de la reperfusion au niveau cellulaire

## 2-5 Les dérégulations calciques au cours de l'hypoxie/réoxygénation



**Figure 22.** Conséquences d'un arrêt de l'approvisionnement en  $O_2$  sur le cardiomyocyte

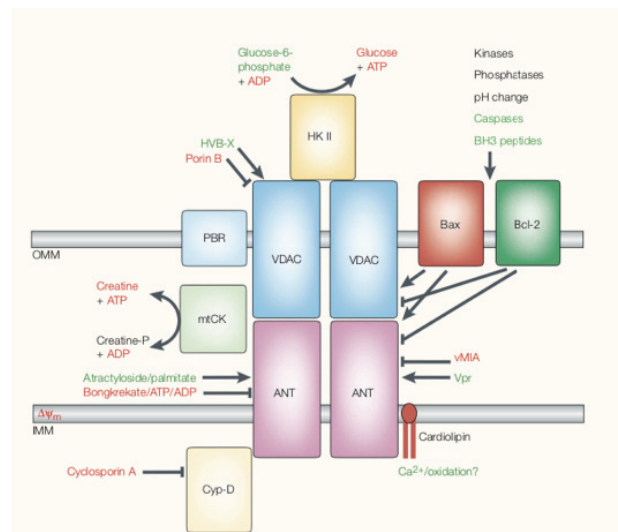
Comme décrit précédemment, au cours de l'hypoxie, il n'y a plus d'apport en oxygène entraînant alors une nette diminution de la synthèse d'ATP. La figure 22 permet d'illustrer les dérégulations calciques au cours de l'hypoxie : il se produira un arrêt du fonctionnement d'une partie des pompes SERCA et PMCA puisqu'elles sont ATP-dépendantes. Ceci aura pour conséquence d'entraîner une vidange progressive du  $Ca^{2+}$  réticulaire via les canaux de fuite calcique<sup>117</sup>. En parallèle, la concentration en  $Ca^{2+}$  cytosolique va augmenter mais également celle de la mitochondrie puisque cette dernière a pour rôle de pomper le  $Ca^{2+}$  cytosolique en excès. Le  $Ca^{2+}$  cytosolique ne pourra pas non plus être extrudé du cytoplasme puisque la pompe PMCA ne fonctionne plus et que l'échangeur NCX passe en « reverse mode » lors d'une diminution du pH<sup>114</sup>. L'augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  mitochondrial, si elle est trop forte, entraînera la mort des cardiomyocytes via la libération du cytochrome C (ouverture

du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP)) et en partie l'activation de la voie des caspases<sup>118</sup>.

Ainsi, comme décrit précédemment, les concentrations calciques cytoplasmique et mitochondriale deviennent élevées au cours de l'hypoxie, mais le restent également au cours de la reperfusion, malgré le réapprovisionnement du tissu et des cellules en oxygène et nutriments<sup>113</sup>. Ceci est appelé le paradoxe du calcium. Ces dérégulations de l'homéostasie calcique au cours de l'hypoxie/réoxygénation vont mener à une augmentation de la mort cellulaire, un stress du réticulum et une surcharge calcique mitochondriale mais également à une hypercontracture des cardiomyocytes<sup>119</sup>.

### 2-5-1 La surcharge calcique mitochondriale

Lors des dérégulations calciques survenant au cours de l'H/R, il a été montré que le  $Ca^{2+}$  s'accumule en partie dans la mitochondrie jusqu'à atteindre un point de non-retour entraînant la rupture de la double membrane mitochondriale et par conséquent la mort de cardiomyocytes<sup>114</sup>. Cette lésion de la membrane est communément appelée ouverture du mPTP. A l'heure actuelle, la structure et la fonction du mPTP sont très controversées. La transition de perméabilité est caractérisée par une augmentation soudaine de la perméabilité de la membrane interne mitochondriale aux ions et aux solutés<sup>118</sup>. L'hypothèse est que ce pore serait constitué des protéines suivantes : une translocase 18 kDa (TSPO), Adénine nucléotide translocator (ANT), VDAC, cyclophiline D (CyD) mais également des protéines telles que l'héxokinase II et certaines de la famille de Bcl-2. Une représentation hypothétique est illustrée en figure 23<sup>120</sup>. Il a été pensé que ces protéines ne sont pas en lien direct mais formeraient un « pore » lors d'un besoin particulier comme par exemple une surcharge calcique mitochondriale.



**Figure 23.** Organisation hypothétique du mPTP

Source : The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens

Une autre hypothèse serait que le mPTP formerait l'ATP synthase (5<sup>ème</sup> et dernier complexe de la chaîne respiratoire). En effet, il a été montré que la CyD interagit avec l'ATP synthase<sup>121</sup>. Ce complexe protéique est très ciblé au cours des stratégies de cardioprotection, ceci sera détaillé dans le chapitre 4.

La CyD est encodée par le gène *Ppif* dont il existe 16 isoformes. La modulation de ce gène entraîne une augmentation de la sensibilité au  $Ca^{2+}$  et à la cyclosporine A (CsA). Cette dernière est un inhibiteur de la CyD, entraînant alors son inhibition et par conséquent l'inhibition de l'ouverture du mPTP. La CyD

est localisée à proximité de la membrane interne mitochondriale et va se fixer sur l'ANT<sup>122</sup>. Il a également été montré qu'ANT interagit avec VDAC.

De plus, l'ouverture de ce pore serait initiée par une surcharge mitochondriale. Ceci entraîne alors une dissipation du potentiel de membrane mitochondrial, le gonflement de la mitochondrie, et la libération de facteurs pro-apoptotiques dans le cytoplasme tels que le cytochrome C, des pro-caspases, des co-activateurs de caspases et des facteurs entraînant l'apoptose (AIF). Il a également été identifié un défaut de la synthèse d'ATP dans la mitochondrie au moment de la reperfusion<sup>123-125</sup>. Cette surcharge calcique mitochondriale entraîne également la production de ROS, et d'acides gras libres ayant des conséquences sur l'ouverture du mPTP en favorisant son ouverture<sup>124</sup>.

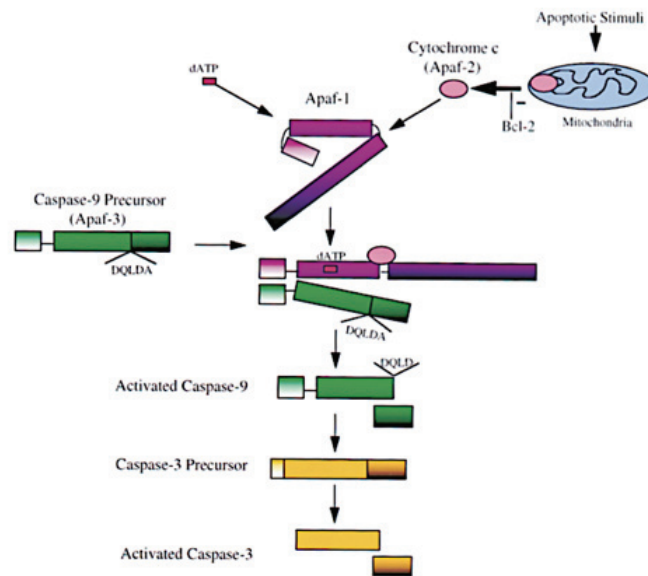
### **2-5-2 Induction de la mort cellulaire dans le cytoplasme médiée par le calcium**

Comme cela a été démontré précédemment, la surcharge calcique mitochondriale va être à l'initiation de facteurs pro-apoptotiques. En effet, il a été mis en évidence que le  $Ca^{2+}$  avait également un rôle dans la régulation de la mort cellulaire. Le  $Ca^{2+}$  va être un déclencheur de la mort cellulaire sous des conditions de surcharge calcique, ce qui est le reflet de l'H/R. Le distinguo entre apoptose, nécrose, nécro-apoptose... ne sera pas traité dans cette partie puisque ce sujet est toujours controversé<sup>126</sup>.

En cas de dérégulations de l'homéostasie calcique cytosolique, les calpaïnes vont être sur-activées entraînant alors leur translocation à la membrane plasmique<sup>127</sup>. Elles vont hydrolyser des protéines telles que l' $\alpha$ -fodrine et l'ankyrine. Ceci va entraîner une fragilité membranaire sensibilisant les cardiomyocytes à la mort cellulaire.

Certaines protéines de la famille de Bcl-2, ayant un rôle fondamental dans l'intégration des signaux pro et anti-apoptotiques, seront impactées lors des dérégulations calciques. En effet, il a été montré que Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> contrôlent la fuite calcique réticulaire via une interaction avec IP3R<sup>128</sup>, limitant ainsi la surcharge de calcium cytosolique. De plus, en conditions physiologiques, il y a une balance entre les facteurs pro et anti-apoptotiques. Au cours de l'hypoxie-réoxygénation, cette balance est déséquilibrée. Initialement, Bcl-2 va inhiber Bax et d'autres protéines pro-apoptotiques. Lors de dérégulations, Bax ira se fixer sur la membrane interne mitochondriale et participera à la libération du cytochrome c<sup>129</sup>.

Comme l'illustre la figure 24, lorsque le cytochrome c va être libéré (ouverture du mPTP et fixation de Bax), et entraîner la la formation de l'apoptosome. En effet, ce complexe est formé à partir de la protéine Apaf-1, deux molécules de pro-caspapase-9 et deux molécules de cytochrome c. L'apoptosome va cliver la pro-caspase-9 en caspase-9<sup>130</sup>. Lorsque la caspase-9 est activée, elle permet de cliver la caspase 3 et la caspase 7. Ces deux dernières entraînent la mort des cardiomyocytes<sup>131,132</sup>.



**Figure 24.** Activation des caspases après libération du cytochrome c

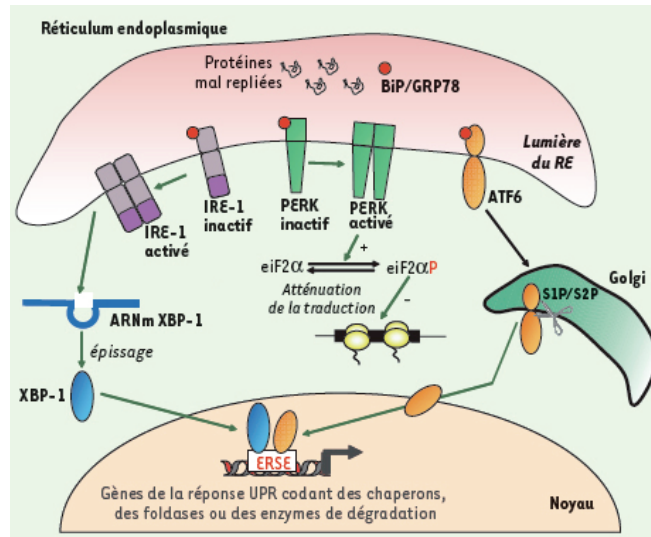
Source :Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade  
n

### 2-5-3 Le stress du réticulum médié par la fuite calcique réticulaire

Enfin, au cours de l'hypoxie, se produit une vidange du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS via les canaux de fuite calciques due à l'arrêt du fonctionnement des pompes SERCA. Cette vidange progressive va entraîner un stress du réticulum. En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$  est un prérequis pour le fonctionnement des protéines chaperonnes permettant la bonne conformation des protéines. Ceci va induire l'activation des voies de signalisation telles que la réponse UPR permettant à la cellule de s'adapter à ce stress<sup>133,134</sup>.

En conditions normales, les protéines transmembranaires du RE, ATF6 $\alpha$  (Activating transcription factor 6), IRE1 (inositol-requiring kinase 1) et PERK (dsRNA-activated protein kinase-like ER kinase) sont liées à la protéine chaperonne GRP78 afin de les maintenir dans un état inactif (figure 25). Lorsque des protéines non conformes s'accumulent (ou en cas d'un autre stress) dans la lumière du RE, GRP78 va se dissocier de ces trois protéines et initier la réponse UPR<sup>13,40,133-137</sup>. GRP78 se dissocie également d'une autre protéine appelée le translocon entraînant également un stress du RE<sup>40</sup>.





**Figure 25.** Les trois voies de signalisation impliquées dans la réponse UPR

Source : <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/7UnfoldedProtResp/1UnfoldedProtResp.htm>

- *ATF6α*

*ATF6α* est une protéine transmembranaire qui sera transloquée vers l'appareil de Golgi lorsque GRP78 se détache. Elle entraîne l'activation de facteur de transcription et l'expression de protéines telles que CHOP (CCAAT/enhancer-binding homologous protein), GRP78 et XBP1 (X-box binding protein 1) dans le but de diminuer la synthèse protéique.

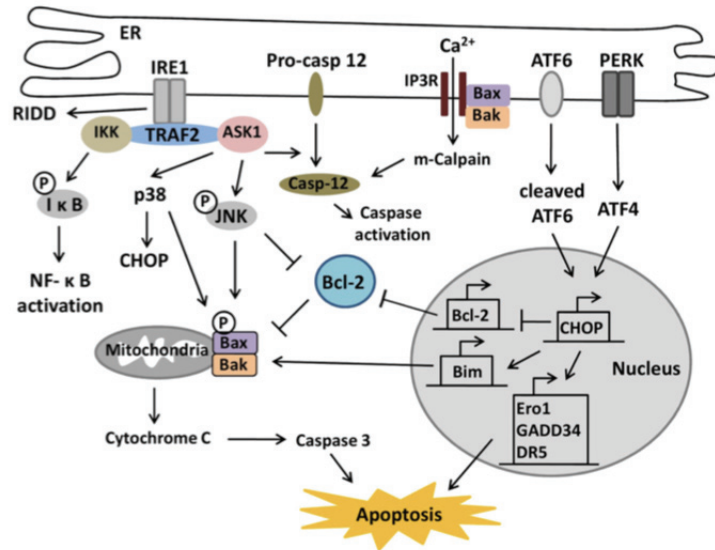
- *IRE1*

*IRE1* est une kinase transmembranaire, activée après la libération de GRP78. Une fois activée, elle va cliver XBP1 qui sera transloqué dans le noyau et va initier l'activation de gène de la réponse UPR.

- *PERK*

*PERK* est également une protéine transmembranaire qui, lorsque GRP78 se dissocie, va s'homodimériser et s'autophosphoryler. *PERK* activé va phosphoryler la sous-unité  $\alpha$  de *eIF2α* (eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ ) permettant de limiter la traduction des protéines et par conséquent diminuer la synthèse protéique. La phosphorylation de *eIF2α* entraîne l'activation de *ATF4* induisant une diminution des protéines mal conformées.

Comme l'indique la figure 26, ces trois voies de signalisation sont activées au cours du stress du RE, menant ainsi à l'augmentation des réponses pro-apoptotiques entraînant alors la mort des cardiomyocytes<sup>134</sup>.



**Figure 26.** Stress du réticulum et impact sur la mort cellulaire

Source :Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets

## 2-6 Conclusion

Pour conclure cette partie, le concept de régulation distincte de la survie cellulaire, de l'apoptose et de la nécrose implique de nombreuses voies de signalisation imbriquées dont certaines sont clairement connues. Des perturbations des flux calciques intracellulaires, notamment, peuvent être délétères pour les cellules. Le défi actuel, dans le cadre de la recherche translationnelle en cardiologie réside en :

- 1- Caractériser les dérégulations spatiotemporelles des flux calciques au sein des cardiomyocytes au cours de l'infarctus du myocarde ;
- 2- De relier ces phénomènes aux stratégies de cardioprotection mises en jeu à ce jour ;
- 3- D'améliorer le point 2 à la connaissance du point 1.

## 2-7 Les stratégies de cardioprotection

Toute stratégie de cardioprotection sera considérée comme un moyen de diminuer la mortalité cellulaire au cours de l'infarctus du myocarde. En effet, les lésions engendrées au cours de l'ischémie-reperfusion peuvent être en partie réversibles. Il a été montré dans la littérature qu'il existait différentes approches afin de protéger les cellules et notamment les cardiomyocytes<sup>138</sup>. La première stratégie aussi évidente soit elle, est de reperfusionner le tissu préalablement ischémié par fibrinolyse ou par angioplastie. Ceci a montré une réelle diminution de la taille d'infarctus et de la mortalité<sup>103,139</sup>. Les progrès de prise en charge ont permis de diminuer le taux de mortalité à 30 jours de 10,2% en 1995 à 2,1% en 2005. Enfin, dans le but de réduire les lésions de reperfusion, le conditionnement ischémié ou pharmacologique semble être une stratégie intéressante, ceci permettra au tissu d'être préparé aux lésions d'I/R.

### 2-7-1 La prise en charge des patients

Comme décrit précédemment, l'une des premières stratégies de cardioprotection est d'améliorer la prise en charge des patients lorsqu'ils manifestent les premiers symptômes d'IDM. Lorsque le patient est dans les mains des urgentistes, seul un électrocardiogramme permet d'identifier la gravité de l'infarctus (artère totalement bouchée ou non). Puis, le patient est transporté dans un centre de cardiologie

interventionnelle. L'objectif sera de déboucher l'artère occluse dans les plus brefs délais. En effet, l'IDM est mortel chez 1 patient sur 10 dans l'heure de sa survenue.

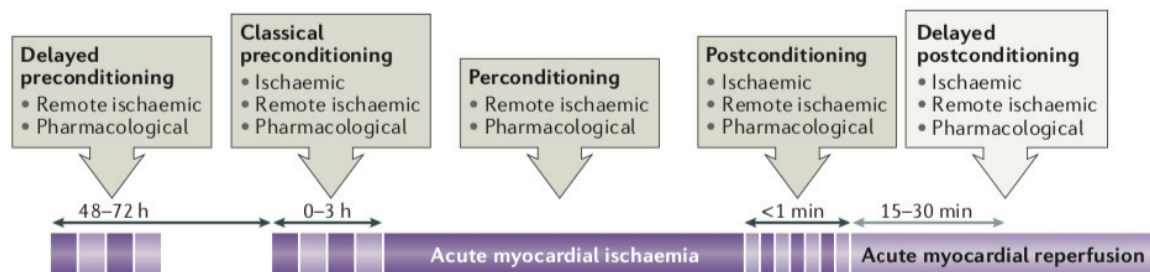
Avant d'être reperfusé, le patient reçoit de l'aspirine (antiagrégant plaquettaire), de l'héparine (anticoagulant) et du ticagrelor (antiagrégant contre la voie de l'adénosine diphosphate). La reperfusion s'effectue soit par fibrinolyse (médicaments permettant de dissoudre le caillot sanguin), soit par angioplastie afin de dilater l'artère en faisant passer un ballonnet ou en posant des stents afin de maintenir l'artère ouverte. En effet, si le délai d'intervention de l'angioplastie est supérieur à 90 minutes (des premiers symptômes jusqu'à l'arrivée dans le centre de cardiologie interventionnelle), le patient recevra un agent thrombolytique. Lorsque le délai est inférieur à 90 minutes, l'angioplastie est systématique.

Le patient sera par la suite transféré dans une salle de coronarographie diagnostique et interventionnelle, où il reçoit des antiagrégants plaquettaires et de l'héparine. Au moment de la reperfusion, de l'héparine, et des antiplaquettaires sont délivrés en bolus. De plus, la troponine dans la circulation sera dosée<sup>140</sup>.

A la sortie de l'hôpital, les patients bénéficieront d'un suivi particulier car 5% des victimes d'un infarctus décèdent dans l'année suivant l'hospitalisation. De plus, il y a environ 15% de récidence à un an<sup>141</sup>.

## 2-7-2 Les différents types de conditionnement

En 2016, le 30<sup>ème</sup> anniversaire de la découverte du conditionnement ischémique a été célébré. Ceci consiste à obstruer une artère du cœur pendant un bref instant dans le but de diminuer la mortalité cellulaire, ce qui paraît contre-intuitif. Comme l'indique la figure 27, la manipulation peut avoir lieu avant, pendant ou après l'infarctus du myocarde.



**Figure 27.** Les différentes stratégies de cardioprotection.

Source : Ischaemic conditioning and reperfusion injury

- *Le préconditionnement classique (PréC)*

Le PréC a été mis en évidence pour la première fois en 1986 par Murry, Jennings et Reimer<sup>139</sup>. Cette procédure consiste à alterner une obstruction et une reperfusion de l'artère coronaire pendant 5 minutes et cela quatre fois d'affilée. Dans cette étude, des chiens subissent une ischémie de 90 minutes et une reperfusion de 3 jours. Ils ont mis en évidence, que les chiens ayant subi un PréC, ont une taille d'infarctus diminuée de 75% par rapport aux chiens contrôles, n'ayant pas reçu un PréC. Ce type de conditionnement a été largement étudié au cours de ces trente dernières décennies et a été testé sur de nombreuses espèces dont l'Homme. De manière intéressante, ce protocole est également très facilement applicable à d'autres organes ou tissus. En outre, le stimulus peut être de nature ischémique et/ou pharmacologique. En effet, chez l'Homme, plusieurs études ont montré le bénéfice d'un PréC ischémique, consistant pour la plupart de ces études en trois cycles de 30 secondes d'ischémie-

reperfusion. La revue de Hansenloy D et Yellon D en 2016 recense ces différentes études cliniques et montre une diminution de la taille d'infarctus avec le PréC ischémique.

Les PréC détaillés ci-dessus sont de type ischémiques ou mécaniques mais des PréC pharmacologiques peuvent également être effectués. Ils consistent en l'injection, en amont de l'ischémie (avant une chirurgie cardiaque de type circulation extracorporelle, ou une greffe), d'une molécule pharmacologique, très souvent en intraveineuse, dans le but de diminuer la taille d'infarctus. Malheureusement, la plupart des études ont montré qu'ils n'avaient pas d'effet positif à long terme pour le patient. Les molécules utilisées sont par exemple des agents anti-inflammatoires ou antioxydants<sup>103,142</sup>.

La première fenêtre de protection est comprise entre 3 heures et quelques minutes avant l'infarctus. Une seconde fenêtre envisageable, retardée, détaillée dans la partie suivante. L'inconvénient de ce conditionnement est qu'il est difficilement applicable en clinique pour un infarctus du myocarde car cette pathologie ne peut naturellement pas être anticipée. En revanche, il peut être employé pour toutes les chirurgies cardiaques programmées.

Malheureusement, les mécanismes sous-jacents de cette protection sont à l'heure actuelle complètement méconnus. Néanmoins, on sait que la protection passe par les voies de signalisation suivantes : RISK, SAFE et la voie du NO.

- *Les préconditionnements à distance*

Ce type de conditionnement peut être à distance de façon spatiale ou temporelle.

Ainsi, lors du conditionnement à distance spatialement, le stimulus sera délivré sur un autre organe. Cette technique est appelée « remote conditioning ». En effet, le conditionnement sur le cœur n'est pas toujours faisable. Une multitude d'organes tels que les reins, l'estomac, les poumons, les intestins, le membre inférieur ou supérieur peuvent être soumis à un protocole d'ischémie-reperfusion afin de protéger à distance le muscle cardiaque<sup>143</sup>. Par exemple, un brassard est positionné sur le bras des patients, un cycle de 5 minutes avec le brassard gonflé à 200 mmHg et 5 minutes dégonflé est effectué et répété 3 fois, ce qui a *in fine* un effet paracrine. Il a été montré que ce type de conditionnement limite les lésions endothéliales à la suite d'une I/R<sup>144</sup>. Ces effets ont également été montrés comme cardioprotecteur dans des études sur l'animal et notamment le rat<sup>145</sup>.

En revanche, lorsqu'il est à distance temporellement, le stimulus sera délivré entre 48 et 72 heures avant l'évènement ischémique. Cette période se nomme la seconde fenêtre de protection<sup>138</sup>. Ceci entraîne plutôt une réponse autocrine.

- *Le perconditionnement (PerC)*

Le PerC est un stimulus qui sera délivré au cours de la séquence d'ischémie. Il ciblera les mêmes voies de signalisation que le PréC. Comme pour ce dernier, l'anticipation et la prise en charge du patient sont compliquées. Il est donc difficile de prévoir un PréC ischémique ou pharmacologique pour l'infarctus du myocarde. En revanche, ceci peut être utile pour les chirurgies cardiaques telles que les greffes cardiaques, ou nécessitant une circulation extracorporelle.

Par exemple, une équipe canadienne en 2007 a montré que sur le cochon, le perconditionnement à distance (induit par brassard sur la patte) induit au moment de l'ischémie, préserve les fonctions cardiaques, diminue les perturbations du rythme et la taille d'infarctus<sup>146</sup>.

- *Le postconditionnement (PostC)*

Le PostC est déclenché au moment de la reperfusion du tissu. Le PostC peut être appliqué entre une minute avant la reperfusion et jusqu'à environ 30 minutes après le début de la reperfusion. En 2003, Zhao et son équipe ont montré que des brefs épisodes d'I/R sont cardioprotecteurs après une séquence complète d'I/R. En effet, les cœurs de chiens avaient des tailles d'infarctus plus faibles (moins 50 %) lorsqu'ils subissaient trois cycles de reperfusion de 30 secondes suivis d'une ischémie de 30 secondes avant les 3 heures de reperfusion<sup>147</sup>. Ce sont les premiers à avoir mis en évidence l'effet cardioprotecteur du PostC bien qu'en 1996 ce terme ait été décrit par une équipe de Séoul ayant réalisé une reperfusion intermittente sur des chats, déclenchant une atténuation de la fibrillation ventriculaire à la reperfusion<sup>148</sup>. Cette étude a initié d'autres études sur différentes espèces telles que le lapin, la souris, le cochon<sup>149-151</sup> ...

D'un point de vue clinique, le PostC ischémique semble le mieux approprié puisqu'il peut être effectué au moment où le patient arrive à l'hôpital en amont de la reperfusion. Il a été montré que ce conditionnement est efficace chez une grande variété d'espèces telles que les rongeurs, les cochons et également chez l'humain<sup>152</sup>. Malheureusement, les effets cardioprotecteurs mesurés ne sont pas aussi efficaces que ceux générés par le PréC. Les mécanismes mis en jeu semblent similaires à ceux du PréC. En revanche, quelques points sont différents entre le PréC et le PostC. En effet la reperfusion intermittente (PostC) permet de retarder la restauration du pH, ce qui limite l'ouverture du mPTP. Le PréC pharmacologique n'a pas non plus été concluant concernant la diminution de la taille d'infarctus. En effet, il n'a pas montré d'effet cardioprotecteur du PréC pharmacologique<sup>142</sup>.

- *Les postconditionnements à distance*

Le PostC à distance est considéré tel quel lorsqu'il a lieu au bout de 30 minutes de reperfusion. Il est donc retardé d'un point de vue temporel. Il peut être également réalisé à distance du cœur sur les mêmes organes cibles cités précédemment<sup>138</sup>, il sera donc à distance spatialement.

### **2-7-3 Bilan des stratégies de cardioprotection**

Pour conclure, bien que le PréC ou le PostC ischémique aient donné des résultats positifs sur la taille d'infarctus chez l'Homme, le conditionnement pharmacologique laisse des résultats très mitigés à l'issue des études cliniques. En effet, les études expérimentales sur les animaux ont donné des résultats encourageants sur la taille d'infarctus mais dès lors que ces études aient été transférées à la clinique, ces résultats n'ont pas été concluants. Cette différence pourrait entre autres être expliquée par le fait que les animaux de laboratoire sont « jeunes » et en bonne santé alors que les patients sont souvent âgés et avec des pathologies de type diabète, hypertension, surpoids...

### **2-7-4 Stratégies de cardioprotection au sein du laboratoire – l'histoire continue**

Historiquement, dans la littérature, la cible visée afin de réduire les lésions d'ischémie et de reperfusion est la mitochondrie et notamment l'inhibition de l'ouverture du mPTP<sup>122</sup>. Comme expliquées précédemment les voies de signalisation de la cardioprotection ont comme effecteur principal la mitochondrie. C'est donc sur l'inhibition de l'ouverture de mPTP que les premiers axes de recherche se sont focalisés.

Une molécule pharmacologique, la CsA, a été largement étudiée comme un antagoniste potentiel de l'ouverture du mPTP. L'une des premières études sur ce sujet a été publiée en 1993 sur des cœurs isolés perfusés de rates<sup>153</sup>. Griffiths et Halestrap ont montré que la CsA restaure le ratio ATP/ADP et les niveaux d'AMP dans le ventricule (dosage de métabolites sur tissu entier broyé) montrant que les cœurs ont un bilan énergétique préservé. Tout aussi important, les fonctions cardiaques après une I/R sont améliorées après lors d'un PréC avec la CsA.

Cette molécule pharmacologique a également été étudiée par la suite sur le modèle murin et des souris génétiquement modifiées pour le gène *Ppif* ont été développées<sup>154</sup>. Lorsque la CsA est employée en PréC sur des souris, la taille de l'infarctus est significativement plus petite que celle des souris contrôles<sup>155</sup>. Ceci a également été démontré lors d'un PostC<sup>156</sup>. Une étude récente du laboratoire a également mis en évidence que les souris CyD-KO développent une taille d'infarctus diminuée de 30%<sup>157</sup> par rapport aux souris contrôles. Ces résultats, cohérents avec la littérature, corroborent le rôle inhibiteur de la CsA vis-à-vis de la CyD et son effet sur l'ouverture du mPTP.

Malgré quelques données controversées sur les effets de la CsA<sup>158</sup>, des études cliniques ont été initiées sur de petits groupes de patients. Au cours d'un premier essai, la CsA est injectée avant une chirurgie cardiaque engendrant des fonctions cardiaques post-opératoires améliorées<sup>159</sup>. Par la suite, en 2014, une large étude multicentrique, en double aveugle et randomisée de phase III a été initiée au sein du laboratoire du Pr Ovize<sup>160</sup>. Les données recueillies au cours de cette étude sont : les complications cliniques à 1 an telles que la mort, une potentielle récurrence, un remodelage ventriculaire, un AVC... Au cours de cette étude, la CsA est injectée juste avant la reperfusion des patients. Malheureusement, les résultats n'ont pas été concluants et la CsA n'a pas apporté les effets bénéfiques attendus sur le long terme (diminution de la récurrence, moins de décès, moins de remodelage). Aucune différence significative n'a été mesurée entre le groupe placebo et le groupe PostC CsA<sup>161</sup> après la levée de l'aveugle. Ceci indique que malgré des résultats encourageants sur le plan expérimental et préclinique, la CsA, seule et administrée selon ce protocole, n'est pas efficace pour limiter les conséquences de l'IDM.

Malheureusement, d'autres études cliniques ciblant la mitochondrie ont également échoué<sup>161</sup>. Point commun, la plupart de ces études cible l'ouverture du mPTP. De ce fait, l'une des stratégies plus récente développée au sein du laboratoire est de continuer de moduler la mitochondrie mais en agissant en amont du mPTP. Au laboratoire, une équipe a montré en 2008 que l'inhibition du mPTP sans passer par la CypD pourrait avoir un effet cardioprotecteur. La cible est toujours le mPTP mais pas de façon directe. En effet, la phosphorylation (inhibition) de la sérine 9 de la GSK3 $\beta$  en PostC dans un modèle murin après une ischémie de 60 minutes suivie de 24 heures de reperfusion est cardioprotectrice. La GSK3 $\beta$  est ciblée avant le mPTP<sup>162</sup>. Une autre étude du même auteur a montré que l'inhibition de la GSK3 $\beta$  altère le transfert de Ca<sup>2+</sup> entre le RS et la mitochondrie dans les cardiomyocytes adultes de souris. Il suggère que la cardioprotection par la GSK3 $\beta$  passe par une abolition de la surcharge calcique cytosolique et mitochondriale<sup>163</sup>. Enfin, une troisième étude s'intéresse au MCU, régulateur de la concentration de Ca<sup>2+</sup> dans la mitochondrie. L'idée serait de moduler MICU1 et MICU2 afin de limiter la surcharge calcique mitochondriale. Des molécules pharmacologiques sont actuellement en phase de test au sein du laboratoire. Des résultats similaires ont été obtenus dans des hépatocytes de souris<sup>164</sup> : une délétion de MICU1 entraîne des perturbations métaboliques et des dérégulations de l'homéostasie calcique en perturbant la capture du Ca<sup>2+</sup> mitochondrial, menant à une surcharge calcique mitochondriale<sup>164</sup>.

Dans ce projet, nous nous intéressons au réticulum endoplasmique. Comme indiqué précédemment, le RS représente le stock calcique majeur de la cellule. La concentration en calcium luminaire du RS module directement la survie cellulaire. Il faut noter également que les flux calciques émanant du RS impactent la concentration en calcium mitochondrial, le métabolisme et les voies apoptotiques induites à partir de cet organe.

Notre intérêt pour le RE a également été conforté par d'autres travaux visant à cibler des mécanismes en amont des mitochondries<sup>165</sup>. Suite aux échecs cliniques ciblant le mPTP, nous avons donc été à l'initiative du développement d'une nouvelle stratégie de recherche au sein du laboratoire.



## **2-7-5 Le réticulum endo-sarcoplasmique : une cible émergente dans l'ischémie-reperfusion cardiaque**

En lien avec le projet de thèse et une nouvelle stratégie de cardioprotection, l'organite ciblé est donc le réticulum sarcoplasmique dans les cardiomyocytes.

Dans la littérature, un faible nombre d'études ciblant la dérégulation de l'homéostasie calcique dans le RS et la réponse UPR a été effectué<sup>166</sup>. Certaines stratégies ont ciblé les partenaires de l'homéostasie calcique tels que les pompes SERCA et les récepteurs RyR<sup>167</sup>. L'inhibition des pompes SERCA au moment de la reperfusion entraînerait une diminution de la mortalité cellulaire en limitant l'ouverture du mPTP<sup>168</sup>. De façon contradictoire, une surexpression de SERCA semblerait bénéfique après une I/R permettant une recapture plus importante de Ca<sup>2+</sup><sup>169</sup>. L'inhibition de RyR a montré être bénéfique après une I/R, limitant la surcharge cytosolique<sup>170</sup>.

Le but de ces travaux a été de moduler le stress du RE, c'est-à-dire la vidange calcique et la réponse UPR tout en évitant la surcharge calcique cytoplasmique et mitochondriale. Toutes ces études ne seront pas détaillées dans cette partie mais seulement quelques acteurs de la fuite calcique réticulaire seront évoqués.

Parmi les molécules utilisées, citons la thapsigargine un inhibiteur des pompes SERCA et la tunicamycine, un antibiotique inhibiteur de la N-glycosylation. Ces deux molécules génèrent un stress du RE<sup>40</sup>. De manière intéressante, il a été mis en évidence que dans le cerveau, la TG et la tunicamycine limitent les lésions d'I/R<sup>171</sup>. Une étude plus récente a montré que de faibles doses de ces deux molécules vont entraîner un léger stress du RE et une autophagie générant une réduction des lésions d'I/R dans des cœurs de rats<sup>172</sup>. Ces molécules vont également améliorer les fonctions cardiaques et diminuer la taille d'infarctus. Ces travaux mettent donc en lumière que la modulation de la concentration en calcium luminale du RS serait un axe de recherche prometteur.

Comme mentionné précédemment, la concentration en calcium réticulaire au repos est un équilibre entre la recapture du calcium par les pompes SERCA et sa sortie via des canaux de fuite. Les canaux de fuite calcique représentent donc un moyen de moduler finement la concentration calcique luminale. L'un de ces canaux d'intérêt est TRPV1. En effet, au sein du muscle strié squelettique, TRPV1<sup>173</sup> a été identifié comme présent à la membrane du réticulum sarcoplasmique et jouant le rôle de canal de fuite calcique fonctionnel. La dernière partie de ce chapitre lui sera consacrée.



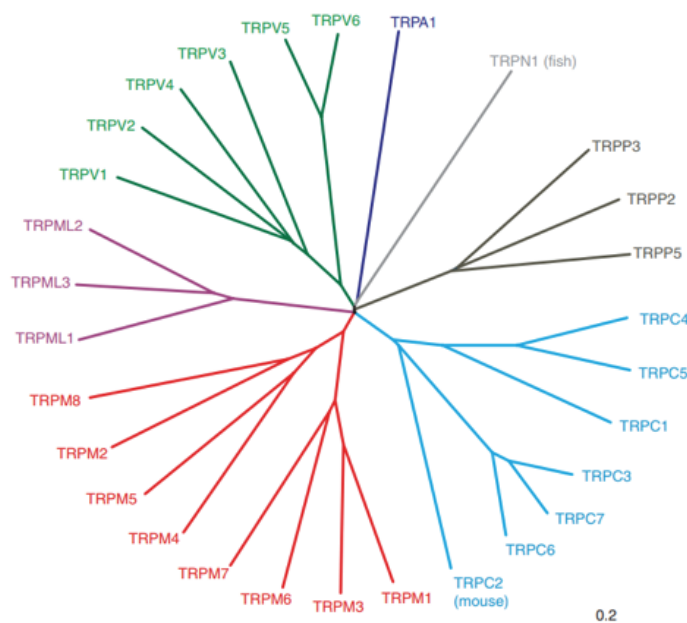
### 3- Les canaux TRP

A la différence des canaux  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{K}^+$  qui sont sélectifs à un ion, les canaux TRP pour Transient Receptor Potential sont dits cationiques non sélectifs. En effet, ils sont perméables à l'ensemble des cations mais peuvent également avoir des sélectivités différentes d'un cation à l'autre. Ces canaux ont été clonés pour la première fois en 1989 chez la drosophile<sup>174</sup>.

#### 3-1 Description et rôle succinct

Dans le but d'identifier, puis de s'adapter à son environnement, les organismes ont mis en place des biomolécules leur permettant de ressentir et d'interpréter les stimuli environnementaux. Une multitude de protéines sont impliquées dans cette perception de l'environnement et notamment un groupe de protéines appelé les canaux TRP jouent le rôle de transducteur du signal. Dès 1969, Cosens et Manning ont identifié un type de drosophile ayant développé une cécité après avoir été en contact avec une lumière constante<sup>175</sup>. Vingt ans plus tard, le premier canal, nommé TRP et responsable de ce phénotype, est cloné par Montell et Rubin<sup>174</sup>.

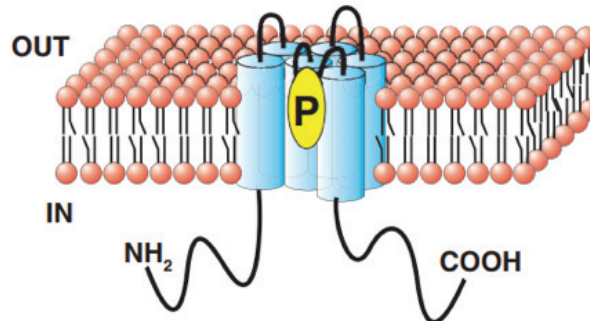
A l'heure actuelle, 29 canaux TRP ont été identifiés, toutes espèces confondues et sont regroupés en 7 grandes familles : TRPC (canonical), TRPM (melastatin), TRPV (vanilloïd), TRPA (ankyrin), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin) et TRPN (nompC). Seuls treize membres de cette superfamille des TRP ont été décrits chez la drosophile. Vingt-huit membres des TRP sont exprimés chez les mammifères où seuls les TRPN ne sont pas représentés. La distribution des canaux au sein des différentes familles est illustrée sur la figure 28. Plus de 100 gènes TRP ont été recensés dans différentes espèces<sup>176</sup>.



**Figure 28.** La grande famille des TRPs

Source : The transient receptor potential family of ion channels

Ces canaux possèdent une base structurale commune illustrée en figure 29 : ils sont constitués de tétramères dont chaque sous-unité possède six segments transmembranaires. Le pore de ce canal est localisé entre les segments S5 et S6. Majoritairement les TRP sont des homotétramères mais certains peuvent être formés en hétérotétramères. Les extrémités N et C-terminales sont intracellulaires et ont une longueur variant d'un TRP à l'autre.



**Figure 29.** Structure commune aux TRPs.

Source : Transient receptor potential (trp) channels

La sélectivité de ces canaux est variable. Ils sont tous perméables aux cations et auront un rapport de perméabilité  $P_{Ca}/P_{Na}$  allant de 0.3 à 10. La structure du pore définit la sélectivité du canal.

Ce paragraphe et le suivant n'ont pas pour but de lister façon exhaustive tout l'état de l'art concernant l'ensemble des canaux TRP mais plutôt d'inventorier brièvement les différents TRP et d'illustrer leur éventuel lien avec la problématique de ma thèse.

### 3-1-1 Les TRPC : Canoniques

Sept membres composent cette sous-famille : TRPC1-7. Ce sont les premiers TRP étudiés. Le premier membre cloné en 1995<sup>177</sup> est TRPC1, possède une homologie de séquence avec le Trp d'origine de la drosophile cloné en 1989. Ils ont tous une structure commune avec 6 domaines transmembranaires, une boucle hydrophobe formant le pore, 3 à 4 répétitions ankyrins et des régions spiralées sur les extrémités C et N-terminales<sup>178</sup>. Ils possèdent également un motif TRP. C'est une région très conservée riche en proline (LPXPFXXXPSPK) nommé EWKFAR, d'environ 25 acides aminés. Ce domaine est nécessaire à l'interaction avec une protéine neuronale (Homer) et des immunophilines, notamment<sup>178</sup>.

Ces canaux sont perméables aux ions  $Ca^{2+}$  et sont localisés à la membrane plasmique<sup>179</sup>. D'un point de vue fonctionnel, une partie des TRPCs est activé par l'étirement membranaire (TRPC6, C3 et C7), des ligands et la vidange des stocks de  $Ca^{2+}$  du RS. Inoue *et al*, en 2001, montrent notamment que les TRPCs sont exprimés dans le système cardiovasculaire, avec 4 membres de représentés sur 7. Ils sont impliqués dans la vasoconstriction, dans la prolifération des cellules musculaires lisses et dans la production du  $NO$ <sup>180</sup>.

Enfin la revue de Ong *et al*, indique que les TRPC semblent également impliqués dans l'activation des SOCEs avec particulièrement deux de ces membres : TRPC1 et TRPC4. Notamment TRPC1 qui aurait une interaction directe avec STIM et Orai lorsque les membranes du sarcolemme et du RS sont en contact<sup>181</sup>. Il a été montré qu'un KO TRPC1 diminue les SOCEs dans les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales<sup>182</sup>. La contribution de TRPC3 semble être dépendante du type cellulaire.

### 3-1-2 Les TRPN : No mechanoreceptor potential C

Dans cette sous famille, seul un TRPN a été identifié et il est seulement exprimé chez le poisson zèbre, la drosophile, le nématode et le xénope. Ce canal est caractérisé par une séquence de 29 ankyrines dans le domaine amino-terminal. Ce mécano-transducteur est impliqué dans l'audition. En effet, dans les organismes où il est exprimé, il est responsable de la réponse à un son et va intégrer les potentiels « microphoniques ». Il n'est pas exprimé chez les mammifères<sup>183</sup>.

### 3-1-3 Les TRPP : Polycystiques

Ces canaux seront principalement connus à cause de leur implication dans une maladie rénale : la polykystose (en anglais Polycystic Kidney Disease ; PKD), TRPP étant également appelé polycystine<sup>184,185</sup>. La PKD est une maladie autosomique dominante où deux gènes peuvent être mutés *PKD1* (~ 85% des cas de PKD) et *PKD2* (~15%). Les polycystines-1 (PC-1), codées par *PDK1*, ne forment pas un canal à proprement parler mais vont s'associer à TRPP2<sup>186</sup> afin de former un canal actif. En effet, PC-1 ou TRPP1 possède 11 segments transmembranaires et donc ne peut pas être considéré comme un TRP. Ce complexe semble impliqué dans la mécanosensation, la polarité cellulaire, la prolifération et l'apoptose<sup>187</sup>. Les polycystines-2 (PC-2), codées par *PDK2*, regroupent les canaux TRPP2, TRPP3 et TRPP5 et ces canaux sont perméables au  $Ca^{2+}$ <sup>188,189</sup>. Ces canaux sont exprimés dans diverses espèces telles que la drosophile, la souris ou chez l'Homme<sup>176</sup>. TRPP2 est nécessaire pour les mouvements ciliaires et est impliqué dans le développement des reins, du muscle squelettique et du cœur. TRPP3, lui est impliqué dans le développement des poils et de la rétine. Il est exprimé dans une large variété de cellules et organes tels que les neurones, les testicules, le rein et les cellules cardiaques non-myocytes. Enfin, la surexpression de TRPP5 dans les cellules HeLa semble bloquer la prolifération cellulaire en inhibant la réplication de l'ADN et activant l'apoptose<sup>190</sup>.

### 3-1-4 Les TRPM : Mélastatines

Ces canaux ont une structure très similaire à celles des autres TRP. En revanche, ils possèdent un domaine spiralé tétramérique en C-terminal ainsi qu'un motif TRP<sup>179</sup>. Huit membres de cette sous-famille ont été identifiés : TRPM1 à 8. La protéine TRPM1 a été pour la première fois découverte dans des cellules de mélanomes et métastatiques<sup>191</sup>. Il a été suggéré que ces canaux jouent un rôle dans le développement des tumeurs, dans la prolifération et différenciation cellulaire<sup>192</sup>. De plus, il a été montré que ces canaux pouvaient être impliqués dans l'intégration de la température, de l'homéostasie du  $Mg^{2+}$  et le goût. Ces canaux ont beaucoup d'activateurs tels que le  $Ca^{2+}$ , les ROS, l'ADP-ribose et l'acide arachidonique.

Ils peuvent être classés en quatre groupes en fonction de leur homologie de structure :

- 1- TRPM1 et TRPM3
- 2- TRPM4 et TRPM5
- 3- TRPM2, TRPM6 et TRPM7
- 4- TRPM8

TRPM1 constituant de la première famille est le premier à avoir été identifié dans les TRPM. Il a été montré qu'il pouvait être un indicateur de l'agressivité d'un mélanome et qu'il est fortement exprimé dans les mélanomes non métastatiques. C'est donc un suppresseur de tumeur et un bon marqueur de pronostic pour les mélanomes<sup>191</sup>. Dans les tissus non cancéreux, il est faiblement exprimé dans le cerveau, les mélanocytes, les macrophages et le cœur. TRPM3 est également perméable au  $Ca^{2+}$  et peut former un complexe avec TRPM1. Il est notamment impliqué dans la libération de l'insuline par le glucose dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques<sup>193</sup>.

Seuls deux de ces canaux seront imperméables au  $\text{Ca}^{2+}$  : TRPM4 et TRPM5<sup>194</sup>. TRPM4 est largement exprimé dans l'organisme et notamment dans l'intestin et la prostate. TRPM5 est exprimé en plus faible quantité mais fortement dans l'intestin et les papilles gustatives, il est notamment impliqué dans la transduction de certains goûts tels que l'amertume, et le sucre<sup>195</sup>.

TRMP2, TRPM6 et TRPM7 sont des protéines avec deux fonctions, en plus de leur perméabilité aux cations, ces canaux vont être activés par d'autres effecteurs tels que les ROS, l'ADP-ribose... Ils ont donc un rôle associé au statut redox. Ils sont exprimés dans le cerveau et les intestins<sup>192</sup> notamment.

Enfin, certains seront des senseurs de leur environnement extérieur. Par exemple, TRPM8 est le principal détecteur au froid et sera activé à des températures d'environ 23-25°C<sup>196</sup>. TRPM8 est également activé par le menthol. Son implication dans plusieurs cancers dont celui de la prostate a été démontré dans plusieurs études<sup>197</sup>.

### **3-1-5 Les TRPML : Mucolipines**

Ce sont les plus petits canaux TRP de cette grande famille, avec moins de 600 acides aminés. Il existe trois sous-familles : TRPML1 à 3. Leur structure est similaire aux autres TRP mais il n'y aucune répétition ankyrin ni de motif complet TRP<sup>179</sup>. Il a été reporté que ces canaux sont localisés dans les compartiments intracellulaires et non à la membrane plasmique, tels que les lysosomes et les endosomes<sup>198</sup>. Leur fonction n'est pas tout à fait élucidée, mais il semblerait qu'ils soient impliqués dans le trafic des vésicules. Ces canaux sont perméables au  $\text{Ca}^{2+}$ .

Le premier membre des TRPML a été identifié dans le cadre de la maladie autosomique récessive des lysosomes se manifestant par une grande accumulation de lysosomes. TRPML1 semble être ubiquitaire, et impliqué dans le trafic membranaire, la transduction du signal et l'homéostasie des lysosomes et endosomes<sup>199</sup>. TRPML2 est le dernier étudié dans cette famille car il ne paraît pas impliqué dans une pathologie. Son rôle semble être dans le trafic de protéines. Il est exprimé dans le système immunitaire<sup>200</sup>. Enfin, TRPML3 a une forte expression dans le système endocrine tels que le rein, les intestins et les poumons. Ce canal est sensible au pH<sup>201</sup>.

### **3-1-6 Les TRPA : Ankyrines**

Cette famille ne contient qu'un seul membre : TRPA1. Il a une structure similaire aux autres TRP mais n'a pas de motif TRP. En revanche, il a 14 à 17 répétitions ankyrin. Il a été caractérisé comme un nocicepteur et chémorécepteur. C'est une cible des analgésiques afin de réduire la douleur, les démangeaisons, et l'hypersensibilité viscérale incluant la vessie, le tractus gastro-intestinale et les voies respiratoires<sup>202</sup>. Il est exprimé à la fois dans les neurones peptidergiques et non peptidergiques tels que les fibres C et  $\text{A}\delta$  mais également les fibres  $\text{A}\beta$  non myélinisées. Il est également retrouvé dans des cellules non neuronales telles que les cellules épithéliales, les mélanocytes, les fibroblastes et les cellules entérochromaffines<sup>203</sup>. Il est activé par une multitude de ligands tels que la bradykinine, le peroxyde d'hydrogène et des lipides (acide oléique).

### **3-1-7 Les TRPV : Vanilloïdes**

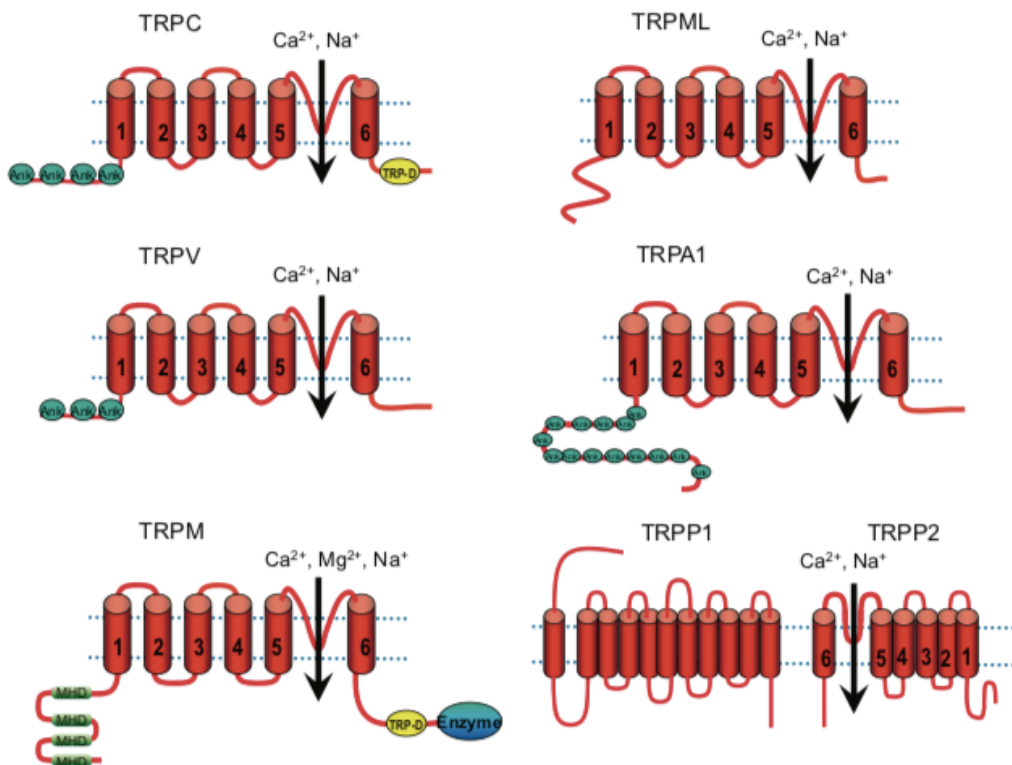
Enfin, les TRPV sont composés de 6 membres : TRPV1 à 6. Le premier membre identifié est TRPV1<sup>204</sup>. Il est considéré comme un senseur de la température et confère la sensation de brûlure lors d'ingestion d'aliment épicé. Le déploiement des études sur les autres canaux TRPV montre qu'ils possèdent plus de 50% d'homologie avec TRPV1. En revanche, ils ne répondent pas tous à des stimuli liés à la température.

Comme TRPV1, TRPV2 est un récepteur à la température, il est activé à des températures supérieures à 52°C. Son expression est ubiquitaire incluant les tissus neuronaux et non-neuronaux. Il a notamment

été montré impliqué dans des processus physiologiques tels que la prolifération des nerfs mais également dans des pathologies telles que le cancer<sup>205</sup>. TRPV3 et TRPV4 peuvent être également considérés comme des senseurs de température. En effet, TRPV3 peut détecter des températures de 31 à 39°C mais le rôle de TRPV4 reste controversé<sup>206</sup>.

TRPV5 et TRPV6 ont un rôle très important dans l'homéostasie calcique. TRPV5 est exclusivement exprimé dans le rein et TRPV6 est exprimé notamment dans l'intestin, le pancréas et le placenta<sup>207</sup>. TRPV1 à 4 sont non sélectifs aux cations alors que les canaux TRPV5 et TRPV6 sont très perméables au  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>208</sup>.

La suite de cette introduction sera centrée sur le canal TRPV1 et sera détaillé dans la partie 5-3.



**Figure 30.** Structure spécifique de TRPs

Source : Role of TRP channels in the cardiovascular system

Le rôle diversifié de ces canaux (senseur de la température, de l'étirement et gonflement cellulaire, homéostasie calcique...) et leur expression dans le tissu cardiaque suggèrent qu'ils pourraient avoir un rôle dans la physiopathologie du cœur<sup>209</sup>. En effet, la revue de Hof *et al*<sup>210</sup>, de 2019, regroupe les TRPs exprimés dans le système cardiovasculaire et notamment dans le nœud sinusal, les oreillettes, les ventricules et les fibres de Purkinje. A l'échelle cellulaire, les TRPs sont principalement exprimés dans les cardiomyocytes et les fibroblastes.

### 3-2 Les TRP dans le cœur

Comme expliqué précédemment, au sein du muscle cardiaque, les ions calciums jouent un rôle prépondérant. L'homéostasie calcique, finement régulée, permet de maintenir le cœur dans un état physiologique lui permettant de se contracter et de se relâcher. Ainsi, la moindre dérégulation de  $\text{Ca}^{2+}$  peut s'avérer être délétère. Les canaux TRP sont perméables aux cations et certains sont très sélectifs au

$\text{Ca}^{2+}$  (ratio  $\text{P}_{\text{Ca}}/\text{PC}_{\text{Na}} > 100$ ), c'est pourquoi, il semble logique qu'ils soient impliqués dans le maintien de l'homéostasie calcique et donc dans la physiologie cardiaque.

Quatorze sur les 28 canaux TRP ont été identifiés comme principaux canaux TRP dans le système cardiovasculaire<sup>180,209,211</sup> chez les mammifères (TRPC1, C3, C4, C5, C6, TRPV1, V2, V3 et V4, TRPM4, M7 et M8, TRPP2, TRPA1). La plupart de ces canaux ont été identifiés dans les cardiomyocytes et les fibroblastes. Le rôle précis de chacun de ces canaux dans le cœur ne sera pas décrit mais leur implication dans le développement, le remodelage, le rythme sinusal, le potentiel d'action... sera évoqué. Des défauts d'expression de ces canaux peuvent être liés à des pathologies cardiaques de type hypertrophie, arrêt cardiaque et arythmies...

### **3-2-1 Dans le nœud sinusal**

La plupart des canaux TRP exprimés dans ce tissu sont les TRPC et les TRPM. Seuls quelques exemples concernant les TRP les plus importants à ce niveau seront cités dans cette partie. Il a récemment été montré que les cellules pacemaker expriment plusieurs TRP tels que TRPM4, TRPM7 et TRPC3. En effet, ces canaux vont jouer sur l'activité électrique de ces cellules via TRPM4 qui module la pente de dépolarisation<sup>212</sup>. Il a été largement montré que ce canal est exprimé dans les tissus nodaux. Chez l'Homme, il est présent dans les oreillettes et les ventricules. Des défauts d'expression de ce canal pourraient entraîner des pathologies liées au rythme cardiaque<sup>213</sup>. Mais également, TRPM7 module l'expression du gène HCN-4 (Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4), régulateur de la fréquence cardiaque via la dépolarisation diastolique. Ce canal est essentiel afin de maintenir l'automatisme cardiaque<sup>214</sup>. Seul TRPM7 et TRPM4 ont été détectés dans le nœud sinusal de souris.

Enfin, TRPC3 via l'activation de l'angiotensine II, fait entrer du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme régulant ainsi NCX et l'activité pacemaker chez la souris. C'est le seul canal TRPC localisé à la membrane plasmique des cellules pacemaker de souris. Ce canal serait impliqué dans le phénomène de SOCE et le phénomène permettant de faire entrer du calcium dans le cytoplasme, aussi appelé ROCE (receptor-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry)<sup>215</sup>.

A ce jour, le seul rôle clairement identifié des TRPs dans le nœud sinusal est d'augmenter le rythme cardiaque.

### **3-2-2 Dans les oreillettes**

Comme dans le tissu sinusal, la plupart des canaux exprimés dans les oreillettes sont les TRPC et les TRPM avec également TRPV1. Parmi les TRPC, le plus représenté dans les cellules atriales de rat et humaines est TRPC1. Les autres TRPC ont principalement été identifiés chez le poulet<sup>216</sup>. TRPC1 participe au phénomène de SOCE dans les cardiomyocytes humains de l'atrium. Parmi les TRPM, seuls TRPM7 et TRPM4 ont été identifiés dans les cellules atriales humaines<sup>217</sup>. Chez des souris KO TRMP4, la durée du potentiel d'action dans des cellules atriales est plus courte en comparaison avec les souris contrôles<sup>218</sup>. Mais aucune modification des courants calcique et potassique n'a été relevée. Le rôle physiologique de TRPM7 dans les oreillettes reste à déterminer<sup>219</sup>. Enfin, TRPV1 dans les cellules atriales de souris semble impliqué dans l'effet inotrope régulé par les ROS. En effet, une production de ROS entraîne une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via les DHPR et les TRPV1 (localisés à la membrane plasmique dans ce type cellulaire). Cet effet est aboli lorsqu'un inhibiteur de TRPV1 est utilisé<sup>220</sup>.

### **3-2-3 Dans les ventricules**

Une très grande partie des TRP est exprimée dans les ventricules, regroupant les TRPA, TRPM, TRPC, TRPV et TRPP. La plupart des cellules exprimant ces canaux sont les cardiomyocytes. Seuls quelques exemples seront détaillés dans cette partie.



TRPA1 est colocalisé avec TRPV1 dans le muscle cardiaque (ligne Z, les disques intercalaires et les costamères)<sup>221</sup>. Ce canal semble exprimé plus fortement dans les cardiomyocytes que dans les cellules non-myocytes telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules musculaires lisses. Dans des conditions basales, TRPA1 ne semble pas avoir de rôle dans la contraction cardiaque mais lorsqu'il est activé cela augmente l'effet inotrope<sup>222</sup>.

Dans des cardiomyocytes adultes de mammifères, le rôle de TRPC est peu connu. Dans des conditions pathologiques, ou d'activation, leur rôle commence à être élucidé. En effet, dans des cardiomyocytes de rat, TRPC1, C3 et C6 sont impliqués dans l'entrée de  $Ca^{2+}$  après activation avec le diacylglycérol<sup>223</sup>. Ces canaux sont également surexprimés lorsque le rat développe une hypertrophie<sup>223</sup>, notamment associé à la voie NFAT/calcineurine.

Les TRPM sont largement exprimés dans les ventricules. En revanche, seuls les rôles de TRPM2 et de TRPM4 ont été étudiés. TRPM2 est exprimé dans le sarcolemme et les tubules-T des cardiomyocytes de souris. Après une I/R, les souris KO TRPM2 ont une plus grande diminution des fonctions contractiles en comparaison avec les contrôles, mais l'activité électrique ne semble pas modifiée<sup>224</sup>. Concernant l'implication des TRP au cours du développement cardiaque, il a été montré qu'un défaut d'expression de TRPM7 est létal chez la souris<sup>225</sup>. De plus, un défaut d'expression de TRPM4 entraîne une hypertrophie cardiaque causé par une hyperplasie des cardiomyocytes<sup>218</sup>.

Dans la famille des TRPV, seuls TRPV2, TRPV4 et TRPV1 sont exprimés dans les cardiomyocytes. Ils contribuent principalement à l'homéostasie calcique et à la protection du myocarde. Le rôle de TRPV1 au sein de ces cellules sera précisément détaillé dans la partie 5-3.

TRPV2 est exprimé dans les compartiments cellulaires et notamment dans les disques intercalaires<sup>226</sup>, et le RS des cardiomyocytes ventriculaires de rat<sup>227</sup>. La limitation de l'expression ou l'inhibition de TRPV2 va améliorer la fonction cardiaque et limiter la progression de la cardiomyopathie dilatée<sup>228</sup>. TRPV4 est plutôt localisé en périphérie du noyau, et semble être transloqué à des régions périphériques cellulaires permettant d'augmenter l'influx calcique suggérant des effets inotropes chez le rat<sup>229</sup>. TRPV4 semble également être impliqué dans le développement des valves au cours de l'embryogénèse chez le poisson zèbre<sup>230</sup>.

Enfin, TRPP1 et TRPP3 sont exprimés dans le ventricule gauche de rat. TRPP1 est un canal ionique de la membrane plasmique et également un régulateur de la libération de  $Ca^{2+}$  du RS. TRPP1 montre également une colocalisation avec SERCA2 chez le poisson zèbre et RyR2 chez la souris. De plus, comme TRPV4, TRPP2 participe au développement des valves chez le poisson zèbre<sup>231</sup>.

### **3-2-4 Dans les fibres de Purkinje, le système vasculaire et les cellules endothéliales**

Les fibres de Purkinje font partie du tissu conducteur et en cas de dysfonction, elles sont la cause d'arythmies générées par une mauvaise homéostasie calcique. Seulement TRPC1 et TRPM4 sont exprimés dans ces fibres<sup>232,233</sup>. Par exemple, des mutations de TRPM4 ont été retrouvées dans des maladies héréditaires du trouble du rythme. L'activité du canal a été mesurée dans des fibres de Purkinje et non dans les cardiomyocytes de lapin.

Dans les fibres sensibles du cœur, il a été montré que TRPV1 est largement exprimé. En effet, ce canal est principalement impliqué dans la nociception. TRPV1 est mis en jeu dans la cardioprotection, ceci sera décrit dans la partie 5-3.6. Ce sont notamment les canaux TRPV1 localisés dans les neurones sensoriels innervant le cœur qui sont responsables de l'effet cardioprotecteur de certains neurotransmetteurs chez le rat<sup>234,235</sup>. Ce canal sera expliqué en détail dans la partie 5-3.



Enfin, une grande partie des TRP est localisée dans le système vasculaire et notamment dans les cellules musculaires lisses. Dans ces cellules, ce sont plutôt les membres de la sous-famille des TRPC qui sont exprimés, mais pas de façon similaire dans chaque espèce<sup>236</sup>. Des conditions qui entraînent la prolifération des cellules musculaires lisses ou qui favorisent le remodelage des tissus vasculaires sont associées à un changement de la répartition d'expression des TRPC<sup>237</sup>. Par exemple, TRPV4 dans les cellules musculaires lisses permettra de s'adapter à l'étirement des vaisseaux. Les TRPCs vont médier la prolifération des cellules endothéliales et vont équilibrer la balance entre la vasoconstriction et la vasodilatation.

### 3-2-5 Dans les fibroblastes

Dans ces cellules, une grande partie de TRP est exprimée tels que TRPM2, TRPV2, TRPV4, TRPA1, TRPC6...

Dans les fibroblastes humains de l'atrium, il a été montré que TRPM7 était surexprimé dans un contexte de fibrillation atriale. Cette pathologie est potentiellement due à une entrée de  $Ca^{2+}$  via la voie TGF- $\beta$ , impliquant TRPM7<sup>238</sup>. De plus, TRPC3 régule la fibrose cardiaque et peut entraîner une fibrillation atriale. Une inhibition de canal va entraîner une diminution de l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule via l'angiotensine II réduisant alors la prolifération des fibroblastes<sup>239</sup>.

TRPV2, TRPV4 et TRPA1 via l'influx de  $Ca^{2+}$  dans la cellule permettent la différenciation et la sécrétion de la matrice extracellulaire. Enfin, il a montré *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins que les canaux TRPC6 participent à la cicatrisation après un infarctus du myocarde<sup>240</sup>.

### 3-2-6 Conclusion

Dans cette partie est mis en avant le rôle essentiel des canaux TRP, et notamment leur implication dans la physiologie cardiaque. En effet, leur rôle est indiscutable. De plus, des mutations sur ces canaux peuvent causer des dégâts allant même jusqu'à la pathologie cardiaque (hypertrophie, arythmie...). C'est pourquoi les canaux TRP semblent une cible importante afin de prévenir certaines pathologies cardiaques telles que les arythmies ou la progression du remodelage cardiaque. Dans la suite de cette introduction, le canal TRP qui sera détaillé est TRPV1 pour Transient Receptor Potential Vanilloid 1.

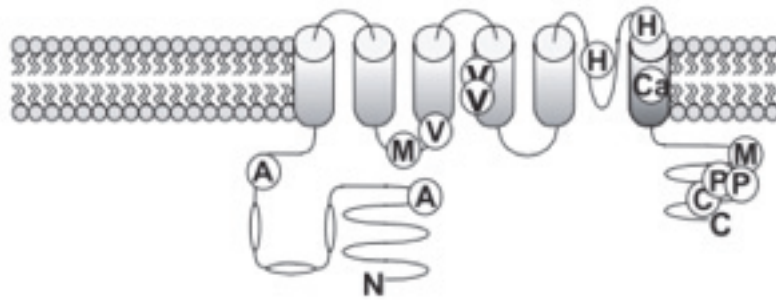
## 3-3 TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1), des données actuelles sur le canal

Les publications de ces 10 dernières années ont montré que TRPV1 est impliqué dans les phénomènes de cardioprotection et que sa modulation avait un réel impact sur la taille d'infarctus. En revanche, à l'heure actuelle, les mécanismes sous-jacents de cette protection sont encore méconnus.

### 3-3-1 Description générale

Dans les années 1880, Hogenes propose que la capsaïcine (CAP) agit sur les neurones sensitifs et initie la sensation de douleur mais entraîne également une libération de chaleur via la transpiration<sup>241</sup>. La CAP est un composé extrait du piment rouge.

Le récepteur TRPV1 a été pour la première fois cloné en 1997 par l'équipe de David Julius<sup>204</sup> et pour la première fois cristallographié en 2013 par cette même équipe<sup>242</sup>. Ce canal a une structure analogue aux autres TRP et notamment un motif TRP proche de la région K710 ; sur l'extrémité C-terminale. En effet, comme l'illustrent les figures 31 et 32, il possède six segments transmembranaires avec une région pore entre le S5 et S6, mais également deux extrémités cytoplasmiques : C- et N-terminale.

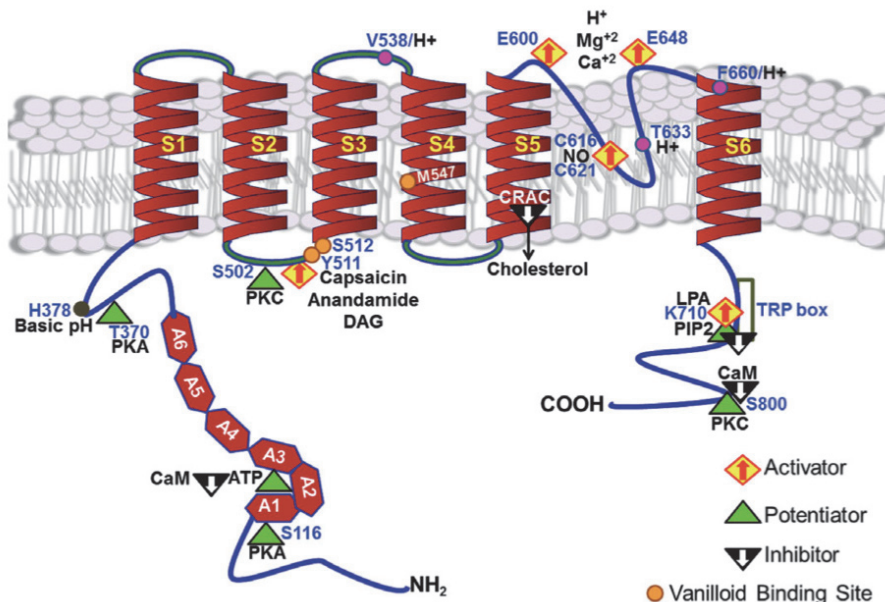


**Figure 31.** Structure de TRPV1.

Source : The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology

L'extrémité N-terminale possède six domaines ankyrin répétés avec des résidus que ciblent la PKA (T370 et S116). Cette extrémité possède également des sites d'inhibition par la CaM et d'interaction avec l'ATP. L'extrémité C-terminale présente des résidus communs qui interagissent avec la CaM (elle a un rôle inhibiteur) et la PKC : notamment S800. De plus, cette extrémité possède un site de liaison (K710) avec le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>).

La partie pore possède des sites d'interaction avec les protons (E600, T633 et E648). Ces interactions sont également retrouvées entre le segment S3 et S4 (V538) et sur le segment S6 proche du site du résidu (F660). Le pore est également impliqué dans la régulation de la perméabilité des ions Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>, où ces ions ont un rôle d'activateur (E600 et E648). Sur les segments S3 et S4, des résidus sont impliqués dans la liaison avec des composés vanilloïdes<sup>243</sup> (Y511, S512 et M547) mais également avec la PKC (S502). Enfin, le segment S5 possède un site d'interaction avec le cholestérol, entraînant l'inhibition du canal.



**Figure 32.** Structure détaillée de TRPV1.

Source : The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)

TRPV1 est perméable aux cations mais a une préférence pour les cations bivalents avec une hiérarchie de perméabilité suivante :  $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ \approx \text{K}^+ \approx \text{Cs}^+$ . TRPV1 a une forte perméabilité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  avec un ratio  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 9,60^{204}$ .

Le gène humain *TRPV1* est localisé sur le chromosome 17p13, organisé sur 17 exons et encode 838 acides aminés. Comme la plupart des TRP, TRPV1 forme un homotétramère et chaque sous-unité possède une taille de 95 kDa. En revanche, cette caractéristique peut varier en fonction de la localisation du canal. Sous forme glycosylée, sa taille peut atteindre 120 kDa<sup>244,245</sup>. De plus, en 2006, Vos *et al* a montré que TRPV1 est exprimé dans une multitude d'organes tels que les poumons ; le pancréas, le foie, la prostate, le cerveau, le rein... et notamment le cœur<sup>246</sup>.

Le développement d'animaux KO TRPV1 a été initié dans les années 2000 toujours par l'équipe de David Julius. Les animaux KO TRPV1 sont également appelés B6.129X1-Trpv1<sup>tm1Juj/J</sup>. Le KO a été effectué de façon à supprimer l'exon codant de la boucle située entre le segment S5 et S6, région pore du canal. Ceci permet de garder un canal « intact » mais non fonctionnel. La température corporelle de ces souris KO TRPV1 n'est pas modifiée par rapport aux souris WT<sup>247-249</sup>. Ces souris ne montrent aucune réponse à la douleur et ont une réponse atténuée aux stimuli classiques tels que des injections de CAP, ou de molécules induisant une inflammation. En effet, après injection de carraghénane (extrait d'algue rouge), dans la patte arrière de souris KO, les souris ne montrent aucune réponse inflammatoire 4 heures après l'injection et n'ont pas de réponse douloureuse. Ces auteurs ont également mis en évidence que ces souris vivent plus longtemps que les animaux WT et maintiennent un profil métabolique similaire à celui d'une souris jeune<sup>250,251</sup>. En revanche, il a été montré en 2015, que les animaux KO TRPV1 développent une obésité, une insulino-résistance et une résistance à la leptine en vieillissant (9 mois)<sup>252</sup>. Une autre étude montre que les souris KO TRPV1 ont un poids proche de 60 g à 14 mois<sup>247</sup>.

De plus, ils ont isolé des neurones de la chaîne dorsale ganglionnaire (DRG) chez les souris WT et KO TRPV1. Par des techniques d'électrophysiologies, les auteurs montrent que les neurones KO ne répondent plus à l'injection de CAP, alors que les neurones WT ont un courant caractéristique après stimulation avec la CAP. Les neurones KO ont également une réponse plus faible à l'augmentation de la température.

### 3-3-2 Expression tissulaire de TRPV1

Les premiers tissus montrant l'expression de TRPV1 sont les ganglions sensitifs trigéminaux, de la racine dorsale et du nerf vague<sup>253</sup>. TRPV1 est également exprimé dans le système nerveux central<sup>254</sup> et notamment dans l'hypothalamus, l'hippocampe, le cortex entorhinal, dans la substance grise périaqueducule et le noyau supramammillaire<sup>255,256</sup>. De plus, il a été montré que TRPV1 est exprimé dans les terminaisons nerveuses myélinisées (fibres A $\delta$ ) et non-myélinisées (fibres C).

En dehors du système nerveux, TRPV1 est exprimé dans le muscle strié squelettique<sup>173</sup> et dans certains tissus thermorégulateurs tels que la peau, la trachée et les muscles crémasteurs<sup>259</sup>. TRPV1 a également été identifié dans la vessie, dans le tractus gastro-intestinal, le colon, le foie et le système cardiovasculaire tels que les ventricules<sup>260</sup>, les plaquettes, l'épicarde, les fibres nerveuses, les cellules endothéliales et les cellules des muscles lisses<sup>261</sup>. Comme décrit dans le paragraphe 5-2, TRPV1 est largement exprimé dans le système cardiovasculaire et son rôle est non négligeable.

### 3-3-3 Localisation subcellulaire de TRPV1

Pendant longtemps, TRPV1 a été considéré uniquement comme un récepteur de la membrane plasmique<sup>245,262</sup>. Dans les années 2000, plusieurs localisations intracellulaires ont été identifiées pour TRPV1 : à la membrane du RE<sup>173,263,264</sup>, dans les vésicules cytoplasmiques<sup>265</sup> et à l'appareil de Golgi<sup>266</sup>.

Plus récemment, Hurt *et al* ont montré que TRPV1 pouvait être présent dans la mitochondrie<sup>267</sup>. Une revue de Ferrandiz-Huertas *et al* démontre que la localisation de TRPV1 peut être modifiée dans la cellule. En effet, dans les neurones, TRPV1 se présente à la membrane plasmique mais il peut être exporté et se retrouver dans des vésicules de transport. Les mécanismes contrôlant l'expression subcellulaire de TRPV1, équilibre entre adressage membranaire, recyclage, internalisation, c'est-à-dire le trafic cellulaire de ce canal nécessitent encore des recherches plus approfondies<sup>268</sup>.

### 3-3-4 Régulations de TRPV1

Concernant la régulation de ce canal, il est connu que TRPV1 est activé par un large éventail d'agonistes tels que les protons (pH < 6,5), la température (supérieure à 42°C), les lipides, mais également la CAP, la résinifératoxine (RTX) et les anesthésiques volatiles<sup>269</sup>. En revanche, TRPV1 est inhibé par la capsazépine (CPZ) et la 5'-Iodorésinifératoxine (iRTX), des inhibiteurs compétitifs. Il a également été montré que le ruthenium red est un inhibiteur de TRPV1<sup>270</sup>. Le tableau 1 regroupe les principaux activateurs et inhibiteurs de TRPV1.

Activateurs de TRPV1	Capsaïcine (CAP)
	Résinifératoxine (RTX)
	Acidose
	Lipides
	Chaleur
	Vanilloïdes
	Anesthésiques volatiles
	Activateurs endogènes (ATP, PIP <sub>2</sub> , diacylglycérol, HPETEs)
Inhibiteurs de TRPV1	Caspazépine (CPZ)
	5'-Iodorésinifératoxine (iRTX)
	Rouge de Ruthénium
	Cholestérol
	Adénosine
	Résolvines

**Tableau 1.** Principaux activateurs et inhibiteurs de TRPV1. Liste non exhaustive.

- *Activation par la température*

C'est en partie grâce à ce canal que lorsque la température est élevée, nous percevons la sensation de brûlure. Le courant enregistré après activation par la température (supérieure à 42°C chez l'Homme) présente des similitudes avec celui induit par la CAP. En revanche, les différences concernant le ratio de perméabilité des cations et la désensibilisation dues au Ca<sup>2+</sup> suggèrent que la réponse impliquée pour l'activation à la CAP est différente de celle avec la température. Le fait que la température active TRPV1 renforce l'idée que ce canal est un senseur de température. D'autres canaux TRP sont également des senseurs de la température tels que TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 et TRPA1<sup>271</sup>.

La partie C-terminale du canal semble être impliquée dans la sensibilité à la température. Dans une étude de Vlachová *et al*, des mutations sur cette même région ont été effectuées, notamment : Q808, E767 et E761. Ils montrent que rendre la partie C-terminale plus petite entraîne une baisse du seuil d'activation liée à la température, jusqu'à 9°C de différence<sup>272</sup>, avec une activation vers 35° C. Chez certains mutants (E767), le seuil d'activation est à 28°C.

Enfin, le canal TRPV1 est également impliqué dans le maintien de la température corporelle<sup>273</sup>. En effet, dans cette même étude, une exposition à de fortes doses de CAP (50 à 80 mg/kg) pendant plusieurs

heures entraîne une désensibilisation du canal persistant pendant 2 à 3 jours. La température corporelle des rats a été mesurée et n'est plus maintenue entre 37 et 38°C mais plutôt entre 40 et 41°C. De plus, il a été montré que des agonistes de TRPV1 peuvent diminuer la température corporelle entraînant une hypothermie<sup>274</sup> et à l'inverse, des antagonistes de TRPV1 mener à l'hyperthermie<sup>275</sup>.

- *Activation par les protons*

Au cours de certains phénomènes tels que les infections, l'inflammation ou l'ischémie, une acidification du milieu extracellulaire a été identifiée. Cette acidification entraîne deux effets sur TRPV1. Dans un premier temps, lorsque le milieu devient acide (pH aux alentours de 6,5), cela abaisse le seuil d'activation du canal à la température et à la CAP. Puis, lorsque le pH s'approche de 6, l'acidification a un effet direct sur le canal en provoquant son ouverture<sup>276</sup>. Deux résidus Glu 600 et 648 ont été identifiés comme essentiel à ce processus. Le premier permet d'être un site régulateur lié aux protons pour l'activation de TRPV1, le second est impliqué dans l'activation directe de TRPV1 en réponse à l'acidification du milieu<sup>277</sup>. L'acidification du milieu intracellulaire entraîne donc une entrée de cations dans la cellule.

- *Activation par le voltage*

Il a également été montré que TRPV1 pouvait être activé par le voltage<sup>272</sup>. TRPV1 possède que très peu de charges positives sur son segment S4, sa dépendance au voltage reste relativement faible. En effet, lorsque TRPV1 est localisé à la membrane plasmique des neurones, l'ouverture du canal entraîne une dépolarisation de la membrane plasmique et une propagation du signal via des potentiels d'action<sup>278</sup>. L'activation par le voltage est expliquée par le fait que le courant TRPV1 est 5 à 10 fois plus important lorsque le potentiel de la membrane plasmique est positif par rapport au négatif<sup>279</sup>.

- *Agonistes de TRPV1*

Seuls les principaux activateurs de TRPV1 seront décrits dans cette partie. Ces molécules vont venir se fixer directement sur le canal. TRPV1 possède en effet de multiples sites de fixation pour sa régulation (figure 39). Ces agonistes seront employés comme des outils pharmacologiques dans l'étude de ce canal.

- Les agonistes endogènes

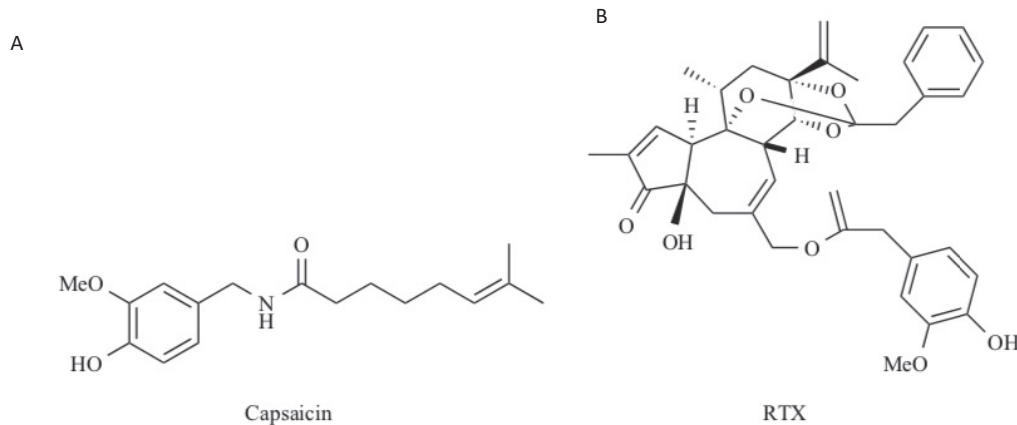
Dans un premier temps, il existe des agonistes endogènes<sup>280</sup> de TRPV1 (liste non exhaustive) tels que les lipides, l'ATP, l'anandamide, la bradykinine, l'acide 12-hydroperoxyeicosatétraénoïque (HPETE) et la dopamine N-arachidonoyl (NADA). Ces agonistes vont permettre d'initier un courant par l'activation du canal<sup>281</sup>.

- La capsaïcine

Ce canal est également régulé par des composés vanilloïdes, ils possèdent un groupe vanillyle. Depuis le clonage de TRPV1, la CAP (figure 33A) aussi appelée (E)-N-[(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)méthyl]-8-méthyl-6-nonénamide<sup>282</sup>, composant piquant du piment rouge, est caractérisée comme le principal activateur de TRPV1. La CAP et ses analogues vanilloïdes (tels que la RTX<sup>283</sup>) sont lipophiles, leur permettant ainsi de passer la membrane plasmique et d'agir directement sur les sites de fixation du côté intracellulaire du canal. Le site de liaison de la CAP a été identifié sur une boucle cytosolique proche du 3<sup>ème</sup> segment transmembranaire<sup>284</sup>. Il a été montré que la CAP (EC<sub>50</sub> = 30 µM<sup>285</sup>) dépolarise les nocicepteurs et augmente la concentration en Ca<sup>2+</sup> cytosolique<sup>286</sup>. De plus, il a été mis en évidence que TRPV1 pouvait être co-exprimé avec TRPV3 entraînant alors une augmentation de la réponse de TRPV1 en réponse à la CAP ou aux protons<sup>287</sup>.

➤ La résinifératoxine

La RTX (figure 33B), un composé isolé d'*Euphorbia resinifera*, est un agoniste de TRPV1 avec une activation plus importante que la CAP ( $EC_{50} = 10 \text{ pM}$ ), environ 20 fois plus puissant<sup>288</sup>. Par conséquent, cette molécule a été développée comme un agent permettant de désensibiliser ce canal afin de réduire des sensations de douleur dans le cas de certaines pathologies telles que l'incontinence urinaire<sup>289</sup> ou lors de la prise en charge des douleurs cancéreuses en soin palliatif<sup>290</sup>. Plusieurs études cliniques sont actuellement en cours, cette partie sera détaillée dans le paragraphe 5-3.6. D'autres agonistes de TRPV1 ont été développés<sup>291</sup> tels que le SDZ-249482, SDZ-249665, l'olvanil, le rinvaril et le DA-5018.



**Figure 33.** Structure des principaux régulateurs de TRPV1

(A) Capsaïcine (B) Résinifératoxine.

Source : Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor

Pour conclure cette partie, une longue exposition des agonistes sur le canal peut entraîner sa désensibilisation et donc par conséquent sa fermeture. Cette désensibilisation peut être bénéfique dans certaines pathologies faisant souffrir les patients<sup>292</sup>. Il a donc été développé des patchs ou des systèmes d'injection<sup>291</sup>.

- *Activation par les anesthésiques volatiles*

Enfin, une étude de Kimball *et al* en 2015 a montré qu'un domaine en hélice du canal TRPV1 était nécessaire pour son activation par les anesthésiques volatiles de type isoflurane<sup>269</sup>, desflurane et sevoflurane. Cette découverte est partie du fait que les anesthésiques volatiles peuvent activer les fibres neuronales C et A- $\delta$  dans plusieurs modèles animaux (singes<sup>293</sup>, lapins<sup>294</sup>, et chiens<sup>295</sup>). Dans cette dernière étude, les anesthésiques volatiles activent seulement les neurones sensibles à la CAP. En effet, les récepteurs des fibres C sont activés avec des anesthésiques volatiles (halothane, enflurane, isoflurane et sevoflurane) chez des chiens anesthésiés, par mesure de l'activité électrique de ces fibres<sup>295</sup>. Ceci suggère que les anesthésiques volatiles vont augmenter les douleurs post-chirurgies en activant directement TRPV1.

- *Antagonistes de TRPV1*

Seuls les principaux inhibiteurs du canal seront décrits dans cette partie. Il existe deux types d'antagonistes de TRPV1 : compétitifs et non compétitifs. Les antagonistes compétitifs vont se lier sur le même site de fixation que l'agoniste respectif et bloquer le canal dans un état fermé. En revanche, les



antagonistes non compétitifs vont interagir avec des sites de fixation additionnels afin de prévenir son ouverture<sup>291</sup>.

➤ Les antagonistes endogènes

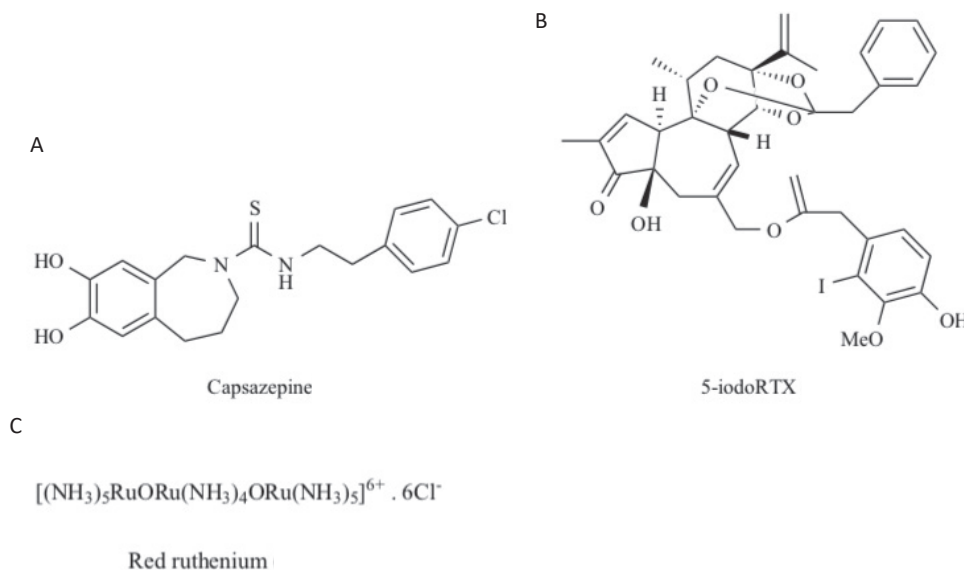
Comme les agonistes de TRPV1, des antagonistes endogènes<sup>280</sup> ont été identifiés, notamment le cholestérol, l'adénosine, et les résolvines (molécules dérivées des acides gras oméga 3). Les autres antagonistes sont issus de synthèse chimique. Par exemple, le cholestérol va modifier des propriétés de la membrane plasmique telles que l'élasticité, entraînant alors des modifications de sensibilité aux différents activateurs de TRPV1. Il a été montré dans les cellules HEK qu'une déplétion en cholestérol diminue la sensibilité du canal à la capsaïcine. Ceci peut également être expliqué par une diminution de la quantité de protéines à la membrane plasmique<sup>280</sup> ».

➤ La caspazépine, la 5'iodorésinifératoxine et le ruthénium red

Le premier antagoniste compétitif synthétisé est la CPZ (figure 34A) et a été caractérisé avant que le canal ne soit cloné. C'est un analogue structural de la CAP<sup>296</sup> avec un IC<sub>50</sub> de 562 nM<sup>297</sup>. Un second inhibiteur compétitif est la iRTX (figure 34B), un puissant antagoniste avec un IC<sub>50</sub> de 3,9 nM, issu de la RTX<sup>297</sup>. Dans la plupart des études ces deux inhibiteurs seront utilisés avec leur activateurs respectif.

Le ruthenium red (figure 34C) est également une molécule permettant d'inhiber TRPV1. Cette molécule est un inhibiteur non compétitif avec un IC<sub>50</sub> de 100 nM.

Il existe enfin des dizaines de molécules chimiques utilisées comme inhibiteur de TRPV1, celles-ci sont détaillées dans la revue Messeguer *et al*<sup>291</sup>.



**Figure 34.** Structure des principaux inhibiteurs de TRPV1

(A) Capsazépine (B) 5'-Iodorésinifératoxine (C) Ruthénium Red.

Source : Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor

Afin de conclure cette partie, notons qu'une protéine présentant 49% d'homologie avec TRPV1 a été cloné et appelée vanilloid-receptor-like protein 1 (VRL-1). Celle-ci n'est pas activée par les vanilloïdes, les protons ou un stimulus de 42°C mais est activée à des températures proches de 52°C. Cette protéine a été identifiée dans la racine ganglionnaire dorsale. Elle est également inhibée par le ruthénium red<sup>298</sup>.



### 3-3-5 Rôles du canal ionique TRPV1

Étant donné que ce canal est exprimé dans un large panel d'organes et de tissus, de nombreuses études se sont intéressées à son rôle précis. Ici, ne seront détaillés que certains exemples, notamment dans le système nerveux, et le muscle strié squelettique.

- *Système nerveux*

Ce canal est principalement impliqué dans la détection et l'intégration de la sensation de la douleur dans les neurones sensitifs périphériques et dans la perception de la température. TRPV1 est donc un nocicepteur. Lorsque TRPV1 est activé, un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Na}^+$  dans le cytoplasme va avoir lieu permettant de générer un potentiel. Si ce potentiel est suffisamment fort, des potentiels d'action seront générés délivrant un message au système nerveux central<sup>299</sup>. Par exemple, l'injection de CAP peut induire une hyperalgésie primaire puis secondaire et enfin une allodynie. Ceci montre que TRPV1 est bien impliqué dans la perception des phénomènes douloureux<sup>300</sup>. Outre cette fonction de perception, l'activation de TRPV1 peut entraîner la libération de deux neurotransmetteurs tels que la substance P (SP) et le calcitonin gene-related peptide (CGRP)<sup>301</sup>. En effet, en réponse à un stimulus, TRPV1 libère ces deux neurotransmetteurs afin d'induire une réponse inflammatoire lors de la perception de la douleur.

- *Muscle strié squelettique*

TRPV1 est un canal ionique laissant passer les ions  $\text{Ca}^{2+}$  à la fois à la membrane plasmique et au RE<sup>173</sup>, il est alors impliqué dans l'homéostasie calcique. La localisation de TRPV1 à la membrane du RS a été pour la première fois montrée par Xin *et al*<sup>263</sup>. Plusieurs études ont montré que la modulation du canal pouvait avoir un impact sur la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et réticulaire<sup>173,302,303</sup>. L'équipe de Cayuoto *et al* montre que TRPV1 est également exprimé dans le muscle squelettique humain. Dans une étude de 2013, dans le muscle strié squelettique de la patte de souris (*Flexor Digitorum Brevis*), TRPV1 est localisé à la membrane du RS à proximité des pompes SERCA et absent de la membrane plasmique. TRPV1 est pour la première fois caractérisé comme un canal de fuite calcique fonctionnel du RS. Les résultats de cette étude montrent que l'activation (pharmacologique ou physiologique) de TRPV1 entraîne une libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS vers le cytoplasme, ce  $\text{Ca}^{2+}$  libéré activerait secondairement les RyR1 contribuant ainsi un relargage calcique plus important<sup>173</sup>.

### 3-3-6 Implication du canal dans différentes pathologies

Plusieurs études se sont intéressées à l'implication du canal TRPV1 dans le développement de pathologies telles que des maladies de l'oreille interne, le développement de problèmes cutanés, des lésions du tractus digestif, mais également des pathologies respiratoires et métaboliques (obésité et diabète)<sup>281</sup>. Seuls les désordres métaboliques seront évoqués dans cette partie.

En effet, la revue de Christie *et al* illustre que TRPV1 est impliqué dans l'homéostasie énergétique<sup>304</sup> caractérisée par le contrôle de l'apport énergétique et de la dépense énergétique. De plus, nous avons montré dans la partie 5-3.4 que TRPV1 possédait des domaines d'interaction avec notamment les lipides, le cholestérol et  $\text{PIP}_2$ . Différentes études ont montré qu'une supplémentation en CAP au cours des repas (3 à 7 mg par repas) chez l'Homme, entraîne une diminution de la prise alimentaire et une augmentation de la satiété. De plus, l'activation de TRPV1 va entraîner une activation de l'activité thermogénique du tissu adipeux blanc et brun. En effet, l'activation de TRPV1 va entraîner un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  activant la CaMK II, impliquant une cascade de signalisation avec les activations séquentielles de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) et de la sirtuine1. Ceci permet la déacétylation PRDM16 (PR domain containing 16) et de PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ). Cette dernière phase permet la thermogénèse du tissu adipeux blanc. Enfin, en parallèle, l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  induit par l'activation de

TRPV1 active directement BMP8b (Bone morphogenetic protein 8B). Sirtuine 1 déacétyle également PGC-1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$ ), activant PPAR $\alpha$ . Ces deux dernières protéines permettent la transcription de UCP-1 (uncoupling protein 1). Toutes ces protéines (PRDM16, PPAR $\gamma$ , UCP-1 et BMP8) initient l'activité de thermogénèse du tissu adipeux brun.

- *L'obésité*

Il a été montré que l'activation de TRPV1 par la CAP pouvait prévenir de l'adipogenèse avec une baisse du niveau de triglycérides après 8 jours de traitement. Par ailleurs, ce traitement ne permet pas d'éviter le développement de l'obésité après un régime « high fat » chez les souris KO TRPV1<sup>305</sup>. Sans régime particulier, Lee *et al* ont montré que les souris KO TRPV1 développent une obésité, une insulino-résistance et une résistance à la leptine en vieillissant (9 mois) en comparaison avec des souris contrôles. Ceci n'est pas expliqué par une augmentation de la prise alimentaire mais pourrait être dû à une diminution de la dépense énergétique<sup>252</sup>.

- *Le diabète*

Il a également été démontré qu'une désensibilisation de TRPV1 due à l'injection de CAP dès la naissance d'un rat lui permet d'avoir une meilleure sensibilité à l'insuline. Cette même expérience effectuée chez des rats diabétiques (Zucker Diabetic Fatty Rat) a montré que l'hyperglycémie ne se développe pas lorsque les nerfs sensitifs ont été désensibilisés. Donc, l'inhibition de TRPV1 pourrait être une approche thérapeutique intéressante dans les maladies métaboliques<sup>306</sup>. Ceci a été montré par une prise orale d'un inhibiteur de TRPV1. En effet, chez des rats diabétiques, ce traitement permet d'améliorer la tolérance au glucose et diminue le stress oxydatif et l'inflammation<sup>307</sup>.

- *Pathologies chroniques*

TRPV1 est surexprimé dans plusieurs pathologies chroniques liées à la douleur telles que l'arthrose rhumatoïde, l'ostéoarthrose, le cancer des os, et certaines neuropathies<sup>268</sup>. C'est pourquoi TRPV1 pourrait être une cible d'analgésiques surtout dans les maladies à composante inflammatoire. En effet, à l'heure actuelle, plusieurs études cliniques sont développées afin de réduire les douleurs liées à des pathologies chroniques. Le site internet *clinicaltrials.gov* regroupe toutes ces études, 21 études cliniques ciblant TRPV1 sur 34 ont un lien avec la douleur. Par exemple, une étude sur l'arthrose des genoux de phase 1 est en cours de développement avec l'expérimentation d'un antagoniste de TRPV1 : NEO6860. Cette étude a lieu en Angleterre.

Ces études cliniques peuvent également cibler des douleurs dentaires après une chirurgie, la migraine, et des brûlures... Comme développé dans la partie « agonistes de TRPV1 », l'idée est soit de désensibiliser le canal avec une forte activation ou une activation chronique, soit d'inhiber le canal avec un antagoniste pour désensibiliser le tissu ou les nerfs sensitifs.

- *L'hyperthermie maligne*

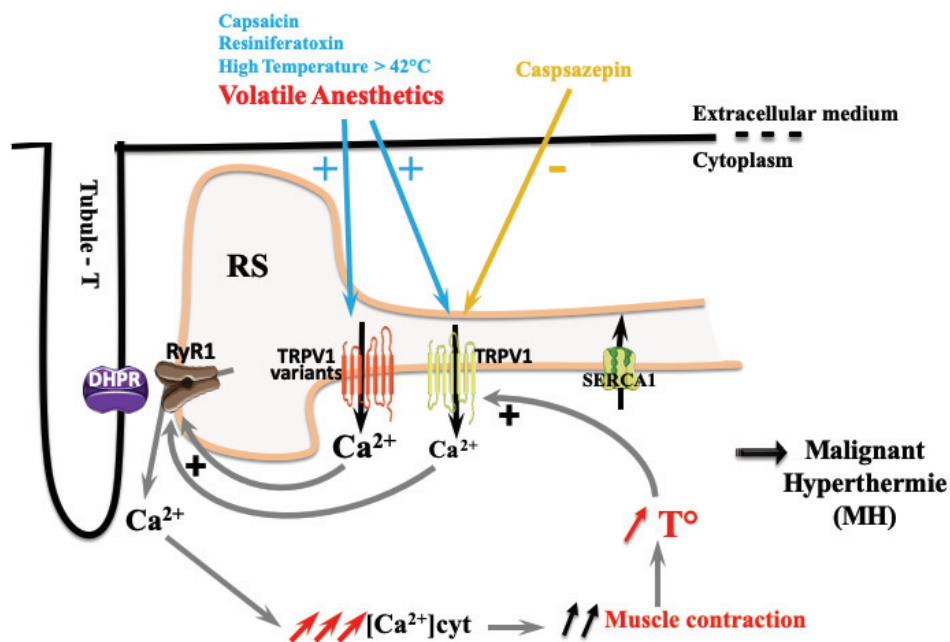
Lors d'études ultérieures, nous avons mis en évidence que TRPV1 est impliqué dans une pathologie du muscle squelettique, l'hyperthermie maligne.

Une crise d'hyperthermie maligne (HM) se caractérise par une libération accrue et non contrôlée de Ca<sup>2+</sup> dans le cytoplasme entraînant alors une contraction du muscle squelettique et en cascade un hypermétabolisme cellulaire, pouvant conduire à la mort du patient dans 85% si la crise n'est pas enrayée par l'utilisation du dantrolène. Cette crise s'accompagne ainsi d'une élévation de la température corporelle (1 à 2°C toutes les cinq minutes). Les éléments déclenchants sont des anesthésiques volatiles de type halogénés tels que l'isoflurane<sup>308</sup> ou certains relaxants musculaires.

Durant les trente dernières années, l'HM a été principalement associée à des mutations du gène *RYR1*. La plupart des mutations identifiées rendent le canal hypersensible à l'activation (caféine, halothane ou  $\text{Ca}^{2+}$ ). Cette hypersensibilité de RyR1 peut alors entraîner une libération incontrôlée de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS<sup>309</sup>. D'autres effets fonctionnels de certaines mutations ont été décrits tels que la diminution de son activation par le voltage, le découplage physique avec le DHPR ou encore un état fuyant permanent<sup>310</sup>.

Malgré une littérature abondante sur le sujet, aucune étude n'a pu mettre en évidence le fait que RyR1 puisse être directement activé par les anesthésiques volatils et ainsi provoquer l'HM. Plus récemment, au sein de notre équipe, nous avons ainsi identifié une nouvelle cible impliquée dans cette pathologie (figure 35) pouvant faire le lien entre le déclenchement de l'HM au cours des anesthésies et le relargage via RyR1<sup>311,312</sup>. Deux variants humains de *TRPV1* ont été identifiés (T612M et N396del) après activation avec des anesthésiques halogénés. Nos résultats montrent que l'expression hétérologue de ces deux mutants dans les muscles des souris TRPV1 KO augmente fortement la libération de calcium du RS après activation avec des anesthésiques halogénés. Nos résultats ont été confirmés *in vivo* en utilisant des souris avec une mutation *RYR1* knock-in (*Y524S*), modèle reconnu pour l'HM, où nous avons montré que la CAP ralentit la réponse hypermétabolique induite par la chaleur dans ce modèle.

Ceci suggère que TRPV1 conférerait une susceptibilité génétique à l'HM et pourrait ainsi représenter une cible thérapeutique pour la prévention de l'hyperthermie maligne.



**Figure 35.** Implication de TRPV1 dans l'hyperthermie maligne.

Source : Pathophysiological Role of Trpv1 In Malignant Hyperthermia: Identification of New Variants

### 3-3-7 Implication de TRPV1 dans les maladies cardiovasculaires

Dans ce chapitre seront citées de façon non exhaustive les pathologies cardiovasculaires impliquant par TRPV1<sup>261,313</sup>.

Tout d'abord, il a été montré récemment que l'activation pharmacologique de TRPV1 dans un modèle d'AVC chez le rat entraîne une hypothermie réversible menant à une neuroprotection avant l'initiation de la mort cellulaire<sup>314</sup>. Par conséquent, TRPV1 est une cible potentielle afin de diminuer la mortalité cellulaire, et renforçant l'idée que ce récepteur est impliqué dans la protection via l'hypothermie ici. De

plus, un prétraitement à la CAP (l'agoniste de TRPV1) chez un modèle de rat permet de protéger le cerveau contre les lésions d'ischémie-reperfusion après un AVC<sup>315</sup>. Cet effet est causé par une amélioration de la fonction vasculaire et l'inhibition de la mort cellulaire. Ceci renforce de nouveau l'idée que TRPV1 est une cible intéressante dans les maladies d'I/R cérébrales.

Basé sur plusieurs études, il a été montré que l'activation de TRPV1 limite la formation des lésions athérosclérotiques. En effet, ceci va permettre d'améliorer l'efflux et de limiter l'influx de cholestérol dans les vaisseaux<sup>316</sup>. Dans la partie 2-4, la mise en place et la progression de l'athérosclérose a été détaillée. L'accumulation des lipides et notamment du cholestérol est la première étape du développement de cette pathologie. Dans un modèle murin, la CAP et la RTX augmentent le Ca<sup>2+</sup> cytosolique et diminuent l'accumulation de lipides dans les cellules musculaires lisses via l'activation de l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme lipidique. TRPV1 permet également de limiter la formation des cellules spumeuses au cours de la mise en place des plaques d'athérome<sup>317</sup>. Dans cette étude, des souris WT et KO TRPV1 ont été utilisées. Les auteurs ont montré que : l'activation de TRPV1 active l'autophagie dans les cellules musculaires lisses permettant d'éliminer les cellules spumeuses et donc de limiter l'évolution du noyau nécrotique. De nouveau, TRPV1 semble une cible potentielle dans la réduction de l'athérosclérose et par conséquent permet de limiter le développement de maladies cardiovasculaires telles que l'infarctus du myocarde.

De plus TRPV1 a un rôle dans la détection des changements de pression artérielle. Il a été montré que TRPV1 est exprimé dans des régions similaires de celle de la régulation du baroréflexe<sup>318</sup>. Ceci permet de maintenir une pression artérielle stable et une homéostasie cardiaque.

### **3-3-8 Cardioprotection mais uniquement périphérique**

Enfin, il a été montré que TRPV1 est largement exprimé dans système cardiovasculaire et le cœur, notamment dans les cardiomyocytes. C'est pourquoi de nombreuses équipes se sont intéressées à l'implication de TRPV1 dans la cardioprotection. Notre intérêt pour TRPV1 a été conforté par les travaux suivants. Tout d'abord, plusieurs études ont montré que les animaux TRPV1-KO perdaient cette capacité de protection<sup>319</sup>. En effet, Zhong et Wang ont utilisé des cœurs de souris C57BL/6J, montés sur un système Langendorff afin de maintenir l'activité cardiaque. Les cœurs ont subi une ischémie de 30 minutes et une reperfusion de 40 minutes. Différents groupes ont été constitués dans cette étude, des cœurs WT, KO, avec ou sans PréC. Les auteurs ont démontré que le PréC ischémique n'a plus aucun bénéfice sur la taille d'infarctus ni sur les fonctions cardiaques (débit coronaire, fonction d'éjection ventriculaire) chez les souris TRPV1<sup>-/-</sup>. De plus, la substance P (SP) et le calcitonin gene-related peptide (CGRP) ne sont plus libérés dans les cœurs KO après PréC, en comparaison avec des cœurs WT PréC, suggérant que l'effet protecteur du PréC passerait par la sécrétion de ces deux neurotransmetteurs<sup>234</sup>.

Cette même équipe a corroboré ces résultats : l'inhibition pharmacologique de TRPV1 par injection, 5 minutes avant l'ischémie chez des souris WT, génère une fonction cardiaque altérée<sup>235,320</sup>. En effet, par la même technique du Langendorff, les cœurs de souris subissent 40 minutes d'ischémie suivie de 30 minutes de reperfusion. Les auteurs perfusent les cœurs avec de la capsazépine (CPZ), mais également du CGRP et de la substance P avec leur inhibiteur respectif. A la fin de la séquence d'I/R, les cœurs PréC avec CPZ, les cœurs KO avec PréC CPZ et les cœurs KO ont des fonctions cardiaques diminuées par rapport aux cœurs WT. L'injection de CGRP et de substance P quant à elles améliorent les fonctions cardiaques après une I/R en comparaison avec les WT. Ces effets sont abolis avec les inhibiteurs respectifs de ces deux neurotransmetteurs.

Cette découverte est également validée chez le rat. En effet, les effets du PostC à distance<sup>321</sup> et du PostC<sup>322</sup> sont abolis lorsque les animaux reçoivent l'inhibiteur de TRPV1 10 minutes avant la reperfusion. Dans cette première étude, les rats subissent *in vivo*, une ischémie de 30 minutes par ligation

de l'artère coronaire descendante antérieure suivie de 3 heures de reperfusion. Les antagonistes de TRPV1, du CGRP et de la substance P ont été utilisés 10 minutes avant la reperfusion. Le « remote » PostC mécanique sert de contrôle dans cette étude. Les auteurs ont montré que l'utilisation des trois antagonistes, de façon séparée, abolit les effets du PostC. Ceci renforce de nouveau l'idée que la cardioprotection passerait en partie par TRPV1 via la libération de deux neurotransmetteurs. Ce mécanisme semble être identique à celui chez la souris. En revanche, l'activateur n'empêche pas la cardioprotection<sup>323</sup>, il a même un effet protecteur<sup>324,325</sup>. Une seconde étude, chez le rat, avec de nouveau la technique de Langendorff, a montré que l'utilisation de la CPZ abolit également l'effet du « remote » PréC. En revanche, la CAP en PréC diminue autant la taille d'infarctus que le « remote » PréC. Ces résultats ont été confirmés avec une mesure de la libération de créatinine, de l'activité de la lactate déshydrogénase, mais également avec les mesures de fonction cardiaque.

Seule une étude, *in vitro*, semble révéler des résultats contradictoires de ces précédentes études. Le modèle cellulaire utilisé est la lignée de cardiomyoblastes de rat H9C2. Les auteurs montrent que TRPV1 est exprimé dans les cellules H9C2, et que son activation par la CAP exacerbe la mort cellulaire après une séquence d'H/R. En revanche, l'inhibition de TRPV1 avec la CPZ protégerait les cellules de la mort cellulaire<sup>326</sup>.

En conclusion, le canal TRPV1 est donc une cible pharmacologique intéressante dans le cadre de la cardioprotection, qui passerait par les fibres sensibles et la libération de neurotransmetteurs. Par conséquent, les travaux présentés ci-dessus sont prometteurs. En effet, ils n'expliquent en rien le phénomène sous-jacent de la cardioprotection induite via TRPV1 dans les cardiomyocytes adultes de souris. La plupart des études se focalisent sur les nerfs sensitifs innervant le muscle cardiaque mais ne s'intéressent pas à ce qui se passe dans la cellule en elle-même. Dans ces études, l'implication de la substance P et le CGRP semblent essentielles à la cardioprotection mais la régulation de la concentration de  $Ca^{2+}$  au sein de la cellule par TRPV1 pourrait également être très importante.

A l'heure actuelle, aucune étude ne s'intéresse à l'effet cardioprotecteur de TRPV1 dans les cardiomyocytes après une ischémie/reperfusion du myocarde. Compte tenu des nombreuses études présentées dans cette introduction, TRPV1 pourrait être une cible intéressante dans ces cellules. En effet, il a été récemment montré que TRPV1 pouvait être considéré comme un canal de fuite calcique du RS dans le muscle strié squelettique et qu'il était notamment activé par les anesthésiques volatiles. Comme cité dans la partie 4-6, la modulation du canal du RS peut être considérée comme une cible potentielle de cardioprotection et notamment la modulation des canaux de fuite a été montrée comme bénéfique. De plus, il a été démontré que les anesthésiques volatiles étaient impliqués dans la cardioprotection. En effet, l'isoflurane délivré en PréC (deux cycles de 15 min avec 1,4% d'isoflurane, avec 5 minutes de rinçage) chez la souris s'est avéré diminuer la taille d'infarctus mais également améliorer la capacité de rétention calcique des mitochondries de cardiomyocytes. En conclusion de ces études, la modulation de TRPV1, notamment l'activation par les anesthésiques volatiles notamment pourrait être bénéfique après un infarctus du myocarde.

# Hypothèses





Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2012, les maladies cardiovasculaires ont causé 17.5 millions de morts dans le monde, soit 30% des décès, ce qui en fait une des premières causes de mortalité mondiale. En France, environ 140 000 personnes sont décédées de MCV<sup>92</sup>, dont 120 000 d'un IDM. En effet, chaque année, 10% des IDM sont mortels dans l'heure et 15% des patients récidivent dans l'année qui suit.

L'infarctus du myocarde (IDM), principale maladie cardiovasculaire, est causé par l'obstruction d'une artère coronaire entraînant un arrêt de l'approvisionnement sanguin du tissu en aval de cette obstruction. Ce phénomène est appelé l'ischémie. Cette zone non irriguée est alors dépourvue en oxygène et en nutriments, entraînant alors la mort cellulaire. Actuellement, le seul traitement possible est la désocclusion de l'artère coronaire permettant au sang d'irriguer *de novo* le tissu ; ceci est appelé la reperfusion. Malheureusement, aussi bien l'ischémie que la reperfusion causent des dégâts irréversibles sur le muscle cardiaque. D'autant plus que ces dernières années, avec le changement de style de vie des femmes, notamment de moins de 50 ans, le nombre d'IDM a triplé. En effet, elles sont concernées de plus en plus jeunes et ont des symptômes méconnus, réduisant leur prise en charge<sup>100</sup>. Cette maladie est donc un enjeu de santé publique majeur. Comprendre les mécanismes sous-jacents des lésions d'ischémie-reperfusion permettra de développer de nouvelles stratégies de cardioprotection.

Le réticulum endoplasmique est la source principale d'ions calcium (second messenger) dans toutes les cellules. La concentration en Ca<sup>2+</sup> réticulaire, finement régulée, contrôle la balance survie cellulaire et mortalité. Les canaux dits « de fuite » calciques, libèrent les ions calcium dans le cytoplasme, peuvent de ce fait moduler le taux de Ca<sup>2+</sup> réticulaire et donc la survie des cellules. Il est donc capital d'identifier les canaux de fuite calcique des cardiomyocytes afin d'augmenter leur survie lors de l'IDM (figure 36).

Récemment, notre équipe a mis en évidence que le canal TRPV1 est un canal de fuite calcique fonctionnel du réticulum sarcoplasmique (RS) dans le muscle strié squelettique<sup>173</sup>. Il a également été montré qu'il pouvait être impliqué dans la pathologie de l'IDM<sup>234,235</sup> mais également dans d'autres pathologies telle que l'hyperthermie maligne<sup>311,312</sup>. En revanche, au sein des cardiomyocytes précisément rien n'est connu sur TRPV1.

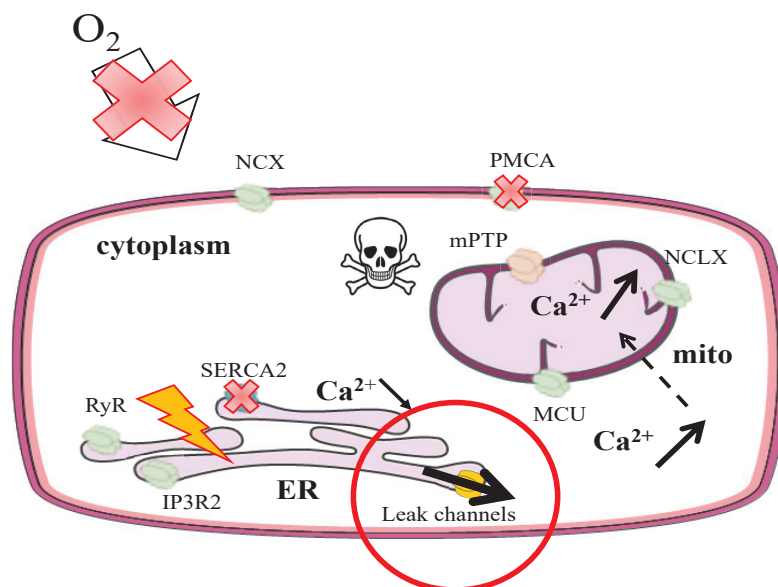
Il a été montré que TRPV1 est un canal cationique non-sélectif homotétramérique appartenant à la super-famille des canaux TRP (Transient Receptor Potential). Il possède six domaines transmembranaires et un pore formé entre les domaines 5 et 6. Ce canal est principalement impliqué dans la nociception. Il est activé par la chaleur (supérieure à 42°C), l'acidose (pH 6) et des agonistes tels que la capsaïcine (CAP), la résinifératoxine (RTX) et les anesthésiques volatils tel que l'isoflurane. Il a été montré que les anesthésiques volatils halogénés sont cardioprotecteurs mais ils possèdent plusieurs cibles dont notamment au sein du RS. Des prétraitements avec ces anesthésiques permettent de pré-vider le RS limitant ainsi la surcharge calcique cytoplasmique au moment de l'I/R<sup>327</sup>.

En revanche, TRPV1 est inhibé par des agonistes tels que la capsazépine (CPZ) et la 5'-Iodorésinifératoxine (iRTX)<sup>204,241,328</sup>. TRPV1 est exprimé dans différents tissus tels que la moelle épinière, le cerveau, le muscle squelettique et le cœur, mais possède différentes localisations à l'échelle cellulaire. En effet, dans la moelle épinière et le cerveau, TRPV1 est localisé à la membrane plasmique et au niveau du réticulum endoplasmique (RE) alors que dans le muscle squelettique, TRPV1 est localisé à la membrane du RS exclusivement.

Le manque de connaissance sur le canal TRPV1 dans le muscle cardiaque et notamment dans les cardiomyocytes ne nous permet pas d'élucider son mécanisme d'action au cours de l'I/R myocardique. C'est pourquoi nous avons trois hypothèses :

- i) TRPV1 est localisé à la membrane du RS dans les cardiomyocytes

- ii) L'activation du canal quelques minutes avant l'ischémie pourrait être bénéfique pour les cellules. En effet, une légère fuite calcique réticulaire permettrait d'augmenter la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie et provoquerait une production d'ATP via les enzymes dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ , préparant ainsi les cellules à ce stress,
- iii) L'inhibition de TRPV1 au moment de la reperfusion pourrait limiter la surcharge calcique mitochondriale effecteur de l'activation des caspases conduisant à la mort cellulaire des cardiomyocytes.



**Figure 36.** Hypothèse de travail et implication du canal TRPV1

Ce projet combine à la fois des approches *in vitro* et *in vivo* (demande d'autorisation de projet acceptée par le ministère). Nos approches sont complémentaires du niveau cellulaire à l'organe jusqu'à l'animal entier. Dans cette étude, deux modèles *in vitro* sont utilisés :

- i) le premier modèle, étant une lignée cellulaire de cardiomyoblastes de rat, H9C2, compatible avec l'utilisation de sondes génétiques et réduisant le nombre d'animaux utilisés,
- ii) le second permet une approche concernant l'aspect excitation-contraction par la culture primaire de cardiomyocytes de souris adultes.

Le projet de recherche intitulé « étude du rôle du canal calcique TRPV1 dans l'ischémie-reperfusion myocardique : une nouvelle cible thérapeutique ? » est donc divisé en trois axes :

- 1- Dynamiques calciques au cours de l'hypoxie-reoxygénation (HR) et impact de la modulation pharmacologique de TRPV1 dans une lignée cellulaire de cardiomyoblastes de rat (H9C2)
- 2- Identification et caractérisation du canal TRPV1 dans les cardiomyocytes adultes de souris
- 3- Rôle de la modulation de TRPV1 dans l'ischémie-reperfusion myocardique *in vivo* chez la souris

L'axe 1 correspond au travail le plus important de ce projet. Les résultats sont présentés en trois grandes parties. Dans la première partie, j'ai étudié l'expression et la localisation subcellulaire de TRPV1 dans la lignée de cardiomyoblastes de rat, les cellules H9C2. J'ai mis au point au sein du laboratoire une lignée stable de HEK surexprimant TRPV1-mCherry. Dans la seconde partie, j'ai réalisé une caractérisation fonctionnelle de TRPV1 dans les cellules H9C2 par le biais de molécules pharmacologiques. J'ai mesuré au cours du temps, grâce à un microscope à champ large, les

concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum, le cytoplasme, la mitochondrie et dans les hot spots mitochondriaux. Enfin, dans la troisième et dernière partie, j'ai étudié l'impact de la modulation de TRPV1 au cours de l'hypoxie-réoxygénation. A la suite de cette séquence, j'ai mesuré la mort cellulaire par cytométrie en flux.

En parallèle de mon projet de thèse, et en collaboration avec des membres de mon laboratoire, j'ai développé une nouvelle méthode permettant de mesurer plusieurs paramètres en même temps (mort cellulaire, potentiel de membrane mitochondrial, ROS, et masse mitochondriale) après une séquence d'hypoxie-réoxygénation sur des cardiomyocytes adultes de souris.

J'ai pu au cours de ma thèse démontrer que TRPV1 est un canal de fuite calcique exprimé dans les cellules H9C2, et localisé à la membrane du RE (et absent de la membrane plasmique). TRPV1 est également un canal de fuite fonctionnel dans les cellules H9C2 où il peut être modulé pharmacologiquement par deux agonistes : la CAP et la RTX et par deux antagonistes : la CPZ et la iRTX. Enfin, j'ai montré que la modulation de TRPV1 avait un impact sur la  $[\text{Ca}^{2+}]$  cytosolique, mitochondriale et dans les hot spots mitochondriaux. La modulation de ce canal peut également être bénéfique après une séquence d'hypoxie-réoxygénation.

Pour conclure, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'ischémie-reperfusion myocardique représente un challenge important pour les chercheurs et cliniciens afin de réduire l'impact sur notre société et d'améliorer le pronostic des patients. Les derniers essais cliniques visant la mitochondrie se sont soldés par des échecs. Ainsi, l'esprit innovant de mon étude est donc de développer une nouvelle stratégie de cardioprotection en modulant TRPV1, un canal de fuite calcique réticulaire, c'est-à-dire en agissant en amont de la surcharge cytosolique et mitochondriale. De plus, l'affiliation du laboratoire au centre d'investigation clinique en cardiologie de l'hôpital Lyon-Est (institut hospitalo-universitaire OpeRa) facilitera l'éventuel transfert à l'Homme des données précliniques obtenues chez la souris.



# **Matériels et méthodes**

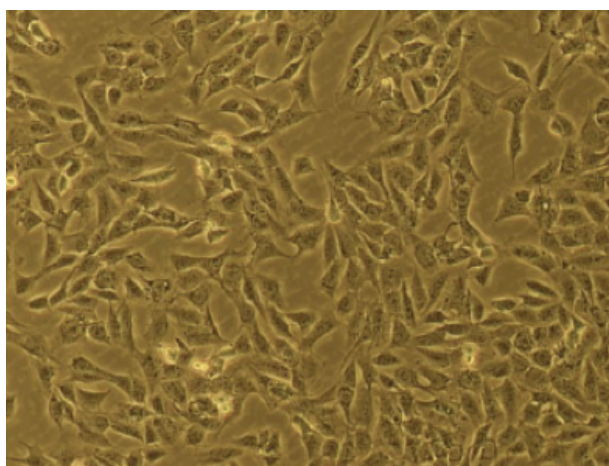


Au cours de cette étude, deux modèles cellulaires ont été utilisés : la lignée cellulaire de cardiomyoblastes de rats (H9C2) et des cardiomyocytes adultes de souris (CMA).

## 1- Cellule cellulaire des cardiomyoblastes de rat, des HEK et des cardiomyocytes adultes de souris

### 1-1 La lignée cellulaire de cardiomyoblastes de rat : les cellules H9C2

Des cardiomyoblastes de rat<sup>329</sup> (figure 37) ont été immortalisés avec le virus SV40 pour former la lignée H9C2. Ces cellules sont ensemencées dans un milieu de culture standard : Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM - Gibco) high glucose (4,5 g/l) enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS - Dutscher) et 10 ml/l d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine (Gibco)). Elles sont incubées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est changé toutes les 48 heures afin que les cellules aient suffisamment de nutriments et pour éviter l'hypoxie. Lorsque la confluence des cellules est supérieure à 80%, elles sont repiquées.



**Figure 37.** Photo de microscopie optique des cellules H9C2

Le tableau 2 indique les concentrations de cellules utilisées pour chaque expérience.

<u>Expérience</u>	<u>Nombre de cellules</u>	<u>Boîte utilisée</u>	<u>Durée d'ensemencement</u>
Immunofluorescence	20 000	LabTeck 8 puits	24 heures
Transfection	140 000	6 puits avec ou sans lamelles	48 heures
Imagerie sans transfection	70 000	6 puits avec lamelles	48 heures
Hypoxie/réoxygénation	60 000	12 puits	24 heures
Fractionnement cellulaire	500 000	Boîte de Pétri (Ø 10 cm)	72 heures

**Tableau 2.** Conditions d'ensemencement des cellules H9C2 en fonction des expériences réalisées



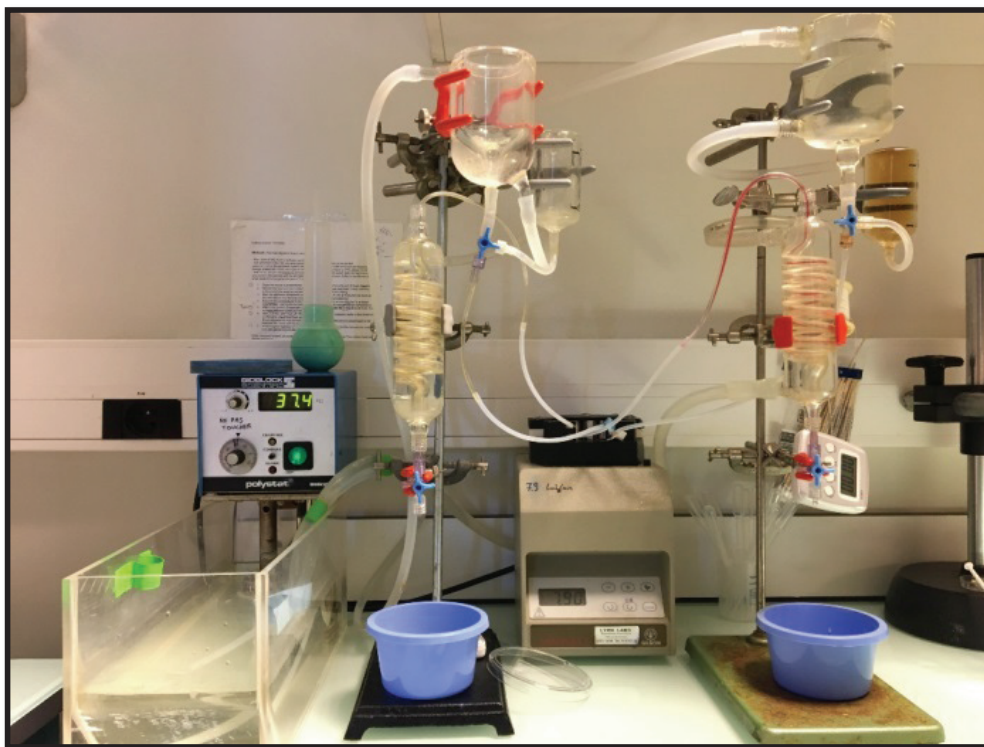
## 1-2 Test de spécificité de l'anticorps anti-TRPV1 : création d'une lignée stable HEK surexprimant un plasmide humain TRPV1 couple à mCherry

Les HEK-293 (pour Human Embryonic Kidney 293) sont ensemencées dans un milieu de culture standard : Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM - Gibco) high glucose (4,5 g/l) enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS - Dutscher), 10 ml/l d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine (Gibco)), 1% de pyruvate de sodium et 1% de MEM (Minimum Essential Medium). Elles sont incubées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est changé toutes les 48 heures afin que les cellules aient suffisamment de nutriments et pour éviter l'hypoxie. Lorsque la confluence des cellules est supérieure à 80%, elles sont repiquées.

## 1-3 Les cardiomyocytes adultes de souris

### **1-3-1 Technique d'isolation des cardiomyocytes**

Le protocole d'isolation des cardiomyocytes est issu de l'article d'O'Connell<sup>330</sup>. Les souris C57Bl6J ou TRPV1 KO sont héparinées avec 50 µl d'héparine à 5000 IU/ml en intrapéritonéal 10 minutes avant l'expérience. Afin de prélever le cœur, les souris subissent une dislocation cervicale puis le cœur est prélevé et monté sur une canule par l'aorte. Cette canule est installée sur une colonne de dissociation et du milieu de perfusion sans calcium (composition dans le tableau 3) est passé dans le cœur pendant trois minutes à 37°C (figure 38).



**Figure 38.** Colonnes de dissociation des cardiomyocytes.

<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentration (mM)</u>
NaCl	S9888 Sigma	120.4
KCl	P4504 Sigma	14.7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	P5379 Sigma	0.6
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	S0876 Sigma	0.6
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	230391 Sigma	1.2
Na-HEPESb	15630 Sigma	10
NaHCO <sub>3</sub>	S5761 Sigma	4.6
Taurine	T0625 Sigma	30
2,3-Butanedione Monoxime (BDM)	B0753 Sigma	10
Glucose	G5767 Sigma	5.5
H <sub>2</sub> O		q.s.p. 1 litre

**Tableau 3.** Composition du tampon de perfusion.

Le pH est ajusté à 7.0

La collagénase de type II (tableau 4) est ensuite perfusée dans le cœur pendant 2 minutes 30 à 37°C. Puis 15 µL de CaCl<sub>2</sub> à 100 mM sont ajoutés dans la solution avec l'enzyme (soit une concentration de 40 µM). Le cœur est perfusé avec cette solution pendant 5 minutes 30 à 37°C.

<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentration</u>
Tampon de perfusion		q.s.p. 50 ml
Collagenase II	Fisher Scientific 17101-015	2.4 mg/ml

**Tableau 4.** Composition de la collagénase II

A la fin de la perfusion, le cœur est récupéré dans une boîte de Pétri et les oreillettes sont retirées. Les deux ventricules sont coupés en morceaux puis mis dans une solution de collagénase de type II avec CaCl<sub>2</sub>. Des allers-retours à la pipette sont effectués afin de terminer la dissociation des cardiomyocytes. Du milieu appelé « Stopping Buffer (SB) » (composition tableau 5) est ajouté sur les cardiomyocytes afin d'arrêter l'action de la collagénase.

<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentration</u>
Tampon de perfusion		q.s.p. 50 ml
FBS	P30-3302C Dutscher	10%
CaCl <sub>2</sub>	21114 Fluka	12,5 µM

**Tableau 5.** Composition du tampon de "Stopping"

Les remontées en calcium consistent à réintroduire du calcium progressivement dans les cardiomyocytes. A la fin de la dissociation, les cardiomyocytes se trouvent dans un falcon 15 ml qui est centrifugé pendant 3 min à 20 g. Puis une succession de centrifugation avec les mêmes réglages aura lieu :

- 1<sup>ère</sup> solution : 10 ml de SB + 200 mM de Na-ATP
- 2<sup>ème</sup> : 10 ml de SB + 100 µM de CaCl<sub>2</sub>
- 3<sup>ème</sup> : 10 ml de SB + 400 µM de CaCl<sub>2</sub>
- 4<sup>ème</sup> : 10 ml de SB + 900 µM de CaCl<sub>2</sub>

A cette dernière étape, les cardiomyocytes peuvent être soit mis dans du milieu complet (MEM, composition tableau 6) et ensemencés pour des techniques d'imagerie, soit placés dans du milieu complet puis dosés afin de pratiquer la technique d'hypoxie/réoxygénation en suspension. Cette dernière technique sera détaillée dans la partie 4-2.1.

Lorsque les CMA sont utilisés pour l'imagerie, le culot de cellules est resuspendu dans 15 ml de milieu MEM complet. Le volume sera ajusté en fonction de la qualité de la dissociation et donc de la taille du culot. Puis, les cellules seront ensemencées dans des B35 contenant des lamelles en verre préalablement coatées (pendant au moins 1h) avec de la laminine (Corning, 354232, 2.67mg/ml). Seulement 500 µl de suspension cellulaire sont déposés sur chaque lamelle. Les CMA auront besoin de 15 minutes pour adhérer correctement à la boîte, puis 1 ml de milieu complet sera ajouté dans chaque boîte afin de leur donner suffisamment de milieu pour la fin de l'adhésion.

<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentration</u>
MEM	11575-035 Fisher Scientific	42,5 ml
FBS	P30-3302C Dutscher	10 %
BDM	B0753 Sigma	10 mM
Pénicilline/Streptomycine	15140122 Fisher Scientific	1 %
Glutamine	25030024 Fisher Scientific	2 mM
Na-ATP	A6419 Sigma	200 mM

**Tableau 6.** Composition du milieu de culture pour cardiomyocytes adultes de souris : MEM complet

Après dissociation, les cardiomyocytes peuvent être utilisés dans les heures qui suivent (maximum une journée après dissociation). Dans des milieux adaptés, ces cellules peuvent être gardées jusqu'à 72 heures mais elles perdent leur capacité à se contracter et changent de phénotype (notamment réarrangement mitochondrial).

## 2- Biologie moléculaire

### 2-1 Technique de transfection par un lipofectant sur les cellules H9C2

Comme décrit précédemment dans le tableau 2. Lorsque les cellules H9C2 sont utilisées pour être transfectées, elles sontensemencées à 140 000 cellules par puits sur des lamelles en verre (24 mm de diamètre) si elles sont utilisées pour l'imagerie ou sans lamelles si elles sont utilisées pour de la biochimie. L'ensemencement s'effectue quelques heures avant la transfection. Les cellules sont transfectées avec un mix de transfection contenant 2 µg d'ADN plasmidique et 2 µL de Dharmafect Duo (Dharmacon) ainsi que 500 µL de milieu « TM » (transfection medium) contenant seulement du DMEM high glucose. Le mix est incubé 20 minutes à température ambiante puis est mis sur les cellules (le milieu a été préalablement enlevé) et 500 µL de TM est ajouté. L'ADN plasmidique peut être remplacé par un siRNA.

Le lendemain le milieu de transfection est changé et remplacé par du milieu complet. Les cellules peuvent être utilisées 48 heures après la transfection.

### 2-2 Séquences des siRNA testés contre la protéine TRPV1

Le protocole de transfection des cellules pour le siRNA est le même que dans le paragraphe 2-1 avec une concentration de 100 nM. Le tableau 7 liste les différents siRNA utilisés contre TRPV1.

<u>Nom du siRNA</u>	<u>Séquence du siRNA</u>	<u>Référence</u>
siRNA 1	5'-ATGGAACAACGGGCTAGCTTA-3'	Qiagen SI02010743
siRNA2	5'-GCGCATCTTCTACTTCAAC-3'	Eurogentec
siRNA 3	5'-GTTCGTGACAAGCATGTAC-3'	Eurogentec
siRNA I	5'-GTGGACAGCTACAGTGAGA-3'	Eurogentec
si RNAII	5'-AGAGCAAGAACATCTGGAA-3'	Eurogentec
siRNA III	5'-GCCTGGAGCTGTTCAAGTT-3'	Eurogentec

**Tableau 7.** Liste des différents siRNA testés sur les cellules H9C2

Afin de vérifier l'efficacité du siRNA, l'ARN est extrait des H9C2 puis une RT-PCR est effectuée. Les protéines de ces cellules sont également extraites afin d'effectuer des Western blots.

### 2-3 Amplification des plasmides

Le protocole utilisé est celui décrit par Promega « Pure Yield Plasmid Maxiprep System ».

### 2-4 Extraction d'ARN

L'ARN est extrait à partir des cellules H9C2, du cerveau, de la chaîne dorsale de ganglions et du cœur de souris après homogénéisation avec 1 ml de la solution de Tripure (Sigma-Aldrich), le protocole d'extraction est le suivant :

Les échantillons sont vortexés et laissés 5 minutes à température ambiante (TA). 200 µl de chloroforme est ajouté aux échantillons, puis la suspension est agitée fortement pendant 15 secondes et laissées à TA

pendant 15 minutes. Les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes à 12 000 g à 4°C. La phase aqueuse est la phase supérieure et est gardée dans un nouvel eppendorf. 500 µl d'isopropanol est ajouté dans ce tube et est agité doucement. Ce tube est laissé 10 minutes à TA, puis centrifugé à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté et 800 µl d'éthanol 75% est ajouté dans le tube. Le tube est centrifugé pendant 5 minutes à 7 500 g à 4°C. L'éthanol est enlevé et le tube est laissé à sécher pendant environ 20 minutes. Le culot est resuspendu dans 30 µl d'eau « RNase free ». Le tube est placé 5 minutes à 65°C sous agitation et il peut être dosé.

L'ARN est par la suite traité avec une DNase I Amplification grade (Sigma-Aldrich) afin d'enlever toute contamination d'ADN. La synthèse des cDNAs est effectuée en utilisant le kit PrimeScript™ RT (Perfect Real Time) (Takara).

## 2-5 RT-PCR

Les amorces spécifiques pour TRPV1 sont listées dans le tableau 8. Leur design a été effectué en utilisant le logiciel Primer-blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) et leur efficacité a été testée. Toutes les réactions PCR ont été réalisées avec le système CFX96 C1000 system (Bio-Rad). L'amplification des gènes est réalisée avec le premix TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (Takara) avec le cycle d'amplification suivant :

- Un premier cycle de 5 minutes à 95 °C
- 42 répétitions du cycle : de 10 secondes à 95 °C, 30 secondes à 60 °C et 30 secondes à 72 °C.

Une courbe de fusion est établie dans l'intervalle de température de 65 à 95°C avec une augmentation de 0.5°C toutes les 5 secondes.

Les expériences sont réalisées en triplicat. Les résultats de la PCR sont analysés en utilisant la méthode de  $2^{-\Delta\Delta Ct^{331}}$ , la GAPDH (D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) est utilisée comme un contrôle interne où la normalisation se fait par rapport à son expression.

Séquence / Forward	Séquence /Backward	Exon	Espèce	Référence
GCT-CTC-ATG-GGC-GAG- ACT-GTC	CGG-AAG-GCC-TTC-CTC- ATG-CAC	13/14	Souris	Eurogentec
GCT-CTC-ATG-GGT-GAG- ACC-GTC	CGG-AAG-GCC-TTC-CTC- ATG-CAC	13/14	Rat	Eurogentec
CAG-GAC-TCT-GTC-TCC- ACT-GG	CAT-TGT-GCA-GAT-TGA- GCA-TGG-C	3/4	Souris	Eurogentec
CAG-GAC-TCC-GTC-TCC- GCT-G	CAT-TGT-GCA-GAT-TGA- GCA-TGG-C	3/4	Rat	Eurogentec

**Tableau 8.** Liste des amorces pour TRPV1

## 2-6 Amplification des plasmides

Le protocole de transfection est identique à celui détaillé dans le paragraphe 2-1. Le plasmide utilisé est le TRPV1-mCherry humain<sup>312</sup>. Pour ce protocole, la transfection est effectuée dans des boîtes de Pétri.

## 2-7 Sélection des clones

48 heures après la transfection, les cellules sont soumises à un protocole de sélection. Le gène de résistance du plasmide TRPV1-mCherry humain est la néomycine. L'antibiotique utilisé sera alors G418

(génétoicine) à 1000 µg/ml. Le milieu (avec antibiotique) des cellules contrôles et transfectées est changé tous les jours pendant deux semaines.

Lorsque les cellules contrôles sont quasiment toutes mortes et que les cellules transfectées forment des clones, la sélection des différents clones peut avoir lieu. Environ 12 clones sont récupérés dans la boîte de Pétri et réensemencé dans une plaque 96 puits. Lorsque les cellules sont à plus de 80% de confluence, elles sont repiquées dans une boîte 12 puits, puis dans une boîte 6 puits et enfin, une boîte de Pétri. Le traitement G418 est continué quelques jours après l'ensemencement dans la plaque 96 puits.

## 2-8 Validation des clones

Les clones sont validés par immunofluorescence et par imagerie calcique. Ces protocoles seront décrits dans la partie 3-2-2 et 3-2-3.

## 2-9 Utilisation d'Adénovirus pour les cardiomyocytes adultes de souris

L'utilisation de cardiomyocytes primaires dont l'utilisation optimale doit se faire dans la journée suivant la transfection est incompatible avec un protocole de transfection nécessitant une mise en culture de 48 heures minimum. La solution actuelle utilisée au laboratoire est le recours à l'injection d'adénovirus dans le myocarde, suivie d'une isolation des CMA 10 jours plus tard (le protocole d'injection est détaillé dans la demande d'autorisation de projet (DAP) ajoutée en annexe). Actuellement, nous ne disposons que de seulement deux adénovirus : 4mtD3CPV et D4ER, respectivement dédiés au suivi des concentrations mitochondriales et réticulaires. A l'inverse, nous disposons d'une multitude de sondes génétiques sous forme plasmidiques (utilisées sur le modèle cellulaire H9C2). Le but est donc de transformer ces plasmides en adénovirus, à partir du protocole dans l'article de Chaussade *et al*<sup>332</sup>. Pour le moment, seul trois plasmides vont être transformés : ErGAP1, N33D1cpv et Ateam<sub>mito</sub>.

### **2-9-1 Protocole pour rendre les bactéries compétentes**

Dans un premier temps, il faut rendre des bactéries compétentes afin de pouvoir les transformer, leur faire exprimer le plasmide d'intérêt et produire ce dernier en grande quantité. Les bactéries utilisées sont les BJ 5183<sup>333</sup>.

La pré-culture des bactéries se fait la veille où 100 µl du glycérol stock, 5 ml de milieu de bactérie (LB = Lysogeny Broth) et 5 µl d'antibiotique : streptomycine sont mis à incuber sous agitation (250 rpm) à 37°C pendant toute la nuit.

Le lendemain, 1 ml de pré-culture est ensemencé dans 50 ml de LB avec antibiotique, la streptomycine. Les bactéries sont incubées entre 4 à 8 heures à 37°C sous agitation. La densité optique (DO) doit être mesurée toutes les heures afin de suivre l'évolution de la croissance des bactéries. Lorsque la DO atteint 0,8, il faut stopper la culture des bactéries. Elles sont alors incubées sur la glace pendant 15 minutes, ceci permet également de leur faire subir un choc thermique. Elles sont par la suite centrifugées à 3 220 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est à reprendre dans 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM puis 14 ml du même CaCl<sub>2</sub> sont ajoutés, et laissés 15 minutes sur la glace. Les bactéries sont centrifugées à 3 220 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est repris dans 200 µl de CaCl<sub>2</sub> + glycérol 15% et complété à 2 ml. Les bactéries sont aliquotées et conservées à -80°C.

Afin de vérifier la compétence des bactéries, elles sont transformées avec un plasmide quelconque. Pour cela, 25 µl de suspension bactérienne sont mis avec 200 pg de plasmide et incubés sur glace pendant 30 minutes, suivi d'un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes. Les bactéries sont par la suite incubées 5 minutes sur la glace. Enfin, 475 µl de SOC (Super Optimal Medium) sont ajoutés à ce mix (bactéries + plasmide) et sont incubées à 37°C sous agitation (250 rpm) pendant au moins 1 heure. Ce mix est alors

étalé dans une boîte de Pétri contenant de l'Agar et l'antibiotique correspondant à la résistance du plasmide utilisé. La boîte est laissée une nuit à 37°C. Le lendemain s'il y a plus de 50 colonies présentes dans la boîte de Pétri, les bactéries sont considérées comme compétentes.

### **2-9-2 Insertion du plasmide ErGAP1, N33D1cpv et Ateam<sub>mito</sub> dans un plasmide V4**

La digestion des plasmides ErGAP1, N33D1cpv et Ateam<sub>mito</sub> pour les linéariser est effectuée grâce aux sites de restriction pour les enzymes SFO1 et Bgl2. La digestion a lieu pendant 60 min à 25°C. La digestion du plasmide V4 est effectuée au niveau de son site de restriction par l'enzyme Swa1. La digestion a lieu pendant 60 minutes à 37°C.

Afin de vérifier que la digestion a bien eu lieu, les échantillons sont déposés sur gel à 0,8% d'agarose et vont migrer pendant 25 min à 100V. La purification des échantillons est effectuée selon le protocole détaillé dans le kit : NucleoSpin® Plasmid, de Macherey Nagel.

L'élution de l'échantillon est effectuée avec 40 µl RNase free. Puis, les échantillons sont dosés. 600 ng de plasmide ErGAP1, N33D1cpv ou Ateam<sub>mito</sub> et 200 ng de plasmide V4 seront ajoutés avec 100 µl de bactéries compétentes afin d'effectuer la transformation bactérienne.

### **2-9-3 Création de l'adénovirus de la séquençage du plasmide obtenu, l'amplification du plasmide, la transformation en adénovirus, l'amplification de l'adénovirus à la titration**

Le plasmide purifié est séquençé afin de vérifier la séquence. Le protocole d'amplification des plasmides est identique à la partie 1.4. Une fois le plasmide obtenu, les cellules HEK sont transfectées avec le plasmide correspondant. La transfection est effectuée au phosphate de calcium. Lorsque les cellules sont suffisamment transfectées, elles sont récupérées afin d'isoler l'adénovirus. L'adénovirus est alors amplifié dans une très grande quantité de cellules puis purifié par Chlorure de Césium. Enfin, l'adénovirus obtenu est titré afin d'en connaître sa concentration.



### 3- Imagerie : microscopie

#### 3-1 Sondes chimiques et génétiques utilisées

Afin de suivre les variations de  $\text{Ca}^{2+}$ , de pH ou d'ATP dans différents compartiments, des sondes chimiques et génétiques ont été utilisées. Le tableau 9 regroupe toutes les sondes utilisées.

<u>Sonde</u>	<u>Nom</u>	<u>Mesure</u>	<u><math>K_d</math> ou pKa</u>	<u>Ratiométrique (Oui/Non)</u>	<u>Excitation</u>	<u>Émission</u>
Chimique	Fura2-AM (thermofisher scientific)	$[\text{Ca}^{2+}]$ cytosolique	0.14 $\mu\text{M}$	Oui	340/380	510
	BCECF AM <sup>334</sup> (invitrogen)	pH	Entre 6.8 et 7.4	Oui	490/440	535
	SNARF-5F <sup>335</sup> (invitrogen)	pH	7.2	Non	488	580/640
	Fluo5N-AM (thermofisher scientific)	$[\text{Ca}^{2+}]$ réticulaire	90 $\mu\text{M}$	Non	488	525/50
	Fluo4-AM (thermofisher scientific)	$[\text{Ca}^{2+}]$ cytosolique	335 nM	Non	488	525/50
Génétique	ErGAP1 <sup>336</sup>	$[\text{Ca}^{2+}]$ réticulaire	16 $\mu\text{M}$	Oui	403/470	520
	4mtD3CPV <sup>337,338</sup>	$[\text{Ca}^{2+}]$ mitochondrial	0.6 $\mu\text{M}$	Oui	477/514	510
	N33D1cpv <sup>339</sup>	Hot spot de $[\text{Ca}^{2+}]$ mitochondrial	10 $\mu\text{M}$	Oui	477/514	510
	R-GECO <sup>340</sup>	$[\text{Ca}^{2+}]$ mitochondrial	142 nM	Non	514	540
	Ateam <sub>mito</sub> <sup>341</sup>	[ATP] mitochondrial	7.4 $\mu\text{M}$ – 3.3 mM	Oui	477/514	510

	D4ER	[Ca <sup>2+</sup> ] réticulaire	312 μM	Oui	477/514	510
--	------	------------------------------------	-----------	-----	---------	-----

**Tableau 9.** Liste des sondes chimiques et génétiques utilisées dans les H9C2, et les CMA

De plus, il existe des sondes fluorescentes permettant de marquer un compartiment tel que le réticulum endoplasmique ou les mitochondries. Le tableau 10 regroupe les différentes sondes utilisées.

<u>Sonde</u>	<u>Compartiment</u>	<u>Temps de chargement</u>	<u>Excitation</u>	<u>Émission</u>	<u>Laser</u>
ER-Tracker Green (ThermoFisher scientific)	Réticulum endoplasmique	30 minutes	488	525/50	Argon
Mito-Tracker Green (ThermoFisher scientific)	Mitochondrie	30 minutes	488	525/50	Argon

**Tableau 10.** Liste des sondes utilisées pour l'immunofluorescence sur cellules non fixées

### 3-2 La microscopie

D'une manière générale, l'imagerie calcique, du pH ou de l'ATP en temps réel est effectuée sur le microscope à champ large (Leica) et les photos d'immunofluorescence sont acquises sur le microscope confocal (Nikon).

#### 3-2-1 Milieu de microscopie et les drogues utilisées

Afin d'effectuer les mesures de microscopie, différents milieux sont utilisés et sont détaillés dans les tableaux suivants. Le milieu de base et commun à tous les milieux utilisés pour la microscopie est l'Experimental Buffer (EB), sa composition est détaillée dans le tableau 11.

<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentration (M)</u>
NaCl	S9888 Sigma	1,4
KCl	P4504 Sigma	0,05
MgCl <sub>2</sub>	H3375 Sigma	0,01
HEPES	M8266 Sigma	0,1
Glucose	G5767 Sigma	0,1
H <sub>2</sub> O		q.s.p. 1 litre

**Tableau 11.** Composition du tampon EB 10X

Par la suite, lorsque les cellules nécessitent d'être chargées avec une sonde, ou d'être incubées avant le début de l'expérience, du Calcium Containing Buffer (CCB) est utilisé. Sa composition est décrite dans le tableau 12.

<u>Produit</u>	<u>Concentration (mM)</u>
Tampon EB 10X	1X
CaCl <sub>2</sub>	2.0
H <sub>2</sub> O	q.s.p. 500 ml

**Tableau 12.** Composition du Calcium Containing Buffer (CCB).

Le pH est ajusté à 7,4

Puis, pour toutes les expériences suivant l'évolution du Ca<sup>2+</sup> dans un organite au cours du temps au microscope, le milieu utilisé est le Calcium Free Buffer (CFB), dont la composition est dans le tableau 13.

<u>Produit</u>	<u>Concentration (mM)</u>
Tampon EB 10X	1X
EGTA	1,0
H <sub>2</sub> O	q.s.p. 500 ml

**Tableau 13.** Composition du Calcium Free Buffer (CFB).

Le pH est ajusté à 7,4.

Enfin, afin d'évaluer les concentrations en Ca<sup>2+</sup> ou en ATP dans les compartiments étudiés, des molécules pharmacologiques sont utilisées et listées dans le tableau 14.

<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentration</u>	<u>Modèle</u>	<u>Rôle</u>
Ionomycine	Abcam (ab120370)	1 µM	H9C2	Perméabilisation des cellules
Thapsigargine	T9033 Sigma	2 µM	H9C2	Vidange du RE via inhibition des SERCA
Mg-ATP	A9187 Sigma	50 µM / 25 µM	H9C2 / CMA	Activation des échanges entre RE et mitochondrie
Histamine	H7125 Sigma	100 µM	CMA	Activation IP3R, vidange du RE
Caféine	C0750 Sigma	5 mM	CMA	Activation des RyR, vidange du RE

**Tableau 14.** Liste des différentes drogues utilisées pour l'imagerie

### 3-2-2 Microscope champ large

Comme son nom l'indique, ce type de microscope permet d'acquérir des images sur un champ assez large, ne permettant pas d'avoir une résolution importante. Le but de ce type d'imagerie est d'acquérir des images regroupant un nombre important de cellules dans un temps relativement court et en associant plusieurs longueurs d'onde d'excitation.

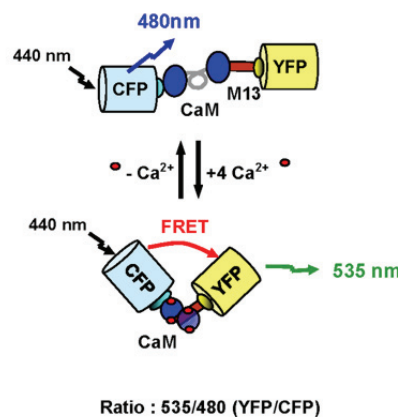
Pour des mesures au microscope à champ large, les ensemencements de cellules requis sont détaillés dans le tableau 2. Les cellules peuvent être soit prêtes à utiliser, c'est-à-dire qu'elles ont été

préalablement transfectées avec une sonde fluorescente, soit elles doivent être chargées avec une sonde chimique. Les caractéristiques spécifiques de chaque sonde sont présentées dans le tableau 3.

- *La sonde chimique : Fura2-AM*

Cette sonde, comme l'indique le tableau 2, permet de mesurer les concentrations calciques dans le cytoplasme. Elles nécessitent une charge de 30 min à 37°C avec 2 µM de sonde et dans l'obscurité, à la fois pour les H9C2 et les HEK-293. Le groupement acetoxyethyl (AM) du Fura2-AM masque les charges négatives des groupements carboxyles (R-COOH) de la sonde, la rendant hydrophobe (lipophile). Sous cette forme, le Fura 2 AM peut traverser la membrane des cellules mais ce groupement le rend insensible au Ca<sup>2+</sup>. Une fois dans le cytoplasme, des estérases endogènes vont hydrolyser le groupement AM du Fura2 AM, libérant ainsi la forme active de la sonde (-COOH) : le Fura. Cette sonde est ratiométrique, cela signifie qu'elle possède deux longueurs d'onde d'excitation permettant d'avoir un ratio de fluorescence. Les sondes ratiométriques ont l'avantage de ne pas être dépendantes de leur concentration à l'intérieur de l'organite et permettent d'évaluer la quantité de Ca<sup>2+</sup> ou d'ATP avant toute stimulation (resting).

- *Les sondes FRET : D4ER, 4mtD3CPV, N33D1cpv et Ateam<sub>mito</sub>*



**Figure 39.** Principe du FRET

Source :

[https://fr.wikipedia.org/wiki/Transfert\\_d%27%C3%A9nergie\\_entre\\_mol%C3%A9cules\\_fluorescentes#/media/Fichier:Sonde](https://fr.wikipedia.org/wiki/Transfert_d%27%C3%A9nergie_entre_mol%C3%A9cules_fluorescentes#/media/Fichier:Sonde)

Ces senseurs permettent de suivre le Ca<sup>2+</sup> réticulaire, mitochondrial, les « hot spot » à la surface de la membrane externe mitochondrial et l'ATP mitochondrial, respectivement. Elles sont basées sur le système de FRET (Förster resonance energy transfer) étant un transfert d'énergie entre deux protéines fluorescentes (YFP et CFP). La figure 47 illustre le principe du FRET. Le donneur est le CFP et l'accepteur est l'YFP. Lorsque la région liant le Ca<sup>2+</sup> ou l'ATP est « libre », la CFP est éloignée de l'YFP. En revanche dès que le Ca<sup>2+</sup> ou l'ATP se fixe, les deux protéines se rapprochent et vont pouvoir transférer leur énergie. En effet, le donneur va donner à l'accepteur. Le CFP sera excité et la fluorescence collectée sera celle de l'YFP. Les sondes que nous utilisons au laboratoire sont des adaptations de ce principe.

Globalement, les sondes génétiques permettant de suivre la [Ca<sup>2+</sup>] ont un domaine de liaison du Ca<sup>2+</sup> entre les deux domaines CFP et YFP. Ce domaine est identique à celui de la CaM. Le domaine de liaison des sondes génétiques permettant de suivre la [ATP] est identique à la sous-unité ε de l'ATP synthase.

- *La sonde BRET : ErGAP1*

ErGAP1 est un senseur génétique basé sur la fusion de deux protéines d'*Aequorea victoria* (GFP et aequorine) appelé BRET (Bioluminescence resonance energy transfer). Le principe de cette sonde est le même que celui du FRET. Elle est employée afin de suivre le  $Ca^{2+}$  réticulaire et son faible  $K_d$  lui permet de détecter de faibles variations de  $Ca^{2+}$  dans ce compartiment et donc d'étudier les canaux de fuite réticulaires.

- *La sonde sépia : R-GECO*

Cette sonde permet de suivre le  $Ca^{2+}$  mitochondrial. L'intérêt de cette sonde bien qu'elle soit non ratiométrique est qu'elle est utilisable en même temps que le Fura2. Ceci rend possible le suivi de façon simultanée des variations de  $Ca^{2+}$  cytosoliques et mitochondriales.

- *Les sondes pH*

Enfin, les sondes pH sont utilisées dans le but d'estimer la diminution du pH intracellulaire au cours d'une hypoxie au microscope. Comme l'indique la partie 1.8, ces sondes ont fait l'objet d'une calibration avec trois solutions ayant des pH différents : 5,5, 7,5 et 9,5. Les deux sondes utilisées sont BCECF et Snarf-5F. Les cellules sont chargées 30 min avec 1  $\mu$ M dans l'obscurité et à 37°C.

Pour toutes les sondes, les lamelles sont montées sur une chambre de microscopie (Chamlide). Cette chambre est placée sur le microscope champ large inversé DMI6000 (Leica microsystem). Les images sont acquises une caméra Orca-Flash 4.0 Scientific CMOS (Hamamatsu) en utilisant un objectif à immersion à huile avec un grossissement 40x. Grâce au Lambda DG-4+ filter (Sutter instruments), les sondes sont excitées selon les longueurs d'onde détaillées dans le tableau 3, et les émissions de fluorescence sont collectées à l'aide de filtres spécifiques. Les images (1024x1024 pixels) sont prises toutes les cinq secondes et l'analyse s'effectue avec le logiciel Metafluor.

### 3-2-3 Microscope confocal

- *Immunofluorescence*

L'intérêt de l'utilisation de ce microscope est de réaliser une image à un champ focal précis. Ceci aboutit à des photos de haute résolution permettant par exemple de co-localiser deux protéines d'intérêt. Deux techniques ont été utilisées pour préparer les échantillons avant la prise d'image : les images des cellules non fixées sont acquises en fonction des paramètres du tableau 4 et les images des cellules fixées en fonction des paramètres du tableau 15. Ces techniques seront détaillées dans la partie 4.4.

<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Hôte ciblé</u>	<u>Excitation (nm)</u>	<u>Emission (nm)</u>	<u>Laser</u>
Alexa 488	A1034 ThermoFisher	Lapin	488	525/50	Argon
Alexa 647	A21447 ThermoFisher	Chèvre	647	700/50	Diode
Alexa 647	A21235 ThermoFisher	Souris	647	700/50	Diode
mCherry	<sup>312</sup>		555	595/50	Sapphire

DAPI	P36935 Invitrogen		401.8	450/50	Diode
------	----------------------	--	-------	--------	-------

**Tableau 15.** Liste des anticorps secondaires fluorescents utilisés

Les images d'immunofluorescence ont été effectuées sur le modèle de cellules H9C2 et HEK-293. Le microscope est un microscope confocal inversé Nikon Eclipse Ti. Les images ont été acquises avec l'objectif à immersion à huile avec le grossissement 63x et traitées avec le logiciel Nis (Nikon). Les fluorescences émises à 525/50 nm et 595/50 nm sont collectées grâce au détecteur ultrasensible (GaAsp) et les fluorescences à 450/50 nm et 700/50 nm avec le détecteur classique (PMT). De plus, le logiciel Nis permet de calculer un coefficient de colocalisation de Pearson et de Mander.

- *Imagerie calcique*

La microscopie confocale, en temps réel, a également été employée sur le modèle CMA. En effet, afin de vérifier la localisation subcellulaire de la sonde Fluo-5N AM ( $K_d = 90 \mu\text{M}$ ), les acquisitions ont été réalisées grâce au Nikon. Les CMA sont chargés 1h30 à 37°C dans l'obscurité avec 5  $\mu\text{M}$  de sonde puis les sondes sont dé-estérifiées pendant 30 minutes également à 37°C. Cette sonde permet de suivre l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  réticulaire en fonction du temps mais n'est pas ratiométrique. Le Fluo-5N AM est excité à 488 nm par un laser argon. La fluorescence émise respectivement est collectée à la longueur d'onde de 525/50 nm en utilisant le détecteur GaAsp. Les images (1024x1024 pixels) sont prises toutes les 10 secondes.

- *Transitoires calciques*

Les CMA, ensemencés sur lamelle de verre de 24 mm, sont chargés 30 min à 37°C dans l'obscurité avec 2  $\mu\text{M}$  de sonde Fluo4-AM ( $K_d = 335 \text{ nM}$ ) dans le milieu de culture des CMA (composition cf. tableau 13). La lamelle est ensuite placée dans une chambre Quick Change Chamber (RC-47FSLP Warner Instruments) et la stimulation a été administrée par un stimulateur MyoPacer (IonOptix).

Après le chargement, les cellules ont été lavées avec du CCB, puis le milieu a été remplacé par un tampon de stimulation (FSB) (tableau 16 et 17). Les transitoires calciques ont été enregistrés dans des CMA chargés de Fluo4-AM stimulés par un champ de stimulation à 1 Hz avec une impulsion de courant délivrée via 2 électrodes en platine, pendant une amplitude de 0,5 msec et 40V, à température ambiante.

Les images Fluo4-AM ont été acquises avec le microscope confocal Nikon A1R plus équipé d'un objectif à immersion dans l'huile  $\times 40$  (scanner résonnant 14,81 FPS (Frame per second)). Fluo4-AM a été excité à 488 nm par un laser à argon ionique. La lumière fluorescente émise respective a été collectée à une longueur d'onde de 525/50 nm en utilisant un détecteur GaAsp. L'analyse du signal cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  a été réalisée à l'aide d'un logiciel Matlab écrit sur mesure par Aymeric Leray (Université de Bourgogne).

<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentration (mM)</u>
NaCl	S9888 Sigma	150
KCl	P4504 Sigma	5.4
MgCl <sub>2</sub>	H3375 Sigma	2
HEPES	M8266 Sigma	10

H <sub>2</sub> O		1 litre
------------------	--	---------

**Tableau 16.** Field Stimulation Buffer, solution stock, pH = 7.4.

<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentration (mM)</u>
Glucose	G5767 Sigma	1
Pyruvate	P2256 Sigma	2.5
Creatine	C0780 Sigma	5
Taurine	T0625 Sigma	5
CaCl <sub>2</sub>	Fluka 21114	2
FSB 1X		q.s.p. 50 ml

**Tableau 17.** Field Stimulation Buffer, solution finale

### 3-2-4 Mesure du pH intracellulaire

Seules des mesures de calibration du pH intracellulaire ont été effectuées (tableau 18). Le pHi (intracellulaire) est estimé en appliquant successivement 3 solutions de pH différents (5,5 ; 7,5 ; 9,5) et contenant de la ionomycine (ionophore). Le pHi est calculé à partir du rapport  $\mathcal{R}$  des signaux de fluorescence du BCECF en utilisant l'équation suivante :

$$[H^+] = 10^{-pKa} \times \frac{(R - R_A)}{(R_B - R)} \times \frac{F_{A(\lambda_2)}}{F_{B(\lambda_2)}}$$

Où R est le ratio  $\frac{F_{(\lambda_1)}}{F_{(\lambda_2)}}$  des intensités de fluorescences (F) mesurées à deux longueurs d'onde  $\lambda_1$  et  $\lambda_2$  et les lettres A et B correspondent aux valeurs limites du pH acide et du pH basique. Le bruit de fond doit être soustrait avant de calculer le R.  $\lambda_1 = 490 \text{ nm}$  ;  $\lambda_2 = 440 \text{ nm}$ .

<u>Solution</u>	<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentration</u>	<u>pH</u>
Solution K <sup>+</sup>	KCl	P4504 Sigma	140 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	M8266 Sigma	1 mM	
	H <sub>2</sub> O		q.s.p. 1.5 litres	
MES	MES	M5057 Sigma	5 mM	5.5
	Solution K <sup>+</sup>		500 ml	Ajusté avec HCl
HEPES	HEPES	H3375 Sigma	20 mM	7.5
	Solution K <sup>+</sup>		500 ml	Ajusté avec NaOH
CAPSO	CAPSO	C2154 Sigma	18 mM	9.5
	Solution K <sup>+</sup>		500 ml	Ajusté avec HCl

**Tableau 18.** Composition des milieux pour la calibration du pH intracellulaire

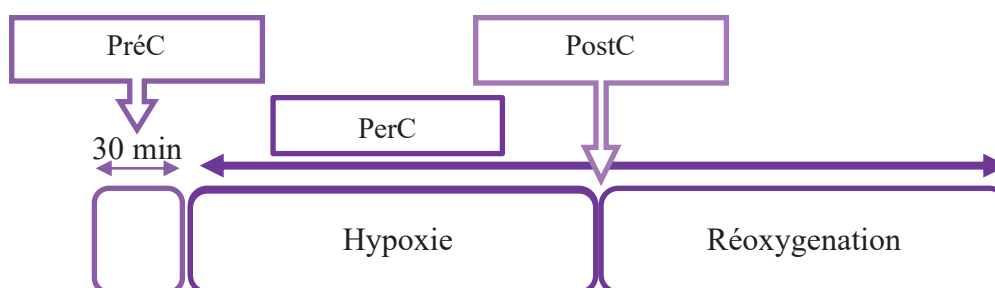


## 4- Imagerie : cytométrie

### 4-1 Séquence d'hypoxie-reoxygenation

Comme l'indique le tableau 2, les cellules sontensemencées à 60 000 cellules dans des plaques 12 puits 48 heures avant le début de l'hypoxie. Les cellules contrôles hypoxiques seront rincées deux fois avec 1 ml de Tyrode (composition détaillée dans le tableau 19), puis 400 µL de Tyrode sont laissés dans chaque puits. Les cellules contrôles normoxiques subissent le même protocole sauf pour les rinçages, effectués avec du milieu complet.

Les cellules peuvent être soumises à des protocoles de conditionnement. Lorsque les cellules sont PréC, la drogue est ajoutée 30 min avant la séquence d'H/R, en PostC, la drogue est ajoutée au moment de la reperfusion et en PerC la drogue est ajoutée au moment de la séquence d'H/R (figure 40).



**Figure 40.** Les différents conditionnements utilisés

L'hypoxie (ou la normoxie) est lancée pour une séquence de 4h50 avec 0,5% d'O<sub>2</sub> (ou 21% d'O<sub>2</sub>) dans un incubateur à Azote (Eppendorf - Galaxy 48R). La reperfusion est initiée lorsque 1 ml de milieu complet est ajouté doucement sur les cellules et dure deux heures. Les cellules peuvent être analysées soit par cytométrie en flux soit par qPCR.

<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentration (mM)</u>
NaCl	S9888 Sigma	130
KCl	P4504 Sigma	5
HEPES	H3375 Sigma	10
MgCl <sub>2</sub>	M8266 Sigma	1
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	C3881 Sigma	1,8
H <sub>2</sub> O		q.s.p. 1 litre

**Tableau 19.** Composition du tyrode.

Le pH est ajusté à 7,4.

### 4-2 Cytométrie

Cette technique permet de faire passer des molécules, particules et cellules à très haute vitesse au travers d'un laser qui les analyse en parallèle. Sur le même principe que le microscope, les cellules peuvent être chargées avec une sonde d'intérêt et les lasers du cytomètre pourront l'exciter. Le signal émis sera alors collecté et analysé.

#### 4-2.1 Développement méthodologique sur des CMA en suspension

Lorsque les CMA ont adhéré à une boîte ou une lamelle en verre, il est impossible de les décoller sans les endommager. Malheureusement, le principe de la cytométrie est incompatible avec des cellules attachées, elles doivent rester en suspension. Les CMA étant des cellules très fragiles, à l'heure actuelle dans la littérature, aucun protocole n'a été développé afin de passer des cardiomyocytes adultes de souris au cytomètre et de faire du multimarquage en même temps. C'est pourquoi au sein du laboratoire, nous avons développé un protocole exclusif, notamment après H/R, pour relever ce défi technique et permettre ainsi de profiter des multiples possibilités qu'offre la cytométrie. La méthode de ce développement est détaillée dans l'article en révision dans *Scientific Reports* dont je suis co-premier auteur. Cet article se trouve dans le chapitre Résultats, partie 6.

#### 4-2.2 Sondes testées dans le modèle CMA

Le tableau 25 regroupe toutes les différentes sondes mises au point dans les CMA, et leur condition d'utilisation. Les deux dernières sondes (ligne bleue) : « viabilité » et « caspase violet » nécessitent encore de la mise au point. En effet, le temps de chargement est assez long pour des cardiomyocytes en suspension et n'est compatible avec les sondes déjà mises au point.

<u>Sonde</u>	<u>Marquage</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentrati on</u>	<u>Temps de chargeme nt</u>	<u>Excitati on</u>	<u>Emissi on</u>
IP (Iodure de propidium)	Viabilité	P4864 Sigma	1/1000	Immédiat	535	620
DilC1 (5) iodide	Potentiel de membrane mitochondrial	ENZ-52207 Enzo Life	15 nM	10 min	638	658
Calcein AM	Viabilité	11564257 Fisher Scientific	1 µM	10 min	488	520
MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxyde Indicator Red	Indicateur du superoxyde	11579096 Fischer Scientific	2 µM	10 min	510	580
NAO	Masse mitochondriale	A1372 Life technologies	50 nM	10 min	488	520
MitoTracker™ Deep Red FM	Masse mitochondriale	12010156 Fischer Scientific	50 nM	10 min	644	665
Tetramethylrhodamine, MethylEster,	Potentiel de membrane	11550796 Fisher Scientific	20 nM	10 min	548	574

Perchlorate : TMRM	mitochondrial					
Sytox™ Green Dead Cell Stain	Viabilité	11310972 Fisher Scientific	1 µM	10 min	504	523
Viability	Viabilité	130-109- 816 Miltenyi Biotec	1/100	30 min	405	520
Caspase Violet	Caspases	BD 565521 ThermoFisher	1/500	30 min	405	454

**Tableau 20.** Liste des sondes testées sur les CMA

#### 4-2.3 Mesure du potentiel de membrane en basal et de la mort cellulaire après H/R sur les cellules H9C2

Afin de vérifier que les différents traitements effectués sur les cellules H9C2 n'ont pas d'effet délétère, le potentiel de membrane et la viabilité ont été mesurés par cytométrie en flux. Après incubation des cellules avec des molécules pharmacologiques, les cellules sont décollées avec de l'acutase (A6964 Sigma). Pour TMRM et DilC1, les concentrations finales sont les mêmes que pour les CMA (tableau 25). En revanche, pour les cellules H9C2, le TMRM est incubé pendant 30 min à 37°C et le DilC1 pendant 10 minutes à 37°C. Les cellules sont par la suite centrifugées et reprise dans un milieu de culture pour acquisition au cytomètre. L'IP est incubée juste avant l'acquisition (1/1000).

Lorsque la mortalité cellulaire est évaluée après H/R sur les cellules H9C2, le surnageant des cellules est récupéré et placé dans des tubes de cytométrie. Les cellules sont décollées à l'acutase puis mises dans le même tube de cytométrie. Enfin, l'évaluation de la mortalité cellulaire est effectuée utilisant l'IP (1/1000).

Le cytomètre utilisé est un Fortessa X-20 (BD Biosciences) et acquiert 10 000 évènements par tubes. Chaque condition est effectuée en triplicat. Les données sont analysées par le logiciel DIVA (BD Biosciences).

## 5- Biochimie

### 5-1 Fractionnement cellulaire

Le fractionnement cellulaire a pour but de séparer les différents compartiments cellulaires tels que le réticulum endoplasmique, la mitochondrie et les MAMs. Le protocole a été adapté de l'article Wieckowski<sup>342</sup>.

Environ 25 boîtes de Pétri (de diamètre 10 cm, B100), à au moins 90% de confluence, doivent être préparées pour ce protocole. Tout le protocole est effectué sur la glace et les centrifugations à 4°C. Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS (phosphate buffered saline, 1X, sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>, Thermofisher Scientific) puis sont décollées avec de la trypsine et du milieu complet est ajouté. La suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 minutes à 600 g puis resuspendue dans de l'IB-1 (composition tableau 6), et enfin broyée au Potter Teflon-Verre. Lorsque les cellules sont suffisamment cassées (vérification sous microscope), elles sont de nouveau centrifugées 5 minutes à 600 g. Le culot contenant les noyaux et les débris est jeté et le surnageant est centrifugé pendant 10 minutes à 7 000 g :

- Le culot A est resuspendu dans de l'IB-2 (composition tableau 5) et centrifugé pendant 10 minutes à 7 000 g.
- Le surnageant B est centrifugé 30 minutes à 20 000 g.

Le nouveau culot A est de nouveau resuspendu dans de l'IB-2 et centrifugé 10 minutes à 10 000 g. Le culot est resuspendu dans du MRB (composition tableau 21). 8 ml de Percoll (composition tableau 6) sont ajoutés dans des tubes d'ultracentrifugeuse puis la suspension de MRB est déposée sur le percoll. Le tube est centrifugé 30 minutes à 95 000 g. Au fond du tube, une bande assez dense représente les mitochondries et au milieu du tube, une autre bande correspond aux MAMs.

Les MAMs et les mitochondries sont collectées dans deux tubes séparés et sont diluées 10 fois dans du MRB. Les deux suspensions sont centrifugées pendant 10 minutes à 6 300 g. Le protocole pour les mitochondries pures est terminé à cette étape. Pour les MAMs, le surnageant est récupéré et centrifugé à 100 000 g pendant 1 heure. Le nouveau culot correspond aux MAMs.

Concernant le surnageant B, il est centrifugé à 14 800 rpm pendant 30 minutes. Le nouveau surnageant est récupéré et centrifugé pendant 1 heure à 100 000 g. Le culot correspond à la fraction du RE.

<b><u>Solution</u></b>	<b><u>Produit</u></b>	<b><u>Référence</u></b>	<b><u>Concentration</u></b>
IB-1	Mannitol	M9647 Sigma	225 mM
	Sucrose	S0389 Sigma	75 mM
	EGTA	E0396 Sigma	0.1 mM
	Tris-HCl	T3253-Sigma	30 mM
	H <sub>2</sub> O		q.s.p. 150 ml
IB-2	Mannitol	M9647 Sigma	225 mM
	Sucrose	S0389 Sigma	75 mM
	Tris-HCl	T3253-Sigma	30 mM
	H <sub>2</sub> O		q.s.p. 150 ml

MRB (Mitochondria resuspending buffer)	Mannitol	M9647 Sigma	250 mM
	HEPES	E0396 Sigma	5 mM
	EGTA	E0396 Sigma	0.5 mM
	H <sub>2</sub> O		q.s.p. 100 ml
Percoll	Mannitol	M9647 Sigma	225 mM
	HEPES	H3375 Sigma	25 mM
	EGTA	E0396 Sigma	1 mM
	Percoll	P1644 Sigma	30 %
	H <sub>2</sub> O		q.s.p. 50 ml

**Tableau 21.** Composition des solutions utilisées dans le protocole de fractionnement cellulaire.

Le pH est ajusté à 7.4.

Les culots correspondants aux MAMs, aux mitochondries et au RE sont resuspendus dans du RIPA complet (tableau 22) et stocké à -20°C.

<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentration</u>
NaCl	S9625 Sigma	150 mM
Triton X-100	T9284 Sigma	1 %
Sodium Deoxycholate	D6750 Sigma	0.5 %
SDS	L3771 Sigma	0.1 %
Tris (Trizma Base)	T1503 Sigma	50 mM
H <sub>2</sub> O		q.s.p. 500 ml

**Tableau 22.** Composition du RIPA non complet.

Afin d'avoir du RIPA complet, il suffit d'ajouter : 5 mM EDTA; 1mM DTT ; Cocktail SIGMA 100X ; phosphatase inhibitor cocktail SIGMA 100X.

## 5-2 Western Blot

### 5-2-1 Extraction des protéines

Deux protocoles peuvent être utilisés pour extraire les protéines à partir de cellules. Un protocole dit classique et un protocole, encore en phase de test, pour extraire les protéines enchâssées dans les membranes sont utilisés.

- *Protocole classique*

Les cellules sont rincées deux fois au PBS<sup>-/-</sup> à 4°C. Dans chaque puits d'une boîte 6 puits, 30 µl de RIPA complet sont ajoutés et laissés pendant cinq minutes sur glace. Les cellules sont ensuite décollées et grattées afin de continuer la lyse cellulaire. Les surnageant sont placés dans un eppendorf et mis sur glace pendant 30 minutes en les vortexant toutes les 5 minutes. Les tubes sont par la suite centrifugés 20 minutes à 14 000 rpm. Le surnageant est récupéré et stocké à -20°C.

- *Protocole pour les protéines membranaires*

Comme le protocole précédent, les cellules sont rincées deux fois au PBS froid et une fois avec de l'eau distillée. 30 µL de RIPA complet sont ajoutés par puits et les boîtes sont laissées 10 minutes sur la glace. Puis, les cellules sont grattées et récupérées dans un eppendorf où la solution cellulaire est passée 10 fois dans une seringue et aiguille de 26 G (gauges). Les tubes sont centrifugés 10 minutes à 3000 rpm. Le surnageant est prélevé et centrifugé 30 minutes à 13 000 rpm. Le nouveau surnageant est stocké à -20°C.

### 5-2-2 Dosage des protéines et préparation des échantillons

La gamme étalon (tableau 23) est préparée avec de la BSA (bovine serum albumin – 04-100-812-E Euromedex) selon les concentrations suivantes : 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 mg/ml.

<b>BSA 1mg/ml (µl)</b>	0	10	20	30	40	50
<b>H2O (µl)</b>	50	40	30	20	10	0

**Tableau 23.** Préparation de la gamme étalon

2 µl de la suspension cellulaire sont dilués 25 fois et utilisés pour quantifier la concentration en protéine de l'échantillon. Le réactif employé est le Bio-Rad DC Protein Assay Kit 2 où 250 µl de la solution A et 2 ml de la solution B sont placés dans chaque tube contenant la dilution préalablement effectuée. Enfin, 300 µl de chaque tube sont utilisés et placés dans une plaque 96 puits. La DO de chaque échantillon est lue entre 650 et 750 nm après homogénéisation. Puis, les échantillons sont dénaturés à 95°C pendant 5 minutes avec du Laemmli 5X contenant du β-mercapto-ethanol.

### 5-2-3 Migration, transfert, blocage, anticorps et révélation

Deux gels sont préparés : gel de séparation et gel de concentration (composition tableau 24). Le pourcentage d'acrylamide des gels utilisé dépend de la taille des protéines à révéler.

<u>Type de gel</u>	<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentration</u>
Gel de séparation	Tris 1.5M pH 8.8	161-0798 Biorad	0.375 M
	Acrylamide 30 %	EU0088-8 Euromedex	Variable
	SDS 10 %	EU0760-A Euromedex	0.1%
	H <sub>2</sub> O		Variable
	Temed	T9281 Sigma	0.1%
	APS (Ammonium Persulfate) 10%	A3678 Sigma	0.075%
Gel de concentration	Tris 0.5M pH 6.8	M1610799 Biorad	0.125 M
	Acrylamide 30 %	EU0088-8 Euromedex	5 %
	SDS 10 %	EU0760-A Euromedex	0.1 %
	H <sub>2</sub> O		Variable
	APS (Ammonium Persulfate) 10 %	A3678 Sigma	0.075 %
	Temed	T9281 Sigma	0.1 %

**Tableau 24.** Composition des gels de séparation et concentration

30 à 100 µg de protéines sont chargés par puits et un marqueur de poids moléculaire est chargé dans un puits (ProSieve QuadColor, Ozyme). Les protéines sont séparées par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE (composition tableau 27) par un courant de 90 V pendant 30 minutes et 120 V pendant 1h15. Le

gel est ensuite transféré sur une membrane de nitrocellulose (Transfert-Blot Turbo, Biorad) pendant 10 minutes à 1.5 V.

Les membranes sont par la suite bloquées pendant 1 heure avec 5 % de lait (TBS-Tween 0.05% + lait 5%). Puis, elles sont incubées avec l'anticorps primaire (liste des anticorps primaires utilisés dans le tableau 25) sur la nuit à 4°C sous agitation.

<u>Anticorps</u>	<u>Concentration</u>	<u>Hôte</u>	<u>Référence</u>
TRPV1	1/250	Lapin	Abnova PAB0698
TRPV1	1/200	Lapin	Alomone ACC-030
TRPV1	1/1000	Lapin	Merck AB5889
TRPV1	1/500	Chèvre	Neuromics GT15129
TRPV1 E-8	1/500	Souris	SantaCruz sc-398417
TRPV1-R130	1/500	Lapin	SantaCruz sc-28759
TRPV1-P19	1/500	Chèvre	SantaCruz sc-12498
GRP75	1/1000	Souris	SantaCruz sc-133137
VDAC	1/1000	Souris	Abcam ab-14734
TOM22	1/1000	Souris	SantaCruz sc-101286
IP3R	1/1000	Chèvre	SantaCruz sc-7278
Tubuline	1/2000	Souris	SantaCruz sc-5286

**Tableau 25.** Liste des anticorps utilisés pour le WesternBlot

Le lendemain, les membranes sont lavées 3 fois 10 minutes avec du TBS-Tween 0.05% puis incubés avec l'anticorps secondaire correspondant à l'hôte de l'anticorps primaire (tableau 28). Cet anticorps secondaire est couplé à l'HRP (Horse Radish Peroxydase - GE Healthcare) et est généralement dilué à 1/10 000, et incubé pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. La membrane est de nouveau lavée 3 fois 10 minutes.

Les membranes sont révélées avec le kit de révélation ECL prime (GE Healthcare), sont visualisées avec le Molecular imager® Gel Doc™ XR+ de BioRad et analysées avec ImageLab.

### 5-3 Immunofluorescence

L'immunofluorescence va nous permettre de mettre en évidence la localisation des protéines d'intérêt et de mettre en évidence leur co-localisation avec une autre protéine ou un compartiment subcellulaire.

#### **5-3-1 Sur cellules non fixées**

Les cellules peuvent être chargées avec des sondes fluorescentes marquant spécifiquement un compartiment subcellulaire. Elles sont listées dans le tableau 4.

#### **5-3-2 Sur cellules fixées**

Les cellules sont préalablementensemencées (tableau 2) sur des Millicell EZ slide 8-well (Merck Millipore) et fixées avec du paraformaldéhyde 2% pendant 5 minutes. Entre chaque étape, les cellules sont rincées 4 fois 5 minutes avec du PSB<sup>-/-</sup> sous agitation. Elles sont par la suite perméabilisées avec du Triton 0,1 % (T9284 Sigma), et bloquées 45 minutes dans de la BSA 5% diluée dans du PBS<sup>-/-</sup> (à cette étape, les cellules ne sont pas rincées). Les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire (tableau 28) pendant 90 minutes sous agitation. L'anticorps secondaire (tableau 22) est incubé pendant 90 minutes sous agitation et dans l'obscurité. Une fois le dernier rinçage effectué, les puits sont laissés à



l'air libre (dans l'obscurité) afin de les faire sécher. Le milieu de montage (contenant du DAPI) est déposé sur la lame et une lamelle est montée dessus.

## 6- Electrophysiologie

Les enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés à température ambiante (entre 20 et 23 °C) avec la technique du patch clamp utilisée dans la configuration de cellule entière par membrane rompue. Les pipettes d'enregistrement ont été fabriquées à partir de tubes de verre dur en borosilicate à l'aide d'une étireuse verticale. La résistance des pipettes après étirement était comprise entre 1.8 et 4 MΩ pour un diamètre à la pointe d'environ 2 à 3 μm. Les cardiomyocytes ventriculaires ont été placés dans une boîte de Pétri installée sur la plate-forme d'un microscope à optique inversée contenant un milieu physiologique type extracellulaire adapté à l'enregistrement du PA. La composition de ce milieu est détaillée dans le tableau 26.

<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentration (mM)</u>
NaCl	S9888 Sigma	136
KCl	P4504 Sigma	4
CaCl <sub>2</sub>	C3881 Sigma	1,8
MgCl <sub>2</sub>	M8266 Sigma	1
Glucose	G5767 Sigma	10
HEPES	H3375 Sigma	10

**Tableau 26.** Milieu physiologique de type extracellulaire.

Le pH est ajusté à 7,4

La pipette est remplie de milieu type intracellulaire (composition tableau 27 et 28) adapté à l'enregistrement du PA ou du courant calcium de type L.

<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentration (mM)</u>
K-aspartate	A6558 Sigma	110
KCl	P4504 Sigma	30
NaCl	S9888 Sigma	8
Mg-ATP	A9187 Sigma	5
EGTA	E4378 Sigma	1
HEPES	H3375 Sigma	20

**Tableau 27.** Milieu physiologique de type intracellulaire pour l'enregistrement du PA.

Le pH est ajusté à 7,2.

<u>Produit</u>	<u>Référence</u>	<u>Concentration (mM)</u>
CsCl	289329 Sigma	140
MgCl <sub>2</sub>	M8266 Sigma	1
Mg-ATP	A9187 Sigma	3
EGTA	E4378 Sigma	10
HEPES	H3375 Sigma	10

**Tableau 28.** Milieu physiologique de type intracellulaire pour l'enregistrement des courants calciques de type L.

Le pH est ajusté à 7,2.

La pipette a été montée sur la chaîne de mesure (amplificateur de patch clamp type RK 400, Bio-Logic, Claix, France) puis descendue sur le cardiomyocyte. Après le passage en configuration de cellule entière, la capacitance du cardiomyocyte a été systématiquement calculée à partir du décours du courant capacitif obtenu en réponse à une dépolarisation de 10 mV suivant la relation  $C_m = \tau_c * I_0 / [E_m * (1 - I / I_0)]$  où  $C_m$  est la capacité membranaire,  $\tau_c$  la constante de temps de cette capacité,  $I_0$  le courant capacitif maximum,  $E_m$  l'amplitude du saut de potentiel (de -80 à -70 mV), et  $I$  l'amplitude du courant capacitif

à l'état stable. La détermination de ce paramètre a permis de quantifier la surface membranaire des cellules puisque toutes les cellules animales ont une capacitance spécifique de 1  $\mu\text{F}$  par  $\text{cm}^2$  de membrane.

Aucune compensation n'a été faite au cours des enregistrements qui ont débuté au moins 3 minutes après le passage en configuration de cellule entière afin de permettre à l'électrolyte de remplissage de la pipette et au milieu intracellulaire de s'équilibrer. Les potentiels membranaires de repos des cellules quiescentes ont été mesurés en l'absence de courant de maintien appliqué aux cellules. Les PA ont été évoqués en mode de courant imposé avec des créneaux de courant dépolarisant de 3 ms de durée délivrés à la fréquence de 1 Hz (fréquence d'échantillonnage de 10 kHz). L'enregistrement de  $I_{\text{CaL}}$  a été réalisé en mode de voltage imposé après avoir changé le milieu extracellulaire baignant la cellule « patchée » par la solution extracellulaire de composition en mM détaillée dans le tableau 29.

<b>Produit</b>	<b>Référence</b>	<b>Concentration (mM)</b>
TEACl	T2265 Sigma	136
CaCl <sub>2</sub>	C3881 Sigma	1,8
MgCl <sub>2</sub>	M8266 Sigma	2
4-aminopyridine	A78403 Sigma	5
Glucose	G5767 Sigma	10
HEPES	H3375 Sigma	10

**Tableau 29.** Composition de la solution extracellulaire pour mesure des courants calciques de type L.

Le pH est ajusté à 7,4.

$I_{\text{CaL}}$  a été évoqué toutes les 10 secondes (fréquence d'échantillonnage de 2 kHz) par des créneaux de potentiels de 250 ms de durée appliqués entre -90 et +60 mV à partir d'un potentiel de maintien de -80 mV. L'amplitude de  $I_{\text{CaL}}$  a été mesurée entre le pic de courant entrant et le courant en fin de pulse. Les densités de courants ont été obtenues en divisant l'amplitude de  $I_{\text{CaL}}$  par la capacitance cellulaire correspondante. Un système de micro perfusion, dont le débit constant est de l'ordre de 20 à 40  $\mu\text{l/s}$ , permettait de changer la solution au contact du cardiomyocyte étudié. La stimulation des cellules et l'acquisition des données ont été réalisées simultanément par l'utilisation du logiciel pCLAMP (Axon Instruments, Foster city, USA).

### 6-1 Différents produits utilisés

Toutes les molécules pharmacologiques ont été regroupées dans le tableau 30. La concentration de ces molécules sera spécifiée dans la partie « résultats ». Le code couleur utilisé pour les deux agonistes : CAP et RTX et pour les deux antagonistes : CPZ et iRTX est détaillé dans le tableau 30.

<b>Produit</b>	<b>Référence</b>	<b>Code couleur</b>
Capsaïcine	M2028 Sigma	
Capsazépine	C191 Sigma	
Résiniférattoxine	Enzo BML-NK 1000005	
5'-Iodorésiniférattoxine	Tocris 1362	
Capsaïcine + Capsazépine		
Résiniférattoxine + 5'-Iodorésiniférattoxine		
Dithionite de sodium	157953 Sigma	Aucun

**Tableau 30.** Liste des molécules pharmacologiques utilisées dans la partie Résultats

## 7- Les études *in vivo* permettant de déterminer l'impact de la modulation de TRPV1

### 7-1 Conditions d'hébergement et animaux KO

Des souris C57Bl/6J (Charles River®) âgées de 8 à 12 semaines sont hébergées dans une animalerie au sein du laboratoire où la température est contrôlée à 23°C, avec un cycle de lumière : 12 heures de jour et 12 heures de nuit. Les souris ont un accès libre à l'eau et la nourriture (Standard Diet / SAFE®). Toutes les procédures sont réalisées en accord avec les principes et les recommandations de la convention Européenne pour la protection des animaux de laboratoire et ont été approuvées par le comité éthique de l'université Claude Bernard Lyon 1 pour l'expérimentation animale (Demande d'autorisation de projet : DR2018-51v2 « Rôle du canal TRPV1 dans la protection des cardiomyocytes vis-à-vis de l'ischémie-reperfusion », #17798-2018112219462174\_v2).

L'élevage des souris KO TRPV1 est effectué au sein du laboratoire. Je suis responsable de cette lignée. En fonction des besoins, le nombre de couple reproducteur est adapté. Comme expliqué dans la partie 5-3.1 de l'introduction, ces animaux possèdent une forme tronquée (partie pore manquante) du canal. Ce KO est constitutif et ubiquitaire. Les femelles donnent environ 4-5 animaux par portée et environ 7-8 portées par an. Le phénotype des souris est non dommageable.

Le génotypage des animaux est effectué sur les souris TRPV1<sup>-/-</sup> en élevage au laboratoire. Pour cela, nous utilisons le kit KAPA Mouse Genotyping Kit (Clinisciences) à partir de morceaux d'oreilles de souris.

La première étape consiste à lyser les morceaux de tissus afin d'extraire l'ADN génomique. Puis à partir de 1 µl de lysat, une PCR est réalisée avec les amorces suivantes afin de pouvoir caractériser les souris TRPV1<sup>-/-</sup> : amorce oIMR1627 (séquence 5' - 3' : TAA AGC GCA TGC TCC AGA CT) pour les TRPV1<sup>-/-</sup> et amorce 19923 (séquence 5' - 3' : CAG CCC TAG GAG TTG ATG GA) en amorce commune aux deux souches (WT et KO). Le cycle PCR est indiqué dans le tableau 31. Enfin, 15 µL de produit de PCR sont déposés dans un gel d'Agarose 1%. Après une migration pendant 25 min à environ 100 Volts, les bandes visualisées sont aux tailles suivantes : une bande à 189 pb pour les WT, une bande à 179 pb pour les TRPV1<sup>-/-</sup> et deux bandes pour les souris hétérozygotes.

Numéro d'étape	Température (°C)	Durée	Informations supplémentaires
1	94	2 min	
2	94	20 sec	
3	65	15 sec	Perte de 0,5°C par cycle
4	68	10 sec	
5	Répétition des étapes 2 et 4 pour 10 cycles		
6	94	15 sec	
7	60	15 sec	
8	72	10 sec	
9	Répétition des étapes 6 à 8 pour 28 cycles		
10	72	2 min	
11	10		

**Tableau 31.** Les différentes étapes du cycle de PCR pour le génotypage

## 7-2 Protocole éthique

La DAP a été validée par le comité éthique de l'université Claude Bernard Lyon 1 en février 2019 et par le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation, en mars 2019. Les procédures présentées dans ce comité sont basées sur les résultats obtenus *in vitro* sur le modèle H9C2. La DAP se trouve en annexe.

## 7-3 Séquence mise en place

Cette procédure a pour but de récupérer le tissu cardiaque après 24 heures d'un épisode d'ischémie reperfusion chez la souris. Ce modèle murin d'infarctus du myocarde consiste en une occlusion transitoire de 45 minutes de la principale artère coronaire irriguant le ventricule gauche : l'artère interventriculaire antérieure (IVA).

La procédure expérimentale complète est la suivante :

1) L'anesthésie : l'animal reçoit une prémédication par injection de buprénorphine (0,075mg/kg) en sous-cutanée, suivi d'une anesthésie par alfaxalone (80mg/kg) et médétomidine (0.3mg/kg) en injection sous-cutanée.

2) La chirurgie :

- Une infiltration locale sous-cutanée de lidocaïne (5mg/kg maximum) est réalisée au niveau de l'abord trachéal et antérolatéral du thorax, décrit ci-dessous.
- Une incision de la peau est réalisée au niveau de la gorge sur quelques millimètres pour permettre un accès direct à la trachée (le muscle trachéal est délicatement dilacéré dans le sens des fibres musculaires pour éviter tout traumatisme) pour visualiser le passage correct de la sonde d'intubation dans la trachée.
- La sonde d'intubation métallique est insérée dans la gueule de l'animal (sans trachéotomie). Elle est ensuite poussée dans la trachée (vérification visuelle au niveau de la gorge), puis immédiatement reliée au respirateur, dont la fréquence et le volume respiratoire ont été pré-réglés en fonction du poids de l'animal. Ces paramètres sont néanmoins adaptés pendant la chirurgie, en fonction de l'EtCO<sub>2</sub> et la SpO<sub>2</sub> qui sont mesurées en continu.
- Une incision de la peau est réalisée au niveau de la base du sternum sur environ 2 cm.
- Les tissus qui maintiennent entre eux les muscles protégeant la cage thoracique sont délicatement disséqués. Ces muscles sont alors écartés sans dommage, libérant l'accès à la cage thoracique.
- La 5<sup>ème</sup> côte est sectionnée, ainsi que les muscles intercostaux supérieurs et inférieurs à cette côte.
- Une compresse imbibée d'une solution diluée de lidocaïne (1mg/ml) est appliquée pendant 2 minutes sur la plaie.
- Des écarteurs sont mis en place pour maintenir cette ouverture, offrant un accès direct au cœur.
- Le péricarde est ouvert puis un fil de suture 8/0 est placé autour de l'artère interventriculaire antérieure (IVA).
- Le pré-conditionnement mécanique (si prévu dans le groupe) sera réalisé juste avant l'ischémie, en serrant 3 fois le fil pendant 5 min. En revanche, le pré-conditionnement pharmacologique (si prévu dans le groupe) sera réalisé par iv dans la jugulaire externe gauche juste avant l'ischémie. Le volume injecté sera de 100 µl.
- L'ischémie est alors réalisée en serrant ce fil de suture. Elle sera maintenue 45 minutes (timing utilisé habituellement dans le laboratoire et dans la littérature pour les protocoles d'ischémie-reperfusion cardiaque chez la souris).

- Après 45 minutes d'ischémie, le fil est desserré pour permettre la reperfusion cardiaque, mais laissé en place, ouvert, sous l'artère.
- Le post-conditionnement mécanique (si prévu dans le groupe) sera réalisé après les 30 premières secondes de reperfusion, en desserrant puis resserrant 3 fois le fil par séquence d'1 min. En revanche, le postconditionnement pharmacologique (si prévu dans le groupe) sera réalisé par iv dans la jugulaire externe gauche 30 secondes après le début de la reperfusion (puis même séquence que le post-conditionnement). Le volume injecté sera de 100µl.
- Le plan musculaire est suturé et le vide est fait dans la cage thoracique. La peau de l'animal est ensuite suturée et une fois bien réveillé, l'animal est extubé et placé dans une couveuse chauffée et enrichie en O2.

### 3) Le suivi post-opératoire :

Les conditions de surveillance post-opératoires de l'animal réveillé, permettant d'éviter toute douleur et souffrance à l'animal sont décrites dans la DAP complète en annexe.

### 4) Le prélèvement terminal

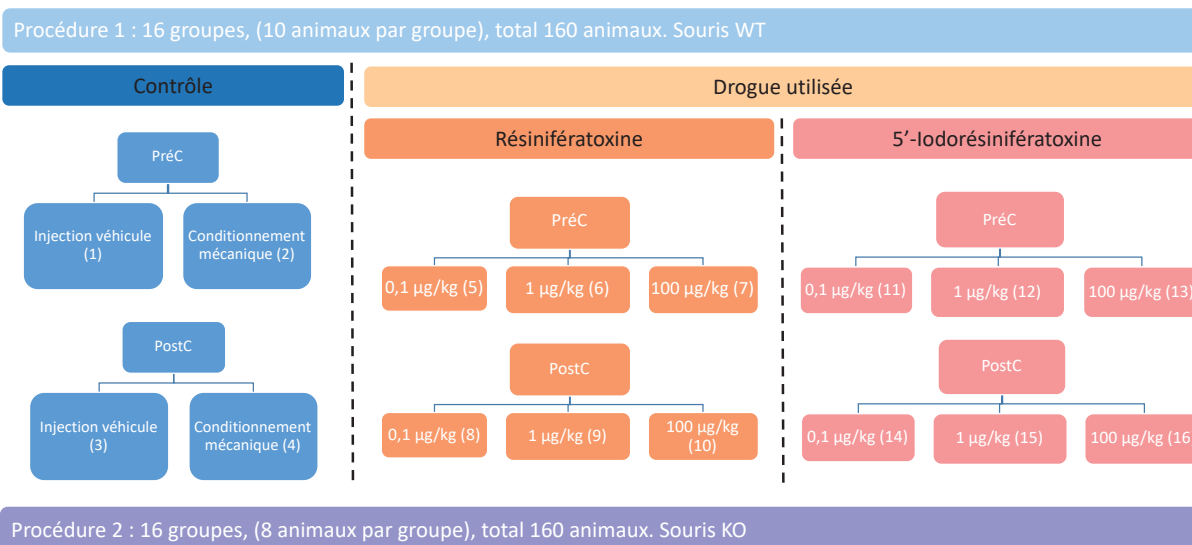
L'animal est de nouveau anesthésié avec le même protocole anesthésique que celui qui lui a été administré la veille. Après confirmation du stade chirurgical, et de la même manière que la veille, l'animal est de nouveau intubé et mis sous respirateur. Les fils de suture placés la veille au niveau de la peau et des muscles du thorax sont sectionnés pour permettre à nouveau un accès au cœur. Le fil de suture placé la veille au niveau de l'IVA est retrouvé et le nœud est reformé autour de l'artère et serré à nouveau. Une laparotomie est réalisée pour accéder à la veine cave inférieure. Une solution de bleu unisperse (diluée au 1/100ème) est injectée en iv dans la veine cave inférieure. Après coloration totale des tissus de l'animal (sauf la zone ischémique), soit environ 5 à 15 secondes, une dislocation cervicale est immédiatement réalisée pour induire la mort de l'animal et permettre le prélèvement du cœur. Le cœur est par la suite découpé en 5 tranches d'environ 1 mm de large, allant de la base du cœur à l'apex. Toutes les tranches sauf celle de la base du cœur sont déposées dans un bac contenant du NaCl 0.9% et sont photographiées. Les tranches sont par la suite incubées pendant 20 minutes dans du chlorure de triphényltétrazolium (TTC) qui colore les cellules vivantes en rouge.

### 7-4 Planimétrie

L'analyse de la taille de la zone à risque (tissu ischémique) et de la taille de la nécrose sera effectuée sur les tranches du cœur prélevé, permettant ainsi de déterminer l'atteinte cardiaque consécutive à l'ischémie-reperfusion, pour chaque animal de chaque groupe.

Chaque cœur est coupé en 5 tranches, chaque tranche est pesée en allant de la base du cœur à l'apex. Sauf la base du cœur, les 4 autres tranches sont prises en photo et la planimétrie est effectuée avec le logiciel Sigma Scan pro. Deux photos sont prises par tranche, une première où le tissu est bleu, la cavité est exclue de l'analyse, l'aire saine en bleu et l'aire totale sont quantifiées. Une deuxième photo où le tissu est rouge, la cavité est de nouveau exclue de l'analyse, la zone nécrosée, en blanc, et l'aire totale sont quantifiées.

Après avoir rapporté la taille des différentes zones, avec le poids des tranches, l'aire à risque et l'aire nécrosée peuvent être quantifiées.



**Figure 41.** Répartition des groupes de souris dans le projet in vivo

## 8- Les analyses statistiques

La normalité est vérifiée avec le test de Shapiro. Lorsque la normalité est respectée, et lorsqu'on analyse deux groupes, un test paramétrique, T-Student est effectuée. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.

Lorsque la normalité n'est pas respectée, et lorsqu'on analyse deux groupes un test non paramétrique Mann-Whitney est effectué. Lorsqu'on analyse plus de deux groupes, un test non paramétrique Kruskal-Wallis est effectué. Les données sont exprimées en médiane.

Le logiciel GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, USA) a été utilisé pour toutes les analyses. Les différences sont considérées comme significatives lorsque la p-value est inférieure à 0,05.

## 9- Implication des membres du laboratoire dans le projet de thèse

Dans ce tableau 32 est illustré l'implication de certains membres du laboratoire dans le projet de thèse.

<b>Technique</b>	<b>Réalisée par :</b>	<b>Statut</b>	<b>Technique apprise</b>	<b>Rôle</b>
Électrophysiologie	Christophe	MCU	Non	Toutes les expériences
Cytométrie	Claire	IR	Oui	Impliquée au début du projet
WesternBlot Fractionnement cellulaire	Mallory	Doctorante	Oui	Impliquée en fin de projet
Génotypage/Élevage souris	Andréa	Technicienne	Non	Tout
Élevage souris	Christelle	IE	Non	Tout
Chirurgie	Lionel /Bruno	IR	Non	Tout



Immunofluorescence Transitoire calcique	Sylvie	MCU	Oui	Seulement certaines photos Tout
Isolation cardiomyocytes	Ludovic	CR	Oui	Formation
Design des SiRNA/Primers	Gabriel	CR	Non	Tout
Extraction ARN et RT- PCR	Sally	Doctorante	Oui	Tout
Amplification des plasmides	Yves	Post doctorant	Oui	En grande partie
Création des adénovirus pour CMA	Fabrice /Mélanie	Post doctorant/CR	Oui	Collaboration

**Tableau 32.** Implication des membres du laboratoire dans le projet de thèse



# Résultats



## 1- Expression et localisation de TRPV1 dans les cellules H9C2

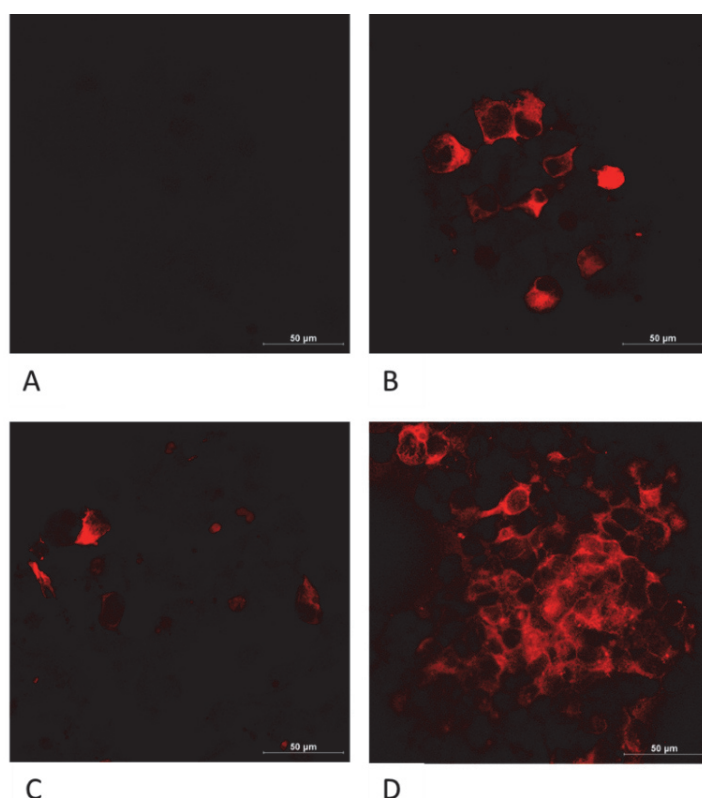
Dans la littérature, seuls quelques articles attestent de l'expression de TRPV1 dans la lignée de cardiomyoblastes de rat H9C2 que nous possédons au laboratoire<sup>329</sup>. Afin de vérifier notre hypothèse selon laquelle TRPV1 pourrait être un canal de fuite calcique du RE, nous souhaitons connaître précisément sa localisation subcellulaire dans cette lignée cellulaire.

### 1-1 Expression et localisation de TRPV1 dans les cellules H9C2 par Western Blot

Les anticorps ciblant les canaux TRP possèdent une spécificité qui est très variable d'un clone à l'autre. Afin de s'assurer de celle des anticorps anti-TRPV1, nous avons, dans un premier temps, développé une lignée HEK-TRPV1mCherry au laboratoire afin d'effectuer un test de spécificité sur plusieurs anticorps commercialisés afin de trouver l'anticorps anti-TRPV1 fonctionnant le mieux sur notre modèle. Ceci a été réalisé au sein de la lignée HEK (cellules facilement transfectables et ne possédant pas de TRPV1 natif). De plus, il nous est impossible de faire une lignée stable H9C2-TRPV1mCherry puisque les cellules H9C2 sont, de base, résistantes à la généticine, ce qui aurait rendu impossible la sélection des clones transfectés, par ce mode de sélection.

#### 1-1.1 **Mise au point de la fonctionnalité des anticorps, test de spécificité des anticorps anti-TRPV1 disponibles : utilisation de la lignée stable HEK-TRPV1**

Douze clones ont été créés par surexpression d'un plasmide TRPV1 couplé à mCherry dans la lignée cellulaire des HEK-293. Ces clones ont été ensemencés et fixés sur des lames de 8 puits afin de visualiser la protéine mCherry, qui est couplée à TRPV1 (en effet, les cellules exprimant le plasmide seront visibles en rouge) au microscope confocal. Ces résultats sont présentés dans la figure 42.

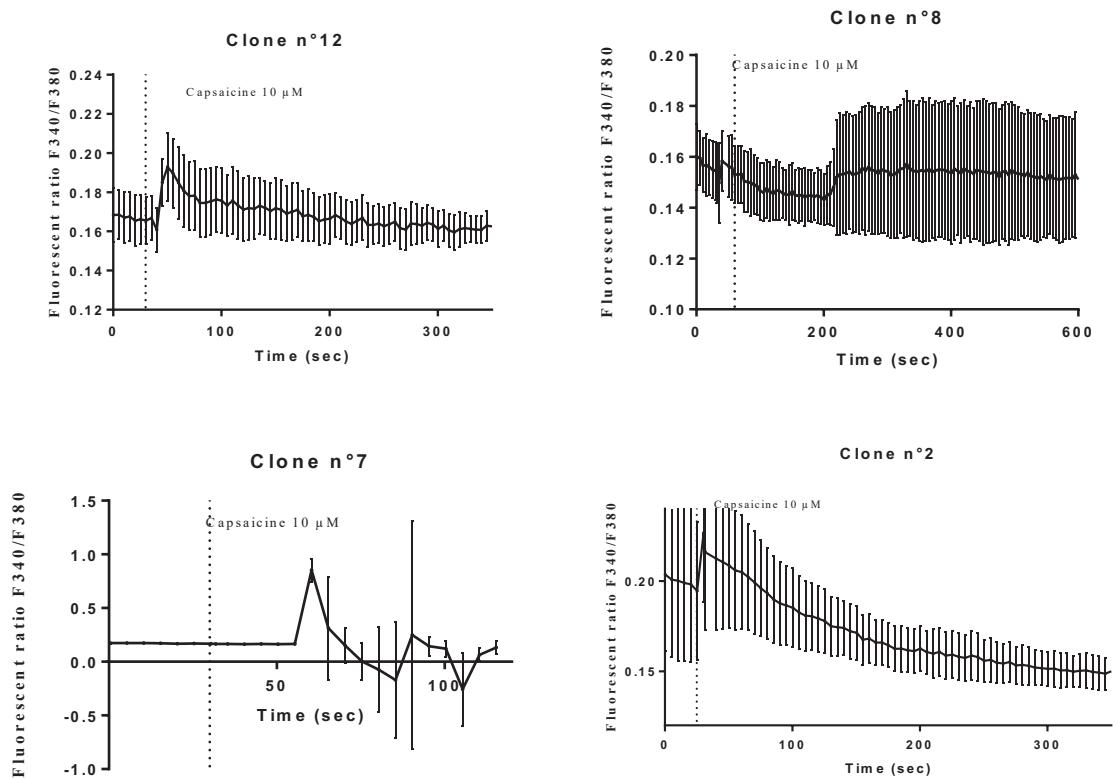


**Figure 42.** Photos prises au microscope confocal des différents clones de TRPV1-mCherry dans les HEK.

(A) Clone n°2 (B) Clone n°7 (C) Clone n°8 (D) Clone n°12.

Les images sont acquises au microscope confocal Nikon sur cellules fixées avec l'objectif à immersion à huile 40x, en 1024 x 1024 pixels. La fluorescence est acquise avec une excitation à 560 nm (laser Sapphire) et une émission à 595/50 nm (détecteur GAasp). L'échelle en bas à droite de chaque photo correspond à 50 µm.

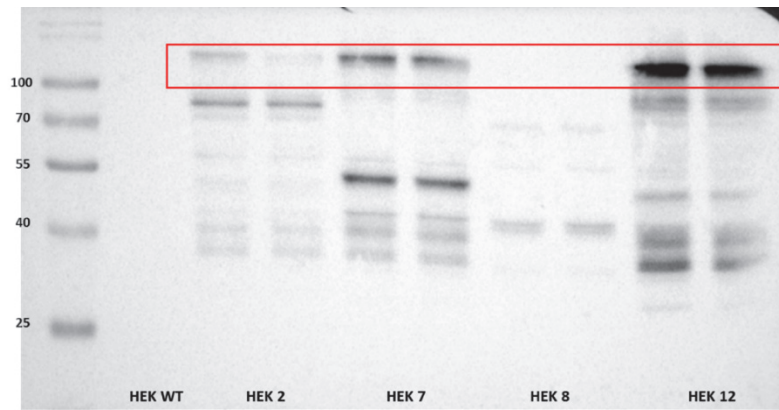
Après élimination de huit clones (n'exprimant pas la protéine mCherry), les quatre clones restant sont ensemencés sur des lamelles afin d'effectuer de l'imagerie calcique fonctionnelle au microscope à champ large. Des mesures de calcium cytosolique ont ainsi été effectuées. Les cellules sont chargées pendant 30 minutes à 37°C dans l'obscurité avec la sonde Fura2-AM (2 µM), permettant de suivre les variations de la  $[Ca^{2+}]$  cytosolique au cours du temps. Après stabilisation du signal, les cellules sont stimulées avec 20 µM de CAP. Seules les cellules répondant par une augmentation de la  $[Ca^{2+}]$  cytosolique sont analysées (figure 43).



**Figure 43.** Courbe de réponse à la CAP après chargement au Fura2-AM sur les cellules HEK-293.

Chaque courbe représente l'évolution du  $Ca^{2+}$  cytosolique (ratio de fluorescence 340/380) en fonction du temps. La CAP est injectée à 20 µM après 30 secondes de stabilisation du signal. Les mesures sont effectuées dans du CFB. Les courbes représentent la moyenne et l'écart type de chaque cellule dans une boîte. Seuls quatre clones ont répondu à la stimulation par une augmentation du  $Ca^{2+}$  cytosolique. Cette expérience a été réalisée une fois.

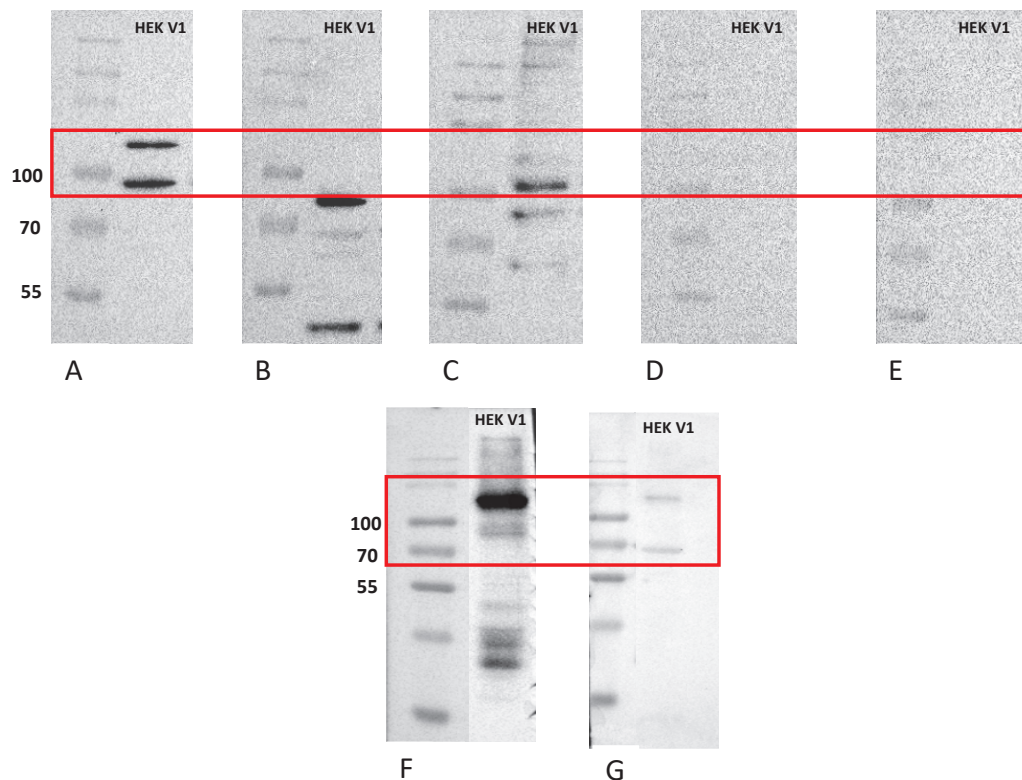
Puis, une extraction protéique a été réalisée sur chacun des 4 clones afin d'effectuer un Western blot. La protéine TRPV1, surexprimée dans les HEK-293, est détectée sous 2 formes : soit sous la forme de protéine de fusion de 123 kDa couplée avec mCherry (95 + 28 kDa), soit sous sa forme native à une taille 95 kDa correspondant à TRPV1 seul (issue de la dégradation de la protéine de fusion). En guise de contrôle, HEK WT ne montre aucune bande pour cet anticorps, indiquant que TRPV1 n'est pas nativement exprimé dans ces cellules (figure 44). Après analyse des membranes, le clone n°12 a été sélectionné comme clone optimal pour la mise au point d'un anticorps anti-TRPV1.



**Figure 44.** Expression de TRPV1 sur les différents clones HEK-TRPV1.

L'analyse du Western blot anti-TRPV1 (1/500) est effectuée à partir des membranes de nitrocellulose. Elles ont été transférées à partir de gel 8%, 30 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits à partir des cellules HEK-TRPV1 et 3 µL de l'échelle de standards ont été déposés pour chaque gel.

Les anticorps anti-TRPV1 testés sur les cellules H9C2 sont listés dans le tableau 22. Comme l'illustre la figure 45, l'anticorps choisi comme spécifique est celui de la compagnie « Abnova », référence : PAB0698. En effet, les autres anticorps contre TRPV1 ne donnent, soit aucune bande, soit trop de bandes dites « aspécifiques » pour être gardés comme anticorps de référence. La suite des expériences sera donc effectuée avec cet anticorps.



**Figure 45.** Expression de TRPV1 dans les cellules HEK-TRPV1.

Les différents anticorps anti-TRPV1 testés sur les HEK-TRPV1. (A) Abnova 1/500 (B) Alomone 1/200 (C) Merck 1/1000 (D) Neuromics 1/500 (E) SantaCruz E-8 (F) SantaCruz R130 1/500 (G) SantaCruz P19 1/500. L'analyse du Western blot est effectuée à partir des membranes de nitrocellulose. Elles ont été transférées à partir de gel 8%, 30 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits à partir des cellules HEK-TRPV1 et 3 µL d'échelle de standards ont été déposés pour chaque gel.



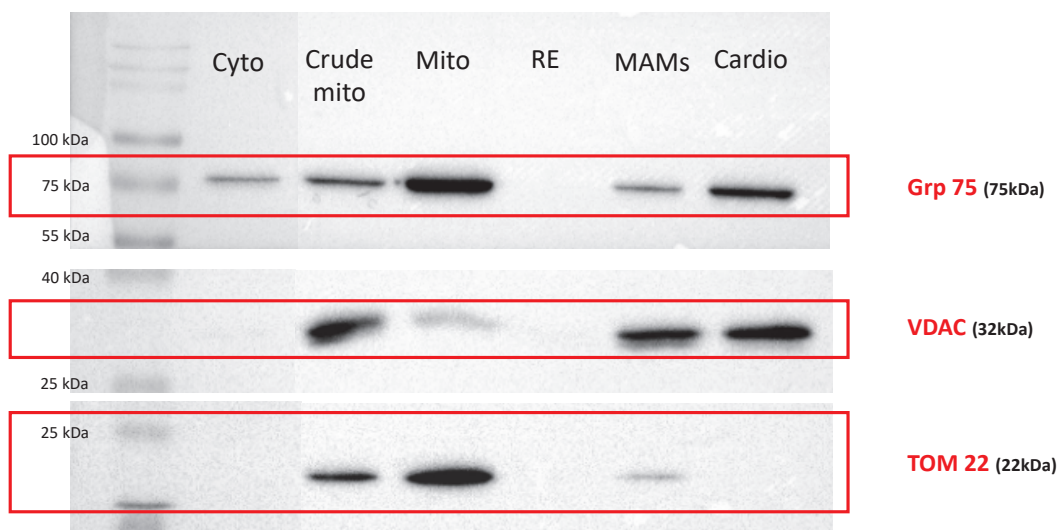
Après avoir choisi l'anticorps optimal, les Western blots seront effectués sur les différentes fractions cellulaires isolées à partir des cellules H9C2 et sur un lysat total H9C2.

### 1-1.2 Western blot sur les cellules H9C2

Les protéines ont été extraites comme détaillé dans la partie « matériels et méthodes ». De plus, le Western blot a été effectué sur les différentes fractions cellulaires afin de localiser précisément la protéine TRPV1.

Dans un premier temps, afin de montrer la spécificité des différentes fractions, des Western blots de protéines connues et caractéristiques de chaque fraction ont été effectués.

La figure 46 montre que les mitochondries pures expriment comme attendu Grp75 et TOM22. On retrouve également VDAC et Grp75 dans les MAMs, en accord avec les données de la littérature. Aucune de ces protéines n'est exprimée dans le RE, prouvant l'absence de contamination mitochondriale de cette fraction.

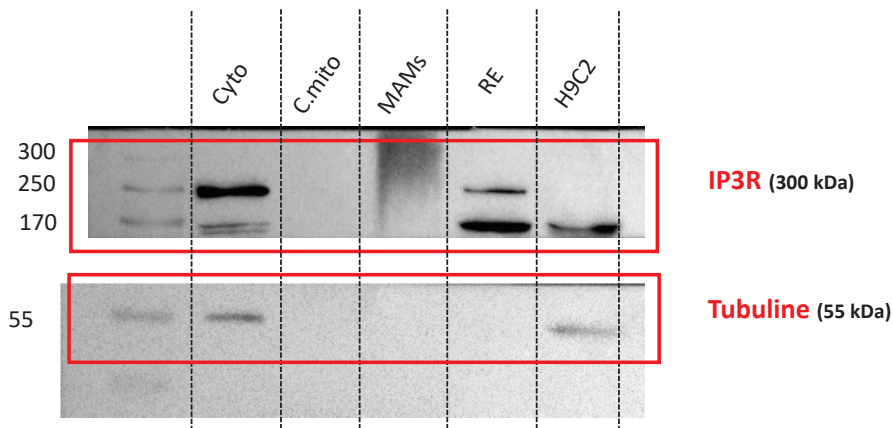


**Figure 46.** Vérification de la pureté des fractions mitochondriales.

De gauche à droite, des échantillons de fractions cytosoliques (cyto), mitochondriales totales (crude mito), mitochondriales pures (Mito), réticulaires (RE), MAMs et lysat total de cardiomyocytes (cardio) sont utilisés. Les anticorps utilisés sont anti-GRP75 1/1000, anti-VDAC 1/1000 et anti-TOM22 1/1000. L'analyse du Western blot est effectuée à partir des membranes de nitrocellulose. Elles ont été transférées à partir de gel 12%, 30 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits à partir des cellules H9C2 et 3 µL d'échelle de standards ont été déposés pour chaque gel.

De plus, la figure 47 montre que la fraction réticulaire exprime bien une protéine caractéristique de ce compartiment : le récepteur IP3. En revanche, la taille de la protéine révélée ne correspond pas à la taille attendue de 300 kDa. Dans la détection pour les trois isoformes, la taille apparente entre 230 et 260 kDa correspondant à celle que nous obtenons. De plus, la fraction cytosolique semble être contaminée par cette protéine. Enfin, la tubuline n'est présente que dans la fraction cytosolique et celle du lysat total indiquant que les fractions mitochondriales, réticulaires et des MAMs sont pures. Seul le cytosol semble être contaminé.

En prenant en compte tous ces résultats, nous pouvons dire que les fractions isolées à partir du protocole, mis au point au laboratoire, sont spécifiques de chaque organite, et qu'il n'y a pas de contamination entre chaque organite.

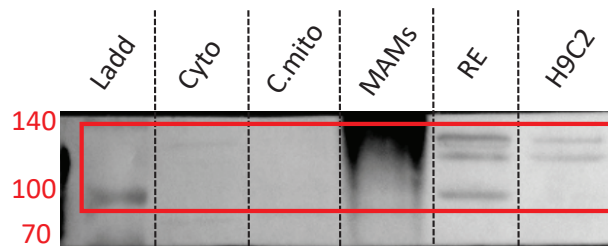


**Figure 47.** Vérification de la pureté des fractions réticulaires.

De gauche à droite, des échantillons de fractions cytosoliques (cyto), mitochondriales totales (crude mito), MAMs, réticulaires (RE) et lysat total de H9C2 sont utilisés. Les anticorps utilisés sont anti-IP3R 1/1000 et anti-tubuline 1/2000. L'analyse du Western blot est effectuée à partir des membranes de nitrocellulose. Elles ont été transférées à partir de gel 8%, 30 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits à partir des cellules H9C2 et 3 µL d'échelle de standards ont été déposés pour chaque gel.

Comme l'illustre la figure 48, une bande est détectée dans le lysat cellulaire des H9C2 mais également dans la fraction du RE. Cette bande sort à une taille d'environ 100 kDa, suggérant que cela correspond à la protéine TRPV1. En revanche, aucune bande n'est détectée dans les fractions cytosoliques, mitochondriales et dans les MAMs. L'intensité du signal s'avère plus faible dans l'extrait total des cellules H9C2 que dans la fraction réticulaire. Pour optimiser la détection de TRPV1 dans des lysats totaux, il serait judicieux d'augmenter la quantité de protéines déposées à 100 µg lors des prochains Western blots. Malheureusement, le puits pour les MAMs est inexploitable dans cette expérience car l'échantillon était trop visqueux (comme pour la figure 47).

Ces résultats nous montrent que TRPV1 est bien exprimé dans les cellules H9C2 et qu'il est localisé à la membrane du RE. En revanche, on ne peut pas exclure la présence de TRPV1 dans les MAMs. Des expériences d'immunofluorescence seront effectuées afin de confirmer cette localisation.

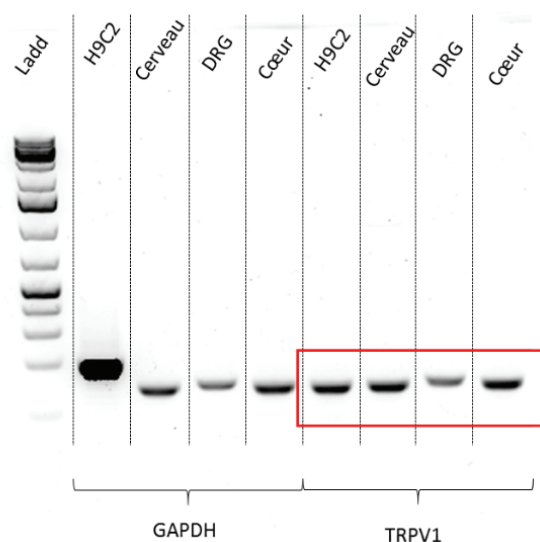


**Figure 48.** Expression et localisation de TRPV1 dans les cellules H9C2 par Western blot.

L'anticorps utilisé est anti-TRPV1 1/250 de chez Abnova. L'analyse du Western blot est effectuée à partir des membranes de nitrocellulose. Elles ont été transférées à partir de gel 8%, 30 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits à partir des cellules H9C2 et 3 µL d'échelle de standards ont été déposés pour chaque gel.

## 1-2 Expression de TRPV1 dans les cellules H9C2 par RT-PCR

Afin de renforcer les résultats obtenus par Western blot, l'expression de TRPV1 dans les cellules H9C2 a été vérifiée par RT-PCR (figure 49). Comme témoins positifs de l'expression de *TRPV1* sont utilisés des échantillons de cerveau, de chaîne dorsale ganglionnaire (DRG) et de cœur de souris. Comme l'illustre la figure 49, *TRPV1* est exprimé dans ces trois échantillons, en relation avec les données de la littérature et également dans l'échantillon des cellules H9C2.



**Figure 49.** RT-PCR à partir d'échantillons de cerveau, de DRG, de cœur et de cellules H9C2.

Une électrophorèse sur gel d'agarose permet de visualiser les produits amplifiés de la PCR en utilisant les amorces spécifiques (GAPDH et TRPV1). Les échantillons de cellules H9C2, le cerveau, la DRG et le cœur sont examinés. La première ligne correspond à l'échelle de standards d'ADN.

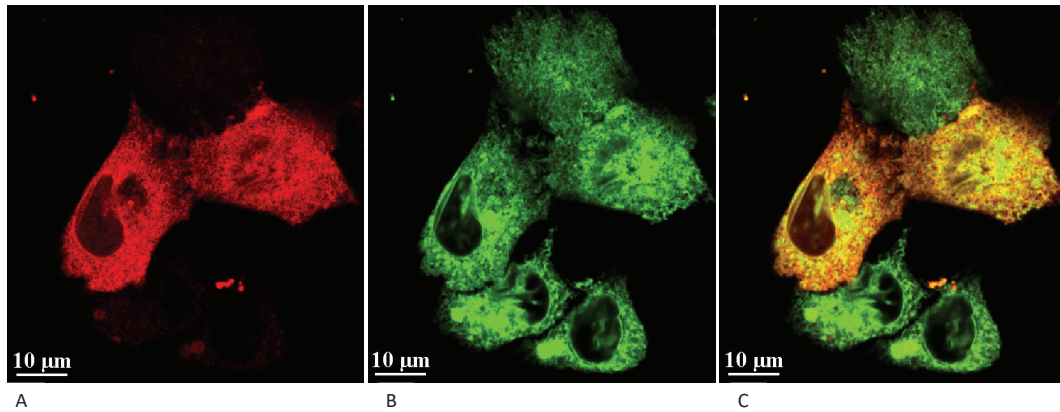
## 1-3 Expression et localisation de TRPV1 dans les cellules H9C2 par immunofluorescence

Deux types de détection de TRPV1 par immunofluorescence ont été effectués dans cette partie :

- Sur des cellules vivantes préalablement transfectées pour surexprimer TRPV1-mCherry, puis incubées avec des sondes fluorescentes (ER-Tracker et Mito-Tracker)
- Sur cellules fixées, puis incubées avec différents anticorps primaires (anti-TRPV1, anti-GRP75, et anti-IP3R).

### 1-3.1 **Par surexpression de TRPV1**

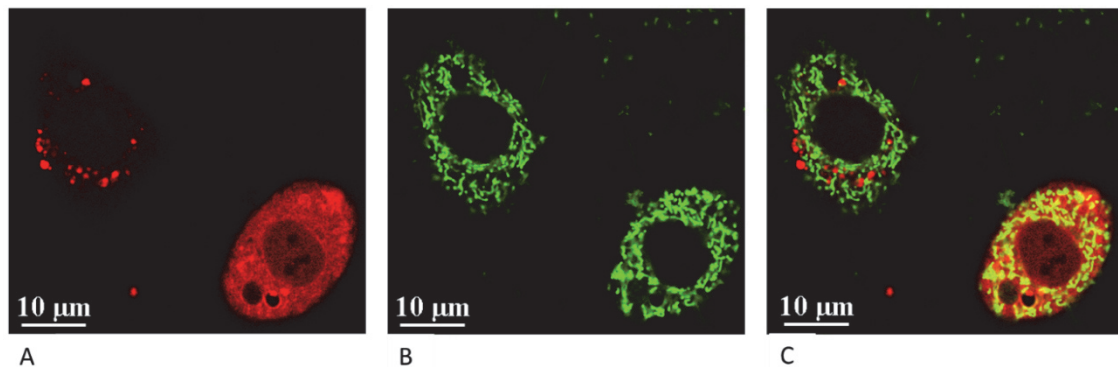
Les cellules ont été chargées pendant 30 min à 37°C dans l'obscurité avec ER-Tracker Green pour nous permettre d'estimer la proportion de RE dans les cellules H9C2. La figure 50 illustre la localisation de TRPV1 (identifiée grâce à la fluorescence de mCherry), le marquage du réticulum et la superposition des deux marquages. Ainsi, il semble que TRPV1 est exclusivement localisé à la membrane du RE avec ER-Tracker des coefficients de colocalisation de Pearson de 0.79 et Manders de 0.87 et semble absent de la membrane plasmique.



**Figure 50.** Localisation de TRPV1-mCherry dans les cellules H9C2.

Photos prises au microscope confocal. (A) Surexpression de TRPV1-mCherry (B) ER-Tracker Green (C) Superposition des deux signaux. Les images sont acquises au microscope confocal Nikon sur cellules vivantes avec l'objectif à immersion à huile 40x, en 1024 x 1024 pixels. Les fluorescences de mCherry et du ER-Tracker Green ont été acquises respectivement avec une excitation à 560 nm (laser Sapphire) et à 488 nm (laser Argon) et des émissions collectées avec 2 détecteurs GAasp 595/50 nm et 525/50 nm. L'échelle en bas à gauche de chaque photo correspond à 10 μm.

De plus, afin de vérifier les résultats obtenus par Western blot, les cellules sont alors chargées pendant 30 minutes à 37°C dans l'obscurité avec Mito-Tracker Green. La figure 51 illustre ces différents marquages. En effet, la figure 51A montre les cellules surexprimant TRPV1 couplé à mCherry, la figure 51B illustre le marquage Mito-Tracker Green et la figure 51C représente la superposition des deux marquages. On peut donc conclure que les deux protéines ne co-localisent pas et par conséquent, TRPV1 ne semble pas exprimé dans la mitochondrie, coefficients de Pearson de 0.21 et de Manders de 0.33.

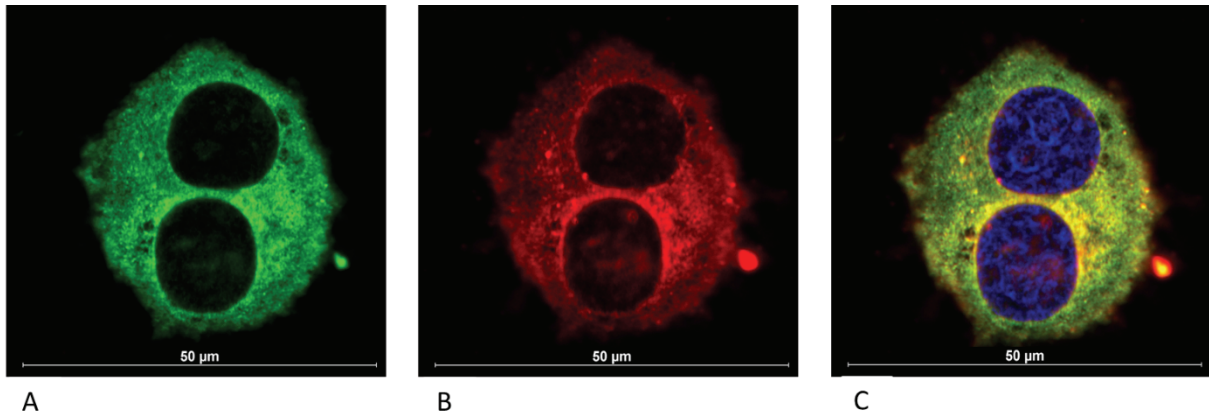


**Figure 51.** Localisation de TRPV1-mCherry dans les cellules H9C2.

Photos prises au microscope confocal. (A) Surexpression de TRPV1-mCherry (B) Mito-Tracker Green (C) Superposition des deux signaux. Les images sont acquises au microscope confocal Nikon sur cellules vivantes avec l'objectif à immersion à huile 40x, en 1024 x 1024 pixels. Les fluorescences de mCherry et du Mito-Tracker Green ont été acquises respectivement avec une excitation à 560 nm (laser Sapphire) et à 488 nm (laser Argon) et des émissions collectées avec 2 détecteurs GAasp 595/50 nm et 525/50 nm. L'échelle en bas à gauche de chaque photo correspond à 10 μm.

### 1-3.2 Par immunofluorescence avec l'anticorps sélectionné : Abnova

Enfin, afin de vérifier la localisation subcellulaire de TRPV1, des co-marquages ont été effectués. En effet, une détection par immunofluorescence a été réalisée avec un anticorps anti-TRPV1 conjointement avec un anticorps anti-IP3R, marqueur positif du RE, ou un anticorps anti-GRP75, marqueur positif de la mitochondrie.

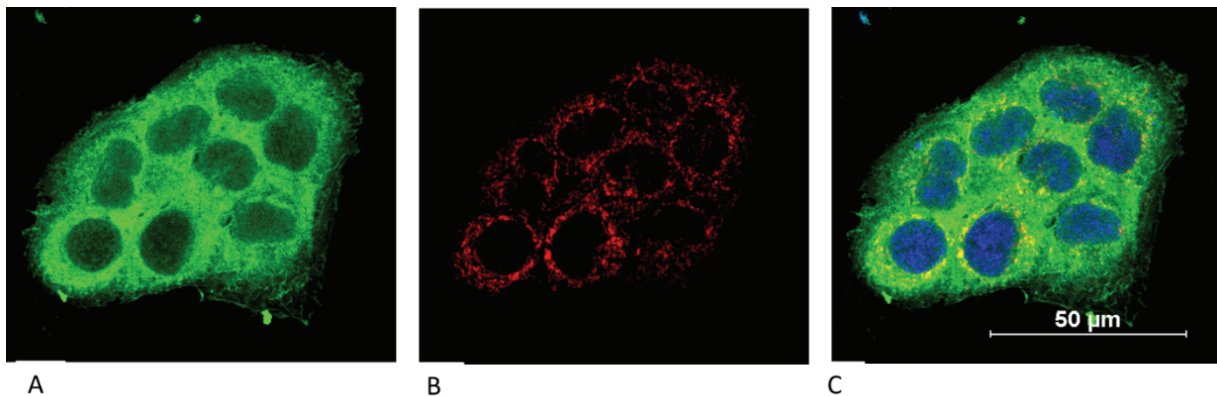


**Figure 52.** Immunomarquage TRPV1 et IP3R.

Photos prises au microscope confocal. (A) Immunofluorescence anti-TRPV1 1/250 (B) Immunofluorescence anti-IP3R 1/250 (C) Superposition des deux marquages.

Les images sont acquises au microscope confocal Nikon sur cellules fixées avec l'objectif à immersion à huile 40x, en 1024 x 1024 pixels. Les fluorescences de Alexa-647, de Alexa-488 et du DAPI ont été acquises respectivement avec une excitation à 647 nm (laser à diode), à 488 nm (laser Argon) et 401,8 nm (laser à diode) et des émissions collectées avec 2 détecteurs GAasp 595/50 nm et 525/50 nm et un détecteur PMT 450/50 nm. L'échelle en bas de chaque photo correspond à 50 µm.

Comme l'illustre la figure 52C, la superposition des deux marquages révèle que TRPV1 et IP3R colocalisent, le coefficient de Pearson est de 0.92 et celui de Manders est de 0.93. Ceci renforce notre hypothèse d'une localisation réticulaire de TRPV1.



**Figure 53.** Immunomarquage TRPV1 et GRP75

Photos prises au microscope confocal. (A) Immunofluorescence anti-TRPV1 1/250 (B) Immunofluorescence anti-GRP75 1/250 (C) Colocalisation des deux marquages.

Les images sont acquises au microscope confocal Nikon sur cellules fixées avec l'objectif à immersion à huile 40x, en 1024 x 1024 pixels. Les fluorescences de Alexa-647, de Alexa-488 et du DAPI ont été acquises respectivement avec une excitation à 647 nm (laser à diode), à 488 nm (laser Argon) et 401,8 nm (laser à diode) et des émissions collectées avec 2 détecteurs GAasp 595/50 nm et 525/50 nm, et un détecteur PMT 450/50 nm. L'échelle en bas de chaque photo correspond à 50 µm.

Enfin, comme l'illustre la figure 53C, la superposition des marquages anti-TRPV1 et anti-GRP75 n'indique pas de colocalisation des deux protéines, montrant que TRPV1 ne semble pas localisé dans la mitochondrie, mais nous n'excluons pas une partielle colocalisation dans les MAMs qui pourrait être vérifiée ultérieurement par la technique de PLA (proximity ligation assay). Le coefficient de Pearson est de 0.52 et celui de Manders est de 0.55.

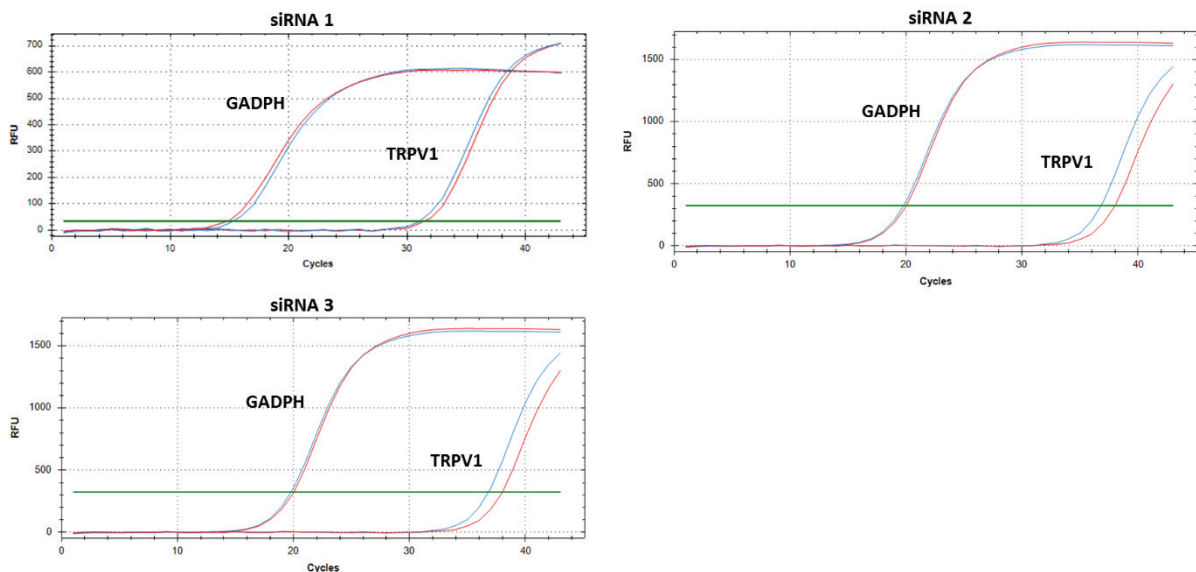


Pour conclure cette partie, nous avons montré par différentes expériences (Western Blot, RT-PCR et immunofluorescence) que TRPV1 est exprimé dans la lignée cellulaire H9C2 et est localisé à la membrane du RE. Par la suite, la fonctionnalité de TRPV1 dans les cellules H9C2 sera investiguée.

#### 1-4 Efficacité et fonctionnalité des ARN interférant ciblant le canal TRPV1, mise au point de siRNA de rat

Afin de valider la spécificité de l'implication de TRPV1 dans nos expériences, plusieurs siRNA contre cette protéine sont testés. Ils sont listés dans le tableau 7.

##### 1-4.1 **Vérification par RT-PCR**



**Figure 54.** Amplification de la PCR en temps réel afin d'évaluer l'efficacité des différents siRNA contre TRPV1.

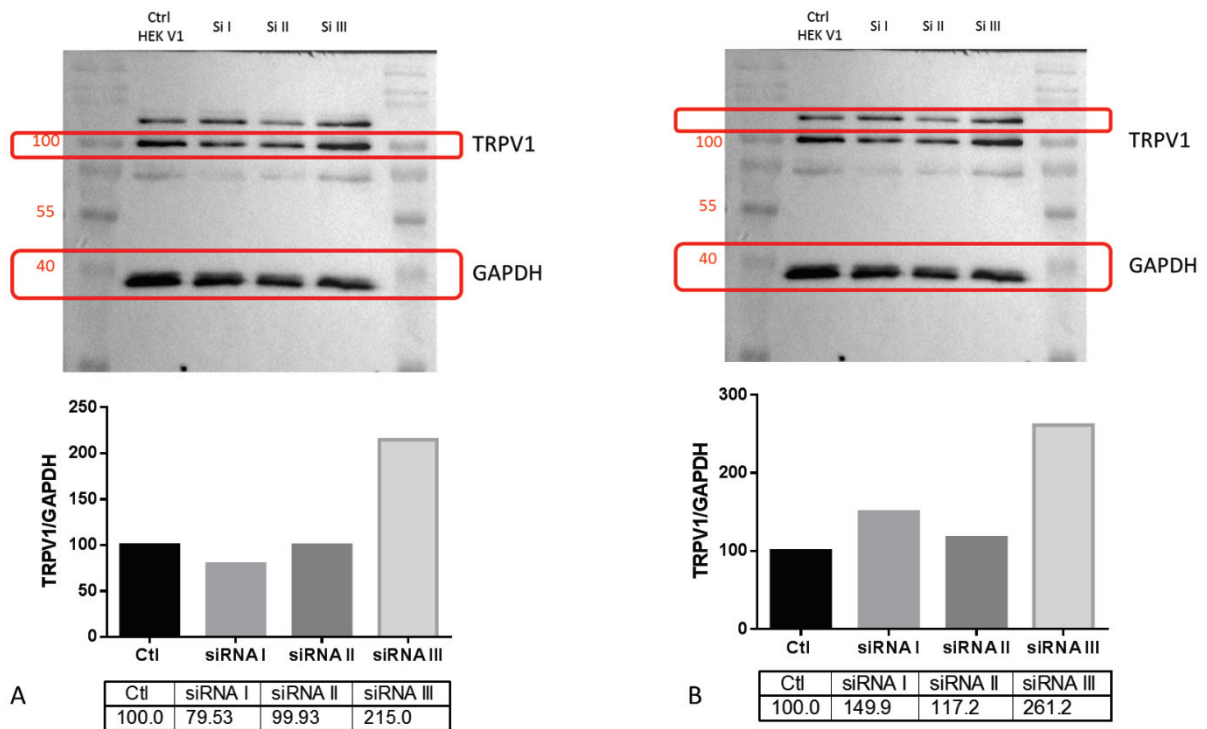
Les amorces utilisées sont spécifiques des exons 13 et 14. GAPDH est utilisée comme contrôle. Les courbes en bleu et en rouge correspondent aux cellules H9C2 contrôles et aux échantillons transfectés avec 100 nM de siRNA contre TRPV1, respectivement.

La figure 54 illustre l'amplification en temps réel de la PCR effectuée sur les échantillons de cellules H9C2 contrôles et les cellules ayant été transfectées avec 100 nM du siRNA 1, 2 et 3 (tableau 7). GAPDH est utilisé comme un contrôle qualité de l'extraction d'ARN. A droite de chaque graphique, les courbes TRPV1 sont illustrées à partir d'environ 35 cycles. Ceci montre que l'ARN est faiblement exprimé. De plus, il n'y a aucune différence entre contrôle (courbe bleue) et siRNA (courbe rouge), nous indiquant que les différents siRNA ne permettent pas de diminuer la quantité d'ARN pour TRPV1.

Malheureusement, à l'heure actuelle, aucun siRNA ne semble être suffisamment efficace pour diminuer l'expression de TRPV1 dans les cellules H9C2.

##### 1-4.2 **Vérification par Western blot**

Enfin, trois nouveaux siRNA ont été testés par Western blot afin d'évaluer leur efficacité sur l'expression protéique dans les cellules HEK surexprimant TRPV1. Puisque l'anticorps révèle deux bandes aux tailles correspondant à la protéine TRPV1 dans ce modèle, leurs analyses ont été effectuées et leur quantification a été rapportée par rapport à la protéine GAPDH (rapport en pourcentage). Quel que soit la bande analysée (figure 55 de gauche ou de droite), les siRNA ne semblent pas diminuer l'expression de TRPV1 dans les HEK-TRPV1. Seul le siRNA I semble avoir un effet mais la diminution est trop faible pour avoir un effet biologique.



**Figure 55.** Test de l'efficacité des siRNA dernièrement designés.

Les cellules sont transfectées avec 100 nM de siRNA contre TRPV1. Les anticorps utilisés sont anti-TRPV1 1/250 de chez Abnova. L'analyse du Western blot est effectuée à partir des membranes de nitrocellulose. Elles ont été transférées à partir de gel 8%, 30 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits à partir des cellules HEK-TRPV1 et 3 µL d'échelle de standards ont été déposés pour chaque gel.

Le développement d'un siRNA fonctionnel contre TRPV1 est toujours en cours d'élaboration puisque les 6 précédemment testés ne permettent pas de diminuer l'expression de TRPV1 dans les cellules H9C2.



## 2- Fonctionnalité de TRPV1 dans les cellules H9C2

Après avoir démontré que TRPV1 est un canal localisé à la membrane du RE, sa fonctionnalité sera étudiée dans cette partie. Ces expériences se sont inspirées des précédentes études sur le muscle strié squelettique<sup>173</sup> et sur les cardiomyocytes (données non publiées provenant de la thèse de Lucille Païta). Le but de cette partie est de moduler pharmacologiquement TRPV1 avec ses agonistes : CAP et RTX mais également avec leurs antagonistes respectifs : CPZ et iRTX.

Pour rappel, comme indiqué dans la partie Matériels et méthodes, afin d'éviter les phénomènes d'entrée calcique capacitive, l'ensemble des expériences d'imagerie calcique a été réalisé en l'absence de  $Ca^{2+}$  externe (sauf mention contraire).

### 2-1 Mesures de concentrations $Ca^{2+}$ réticulaire ( $[Ca^{2+}]_{RE}$ : ErGAP1

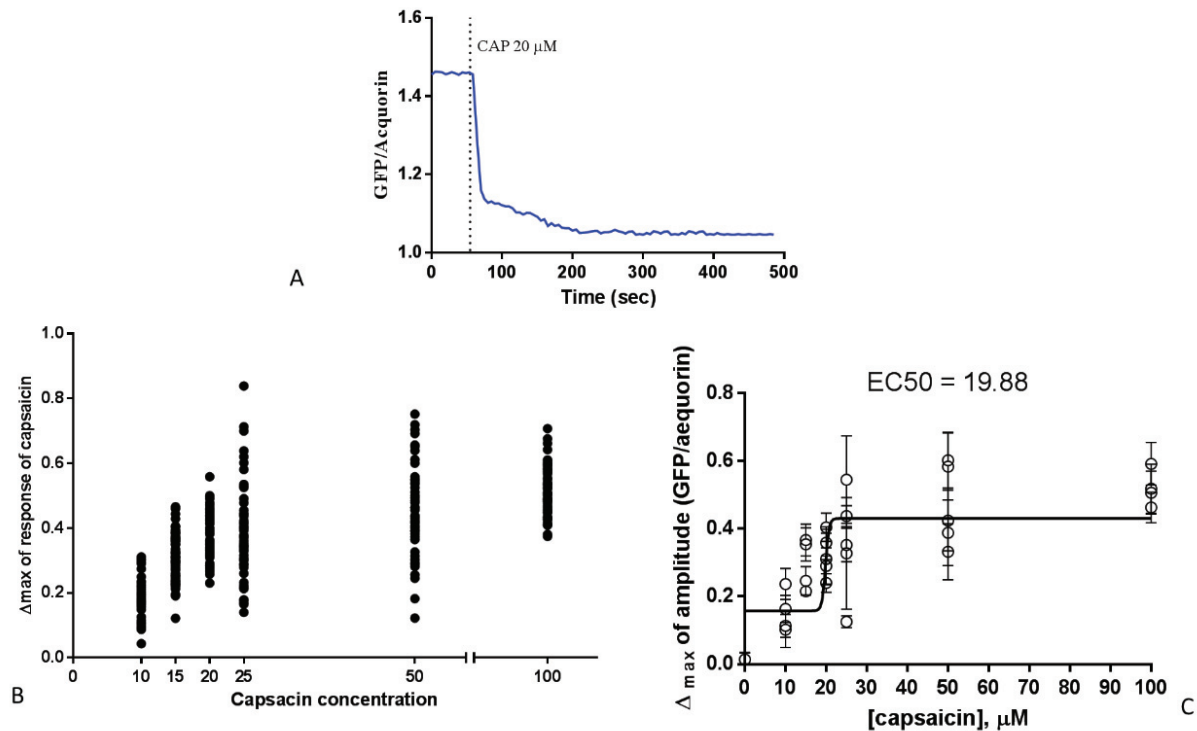
Dans un premier, nous avons validé la dose optimale de réponse des agonistes de TRPV1 par mesure de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  grâce à la sonde génétique ErGAP1. Sur des cellules musculaires squelettiques primaires isolées FDB (*flexor digitorum brevis*), la dose utilisée de CAP est de  $100 \mu M$ <sup>173</sup>. A l'inverse sur des neurones (où TRPV1 est exprimé à la membrane plasmique), la dose utilisée varie entre 1 et  $10 \mu M$ <sup>302</sup>.

La sonde ErGAP1 est utilisée dans cette étude car sa constante de dissociation ( $K_d = 16 \mu M$ ) permet de visualiser les faibles variations de  $Ca^{2+}$  dans le RE. En effet, nous nous attendons à avoir de faibles variations puisque notre hypothèse stipule que TRPV1 serait un canal de fuite calcique.

#### 2-1-1 Dose réponse de CAP

Les différentes concentrations testées sont les suivantes : 10, 15, 20, 25, 50 et  $100 \mu M$ . Les cellules ont préalablement été transfectées avec ErGAP1. Les expériences sont effectuées à température ambiante et dans du milieu externe dépourvu de  $Ca^{2+}$  (CFB). Après stabilisation du signal, les cellules sont stimulées avec la CAP avec une des 6 concentrations préalablement citées. L'amplitude maximale de variation de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  obtenue suite à l'ajout d'une substance, ici la CAP : correspondant à la soustraction du ratio minimal de fluorescence (GFP/Acquorine) obtenu, moins le ratio basal (état de repos).

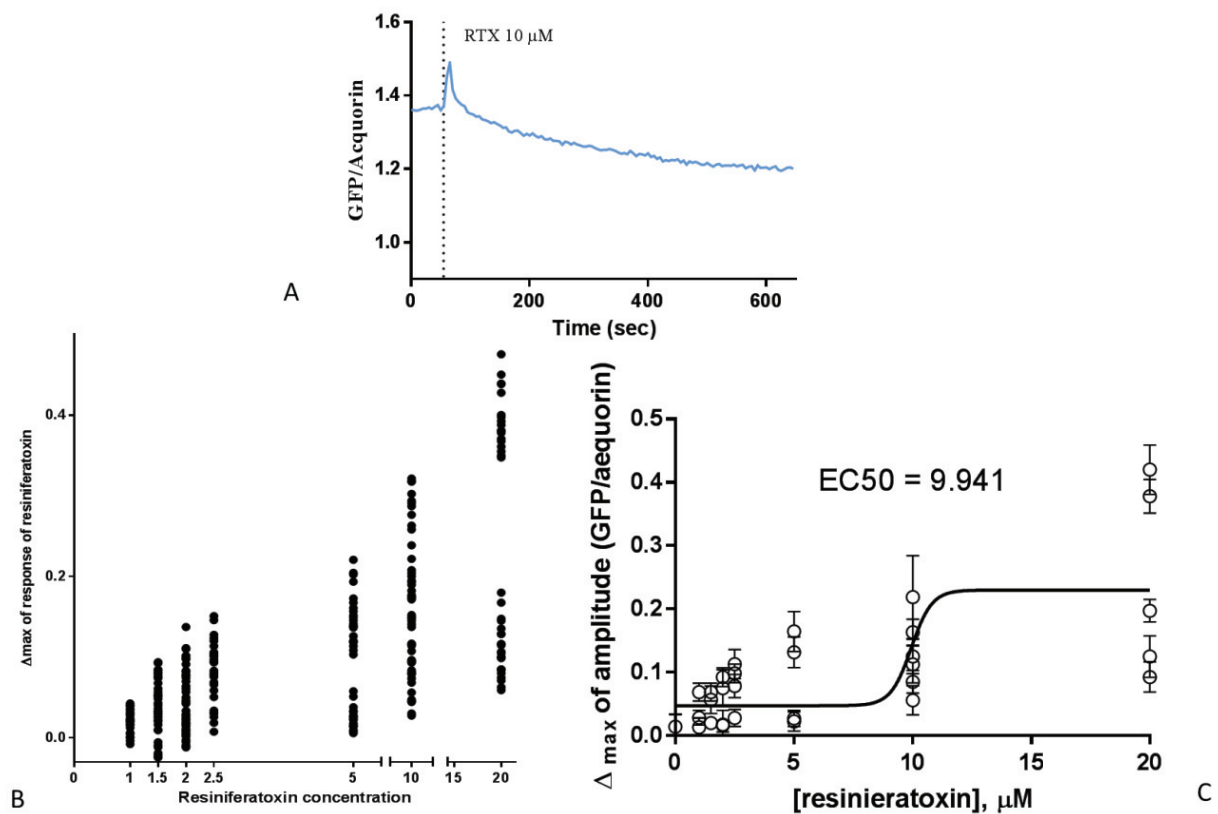
La figure 56A illustre une courbe représentative de l'évolution de la concentration de  $Ca^{2+}$  réticulaire ( $[Ca^{2+}]_{RE}$ ). En effet, la stimulation de CAP entraîne une diminution de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$ , reflétant une vidange du  $Ca^{2+}$  réticulaire. La figure 56B illustre toutes les réponses obtenues pour chaque concentration testée. Les données sont représentées en nuage de points. La figure 56C permet de visualiser la courbe de dose dépendance de la CAP permettant de mobiliser les stocks de  $Ca^{2+}$  réticulaire. Compte tenu des résultats et de l'EC 50 calculé (figure 56C), la concentration optimale pour la stimulation de CAP sur les cellules H9C2 est de  $20 \mu M$ .



**Figure 56.** Évolution de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ ) lors d'une stimulation avec la CAP, agoniste de TRPV1. (A) Courbe représentative de l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  en fonction du temps (B) Les réponses de chaque cellule sont représentées en nuage de points. L'amplitude maximale est représentée en fonction de la concentration testée de CAP (C) Les moyennes de chaque jour de manipulation sont représentées par un point, permettant de tracer la courbe dose réponse en fonction de l'amplitude réponse à la CAP. Le calcul de l'EC50 est effectué à partir de cette courbe. Les expériences sont effectuées dans du CFB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante.

### 2-1-2 Dose réponse de RTX

L'expérience est répétée avec l'autre agoniste de TRPV1 : la RTX. Les différentes concentrations testées sont les suivantes : 1, 1.5, 2, 2.5, 5, 10 et 20 μM. Les conditions d'expériences sont identiques à celles effectuées pour la dose réponse de CAP. Après stabilisation du signal, les cellules sont stimulées avec la RTX avec une des 7 concentrations préalablement citées. La figure 57A illustre une courbe représentative de l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ . La stimulation de RTX entraîne une diminution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ . La figure 57B illustre toutes les réponses obtenues pour chaque concentration testée. Les données sont représentées en nuage de points. La figure 57C permet de visualiser la courbe de dose réponse de la RTX permettant de mobiliser les stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire. Compte tenu des résultats et de l'EC 50 calculé (figure 57C), la concentration optimale pour la stimulation de RTX sur les cellules H9C2 est de 10 μM.



**Figure 57.** Évolution de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  lors d'une stimulation avec la RTX, agoniste de TRPV1.

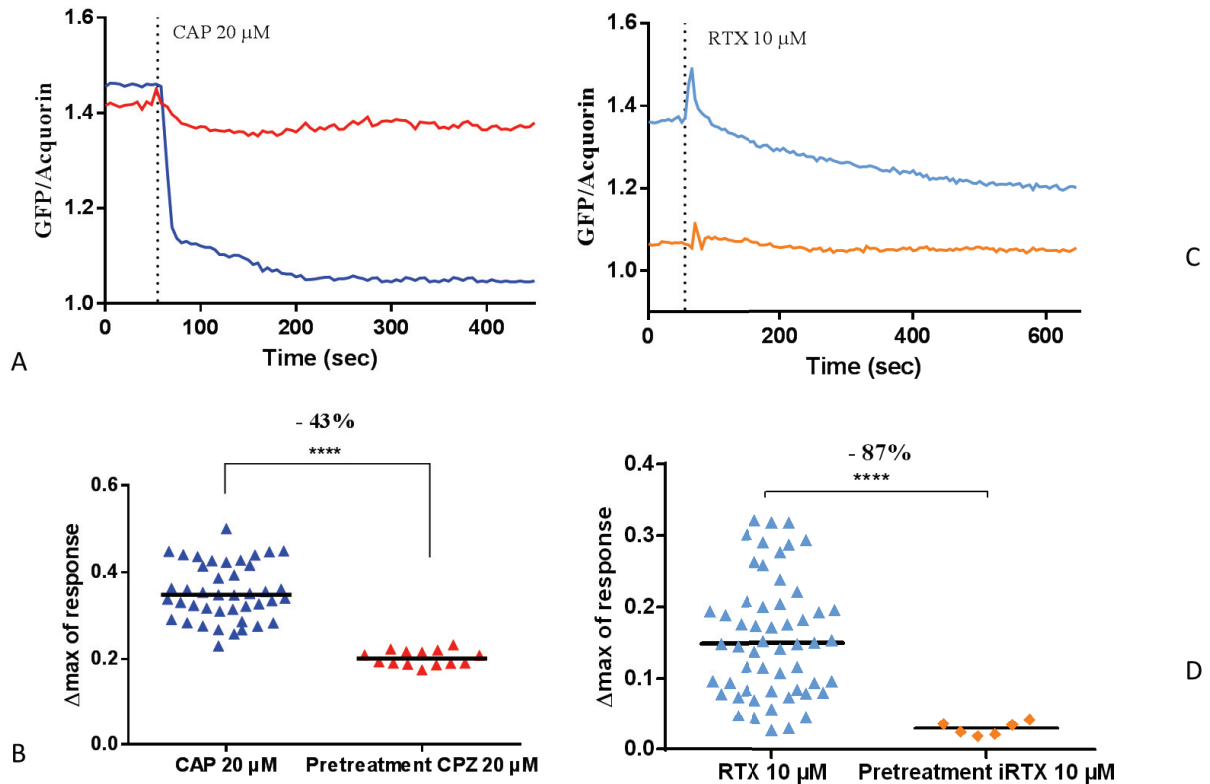
(A) Courbe représentative de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  en fonction du temps (B) Les réponses de chaque cellule sont représentées en nuage de points. L'amplitude maximale est représentée en fonction de la concentration testée de RTX (B) Les moyennes de chaque jour de manipulation sont représentées par un point, permettant de tracer la courbe dose réponse en fonction de l'amplitude réponse à la RTX. Le calcul de l'EC50 est effectué à partir de cette courbe. Les expériences sont effectuées dans du CFB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante.

### 2-1-3 Incubation avec les antagonistes respectifs CPZ et iRTX

De plus, afin de vérifier la spécificité de l'agoniste, l'antagoniste respectif est incubé 30 minutes avant la stimulation avec l'agoniste (CAP ou RTX). L'incubation se fait dans du CCB. Les concentrations des antagonistes seront identiques à celles des agonistes.

La figure 58A montre que l'application de 20 μM de CAP entraîne une diminution du  $[Ca^{2+}]_{RE}$  au cours du temps. Cette diminution est en partie abolie lorsque les cellules sont prétraitées 30 minutes avec l'antagoniste respectif, la CPZ. En effet, le nuage de points (figure 58B) illustre que le prétraitement diminue la réponse de l'agoniste d'environ 43%. Le delta de réponse passe de 0.35 à 0.20. De plus, la figure 58C nous indique que l'application de la RTX à 10 μM entraîne également une diminution de la  $[Ca^{2+}]$  réticulaire. En revanche, cette baisse est de plus faible amplitude et plus longue dans le temps. Le nuage de points de la figure 58D montre que l'inhibition avec l'antagoniste respectif la iRTX permet de diminuer de 87% la réponse induite par la RTX. Le delta de réponse passe de 0.15 à 0.03.

Cette figure nous indique donc que les agonistes diminuent la  $[Ca^{2+}]$  du RE. Les différences de réponse entre la CAP et la RTX seront expliquées dans la partie « discussion », mais nous pensons, qu'elles possèdent probablement des sites de liaison différents avec TRPV1.



**Figure 58.** Évolution de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  lors d'un prétraitement avec les antagonistes de TRPV1.

(A) Courbes représentatives de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  en fonction du temps. En bleu foncé, les cellules sont stimulées avec la CAP 20  $\mu M$ , en rouge les cellules ont été prétraitées avec CPZ 20  $\mu M$  puis stimulées avec 20  $\mu M$  de CAP (B) Nuage de points des différentes cellules stimulées avec la CAP et prétraitées avec la CPZ (C) Courbes représentatives de l'évolution du  $Ca^{2+}$  réticulaire en fonction du temps. En bleu clair, les cellules sont stimulées avec la RTX 10  $\mu M$ , en orange les cellules ont été prétraitées avec iRTX 10  $\mu M$  puis stimulées avec la RTX 10  $\mu M$  (D) Nuage de points des différentes cellules stimulées avec la RTX et prétraitées avec la iRTX. Les expériences sont effectuées dans du CFB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Mann-Whitney, les différences significatives sont considérées comme significative lorsque la p value est inférieure à 0.05. \*\*\*\* p < 0.0001.

Ces résultats indiquent que l'activation de TRPV1 par ses agonistes (CAP et RTX) entraîne bien une vidange calcique du RE au cours du temps. De plus, la pré-inhibition avec des antagonistes respectifs (CPZ et iRTX) permet d'abolir en partie cette vidange. Ces résultats confirment la spécificité d'action des différentes molécules pharmacologiques utilisées pour moduler TRPV1. La spécificité réside dans l'emploi de deux agonistes différents qui donnent des effets similaires. De plus, l'efficacité de ces deux agonistes est abolie suite à la préincubation des cellules par les deux antagonistes. Par conséquent, TRPV1 est bien un canal calcique réticulaire fonctionnel.

#### 2-1-4 Effets à court terme de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques réticulaires

Afin d'être en accord avec la suite des expériences et les prétraitements qui seront effectués pour les séquences d'hypoxie-réoxygénation. Les agonistes, antagonistes ou les deux en même temps ont été incubés avec les cellules dans du CCB pendant 30 minutes, avant l'expérience à 37°C.

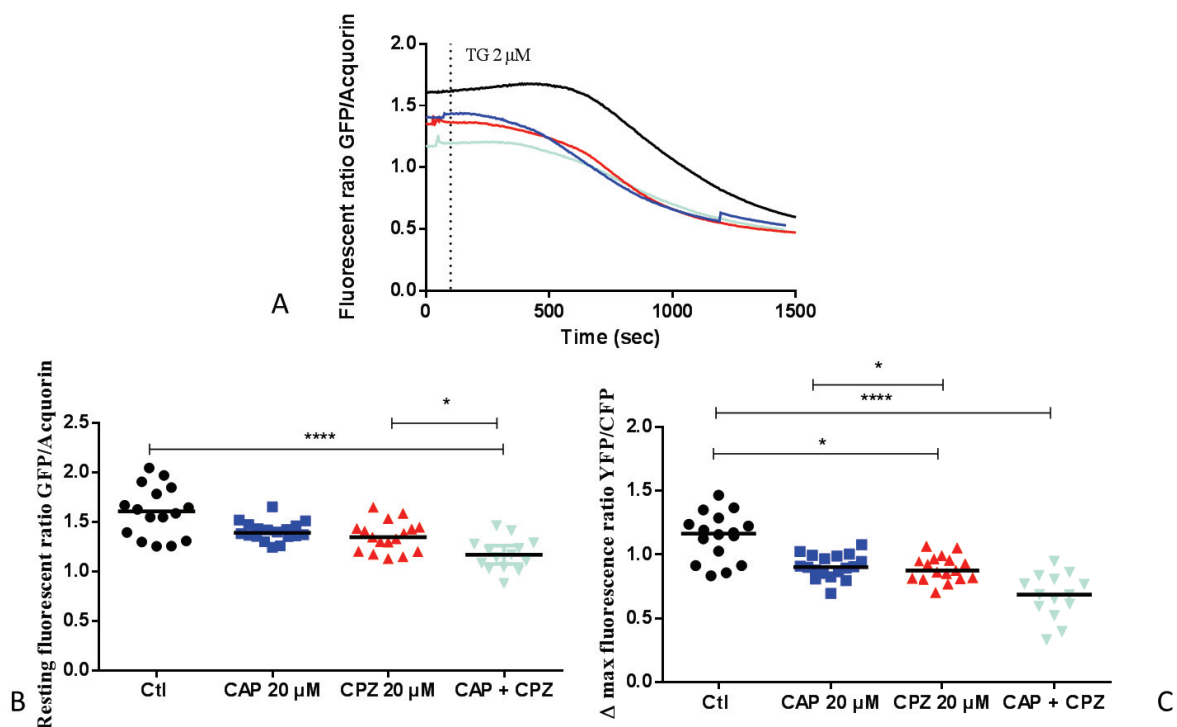
Dans un premier temps, le couple CAP/CPZ a été testé. Les données recueillies sont :

- La  $[Ca^{2+}]_{RE}$  à l'état de repos : correspondant à la moyenne du signal avant stimulation.

- L'amplitude maximale de variation de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  obtenue suite à l'ajout d'une substance, ici la thapsigargine (inhibiteur des pompes SERCA) : correspondant comme décrit précédemment à la soustraction du ratio minimal de fluorescence (GFP/Acquorine) obtenu, moins le ratio basal (état de repos).

La figure 59A illustre l'évolution des  $[Ca^{2+}]_{RE}$  en fonction du temps. Les cellules H9C2 sont prétraitées 30 minutes avant l'expérience dans du CCB avec la CAP, la CPZ ou les deux en même temps. La figure 59B illustre le contenu en  $Ca^{2+}$  réticulaire avant la stimulation avec la thapsigargine (1.61). Seul le prétraitement avec la CAP et CPZ en même temps diminue significativement la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  basale (1.16). En revanche, le prétraitement avec la CAP et la CPZ seule n'ont pas d'effet (1.39 et 1.35 respectivement). Ces faibles variations laissent penser que le niveau basal de  $Ca^{2+}$  réticulaire est finement régulé, notamment par la mitochondrie (NCLX).

L'utilisation de la thapsigargine permet de bloquer la recapture de  $Ca^{2+}$  à l'intérieur du réticulum, donc permet de mettre en évidence la fuite  $Ca^{2+}$  réticulaire et par conséquent d'estimer indirectement la taille des stocks calciques réticulaires. En figure 59C, le prétraitement CPZ ou CAP et CPZ, en même temps, diminuent significativement l'amplitude de réponse à la TG (0.88 et 0.69 respectivement vs 1.17). Ceci signifie que ces deux prétraitements pré-vidangent les stocks en  $Ca^{2+}$  réticulaire. En effet, nous nous attendions à avoir au contraire une augmentation des stocks de  $Ca^{2+}$  réticulaire avec un prétraitement avec la CPZ.

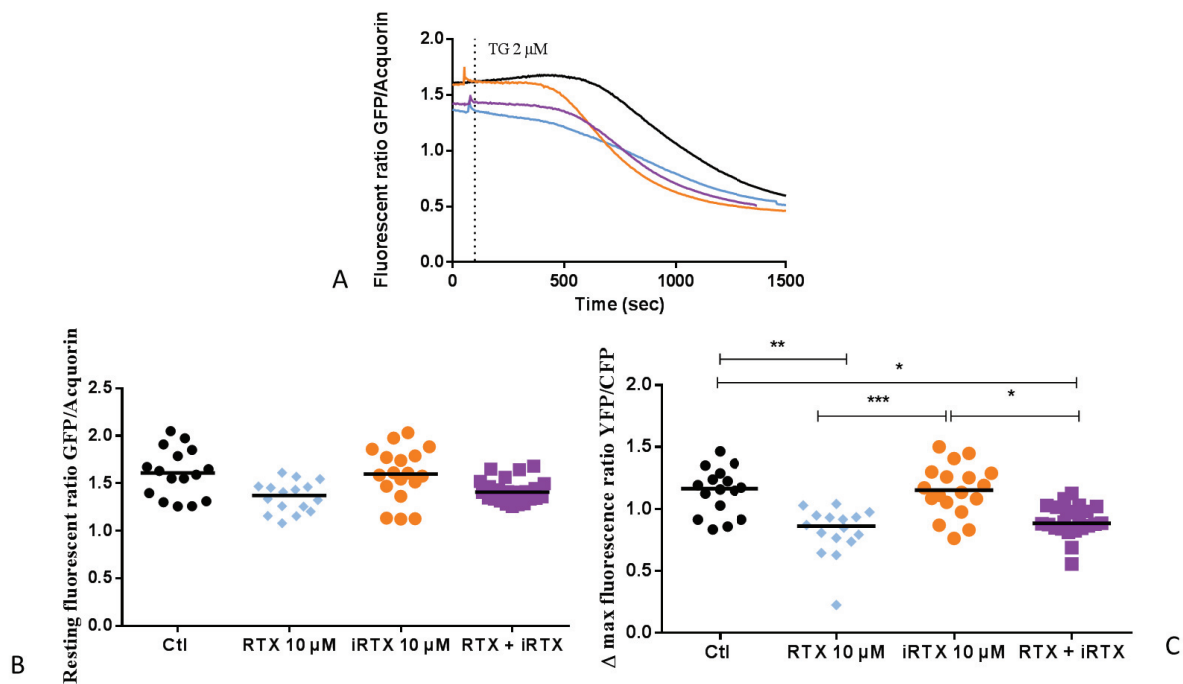


**Figure 59.** Évolution de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  lors d'un prétraitement avec CAP, CPZ ou les deux en même temps.

(A) Courbes représentatives de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  en fonction du temps. La courbe en noir représente les cellules contrôles, en bleu foncé avec les cellules prétraitées avec la CAP 20 μM, en rouge avec CPZ 20 μM et en vert avec les deux drogues en même temps. (B) Nuage de points des  $[Ca^{2+}]_{RE}$  à l'état de repos de fluorescence (GFP/Acquorine). (C) Nuage de points des amplitudes maximales de réponse induite par la stimulation TG (2 μM). Les expériences sont effectuées dans du CCB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, les différences significatives sont indiquées lorsque la p value est inférieure à 0,05. \* équivaut à une p value inférieure à 0,05, \*\*\*\* à une p value < 0,0001.

Comme remarqué dans la figure 58, la modulation de TRPV1 a un réel effet sur la  $[Ca^{2+}]_{RE}$ , puisque les 3 prétraitements diminuent son contenu. En revanche, la CAP et la CPZ semble avoir des effets assez similaires lorsqu'elles sont incubées sur un temps court, cela pourrait laisser supposer que ces molécules ont des effets aspécifiques (via notamment une concentration de CPZ pas assez importante, expliquant une diminution de seulement 43 % de la réponse à la CAP avec la CPZ).

De façon similaire, le couple RTX/iRTX a été testé. La figure 60A montre l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  en fonction du temps. Les cellules H9C2 sont prétraitées 30 minutes avant l'expérience dans du CCB avec la RTX, la iRTX ou les deux en même temps. La figure 60B illustre le contenu en  $Ca^{2+}$  réticulaire avant la stimulation avec la thapsigargine (1.17). Les prétraitements avec les trois molécules n'ont pas d'effet sur le contenu basal en  $Ca^{2+}$  dans le RE. En revanche, la figure 60C suggère que la RTX diminue significativement la réponse à la TG (0.86), la iRTX seule abolit significativement cette diminution (1.15) et l'incubation des deux drogues en même temps diminue également la réponse à la TG (0.88) laissant suggérer l'effet prépondérant de la RTX sur la iRTX. Ceci signifie que les stocks en  $Ca^{2+}$  réticulaire sont plus faibles avec ces deux traitements (RTX seule et RTX + iRTX).



**Figure 60.** Évolution de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  lors d'un prétraitement avec RTX, iRTX ou les deux en même temps.

(A) Courbes représentatives de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  en fonction du temps. La courbe en noir représente les cellules contrôles, en bleu clair avec les cellules prétraitées avec la RTX 10  $\mu$ M, en orange avec iRTX 10  $\mu$ M et en violet avec les deux drogues en même temps. (B) Nuage de points des resting de fluorescence (GFP/Acquorine). (C) Nuage de points des amplitudes maximales de réponse induite par la stimulation TG (2  $\mu$ M). Les expériences sont effectuées dans du CCB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, les différences significatives sont indiquées lorsque la p value est inférieure à 0,05. \* équivaut à une p value inférieure à 0,05, \*\* à une p value < 0,01 et \*\*\* à une p value < 0,001.

En conclusion de cette partie, la modulation pharmacologique de TRPV1 a un impact sur la  $[Ca^{2+}]_{RE}$ , à la fois en aigu et en incubation de courte durée. Le CAP a un effet immédiat et important de diminution du  $[Ca^{2+}]_{RE}$  qui n'est abolit que de moitié avec son antagoniste. En revanche, la RTX produit un effet plutôt lent et fin sur la  $[Ca^{2+}]_{RE}$ , cinétique attendue d'un canal de fuite, donnant l'impression que cet



agoniste est très spécifique du canal. En effet, la pré-vidange avec la RTX entraîne une réponse à TG plus faible, de plus nous ne mesurons pas d'effets de la iRTX seule. La iRTX abolit en grande partie la réponse de la RTX. Si nous partons du principe qu'inhiber la fuite calcique réticulaire via TRPV1, cela aurait dû augmenter le contenu calcique du RE et donc le pool de  $Ca^{2+}$  TG-sensible. Or, l'inhibition de TRPV1 par la iRTX n'a pas d'impact sur les stocks calciques réticulaires, suggérant que l'équilibre est maintenu par l'activité des pompes SERCA ou par une compensation mitochondriale. En revanche avec les deux molécules en même temps (RTX + iRTX) nous avons une réponse intermédiaire laissant suggérer une action compétitive des deux molécules. Les résultats avec ce couple RTX/iRTX sont plus facilement interprétables qu'avec le précédent.

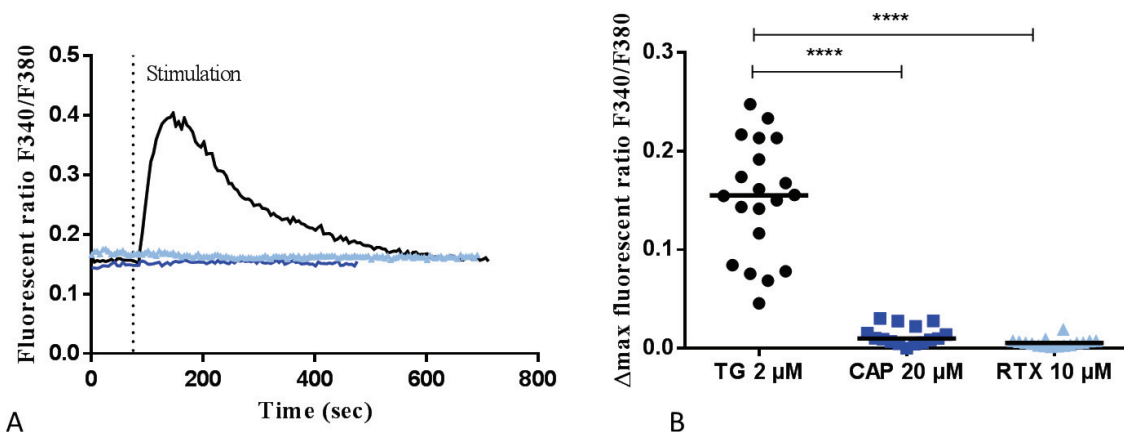
De plus, les effets observés lors d'un traitement court confirment les résultats des traitements aigus. Par conséquent, nous montrons dans cette partie que TRPV1 est un canal de fuite calcique réticulaire fonctionnel.

## 2-2 Mesures des concentrations $Ca^{2+}$ cytosoliques ( $[Ca^{2+}]_c$ ) : Fura2-AM

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence le rôle de TRPV1 comme canal de fuite calcique réticulaire fonctionnel. Nous nous intéressons ici à l'impact de la modulation pharmacologique de TRPV1 de manière aiguë et lors d'un traitement court sur la  $[Ca^{2+}]_c$ . En effet, une vidange calcique via TRPV1 pourrait être perçue en mesurant les variations de  $[Ca^{2+}]_c$ .

### 2-2-1 Effets aigus de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques cytosoliques

Ici, nous avons voulu visualiser les effets de la diminution de  $[Ca^{2+}]_{RE}$ , engendrée après stimulation du canal avec ses agonistes : CAP et RTX, sur la  $[Ca^{2+}]_c$ . Les cellules contrôles sont uniquement stimulées avec la thapsigargine (TG) afin d'inhiber les pompes SERCA et par conséquent de créer une vidange de  $Ca^{2+}$  du RE vers le cytosol.



**Figure 61.** Évolution de la  $[Ca^{2+}]_c$  lors d'une stimulation avec la CAP et la RTX.

(A) Courbes représentatives de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_c$  en fonction du temps. La courbe en noir représente les cellules stimulées avec la TG, en bleu foncé avec la CAP 20  $\mu$ M, et en bleu clair avec la RTX 10  $\mu$ M (B) Nuage de points des différentes cellules contrôles, stimulées avec la CAP ou la RTX. Les expériences sont effectuées dans du CFB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, les différences significatives sont indiquées lorsque la p value est inférieure à 0,05. \*\*\*\* équivaut à une p value inférieure à 0,0001

Comme l'illustrent les figures 61A et 61B, les stimulations avec la CAP 20  $\mu$ M et la RTX 10  $\mu$ M n'induisent aucune variation de  $[Ca^{2+}]_c$  contrairement à la stimulation avec la thapsigargine. En effet, la TG permet de visualiser une augmentation de  $[Ca^{2+}]_c$ , résultante de la vidange du RE, avec un delta de

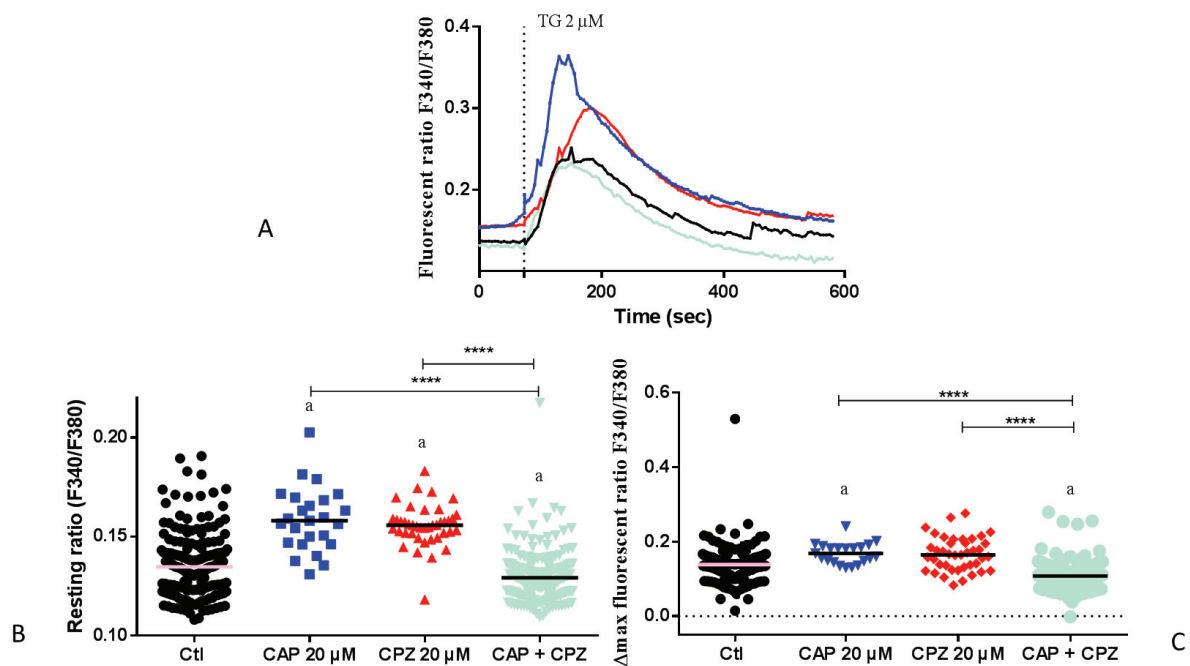


fluorescence d'environ 0.16 alors que les moyennes des deltas de réponse pour la CAP et la RTX sont proches de 0 (0.01 et 0.005 respectivement). Par conséquent, les antagonistes n'ont pas été testés dans ces conditions.

Malheureusement, aucune réponse cytosolique n'a été enregistrée suite à l'activation de TRPV1, suggérant que la sonde Fura-2 AM n'est pas un outil adéquat pour mesurer de fines libérations de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme. Notre hypothèse est que de faibles fuites calciques ne peuvent pas être détectées de manière globale sur la concentration de calcium cytosolique. En effet, le calcium est soit repompé, soit tamponné par la mitochondrie ou extrudé rapidement. De plus, nous pensons que la vidange à lieu au niveau de microdomaines (MAMs) non détectables par le Fura-2 AM, renforçant l'idée que TRPV1 serait un canal de fuite calcique du RE.

### 2-2-2 Effets à court terme de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques cytosoliques

Par conséquent, afin d'évaluer l'impact de la modulation de TRPV1 sur la concentration  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, les différents agonistes et antagonistes sont incubés avec les cellules 30 minutes avant l'expérience dans du CCB à 37°C.



**Figure 62.** Évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  lors d'un prétraitement avec CAP, CPZ ou les deux en même temps.

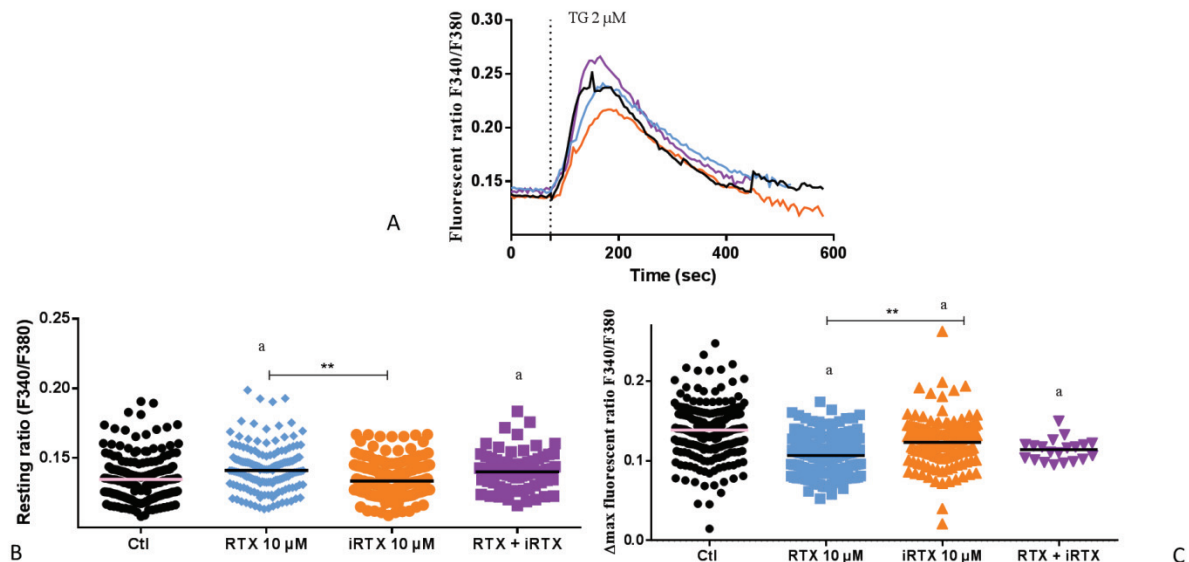
(A) Courbes représentatives de l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  en fonction du temps. La courbe en noir représente les cellules contrôles, en bleu foncé avec les cellules prétraitées avec la CAP 20  $\mu\text{M}$ , en rouge avec CPZ 20  $\mu\text{M}$  et en vert avec les deux drogues en même temps (B) Nuage de points des resting de fluorescence (340/380). (C) Nuage de points des amplitudes maximales de réponse induite par la stimulation TG (2  $\mu\text{M}$ ). Les expériences sont effectuées dans du CCB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, les différences significatives sont indiquées lorsque la p value est inférieure à 0,05. \*\*\*\* équivaut à une p value inférieure à 0,0001. a signifie différent des contrôles.

Dans un premier temps, le couple CAP/CPZ a été testé. Les données recueillies sont :

- La  $[Ca^{2+}]_c$  à l'état de repos : correspondant à la moyenne du signal avant stimulation.
- L'amplitude maximale de variation de la  $[Ca^{2+}]_c$  obtenue suite à l'ajout d'une substance, ici la thapsigargine (inhibiteur des pompes SERCA) : correspondant comme décrit précédemment à la soustraction du ratio maximal de fluorescence (340/380) obtenu, moins le ratio basal (état de repos).

La figure 62A montre l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_c$  en fonction du temps. Les cellules H9C2 sont prétraitées 30 minutes avant l'expérience dans du CCB avec la CAP, la CPZ ou les deux en même temps. La figure 62B illustre le contenu en  $Ca^{2+}$  cytosolique avant la stimulation avec la thapsigargine (0.134). Les prétraitements avec la CAP et la CPZ, de façon indépendante, augmente significativement la  $[Ca^{2+}]_c$  (0.16 et 0.16 respectivement). En revanche, le prétraitement avec les deux CAP et CPZ en même temps diminue significativement la  $[Ca^{2+}]_c$  cytosolique basale (0.13). Le résultat CAP est cohérent, puisqu'activer un canal de fuite permettrait d'augmenter le contenu de  $Ca^{2+}$  cytosolique. En revanche, le résultat avec la CPZ n'est pas très cohérent car nous nous attendions soit à une diminution de la  $[Ca^{2+}]_c$ , soit à une concentration équivalente à celle des cellules contrôles. Enfin, le prétraitement avec les deux molécules en même temps permet de revenir à une concentration proche de celle des cellules contrôles même si les résultats sont significativement différents.

La figure 62C illustre le delta de réponse après stimulation avec la TG (0.14). Lorsque les cellules sont prétraitées avec la CAP, l'amplitude de réponse à la TG est significativement augmentée par rapport aux contrôles (0.17). De même, lorsque les cellules sont prétraitées avec la CPZ, l'amplitude de réponse à la TG a tendance à être augmentée dans ces conditions (0.16 ; p value = 0.0951). Enfin, lorsque les deux drogues sont incubées en même temps, l'amplitude de réponse est significativement diminuée (0.11)



**Figure 63.** Évolution de la  $[Ca^{2+}]_c$  lors d'un prétraitement avec RTX, iRTX ou les deux en même temps

(A) Courbes représentatives de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_c$  en fonction du temps. La courbe en noir représente les cellules contrôles, en bleu clair avec les cellules prétraitées avec la RTX 10  $\mu$ M, en orange avec iRTX 10  $\mu$ M et en violet avec les deux drogues en même temps (B) Nuage de points des resting de fluorescence (340/380) (C) Nuage de points des amplitudes maximales de réponse induite par la stimulation TG (2  $\mu$ M). Les expériences sont effectuées dans du CCB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, les différences significatives sont indiquées lorsque la p value est inférieure à 0,05. \* équivaut à une p value inférieure à 0,05, \*\* à une p value < 0.01. a signifie différent des contrôles.

L'augmentation de la réponse à la TG après le prétraitement à la CPZ est cohérente puisqu'inhiber les canaux TRPV1 permettrait d'accumuler du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE, en amont de la stimulation avec la TG. En revanche, l'augmentation de la réponse TG après le prétraitement à la CAP est difficilement compréhensible.

Enfin, le couple RTX/iRTX a été testé. La figure 63A retrace l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  en fonction du temps suite à la perfusion de TG. Les cellules H9C2 sont prétraitées 30 minutes avant l'expérience dans du CCB avec la RTX, la iRTX ou les deux molécules conjointement. La figure 63B illustre le contenu en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique avant la stimulation avec la thapsigargine (0.134). Le prétraitement avec la RTX augmente significativement la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (0.142).

De plus, le prétraitement avec la iRTX n'a aucun effet sur la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  basale par rapport aux contrôles (0.13). En revanche, le prétraitement avec la RTX et la iRTX augmente significativement la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (0.14). Les résultats obtenus avec le binôme RTX/iRTX est ici plus cohérent : l'activation de TRPV1 et de la fuite calcique par la RTX est détectée via l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique.

A l'inverse, l'inhibition de la fuite calcique via TRPV1 n'a pas d'effets significatifs suggérant un mécanisme de régulation fine de la concentration en calcium cytosolique au sein des cellules H9C2.

La figure 63C illustre le delta de réponse après stimulation avec la TG (0.14). Lorsque les cellules sont prétraitées avec la RTX, l'amplitude de réponse à la TG est significativement diminuée par rapport aux contrôles (0.11). De plus, le prétraitement à la iRTX entraîne une réponse significativement diminuée par rapport à la TG et qui est augmentée par rapport à la RTX (0.12). Enfin, lorsque les deux drogues sont incubées en même temps, l'amplitude de réponse est significativement diminuée (0.11). De plus, nous avons montré que la réponse à la TG est plus importante avec le prétraitement iRTX et que RTX (0.12 vs 0.11), signifiant que la RTX pré-vidange davantage que la iRTX, ce qui est logique pour un agoniste de TRPV1.

Ces derniers résultats indiquent donc que la modulation de TRPV1 a bien un impact sur la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . En revanche, les résultats obtenus pour les prétraitements sont difficiles à interpréter puisque ce traitement dure 30 minutes. Il existe probablement des compensations pendant ce délai par les effecteurs impliqués notamment dans le maintien de l'homéostasie calcique. Ces résultats laissent suggérer que le couple RTX/iRTX a plutôt tendance à donner des résultats cohérents et spécifiques d'un canal de fuite calcique. En effet, nous avons montré que la pré-vidange du RE due à l'activation de TRPV1 (RTX) augmente la  $[\text{Ca}^{2+}]$  cytosolique basale et, en parallèle, diminue de façon logique les stocks calciques réticulaires mobilisables par la TG. Ces résultats suggèrent donc une nouvelle fois que TRPV1 serait un canal de fuite fonctionnel du RE.

### 2-3 Mesures des concentrations $\text{Ca}^{2+}$ mitochondriales ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ ): R-GECO et 4mtD3CPV

Comme décrit précédemment, il est connu que se produisent des échanges calciques entre le RE et la mitochondrie via des microdomaines appelés MAMs. Certains récepteurs ou pompes tels que IP3R et SERCA sont impliqués dans les interactions entre ces deux organites. Pour aller plus loin, il est donc intéressant d'évaluer si la modulation de TRPV1, réticulaire, peut avoir un impact sur les échanges calciques RE-mitochondries et donc sur le contenu de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie. Pour ce faire, deux sondes génétiques ont été utilisées : R-GECO et 4mtD3CPV. La première, non ratiométrique, permet de faire des mesures simultanées de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique avec Fura2-AM. 4mtD3CPV est une sonde ratiométrique évaluant le contenu basal de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie.

En effet, la sonde R-GECO ( $K_d = 142 \text{ nM}$ ) est cinq fois plus sensible aux faibles variations de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  mitochondriale que 4mtD3CPV ( $K_d = 0.6 \text{ }\mu\text{M}$ ). R-GECO nous a donc permis de mesurer des variations de  $[\text{Ca}^{2+}]$  après stimulation aigüe avec les agonistes de TRPV1 et 4mtD3CPV nous a permis de mesurer des variations de  $[\text{Ca}^{2+}]$  après des prétraitements avec les molécules pharmacologiques de TRPV1.

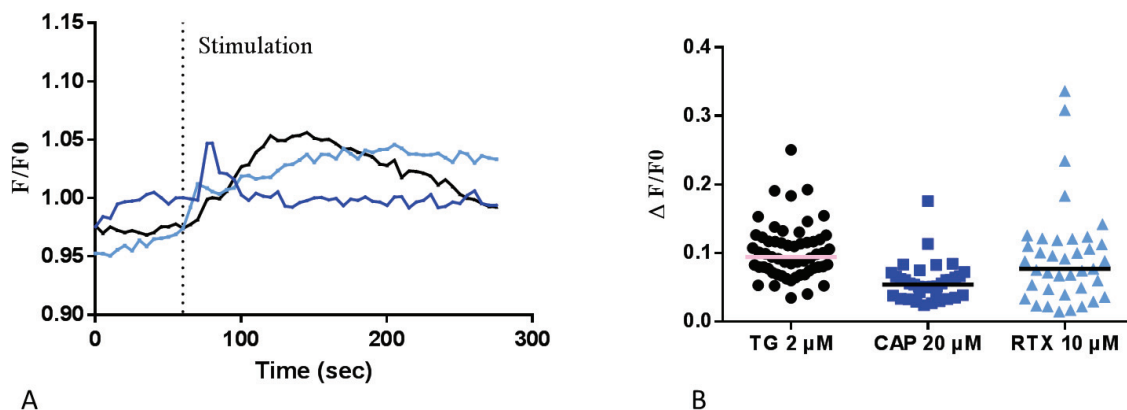
### 2-3-1 R-GECO

- *Effets aigus de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques mitochondriaux.*

Seuls les agonistes de TRPV1 : la CAP et la RTX ont été testés par stimulation sur les cellules H9C2. La figure 64A illustre l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  au cours du temps avec la sonde R-GECO. La molécule de référence contrôlée utilisée au cours de cette expérience est la TG générant une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial lorsque les pompes SERCA sont inhibées (0.09). Le mécanisme est le suivant : la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  augmente dans le cytoplasme, compartiment intermédiaire. Ces ions sont en partie re-pompés par la mitochondrie par la suite.

La figure 64B représente les nuages de points des deltas de réponse de chaque cellule. La stimulation avec la CAP ou la RTX permet une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  mais qui est assez faible (0.05 et 0.08 respectivement). Seule l'activation de la CAP a en effet une différence significative avec la TG. Sur les courbes représentatives (figure 64A), la réponse à la CAP est à peine visible, et transitoire, alors que celle à la RTX est très lente, reflétant la vidange réticulaire. Ces cinétiques sont proches de celles observées lors des mesures du  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire et lors des prétraitements au cours de la mesure du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique.

Cette augmentation transitoire est plus soutenue avec RTX que la CAP. Ceci ressemble à la réponse de la TG : une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie puis une diminution, suggérant que la régulation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  est comme dans le RE. La TG vide les stocks également de façon transitoire d'où une réponse dans la mitochondrie cohérente. Sur la mitochondrie, la vitesse d'entrée est plus rapide que celle de la diminution, comme l'a démontré l'équipe d'Hajnóczky<sup>75</sup>. Nous pensons que la RTX provoque une fuite réticulaire qui est partiellement compensée par les SERCA non inhibées ici, entraînant une réponse plus prolongée alors que la CAP provoque une réponse transitoire et l'entrée de calcium pourrait être compensée par une extrusion mitochondriale.



**Figure 64.** Évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  au cours du temps avec la sonde R-GECO lors d'une stimulation avec la CAP ou la RTX (A) Courbes représentatives de l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  en fonction du temps. La courbe en noir représente les cellules stimulées avec la TG, en bleu foncé avec la CAP 20  $\mu\text{M}$ , et en bleu clair avec RTX 10  $\mu\text{M}$  (B) Nuage de points des différentes conditions : cellules contrôles, stimulées avec la CAP 20  $\mu\text{M}$  et stimulées avec la RTX 10  $\mu\text{M}$ . Les expériences sont effectuées dans du CFB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, aucune différence significative n'a été mesurée entre chaque groupe.

Des prétraitements avec l'agoniste CAP et l'antagoniste CPZ seront effectués sur les cellules H9C2 afin d'évaluer l'effet de plus près de la modulation de TRPV1 sur le contenu de  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial.

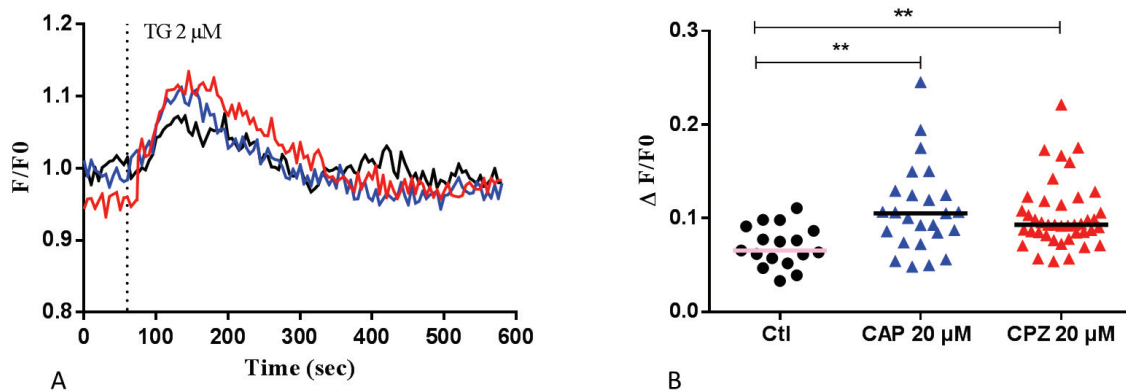
- *Effets à court terme de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques mitochondriaux.*

Comme précédemment, afin d'évaluer l'impact de la modulation à court terme de TRPV1 sur le  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial, les différents agonistes et antagonistes sont incubés avec les cellules 30 minutes avant l'expérience dans du CCB à 37°C. Dans des conditions physiologiques, il existe des échanges finement régulés entre le RE et la mitochondrie. En effet, la mitochondrie est capable de tamponner le  $\text{Ca}^{2+}$  sortant du RE, mais également, en cas de besoin ou de dérégulations la mitochondrie sera capable de libérer de faibles quantités de  $\text{Ca}^{2+}$  pour le RE, notamment démontré dans l'équipe d'Hajnóczky<sup>75,343</sup>.

Le couple CAP/CPZ a été testé. Les données recueillies sont :

- L'amplitude maximale de variation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  obtenue suite à l'ajout d'une substance, ici la thapsigargine (inhibiteur des pompes SERCA) : correspondant comme décrit précédemment à la soustraction du ratio maximal de fluorescence (F/F0) obtenu, soustrait du ratio basal (état de repos).

La figure 65A illustre l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  au cours du temps avec la sonde R-GECO. La TG, utilisée comme contrôle, provoque une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  lorsque les pompes SERCA sont inhibées (0.07). Cette augmentation est significativement amplifiée lorsque les cellules sont prétraitées avec la CAP et la CPZ (0.11 et 0.09 respectivement). Seul le résultat avec la CPZ est cohérent puisqu'inhiber TRPV1 permettrait d'avoir plus de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE au moment de la stimulation avec la TG. En revanche, les stocks réticulaires devraient être partiellement diminués lors d'un prétraitement avec la CAP et donc nous devrions observer une diminution de l'amplitude de réponse à la TG au niveau mitochondrial.



**Figure 65.** Évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  (R-GECO) lors d'un prétraitement avec la CAP ou la CPZ.

(A) Courbes représentatives de l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  en fonction du temps. La courbe en noir représente les cellules contrôles, en bleu foncé avec les cellules prétraitées avec la CAP 20 μM, et en rouge avec CPZ 20 μM (B) Nuage de points des différentes conditions : cellules contrôles, prétraitées avec la CAP 20 μM ou prétraitées avec la CPZ 20 μM. Les expériences sont effectuées dans du CFB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, les différences significatives sont indiquées lorsque la p value est inférieure à 0,05. \*\* à une p value < 0.01.

Dans cette partie, seul un couple a été étudié CAP et CPZ. La perspective est donc de compléter cette série d'expérience avec le second couple RTX et iRTX, mais également de tester les deux binômes agoniste/antagoniste. Nous souhaitons en revanche, vérifier si la modulation de TRPV1 a un impact sur



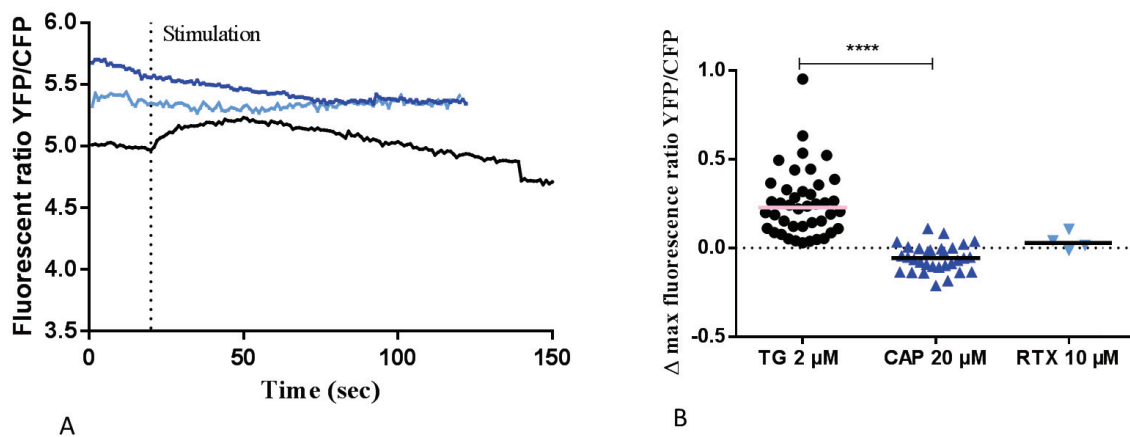
le contenu basal de  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial. La seconde partie de la mesure de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  utilise la sonde 4mtD3CPV, qui a l'avantage d'être ratiométrique, permettant d'évaluer le contenu basal de  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial.

### 2-3-2 4mtD3CPV

- *Effets aigus de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques mitochondriaux.*

Comme l'illustrent les figures 66A et 66B, les stimulations avec la CAP 20  $\mu\text{M}$  et la RTX 10  $\mu\text{M}$  ne permettent pas de visualiser une augmentation de la concentration  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondriale contrairement à la thapsigargine. Comme l'indique le nuage de points, la TG permet de visualiser une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ , transitoire également, avec un delta de fluorescence d'environ 0.23 alors que les moyennes des deltas de réponse pour la CAP et la RTX sont proches de 0 (-0.05 et 0.02 respectivement). Par conséquent, les antagonistes n'ont pas été testés dans ces conditions. Ces résultats sont en cohérence avec ceux obtenus avec la première sonde calcique mitochondriale (R-GECO) testée.

Malheureusement, aucune réponse n'a été enregistrée après stimulation directe avec les agonistes respectifs de TRPV1, suggérant que les différentes sondes testées (R-GECO et 4mtD3CPV) ne sont pas des outils optimaux pour mesurer les effets de fines libérations de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme et leurs conséquences sur la mitochondrie. Ceci peut également être expliqué par le fait que TRPV1 n'est pas exprimé dans la mitochondrie et qu'en « aigu » il n'a aucun effet sur la concentration calcique mitochondriale globale. C'est pourquoi, nous avons évalué l'effet des molécules pharmacologiques appliquées sur un temps court sur la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  basale.



**Figure 66.** Évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  au cours du temps avec la sonde 4mtD3CPV.

(A) Courbes représentatives de l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  en fonction du temps. La courbe en noir représente les cellules stimulées avec la TG, en bleu foncé avec la CAP 20  $\mu\text{M}$ , et en bleu clair avec RTX 10  $\mu\text{M}$  (B) Nuage de points des différentes conditions : cellules contrôles, stimulées avec la CAP 20  $\mu\text{M}$  et stimulées avec la RTX 10  $\mu\text{M}$ . Les expériences sont effectuées dans du CFB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, les différences significatives sont indiquées lorsque la p value est inférieure à 0,05. \*\*\*\* à une p value < 0.0001.

- *Effets à court terme de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques mitochondriaux.*

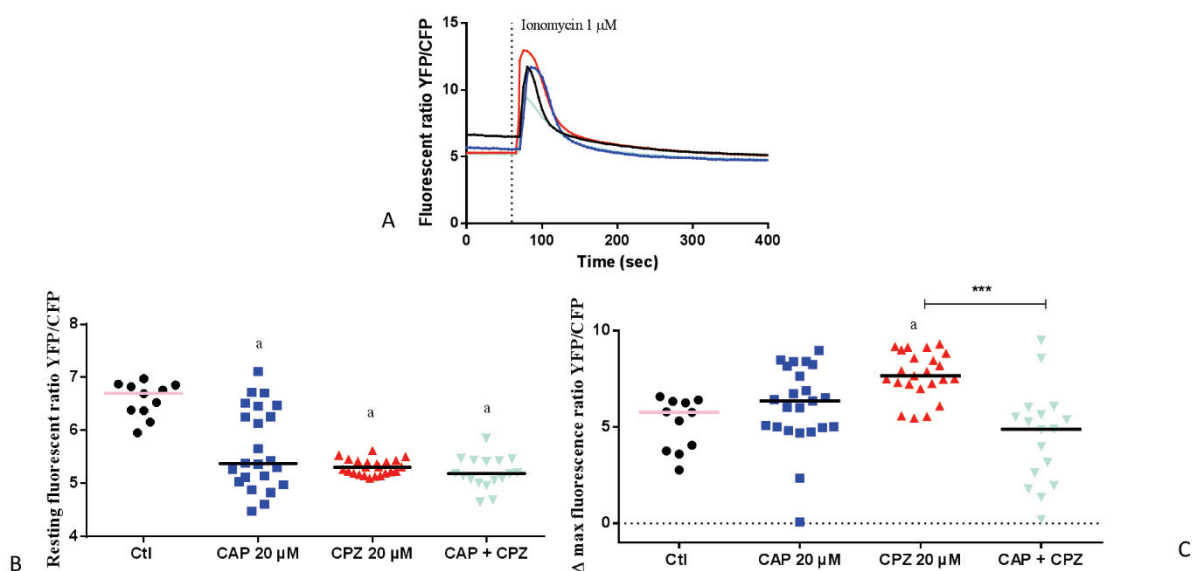
Dans un premier temps, le couple CAP/CPZ a été testé. Les données recueillies sont :

- La  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  à l'état de repos : correspondant à la moyenne du signal avant stimulation.

- L'amplitude maximale de variation de  $[Ca^{2+}]_{mito}$  obtenue suite à l'ajout d'une substance, ici la ionomycine (ionophore) : correspondant comme décrit précédemment à la soustraction du ratio maximal de fluorescence (YFP/CFP) obtenu, moins le ratio basal (état de repos).

La figure 67A montre l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_{mito}$  en fonction du temps. Les cellules H9C2 sont prétraitées 30 minutes avant l'expérience dans du CCB avec la CAP, la CPZ ou les deux en même temps. La figure 67B illustre le contenu en  $Ca^{2+}$  mitochondrial avant la stimulation avec l'ionomycine (6.7). Les trois prétraitements diminuent significativement la  $[Ca^{2+}]_{mito}$  (5.37, 5.31 et 5.18 respectivement). Ces résultats sont assez étranges puisque les trois prétraitements ont les mêmes effets. Comme décrit précédemment, il existe une régulation de la concentration de  $Ca^{2+}$  entre le RE et la mitochondrie. C'est pourquoi, nous pensons, qu'une modulation du stock de  $Ca^{2+}$  dans le RE a un impact direct sur les stocks de  $Ca^{2+}$  dans la mitochondrie. La modulation du  $Ca^{2+}$  réticulaire, via les prétraitements de CAP, CPZ et les deux en même temps, pourrait par conséquent diminuer la concentration basale de  $Ca^{2+}$  dans la mitochondrie. En effet dans la partie 2-2.1, nous n'avons pas observé de diminution de la  $[Ca^{2+}]$  réticulaire basale avec les traitements CAP et CPZ, probablement compensé par la mitochondrie. Ceci expliquerait donc la diminution observée ici. En revanche, la CAP et la CPZ donnent des résultats identiques, probablement expliqué par une non spécificité des molécules.

La figure 67C illustre le delta de réponse après stimulation avec la ionomycine (5.8). Lorsque les cellules sont prétraitées avec la CPZ, l'amplitude de réponse à la ionomycine est augmentée significativement (7.66). Enfin, lorsque les deux drogues sont incubées en même temps, l'amplitude de réponse est significativement diminuée (4.90) par rapport aux cellules CPZ. Ici, contrairement aux résultats précédents, la ionomycine est utilisée pour stimuler la libération de  $Ca^{2+}$ . En effet, avec la sonde 4mtD3CPV, nous n'avons mesurée aucune libération de  $Ca^{2+}$  après stimulation avec la TG ( $K_d = 0.6 \mu M$ ). La ionomycine, étant un ionophore, va permettre d'estimer le contenu global de  $Ca^{2+}$  dans la cellule, et notamment dans la mitochondrie.



**Figure 67.** Évolution de la  $[Ca^{2+}]_{mito}$  lors d'un prétraitement avec CAP, CPZ ou les deux en même temps.

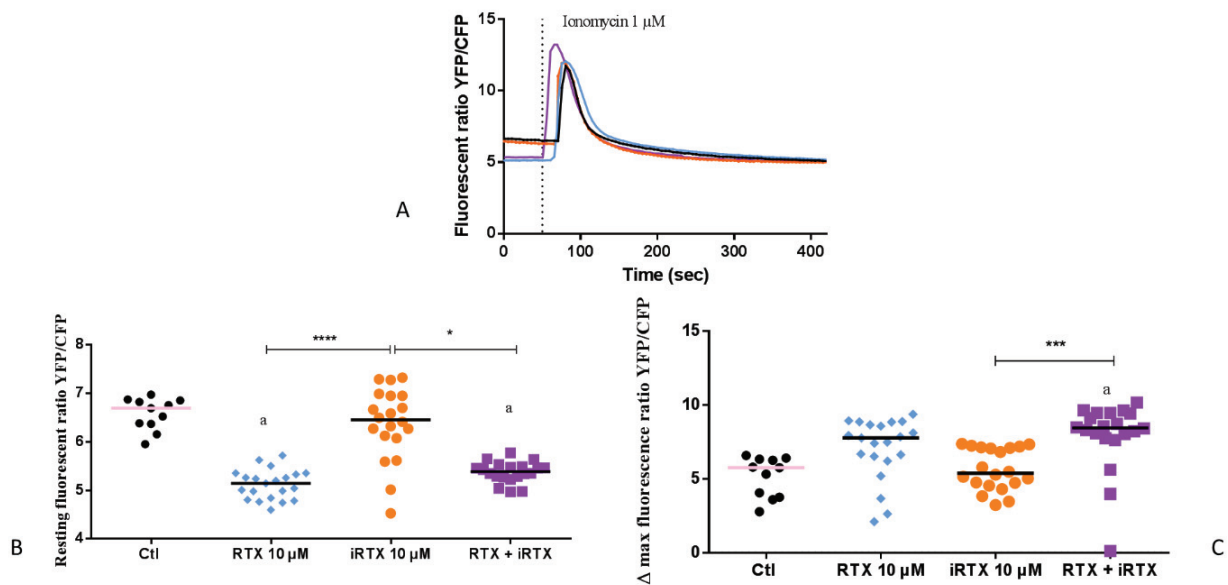
(A) Courbes représentatives de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_{mito}$  en fonction du temps. La courbe en noir représente les cellules contrôles, en bleu foncé avec les cellules prétraitées avec la CAP 20  $\mu M$ , en rouge avec CPZ 20  $\mu M$  et en vert avec les deux drogues en même temps (B) Nuage de points des resting de fluorescence (YFP/CFP). (C) Nuage de points des amplitudes maximales de réponse induite par la stimulation ionomycine (1  $\mu M$ ). Les expériences sont effectuées dans du CCB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, les différences significatives sont indiquées lorsque la p value est inférieure à 0,05. \*\* équivaut à une p value inférieure à 0,01. a signifie différent des contrôles.



L'augmentation de la réponse à la ionomycine après le prétraitement CPZ est expliquée par une plus grande quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule, pouvant provenir notamment du RE ou de la mitochondrie. En effet, TRPV1 étant un canal de fuite calcique, la CPZ permettrait d'augmenter les stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum, bien que nous n'ayons pas vu d'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  réticulaire en basal et après stimulation avec la TG.

Enfin, le couple RTX/iRTX a été testé. La figure 68A montre l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  en fonction du temps. Les cellules H9C2 sont prétraitées 30 minutes avant l'expérience dans du CCB avec la RTX, la iRTX ou les deux conjointes, à 37°C. La figure 68B illustre le contenu en  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial avant la stimulation avec l'ionomycine (6.7). Les prétraitements RTX +/- iRTX diminuent significativement la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  basale (5.14 et 5.39 respectivement) par rapport aux cellules contrôles. Ces résultats indiquent qu'un prétraitement avec la RTX entraîne une vidange du  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire. La RTX provoque en aigu une accumulation de calcium mitochondrial, que nous avons observé avec la sonde précédente (R-GECO). En chronique, RTX vide les stocks calciques intracellulaire, d'où moins de calcium mitochondrial.

La figure 68C illustre le delta de réponse après stimulation avec la ionomycine (5.8). Seul le prétraitement avec la CAP et la CPZ en même temps augmente significativement par rapport aux contrôles (8.44).



**Figure 68.** Évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  lors d'un prétraitement avec RTX, iRTX ou les deux en même temps.

(A) Courbes représentatives de l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  en fonction du temps. La courbe en noir représente les cellules contrôles, en bleu clair avec les cellules prétraitées avec la RTX 10  $\mu\text{M}$ , en orange avec iRTX 10  $\mu\text{M}$  et en violet avec les deux drogues en même temps (B). Nuage de points des resting de fluorescence (YFP/CFP). (C) Nuage de points des amplitudes maximales de réponse induite par la stimulation ionomycine (1  $\mu\text{M}$ ). Les expériences sont effectuées dans du CCB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, les différences significatives sont indiquées lorsque la p value est inférieure à 0,05. \* équivaut à une p value inférieure à 0,05, \*\* à une p value < 0.01. a signifie différent des contrôles.

En conclusion de cette partie, l'activation de TRPV1 par ses agonistes respectifs entraîne une diminution de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  basale. En revanche, nous n'observons pas de différences sur l'amplitude de réponse à la ionomycine. Les antagonistes, quant à eux, ont des résultats plus compliqués à expliquer. La CPZ diminue la  $[\text{Ca}^{2+}]$  basale mais augmente l'amplitude de réponse à la ionomycine. La iRTX n'a aucun effet significatif sur la modulation du calcium mitochondrial. Nous avons montré que la modulation de

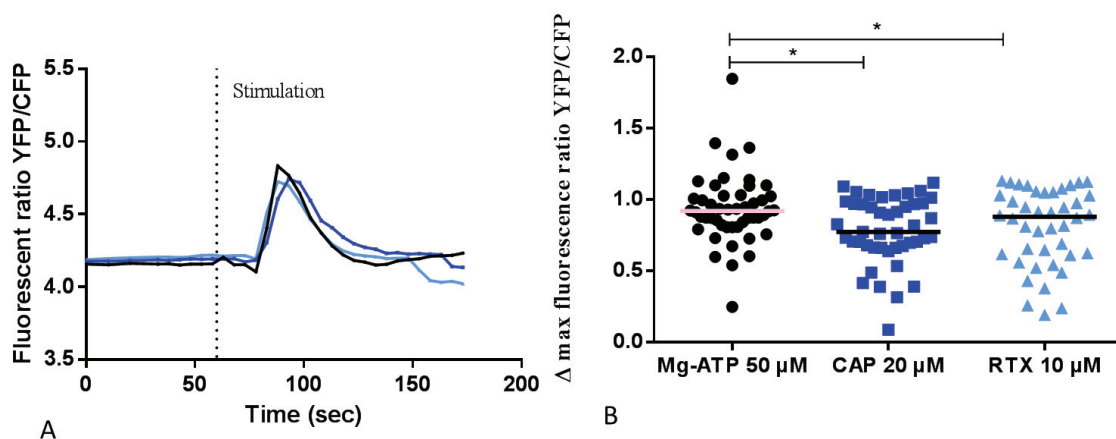
TRPV1 a un réel impact sur le contenu en  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie. Par conséquent, nous allons vérifier si cette modulation passe par les MAMs.

## 2-4 Mesures des concentrations du $\text{Ca}^{2+}$ dans les hot spot mitochondriaux ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{hot spot}}$ ) : N33D1cpv

Au sein du laboratoire, nous avons récemment obtenu le plasmide N33D1cpv. La gamme de sensibilité du N33D1cpv est compatible avec les concentrations calciques présentes au niveau des « hot spots », c'est-à-dire des microdomaines cytosoliques présents à proximité de la membrane externe mitochondriale. Les concentrations calciques à ce niveau peuvent atteindre 15 à 20  $\mu\text{M}$ . Nous ne pouvons pas exclure que TRPV1 soit présent au niveau des MAMs. Une libération de calcium réticulaire, via TRPV1, peut passer complètement inaperçue au niveau du cytoplasme de manière globale, mais pourrait être détectable localement au niveau des hot spots calciques.

### 2-4-1 Effets aigus de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques dans les hot spots mitochondriaux

Afin de comparer les différentes expériences entre elles, dans un premier temps, les cellules sont stimulées en aigu avec les agonistes de TRPV1 : CAP et RTX. La figure 69A illustre l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{hot spot}}$  au cours du temps avec la sonde N33D1cpv. La figure 69B indique que l'activation de TRPV1 provoque la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les hot spots mitochondriaux. Nous avons utilisé comme contrôle, l'ATP qui induit, via une cascade de signalisation, une ouverture des récepteurs à l'IP<sub>3</sub>, connus pour être localisés au sein des MAMs. L'ATP, comme la CAP et la RTX faible (0.91, 0.77 et 0.87 respectivement) provoquent une augmentation transitoire de la concentration calcique cytosolique au sein des Hot spots. Les réponses obtenues sont transitoires. En effet, la libération de calcium réticulaire provoque son accumulation au sein des microdomaines qui sera par la suite absorbé par les mitochondries, repompé par les SERCA et diffusé dans le cytoplasme. Ces mesures indiquent donc que TRPV1 est bien un canal de fuite calcique réticulaire fonctionnel. La libération de calcium cytosolique n'est détectable, avec les moyens techniques à notre disposition, uniquement dans les microdomaines mitochondriaux, probablement les MAMs. Le calcium libéré, en concentration importante, pourra être absorbé par l'organite, provoquant ainsi une hausse de la concentration calcique mitochondriale.



**Figure 69.** Évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{hot spot}}$  au cours du temps avec la sonde N33D1cpv.

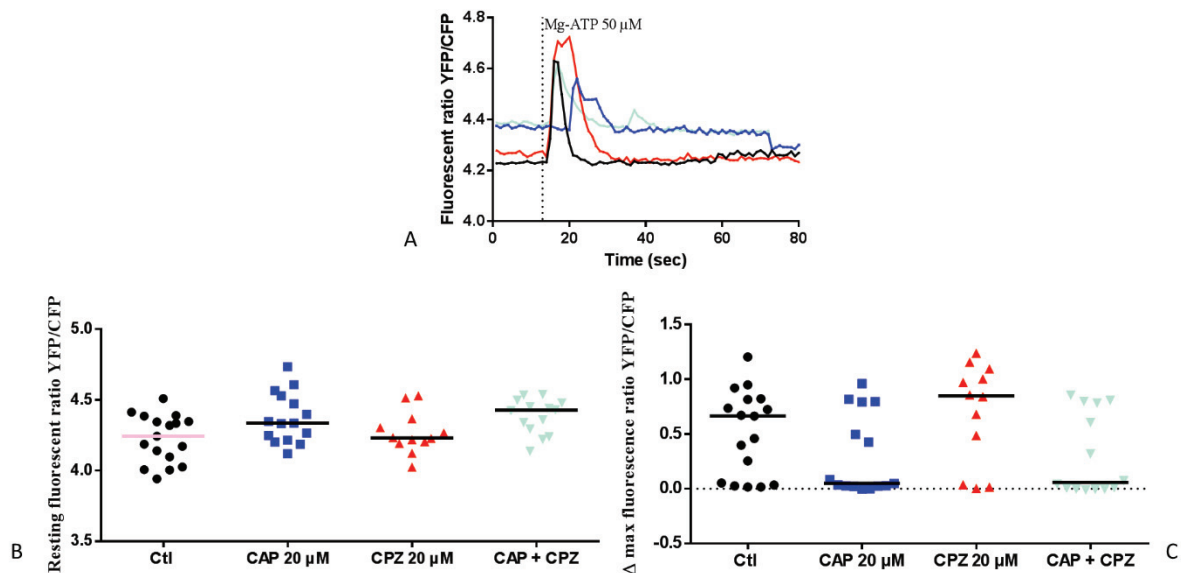
(A) Courbes représentatives de l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{hot spot}}$  en fonction du temps. La courbe en noir représente les cellules stimulées avec l'ATP, en bleu foncé avec la CAP 20  $\mu\text{M}$ , et en bleu clair avec RTX 10  $\mu\text{M}$  (B) Nuage de points des différentes conditions : cellules contrôles, stimulées avec la CAP 20  $\mu\text{M}$  et stimulées avec la RTX 10  $\mu\text{M}$ . Les expériences sont effectuées dans du CFB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, les différences significatives sont indiquées lorsque la p value est inférieure à 0,05. \* à une p value < 0,05.

## 2-4-2 Effets à court terme de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques dans les hot spots mitochondriaux

Enfin, afin d'être en accord avec ce qui a été fait précédemment et les prétraitements qui seront effectués pour les séquences d'hypoxie-réoxygénation. Les agonistes, antagonistes ou les deux combinés ont été incubés avec les cellules dans du CCB pendant 30 minutes, avant l'expérience à 37°C. Dans un premier temps, le couple CAP/CPZ a été testé. Les données recueillies sont :

- La  $[Ca^{2+}]_{hot\ spot}$  à l'état de repos : correspondant à la moyenne du signal avant stimulation.
- L'amplitude maximale de variation de  $[Ca^{2+}]_{mito}$  obtenue suite à l'ajout d'une substance, ici la ionomycine (ionophore) : correspondant comme décrit précédemment à la soustraction du ratio maximal de fluorescence (YFP/CFP) obtenu, moins le ratio basal (état de repos).

La figure 70A représente l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_{hot\ spot}$  en fonction du temps. Les cellules H9C2 sont prétraitées 30 minutes avant l'expérience dans du CCB avec la CAP, la CPZ ou les deux en même temps. La figure 70B illustre le contenu en  $Ca^{2+}$  dans les hot spots mitochondriaux avant la stimulation avec le Mg-ATP (4.24).



**Figure 70.** Évolution de la  $[Ca^{2+}]_{hot\ spot}$  lors d'un prétraitement avec CAP, CPZ ou les deux en même temps

(A) Courbes représentatives de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_{hot\ spot}$  en fonction du temps. La courbe en noir représente les cellules contrôles, en bleu clair avec les cellules prétraitées avec la CAP 10 μM, en orange avec CPZ 10 μM et en violet avec les deux drogues en même temps (B). Nuage de points des resting de fluorescence (YFP/CFP) (C) Nuage de points des amplitudes maximales de réponse induite par la stimulation Mg-ATP (50 μM). Les expériences sont effectuées dans du CCB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, aucune différence significative n'a été mesurée entre chaque groupe.

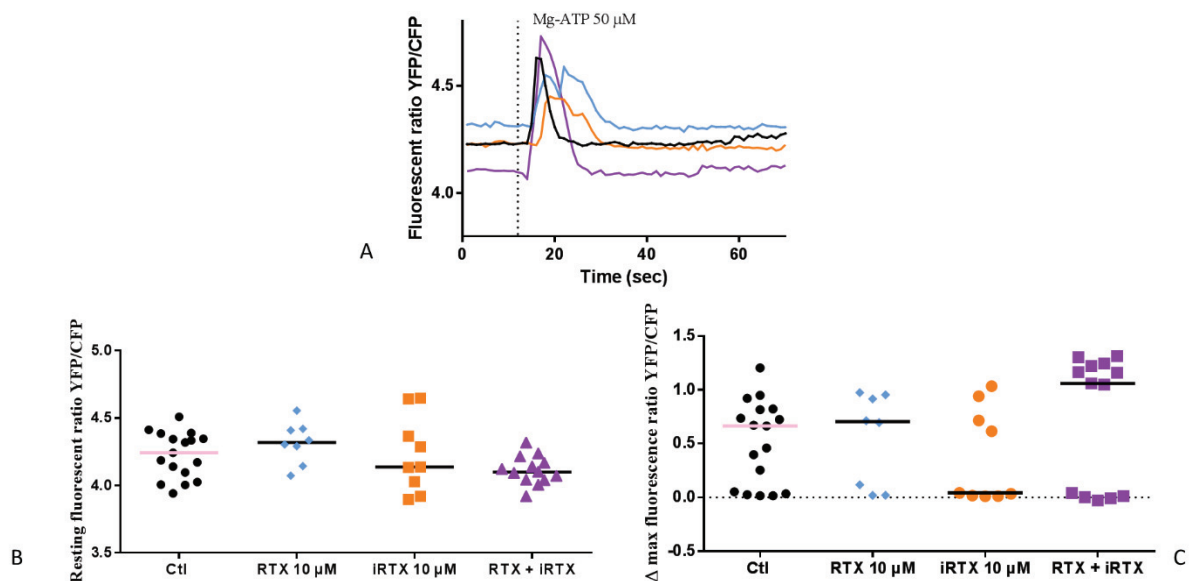
Les trois prétraitements ne modifient pas le contenu de  $Ca^{2+}$  dans les hot spots mitochondriaux, à la fois sur le contenu basal (4.33, 4.23 et 4.43 respectivement) et sur l'amplitude de réponse à l'ATP (0.05, 0.85 et 0.06 respectivement). Ces résultats indiquent que les prétraitements réalisés avec le couple CAP/CPZ n'ont pas d'effets significatifs sur le contenu des stocks calciques réticulaires IP3 sensibles à proximité des hot spots mitochondriaux. Ces résultats sont à pondérer car il semble qu'il co-existe 2 populations de cellules : répondantes et non-répondantes à l'ATP. Il sera intéressant de réaliser une

analyse séparée de ces 2 populations et de déterminer la proportion respective de chacune de ces sous-populations.

Nous avons naturellement testé les effets de l'autre binôme de molécules RTX/iRTX. Les résultats obtenus sont illustrés ci-dessous.

La figure 71A montre l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_{hot\ spot}$  en fonction du temps. Les cellules H9C2 sont prétraitées 30 minutes avant l'expérience dans du CCB avec la RTX, la iRTX ou les deux en même temps à 37°C. La figure 71B illustre le contenu en  $Ca^{2+}$  dans les hot spots mitochondriaux avant la stimulation avec l'ATP (4.24). Les trois prétraitements avec la RTX et la iRTX, de façon indépendante, et les deux en même temps ne modifient pas le contenu de  $Ca^{2+}$  dans les hot spots mitochondriaux (4.32, 4.14 et 4.10 respectivement). La figure 71C illustre le delta de réponse après stimulation avec le Mg-ATP (0.66). Les trois prétraitements avec la CAP et la CPZ, de façon indépendante, et les deux en même temps ont tendance à augmenter significativement par rapport aux contrôles (0.70, 0.04 et 1.05 respectivement). Globalement, ces résultats montrent que les prétraitements avec le couple RTX/iRTX n'a pas d'effet sur le contenu en  $Ca^{2+}$  dans les hot spots mitochondriaux (ni en resting, ni en delta). Notons que dans cette série d'expériences comme dans la précédente, les données semblent être réparties en 2 sous-populations.

La stimulation en aigu avec les agonistes de TRPV1 a un réel impact sur la  $[Ca^{2+}]_{hot\ spot}$ . En revanche, les différents prétraitements ne modifient pas significativement la libération de  $Ca^{2+}$  liée à l'ATP.



**Figure 71.** Évolution de la  $[Ca^{2+}]_{hot\ spot}$  lors d'un prétraitement avec RTX, iRTX ou les deux en même temps

(A) Courbes représentatives de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_{hot\ spot}$  en fonction du temps. La courbe en noir représente les cellules contrôles (réponse Mg-ATP 50 μM), en bleu clair avec les cellules prétraitées avec la RTX 10 μM, en orange avec iRTX 10 μM et en violet avec les deux drogues en même temps (B). Nuage de points des resting de fluorescence (YFP/CFP) (C) Nuage de points des amplitudes maximales de réponse induite par la stimulation Mg-ATP (50 μM). Les expériences sont effectuées dans du CCB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, aucune différence significative n'a été mesurée entre chaque groupe.

Ces résultats sont inattendus mais intéressants. En effet, cela signifie que l'activation ou l'inhibition de TRPV1 ne module pas significativement le contenu des stocks calciques réticulaires IP3 sensibles (ni en basal, ni en amplitude). La fuite calcique ou l'absence de fuite via TRPV1 doit probablement être contrebalancée par une modulation de l'activité des SERCAs afin de maintenir un stock calcique global

identique. L'intérêt pratique de cela est que la fuite calcique via TRPV1 « passe inaperçue » au niveau cytosolique et au niveau réticulaire. Si l'on extrapole ces résultats aux cardiomyocytes primaires (voir le paragraphe « discussion »), la modulation de TRPV1 n'aurait pas d'impact sur les mécanismes calcium-dépendants du couplage excitation-contraction. Cela fait donc de TRPV1 une cible privilégiée dans le domaine de la cardioprotection.

## 2-5 Conclusion des effets aigus et à court terme de la modulation pharmacologique de TRPV1 sur les stocks calciques intracellulaires

Pour conclure la partie sur la dynamique calcique dans les différents compartiments, nous avons montré que TRPV1 est un canal de fuite réticulaire fonctionnel à la membrane du RE. En effet, l'application des agonistes de TRPV1 : la CAP et la RTX entraîne une vidange de la  $[Ca^{2+}]$  réticulaire. Cette diminution est en partie abolie lorsque les antagonistes respectifs sont pré-incubés dans les cellules H9C2. Ceci nous montre que les molécules pharmacologiques sont bien spécifiques du canal TRPV1. Par la suite, nous avons mesuré l'évolution de la  $[Ca^{2+}]$  dans le cytoplasme, la mitochondrie et dans les hot spots mitochondriaux. Nous avons montré que l'application directe des agonistes de TRPV1 n'induit pas de modulation de la concentration de  $Ca^{2+}$  cytoplasmique. En revanche, cette activation entraîne une augmentation de  $Ca^{2+}$  dans la mitochondrie et dans les hot spots mitochondriaux.

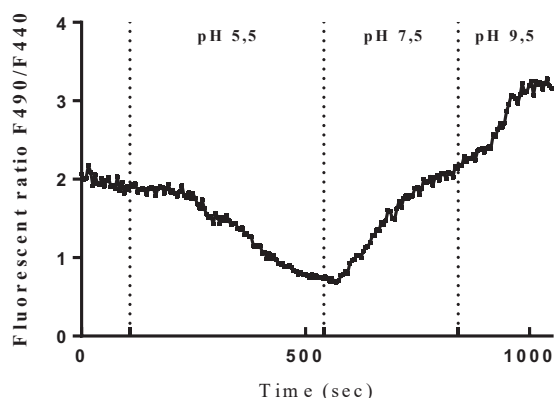
En parallèle, nous avons effectué des prétraitements sur les cellules H9C2 avec les différentes molécules pharmacologiques modulant TRPV1. Nous avons globalement montré que la CAP et la CPZ en chronique entraîne des réponses similaires malgré qu'elles aient des effets différents (agoniste vs antagoniste). Ceci nous laisse suggérer que ces deux molécules ont des effets aspécifiques. En revanche, nous avons montré que la modulation de TRPV1 par la RTX et la iRTX ont des effets contraires, et ces molécules permettent une modulation de la concentration du  $Ca^{2+}$  cytoplasmique, mitochondriale et dans les hot spots mitochondriaux. Les résultats obtenus dans cette partie sont synthétisés dans le tableau 33 et seront discutés dans la partie « discussion ».

## 2-6 Mesure du pH intracellulaire des cellules H9C2

Il est connu que TRPV1 est un canal activé par l'acidose, or au cours de l'hypoxie, le pH a tendance à diminuer (pH proche de 6,4 dans le cœur). Dans cette partie, nous avons voulu suivre le pH au cours de l'hypoxie dans les cellules H9C2 afin de savoir si ce dernier était suffisamment acide pour activer TRPV1. Deux sondes ont été utilisées afin d'évaluer le pH intracellulaire : BCECF et SNARF-5F.

### **2-6-1 BCECF**

La sonde BCECF est calibrée comme détaillée dans la partie « matériels et méthodes ». Les pH utilisés sont 5.5, 7.5 et 9.5. La ionomycine est utilisée comme ionophore calcique. La figure 72 illustre la variation du pH intracellulaire en fonction des différentes solutions perfusées.



**Figure 72.** Évolution du pH intracellulaire en fonction du temps avec la sonde BCECF.

Courbes représentatives de l'évolution du pH intracellulaire en fonction du temps. La courbe représente les cellules contrôles. Le signal est stabilisé pendant quelques secondes, puis les cellules sont en contact avec un pH de 5,5 et un ionophore (la ionomycine). Une fois que le signal est stable un pH de 7,5 est perfusé sur les cellules, puis un pH de 9,5.

Par la suite, la sonde a été utilisée au cours d'une hypoxie/réoxygénation au microscope. Malheureusement, le pH n'a pas varié au cours de cette séquence (30 minutes d'hypoxie), expliqué par une durée d'hypoxie probablement trop courte. Ceci est probablement dû à une incompatibilité de séquence pour la microscopie. En effet, il est compliqué de faire des séquences de 4h50 d'hypoxie suivie de 2h de réoxygénation au microscope. Une seule condition prendrait au moins 7 heures d'acquisition, sans compter les temps de mise au point. Il serait donc difficile de faire plusieurs conditions sur la même journée d'expérience. La séquence alternative serait donc de 30 minutes d'hypoxie suivie de 30 minutes de réoxygénation, avec un ajout de dithionite de sodium dans le milieu d'hypoxie.

La dithionite de sodium (aussi appelé hydrosulfite de sodium) est utilisée comme un agent réducteur de l'oxygène et permet d'avoir une hypoxie, voire plutôt même une anoxie de façon très rapide. En revanche, la sonde BCECF semble être sensible à cette molécule et cela fait varier les deux longueurs d'onde. Par conséquent, nous allons tester une autre sonde chimique permettant de mesurer le pH intracellulaire.

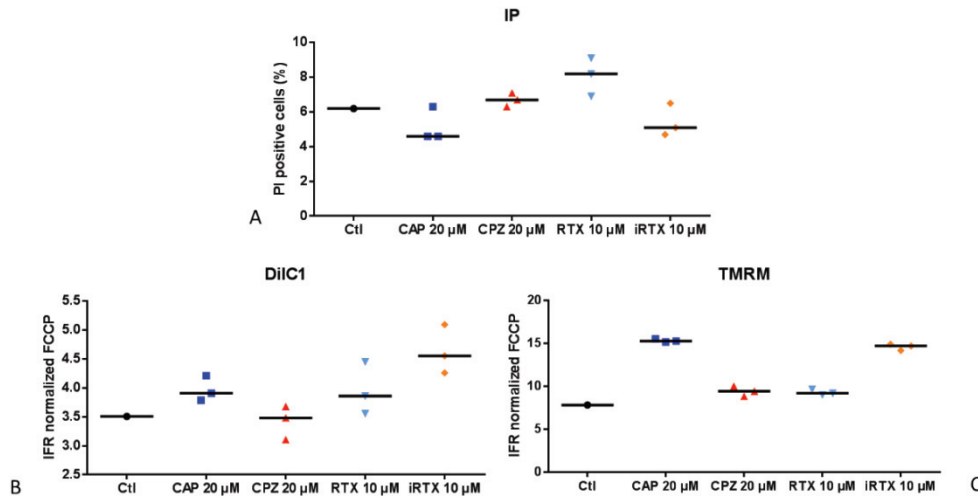
### 2-6-2 SNARF-5F

Afin de s'affranchir de la sensibilité de la sonde BCECF à la dithionite, nous avons testé une nouvelle sonde permettant de suivre le pH intracellulaire : SNARF-5F. Comme pour la sonde BCECF, SNARF-5F semble être sensible à la dithionite de sodium et cela fait également varier les deux longueurs d'onde d'émission de la sonde.

Malheureusement, aucune des deux sondes ne nous a permis d'évaluer le pH intracellulaire au cours de l'hypoxie dans les cellules H9C2. La prochaine stratégie sera d'utiliser une sonde génétique : CytoSYNHER que nous possédons au laboratoire.

## 2-7 Mesure du potentiel de membrane et de la mortalité cellulaire suite à un traitement à court terme visant TRPV1

Dans le but d'évaluer l'effet du prétraitement de 30 minutes sur le potentiel de membrane et la mortalité cellulaire, les cellules sont incubées avec les quatre drogues, de façon indépendante. Le potentiel de membrane est évalué par TMRM et DilC1. La mortalité cellulaire est mesurée grâce à l'iodure de propidium (IP) par cytométrie en flux.



**Figure 73.** Mesure de la mortalité cellulaire et du potentiel de membrane mitochondrial après incubation de 30 minutes avec les différentes molécules pharmacologiques modulant TRPV1.

(A) Mesure de la mortalité cellulaire par propidium iodide, les point correspondent aux cellules positives au IP. (B) et (C) Mesure du potentiel de membrane mitochondrial avec les sondes DilC1 et TMRM respectivement. Les données sont normalisées par FCCP. L'incubation se fait dans du milieu de culture complet, à 37°C, dans un incubateur à CO<sub>2</sub>. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, aucune différence significative n'a été mesurée entre chaque groupe.

Comme l'illustre la figure 73, les prétraitements avec les quatre molécules pharmacologiques n'ont pas d'effet sur la mortalité cellulaire ni sur le potentiel de membrane. Ces résultats sont rassurants puisque nous ne nous attendions pas à avoir des effets sur ces paramètres. Nous avons utilisé deux marqueurs de potentiel de membrane puisque le TMRM (gold standard) est incompatible avec l'IP.



### 3- Effets de la modulation de TRPV1 sur la mortalité des cellules H9C2 après une séquence d'hypoxie-réoxygénation

Afin de s'approcher, *in vitro*, des mécanismes mis en jeu *in vivo*, ou en clinique humaine, lors des événements d'ischémie/reperfusion, nous avons soumis les cellules H9C2 à des séquences d'hypoxie-réoxygénation. Au sein du laboratoire, cette séquence complète a déjà été mise au point sur notre modèle cellulaire. L'hypoxie, d'une durée de 4h50 où l'oxygène est réduit à 0,5%, est suivie de 2 heures de reperfusion.

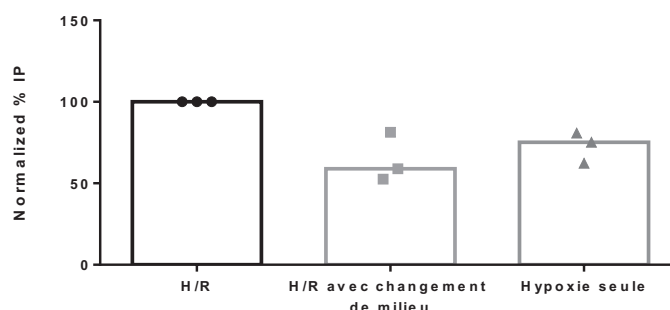
Les cellules vont subir différents conditionnements (PréC, PostC et PerC) avec les quatre molécules pharmacologiques précédemment utilisées dans le but d'évaluer la mortalité cellulaire après une séquence d'H/R. La figure 40 dans la section « matériels et méthodes » illustre ces différents types de conditionnement.

Ces molécules seront employées aux mêmes concentrations que préalablement, soit 20  $\mu$ M pour CAP et CPZ et 10  $\mu$ M pour RTX et iRTX. Le PréC est d'une durée de 30 minutes avant la séquence complète, le PostC est effectué au moment de la réoxygénation et le PerC est appliqué pendant toute la séquence d'hypoxie/réoxygénation. La mortalité cellulaire est évaluée par iodure de propidium en cytométrie en flux et est normalisée à 100% en fonction des contrôles hypoxiques de la journée d'expérience.

#### 3-1 Effet du changement de milieu au moment de la reperfusion et du véhicule : DMSO

Dans un premier temps, quelques contrôles sont effectués afin d'être sûrs de la séquence utilisée. Les temps d'hypoxie et de réoxygénation ne sont pas modifiés mais l'effet de l'hypoxie seule est évalué ainsi que l'effet du changement de milieu à la réoxygénation.

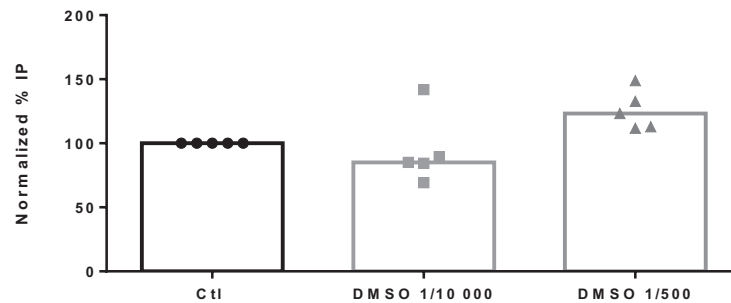
Comme l'indique la figure 74, l'hypoxie seule permet d'avoir 72% de mortalité par rapport à la séquence complète. En effet, comme détaillé dans la littérature, la reperfusion va également entraîner un rebond de la mortalité cellulaire, ce qui est vérifié dans notre modèle. De plus, le fait de changer le milieu des cellules au moment de la reperfusion entraîne une diminution de la mortalité cellulaire. Ceci signifie que les cellules, au cours de l'hypoxie, vont sécréter des facteurs circulants qui une fois rincés ne seront plus dans le milieu et ne permettront pas de participer aux lésions de reperfusion. Également, lorsque le milieu est changé, des cellules mortes ou en souffrance peuvent être enlevées. Ces contrôles sont donc essentiels à la compréhension et à l'interprétation des résultats obtenus par la suite.



**Figure 74.** Effet d'un changement de milieu au moment de la reperfusion et de l'hypoxie seule sur la mortalité cellulaire après une séquence d'hypoxie/réoxygénation.

Les valeurs représentées ont été normalisées par rapport aux contrôles obtenus à chaque expérience indépendante. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, aucune différence significative n'a été mesurée entre chaque groupe.

Enfin, les molécules pharmacologiques utilisées au cours de cette étude sont diluées dans du DMSO (diméthylsulfoxyde). L'effet du véhicule seul a donc été évalué au cours de la séquence complète d'hypoxie/réoxygénation. Les données obtenues sont illustrées sur la figure 75.



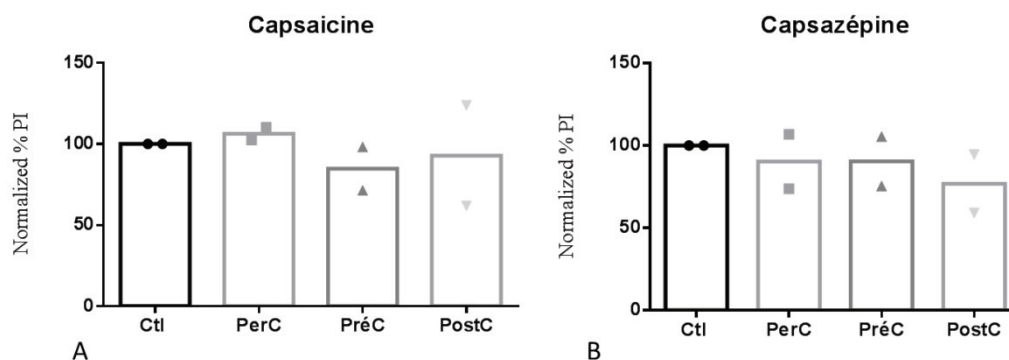
**Figure 75.** Effet du véhicule (DMSO) sur la mortalité cellulaire après une séquence d'hypoxie/réoxygénation.

Les valeurs représentées ont été normalisées par rapport aux contrôles obtenus à chaque expérience indépendante. Chaque expérience a été répétée cinq fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, aucune différence significative n'a été mesurée entre chaque groupe.

Comme l'illustre la figure 75, aucune différence significative n'a été obtenue entre les contrôles et les deux concentrations testées pour le véhicule : 1/10 000 et 1/500. La première concentration correspond à la dilution pour le couple CAP/CPZ et la seconde correspond à celle employée pour le RTX/iRTX. Ceci nous indique que le DMSO n'a aucun effet sur la mort cellulaire au cours d'une hypoxie/réoxygénation.

### 3-2 Modulation de TRPV1 au cours de la normoxie

Les contrôles normoxiques seront détaillés dans cette partie (figure 76). Je ne les détaillerai pas dans les 4 parties suivantes. Les cellules H9C2 sont donc conditionnées de la même manière à celles qui subiront une séquence d'hypoxie/réoxygénation exception faite qu'elles seront dans du milieu complet et dans un incubateur à CO<sub>2</sub>.



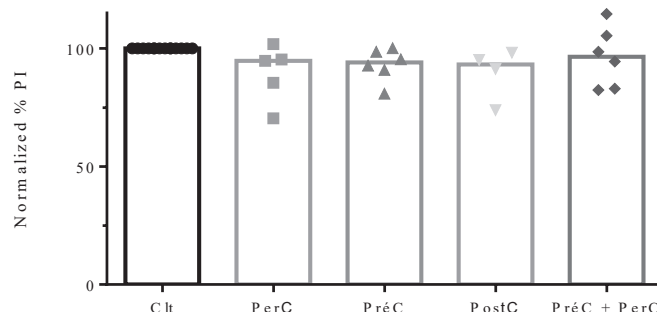
**Figure 76.** Effet de l'incubation de la CAP et la CPZ au cours de la normoxie sur la mortalité cellulaire après une séquence d'hypoxie/réoxygénation.

Les valeurs représentées ont été normalisées par rapport aux contrôles obtenus à chaque expérience indépendante. Chaque expérience a été répétée deux fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, aucune différence significative n'a été mesurée entre chaque groupe.

Ces contrôles indiquent que la CAP et la CPZ n'ont pas d'effet sur la mortalité cellulaire au cours de la normoxie. Les effets démontrés dans les parties suivantes seront de ce fait uniquement dus à l'hypoxie-réoxygénation et aux différents conditionnements.

### 3-3 Effet du conditionnement avec la capsaïcine

Dans un premier temps, le conditionnement a été testé avec la CAP à 20  $\mu\text{M}$ . Comme l'illustre la figure 77, à la concentration utilisée, aucun des quatre conditionnements avec la CAP n'a produit d'effet significatif sur la mortalité cellulaire après une séquence d'hypoxie-réoxygénation.

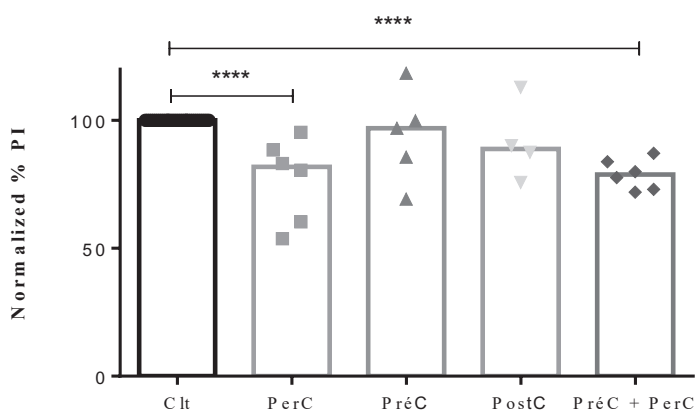


**Figure 77.** Effet du conditionnement avec la CAP sur la mortalité cellulaire après une hypoxie/réoxygénation évalué par iodure de propidium par cytométrie en flux.

Les valeurs représentées ont été normalisées par rapport aux contrôles obtenus à chaque expérience indépendante. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, aucune différence significative n'a été mesurée entre chaque groupe.

### 3-4 Effet du conditionnement avec la capsazépine

Par la suite, l'antagoniste respectif a été testé (20  $\mu\text{M}$ ). Comme l'illustre la figure 78, deux types de conditionnement semblent avoir un effet sur la mortalité cellulaire. En effet, si la molécule est appliquée tout au long de la séquence d'hypoxie/réoxygénation (PerC), la mortalité cellulaire est diminuée significativement de 24 %. L'effet est retrouvé lorsque la CPZ est appliquée 30 minutes avant la séquence et lorsqu'elle est gardée pendant la séquence complète (- 22 %). En revanche, le PréC seul et le PostC n'ont pas d'effet sur la viabilité cellulaire. En conclusion, la CPZ n'aurait d'effet positif sur la survie cellulaire qu'en PerC (pas de différences avec PréC+PerC et pas d'effets du PréC).

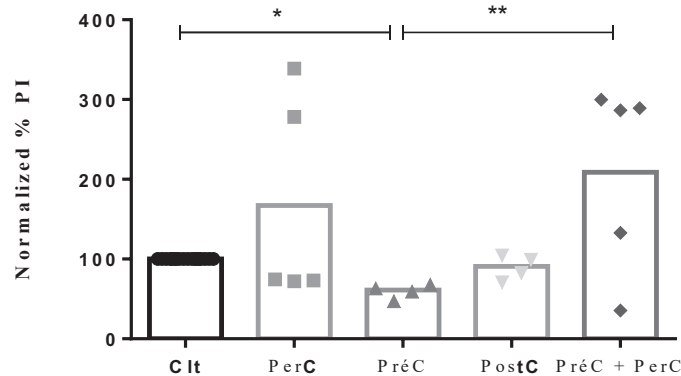


**Figure 78.** Effet du conditionnement avec la CPZ sur la mortalité cellulaire après une hypoxie/réoxygénation évalué par iodure de propidium par cytométrie en flux.

Chaque expérience a été répétée cinq fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, les différences significatives sont indiquées lorsque la p value est inférieure à 0,05. \*\*\*\* équivaut à une p value inférieure à 0,0001

### 3-5 Effet du conditionnement avec la résinifératoxine

Par la suite, le second agoniste de TRPV1 de cette étude a été testé. Comme l'illustre la figure 79, trois types de conditionnement semblent avoir un effet sur la mortalité cellulaire, mais des effets hétérogènes. En effet, à la dose utilisée (10  $\mu$ M), si la molécule est appliquée tout au long de la séquence d'hypoxie/réoxygénation (PerC) ou en PréC + PerC, la mortalité cellulaire est augmentée significativement de 48 % et 108 % respectivement. L'effet protecteur est retrouvé lorsque la RTX est appliquée 30 minutes avant la séquence ; PréC (- 40 %). En revanche, le PostC n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire.



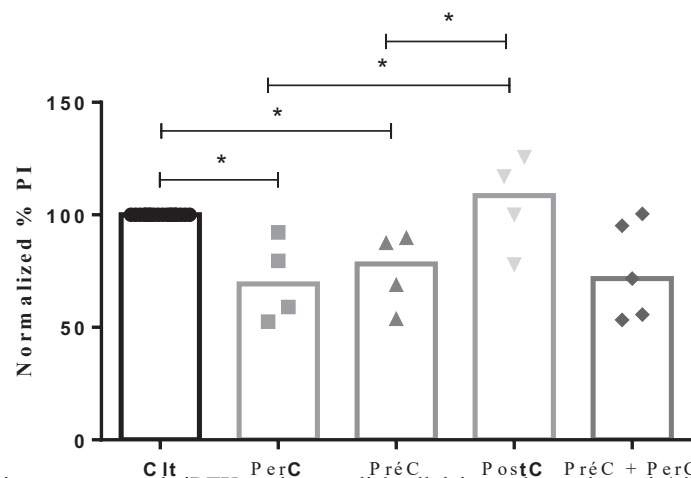
**Figure 79.** Effet du conditionnement avec la RTX sur la mortalité cellulaire après une hypoxie/réoxygénation évalué par iodure de propidium par cytométrie en flux.

Chaque expérience a été répétée cinq fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, les différences significatives sont indiquées lorsque la p value est inférieure à 0,05. \* équivaut à une p value inférieure à 0,05 et \*\* à une p value inférieure à 0,01

La RTX est probablement toxique en chronique, il serait intéressant de tester une autre concentration, notamment plus faible.

### 3-6 Effet du conditionnement avec la 5'-Iodorésinifératoxine

Par la suite, le second antagoniste de TRPV1, la iRTX (10  $\mu$ M) a été testé. Comme l'illustre la figure 80, trois types de conditionnement semblent avoir un effet significatif sur la mortalité cellulaire. En effet, si la molécule est appliquée tout au long de la séquence d'hypoxie/réoxygénation (PerC) ou en PréC seulement ou en PréC et PerC en même temps, la mortalité cellulaire est diminuée significativement de 30 %, 26 % et 45 % respectivement.



**Figure 80.** Effet du conditionnement avec la iRTX sur la mortalité cellulaire après une hypoxie/réoxygénation évalué par iodure de propidium par cytométrie en flux.

Chaque expérience a été répétée cinq fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Kruskal-Wallis, les différences significatives sont indiquées lorsque la p value est inférieure à 0,05. \* équivaut à une p value inférieure à 0,05

Nous avons donc montré que la iRTX donne des résultats intéressants sur la viabilité cellulaire au cours de l'hypoxie-réoxygénation. Elle a des effets protecteurs en PréC et en PerC.

### 3-7 Conclusion de l'effet de la modulation de TRPV1 sur la mortalité des cellules H9C2 après une séquence d'hypoxie-réoxygénation

Pour conclure, aux doses utilisées, le PostC n'offre aucun résultat cytoprotecteur sur la mortalité cellulaire après la séquence d'hypoxie/réoxygénation, quel que soit la molécule pharmacologique employée. Ceci est relativement problématique, en effet ; le conditionnement le plus applicable à l'IDM est le PostC. C'est pourquoi nous allons tester ces conditionnements sur des cardiomyocytes adultes de souris et *in vivo* sur la souris. Notons tout de même qu les résultats positifs du Pré-C pourraient servir lors d'ischémie programmée (chirurgie ou greffe cardiaque).

Les effets bénéfiques de ces molécules ont des effets disparates en fonction du moment où elles sont appliquées. Tout d'abord, la RTX est cytoprotectrice seulement lorsqu'elle est appliquée 30 minutes avant la séquence complète d'hypoxie/réoxygénation. En revanche, elle augmente la mortalité cellulaire lorsqu'elle est en contact avec les cellules pendant la séquence complète.

Enfin, les antagonistes CPZ et iRTX ont des effets protecteurs. Concernant la CPZ, elle permet de diminuer la mortalité cellulaire lorsqu'elle est appliquée pendant toute la séquence complète. Cet effet est retrouvé pour la condition PréC + PerC. Cet effet est probablement exclusivement du au PerC. Quant à elle, la iRTX est tout le temps cytoprotectrice, en PréC et en PerC. En conclusion de cette partie, les molécules pharmacologiques les plus intéressantes d'un point de vue cardioprotection seraient la RTX et la iRTX. Ces mêmes molécules avaient donné des résultats intéressants sur la modulation de la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire.

Afin de compléter ces expériences, d'autres sondes pourraient être utilisées pour évaluer par exemple le potentiel de membrane, la masse mitochondriale et l'anion superoxyde... après une séquence d'hypoxie/réoxygénation afin de détailler un peu plus les différents effets des conditionnements. De plus, il serait intéressant d'effectuer des séquences d'hypoxie/réoxygénation plus courtes au microscope afin de suivre l'évolution de  $Ca^{2+}$  dans différents compartiments. En effet, nous pourrions comprendre les effets cytoprotecteurs de la RTX, la iRTX et la CPZ. Il serait également intéressant de tester d'autres concentrations de ces molécules afin d'éviter notamment les effets toxiques.

## 4- Rôle de TRPV1 dans les cardiomyocytes primaires adultes de souris : suite d'une thèse préalablement soutenue au laboratoire

Le but de cette étude est dans un premier temps d'identifier l'expression et la localisation de TRPV1 dans les CMA, mais également de mettre en évidence les différences phénotypiques et fonctionnelles entre les cardiomyocytes WT et les cardiomyocytes provenant des souris TRPV1<sup>-/-</sup>. Ces expériences ont en partie été réalisées au cours de la thèse de Lucille Païta. En revanche, depuis la réalisation de sa thèse, la technique d'isolation de cardiomyocytes a été modifiée. Ce projet est à l'heure actuelle en cours de réalisation. En effet, nous sommes en train de préciser la localisation subcellulaire de TRPV1 dans les CMA avec le nouvel anticorps identifié dans la partie 1-1 des résultats. Nous allons également compléter les expériences d'imagerie calcique puisque Lucille Païta a seulement utilisé la sonde Fluo-5N AM; qui est non ratiométrique. Nous aimerions également mesurer la concentration de Ca<sup>2+</sup> dans différents compartiments tels que le cytoplasme, la mitochondrie et dans les hot spots mitochondriaux et comparer les deux types de souris (WT vs KO). De plus, nous allons effectuer des séquences d'hypoxie-réoxygénation sur des cardiomyocytes adultes de souris et tester la modulation de TRPV1 sur la viabilité cellulaire.

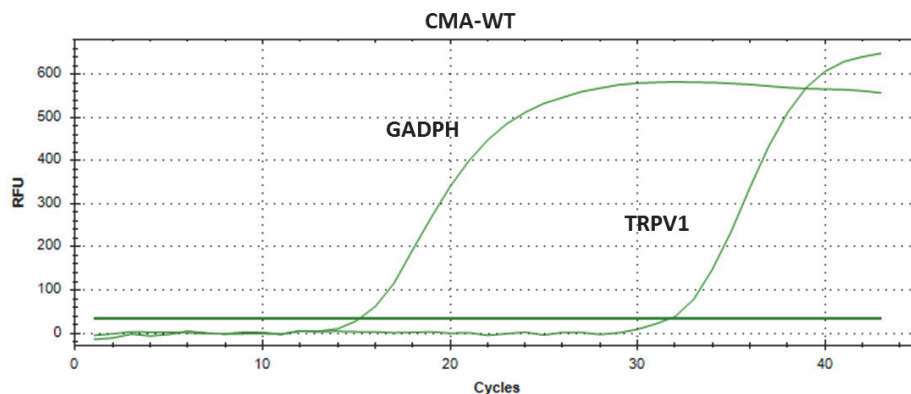
En résumé, il a été précédemment montré par Western blot et par immunofluorescence que TRPV1 est exprimé dans les cardiomyocytes adultes de souris et qu'il est localisé à la membrane du RS, à proximité des récepteurs RyR et IP3R, et absent de la membrane plasmique. De plus, grâce à des techniques d'échographie et de microscopie électronique, il a été mis en évidence qu'il n'existe de différences phénotypiques sur les fonctions cardiaques entre les souris WT et les souris KO et que d'un point de vue structurel les cardiomyocytes ne sont pas différents, mis à part les noyaux des CMA issus de souris KO qui ont plutôt tendance à être crénelés. Pour finir, il a été démontré que TRPV1 est un canal de fuite calcique du RS dans les CMA. TRPV1 est notamment activé par la CAP à 100 µM et par l'isoflurane à 0.5 mM.

Dans ce chapitre, je présenterai seulement ma contribution à la poursuite des travaux précédents.

### 4-1 Expression de TRPV1 dans les CMA

Nous avons confirmé dans cette partie l'expression de TRPV1 dans les cardiomyocytes adultes de souris par RT-PCR, puisque l'anticorps utilisé précédemment sur les CMA donnait beaucoup de bande aspécifique.

#### 4-1-1 RT-PCR



**Figure 81.** Amplification de la PCR en temps réel afin d'évaluer le niveau d'expression de TRPV1.

Les primers utilisés sont spécifiques des exons 13 et 14. GAPDH est utilisée comme contrôle.

La figure 81 illustre l'amplification en temps réel de la PCR effectuée sur les échantillons de cardiomyocytes adultes de souris. La GAPDH est utilisée comme un contrôle qualité de l'extraction d'ARN. A droite de ce graphique, la courbes TRPV1 est illustrée à partir d'environ 35 cycles. Ceci indique que l'ARN est faiblement exprimé. Ceci nous semble logique puisque TRPV1 est un canal de fuite et n'a pas une grande expression. Nous avons donc ici vérifié que TRPV1 est bien exprimé dans les cardiomyocytes adultes de souris.

## 4-2 Fonctionnalité de TRPV1 dans les CMA

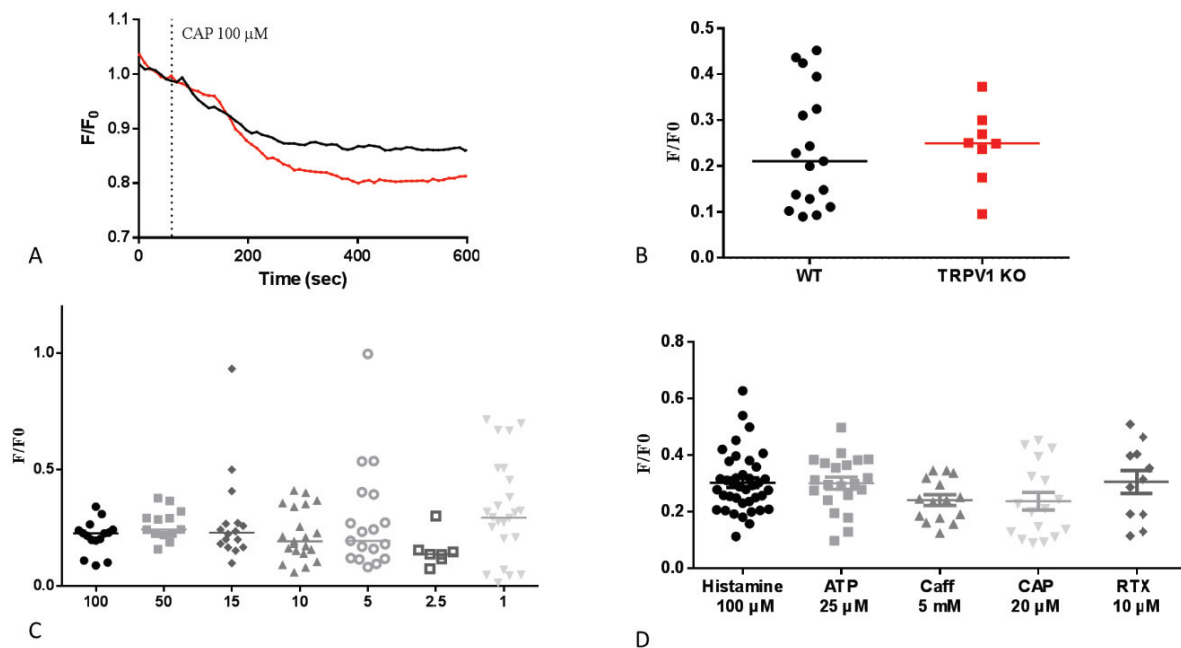
### 4-2-1 **Imagerie calcique**

Afin de compléter les expériences réalisées par Lucille au microscope confocal, la sonde fluo-5N AM est employée pour suivre les variations de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$ . Une courbe représentative de la réponse à la CAP sera illustrée ainsi que les deltas des amplitudes de réponse dans cette partie.

- *Mesure de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  réticulaire au cours de la stimulation de TRPV1 sur des CMA WT et KO : Fluo-5N AM*

Dans un premier temps, les cardiomyocytes WT et KO ont été stimulés avec la concentration de CAP utilisée dans la thèse de Lucille : 100  $\mu$ M (figure 82A et B). Les données recueillies sont :

- L'amplitude maximale de variation de  $[Ca^{2+}]_{RE}$  obtenue suite à l'ajout d'une substance, ici la CAP (agoniste de TRPV1) : correspondant comme décrit précédemment à la soustraction du ratio minimal de fluorescence ( $F/F_0$ ) obtenu, moins le ratio basal (état de repos).



**Figure 82.** Évolution de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  lors de la vidange du RE.

(A) Courbes représentatives de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  en fonction du temps. La courbe en noir représente les cellules contrôles (WT), en rouge avec les cellules KO (B) Nuage de points des différentes conditions : cellules contrôles WT (noir) et KO (rouge), stimulées avec la CAP 100  $\mu$ M. Les expériences sont effectuées dans du CFB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Mann-Whitney, aucune différence significative n'a été mesurée entre chaque groupe (C) Nuage de points des différentes conditions stimulées avec la CAP (D) Nuage de points des différentes conditions stimulées avec l'histamine, l'ATP, la caféine, CAP et RTX. Les expériences sont effectuées dans du CFB. Chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante. Après un test non paramétrique Mann-Whitney, aucune différence significative n'a été mesurée entre chaque groupe.



La figure 82A illustre l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_{RS}$  au cours du temps avec la sonde Fluo-5N AM. L'application de la CAP 100  $\mu M$  sur les cardiomyocytes WT entraîne une diminution de la  $[Ca^{2+}]_{RS}$ . Malheureusement, les cardiomyocytes KO répondent également à cette stimulation montrant alors l'effet non spécifique de cette molécule à cette concentration.

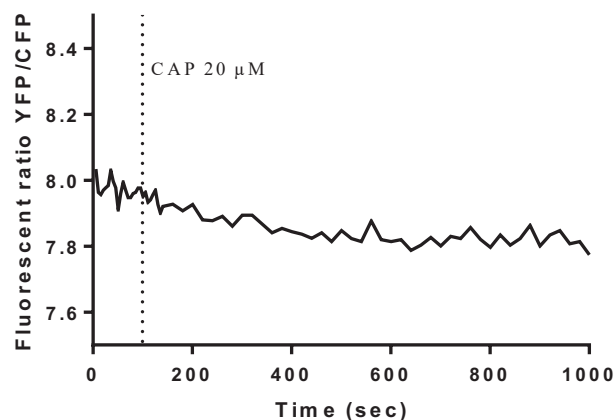
C'est pourquoi, pour la suite des expériences, une dose réponse avec la CAP a été effectuée (figure 82C). Sept concentrations de CAP ont été testées sur les cardiomyocytes adultes de souris WT : 100, 50, 15, 10, 5, 2.5 et 1  $\mu M$ . Comme l'illustre la figure 82C, les stimulations avec les différentes concentrations de CAP entraînent une augmentation de l'amplitude de réponse, signifiant une diminution de la concentration de  $Ca^{2+}$  réticulaire. Malheureusement, aucune différence significative n'a été mesurée entre les différentes concentrations, laissant supposer que la concentration à 2.5  $\mu M$  est suffisante pour induire une diminution de la concentration de  $Ca^{2+}$  réticulaire.

Afin de vérifier les effets aspécifiques de la CAP, le contenu de  $Ca^{2+}$  dans le RS a été évalué par différentes molécules pharmacologiques : histamine 100  $\mu M$ , Mg-ATP 25  $\mu M$  et caféine 5 mM (figure 82D). Aucune différence significative n'a été mesurée entre ces différentes conditions. Ceci stipule que la stimulation avec la CAP ou la RTX permet de mobiliser autant de  $Ca^{2+}$  réticulaire que les activateurs des récepteurs IP3 et RyR. Ces résultats nous paraissent étranges puisque TRPV1 agit comme un canal de fuite réticulaire, il ne devrait donc pas libérer, dans les CMA, autant de  $Ca^{2+}$  lorsqu'il est activé que les IP3R et RyR (ou du moins la cinétique devrait être différente).

Il est cependant important de noter que le Fluo-5N AM est une sonde non ratiométrique. Les résultats obtenus sont donc difficilement interprétables en termes de concentration avec cette sonde puisque le signal basal obtenu est dépendant de sa concentration dans l'organite. C'est pourquoi, nous avons testé une nouvelle sonde réticulaire : D4ER.

- *Mesure du  $Ca^{2+}$  réticulaire : D4ER*

L'intérêt de cette expérience est d'utiliser une sonde ratiométrique, dans le but de remplacer la sonde chimique, Fluo-5N AM. En revanche, l'utilisation des sondes ratiométriques dans les cardiomyocytes implique l'utilisation de sonde génétique en adénovirus, puisqu'actuellement, nous ne disposons pas de sondes chimiques ratiométriques pour mesurer la  $[Ca^{2+}]_{RE}$ . Par conséquent, nous avons recours à une chirurgie cardiaque. L'adénovirus est injecté dans le cœur de souris, 7 à 10 jours avant l'expérience. Elle permet de mesurer l'évolution de  $Ca^{2+}$  réticulaire.



**Figure 83.** Évolution de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  lors de la vidange du RE.

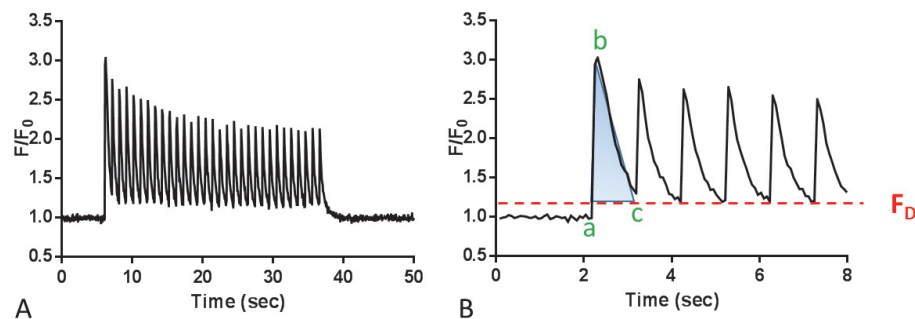
Courbes représentatives de l'évolution de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  en fonction du temps. La courbe en noir représente les cellules contrôles. L'expérience a été effectuée une fois sur 3 cellules infectées.

Comme l'illustre la figure 83, la stimulation avec la CAP 20  $\mu\text{M}$  sur les cardiomyocytes de souris n'a pas d'effet sur le contenu de  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire. En effet, le  $K_D$  de la sonde (312  $\mu\text{M}$ ) ne permet malheureusement pas de visualiser de faibles variations de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ . Actuellement, au laboratoire, nous sommes en cours de développement d'adénovirus pour notamment le plasmide ErGAP1. Cet adénovirus nous permettra, nous l'espérons, de mesurer l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  réticulaire au cours du temps.

#### 4-2.2 Transitoires calciques

Dans le but de caractériser le modèle KO TRPV1 au sein du laboratoire, et d'investiguer l'excitabilité des cellules, nous avons mesuré les transitoires calciques sur les cardiomyocytes adultes de souris WT et KO TRPV1. La figure 84 permet de comprendre comment les données ont été analysées après la mesure des différents trains de transitoires calciques.

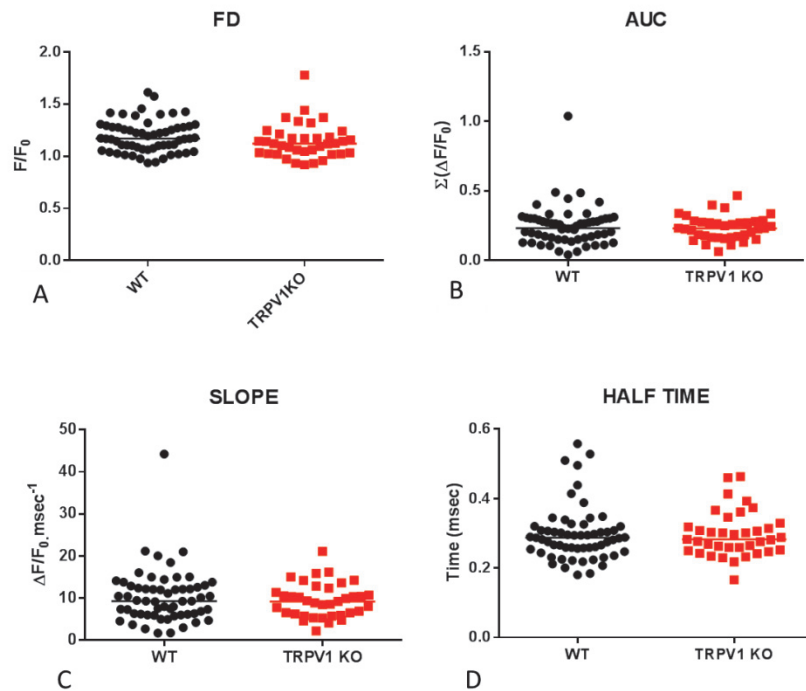
Les transitoires calciques correspondent à l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique mesurée au cours de la contraction.



**Figure 84.** Représentation d'un train de transitoires calciques obtenu avec une fréquence de stimulation à 1 Hz et illustration de la mesure des transitoires calciques.

L'intervalle de temps entre point a et b est le « time to peak », la pente initiale du transitoire calcique (slope) correspond l'amplitude du transitoire ( $F/F_{0b} - F/F_{0a}$ ) divisé par l'intervalle de temps entre a et b ( $t_b - t_a$ ). L'intervalle de temps entre le point b et c est le « time to basal ». L'aire sous la courbe correspond à la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisée au cours d'un transitoire, est représentée par le triangle bleu.  $F_D$  représente la  $[\text{Ca}^{2+}]$  diastolique.  $\frac{1}{2}$  decay est le temps qu'il faut diminuer de moitié l'amplitude du transitoire.

Comme l'indique la figure 85, les transitoires calciques WT et KO sont similaires aussi bien dans la quantité de calcium mobilisé au cours de chaque transitoire (aire sous le courbe et  $F_D$ ) que dans la cinétique de l'évènement (slope et  $\frac{1}{2}$  decay). Ceci nous montre que l'activité électrique ne semble pas différente entre ces deux groupes. En effet, nous n'avons pas mesuré de phénotype cardiaque particulier entre ces deux types de souris.



**Figure 85.** Nuage de points représentant les différents paramètres mesurés au cours des transitoires calciques.

(A)  $F_D$  (B) Aire sous la courbe (C) Pente mesurée pour le time to peak (D)  $\frac{1}{2}$  decay. Chaque point représente la moyenne de 30 transitoires obtenu sur un CMA (correspondant au train de stimulation à 1 Hz pendant 30 sec). En noir sont représentées les cellules contrôles (WT) et en rouge les cellules KO. Les données sont issues de 5 animaux différents WT et TRPV1KO. Après un test non paramétrique Mann-Whitney, aucune différence significative n'a été mesurée entre chaque groupe

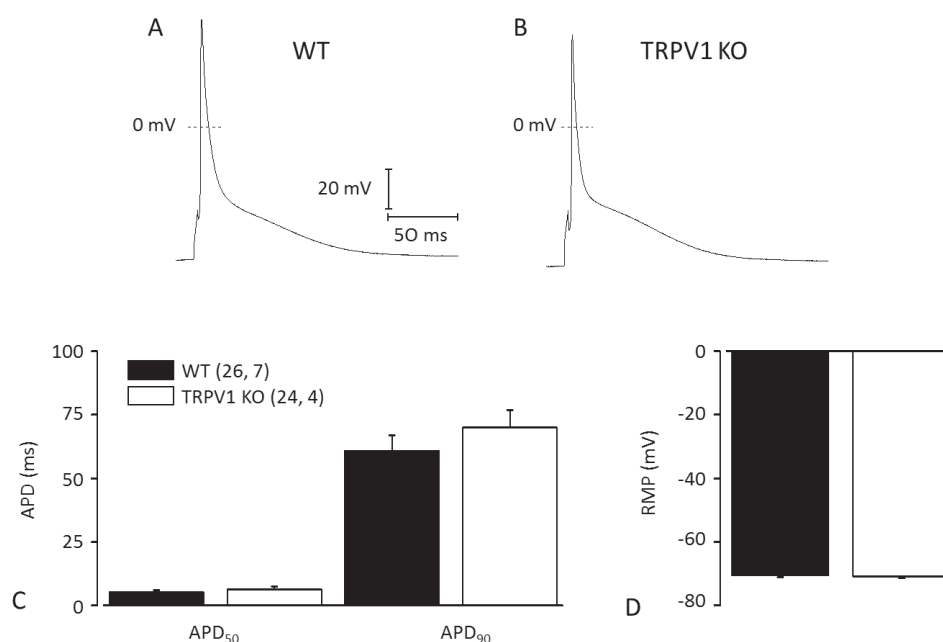
Par la suite, des expériences d'électrophysiologie ont été réalisées sur ces cellules.

#### 4-2.3 Électrophysiologie

Tout d'abord, la capacitance des cardiomyocytes (le reflet de la surface de la membrane plasmique) a été mesurée par électrophysiologie. Il n'a pas été observé de différence significative pour ce paramètre entre les cardiomyocytes ventriculaires issus des souris WT ( $183,5 \pm 6,0$  pF,  $n = 60$  et  $N = 13$ ) et TRPV1<sup>-/-</sup> ( $169 \pm 6,6$  pF,  $n = 57$  et  $N = 9$ ).

- *Mesure des potentiels d'action*

La figure 86 illustre les potentiels d'action classiquement obtenus à partir d'un cardiomyocyte ventriculaire de souris WT à gauche (86A) et d'un cardiomyocyte ventriculaire de souris KO à droite (86B) en configuration Whole cell. Ils sont représentés sous forme d'histogramme. Les durées moyennes des PA à 50 et 90% de repolarisation sont illustrées sur la figure 86C. Ces données sont issues de 26 cardiomyocytes provenant de 7 souris WT et de 24 cardiomyocytes provenant de 4 souris KO TRPV1. Les durées du PA à 50 et 90 % de repolarisation ne sont pas significativement différentes entre les cellules WT et KO. Les valeurs moyennes des potentiels de membranes de repos (RPM) et des amplitudes du PA (APA) sont également déterminées pour caractériser l'activité électrique des cardiomyocytes WT (RPM =  $-71,7 \pm 0,3$  mV, APA =  $116,2 \pm 1,4$  mV) et KO TRPV1 (RPM =  $-71,7 \pm 0,3$  mV, APA =  $116,2 \pm 1,4$  mV). Elles ne sont pas significativement différentes.



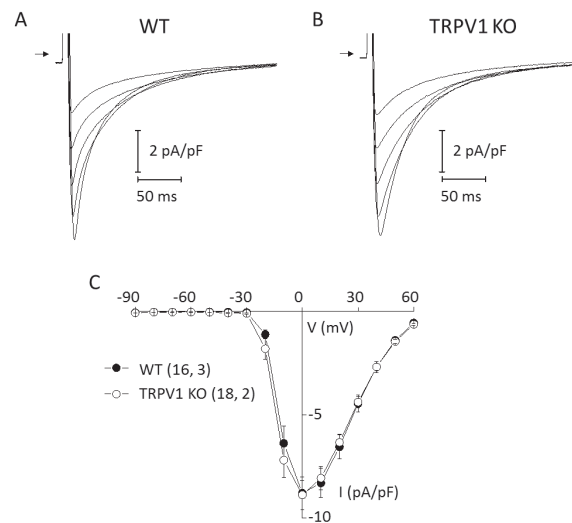
**Figure 86.** Mesure des potentiels d'action des CMA WT et KO TRPV1.

Les PA sont classiquement enregistrés à partir d'un cardiomyocyte ventriculaire gauche issu d'une souris WT (A) et KO TRPV1 (B). (C) Histogrammes montrant les durées moyennes des PA à 50 et 90 % de repolarisation des cardiomyocytes ventriculaires issus de souris WT et KO TRPV1. Les valeurs obtenues correspondent aux moyennes  $\pm$  SEM pour n,N (valeurs entre parenthèses) où n correspond à un cardiomyocyte et N à une souris. Après un test non paramétrique T-Student, aucune différence significative n'a été mesurée entre chaque groupe.

- *Mesure des courants calciques de type L*

La figure 87A illustre les traces des courants calciques classiquement enregistrées à partir de cardiomyocytes ventriculaires gauche issus d'une souris WT en réponse à des impulsions de potentiel de 250 ms de durée appliquées par un incrément de 10 mV entre 0 et +40 mV à partir d'un potentiel de maintien à -80 mV. La figure 87B présente les traces de courant calcium classiquement enregistrée dans les mêmes conditions à partir d'un cardiomyocyte ventriculaire gauche issu d'une souris KO TRPV1. Le courant  $I_{CaL}$  a ainsi été enregistré sur 16 cardiomyocytes issus de trois souris WT et pour 18 cardiomyocytes issus de deux souris KO TRPV1. Les voltage-dépendances établies pour les deux populations de cardiomyocytes sont présentées sur la figure 87C. Pour les deux populations cellulaires, le seuil d'activation du courant se situe autour de -30 mV, le courant est maximum à 0mV et les voltage-dépendances des densités de  $I_{CaL}$  sont parfaitement similaires (figure 87C).

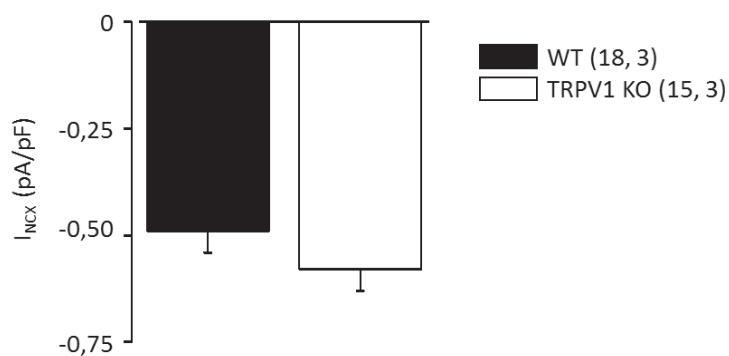
Aucune différence significative n'a été observée en densité de courant  $I_{CaL}$  entre les deux groupes de cellules.



**Figure 87.** Courants calciques de type L des cardiomyocytes WT et KO TRPV1.

Les traces des courants calciques de type L ont été enregistrées classiquement à partir d'un cardiomyocyte issu d'une souris WT (A) et d'une souris KO TRPV1 (B) en réponse à des dépolarisations de 250 ms de durée appliquées par incrément de 10 mV entre 0 et +40 mV (trace la plus haute) à partir d'un potentiel de maintien de -80 mV. (C) Les courbes voltage-dépendances de la densité de courant calcique de type L (amplitude de  $I_{CaL}$  normalisée à la capacitance) ont été établies pour les cardiomyocytes ventriculaires issus de souris WT et KO TRPV1. Les barres correspondent aux SEM pour n, N (valeurs entre parenthèses) où n correspond à un cardiomyocyte et N à une souris.

- *Mesure du courant NCX*



**Figure 88.** Mesure du courant NCX sur les CMA WT et TRPV1 KO.

Les traces des courants NCX ont été enregistrées classiquement à partir d'un cardiomyocyte issu d'une souris WT (noir) et d'une souris KO TRPV1 (blanc) Les valeurs obtenues correspondent aux moyennes  $\pm$  SEM pour n,N (valeurs entre parenthèses) où n correspond à un cardiomyocyte et N à une souris. Après un test non paramétrique T-Student, aucune différence significative n'a été mesurée entre chaque groupe.

Enfin, les courants NCX ont été enregistrés sur 18 cardiomyocytes issus de trois souris WT et pour 15 cardiomyocytes issus de trois souris KO TRPV1. Aucune différence significative n'a été observée en densité de courant NCX entre les deux groupes de cellules.

En conclusion de cette partie, aucune différence électrophysiologique n'a été détectée entre les cardiomyocytes issus des souris WT et des souris KO TRPV1. Ceci n'est pas très étonnant puisqu'aucune différence sur les transitoires et aucun phénotype cardiaque n'avaient été détectés chez les souris KO TRPV1. La perspective de cette étude est d'analyser les électrocardiogramme (ECG)

recueillis au cours des chirurgies et de les analyser. Nous ne devrions trouver aucune différence entre ces deux groupes.

#### 5- Données préliminaires *in vivo*

La DAP étant été acceptée seulement depuis février 2019, seuls quelques résultats préliminaires seront présentés dans cette partie. Actuellement, douze souris ont été effectuées. Les groupes sont randomisés et nous testons actuellement l'agoniste de TRPV1 (RTX). Les 4 souris recevant la concentration 100 µg/kg que ce soit en PréC ou en PostC sont décédées à la suite de cette injection. Nous allons donc retirer ces deux groupes de cette étude.

#### 6- Développement méthodologique des CMA en suspension après une hypoxie-réoxygénation

Cette partie ne sera pas développée directement dans le manuscrit, elle est développée à l'article intitulé : « **An innovative sequence of hypoxia-reoxygenation on adult mouse cardiomyocytes in suspension to perform multilabeling analysis by flow cytometry** » se trouvant en annexe 1.

# Discussion





## 1- Hypothèse de travail

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la première cause de mortalité mondiale en provoquant 17.5 millions de morts dans le monde occidental, soit 30% des décès en 2012. En France, environ 140 000 personnes sont décédées de MCV<sup>92</sup>, dont 120 000 d'un IDM. Chaque année, 10% des IDM sont mortels dans l'heure et 15% des patients récidivent dans l'année qui suit. Cette maladie est donc un enjeu de santé publique majeur. Comprendre les mécanismes sous-jacents des lésions d'ischémie-reperfusion permettra de développer de nouvelles stratégies de cardioprotection.

Au cours de l'infarctus du myocarde, des dérégulations physiologiques vont avoir lieu notamment la dérégulation de l'homéostasie calcique menant à une surcharge calcique dans le cytoplasme et la mitochondrie, aussi bien pendant l'ischémie que la reperfusion. Ces dérégulations vont mener progressivement à une augmentation de la mortalité cellulaire. La première cible des stratégies de cardioprotection a été la mitochondrie. En effet, il a été montré que limiter la surcharge calcique au moment de la reperfusion dans la mitochondrie peut avoir des effets positifs sur la viabilité cellulaire. Ces résultats ont notamment fait l'objet du développement d'une étude clinique de phase III nommée CIRCUS. Malheureusement, cette étude n'a pas donné de résultats concluant sur la cardioprotection liée à la CsA<sup>160,344</sup>. C'est pourquoi au laboratoire, une stratégie alternative est de cibler le réticulum sarcoplasmique. Il est en effet la source principale d'ions calcium (second messenger) dans toutes les cellules. La concentration en Ca<sup>2+</sup> réticulaire, finement régulée, contrôle la balance survie cellulaire et mortalité. Les canaux dits « de fuite » calciques, libèrent les ions calcium dans le cytoplasme, peuvent de ce fait moduler le taux de Ca<sup>2+</sup> réticulaire et donc la survie des cellules. Le but de cette étude est d'identifier si le ciblage de l'un de ces canaux de fuite calcique des cardiomyocytes, TRPV1, peut augmenter leur survie lors de l'IDM.

L'hypothèse globale de mon travail est donc que TRPV1 serait un canal de fuite calcique réticulaire impliqué dans le phénomène de cardioprotection. Cet axe de recherche se base notamment sur une étude menée précédemment au laboratoire indiquant que TRPV1 est un canal de fuite calcique fonctionnel dans les cellules musculaires striées squelettiques<sup>173</sup>.

Pour mener à bien cette étude, deux modèles cellulaires complémentaires sont employés : la lignée cellulaire H9C2 (cardiomyoblastes de rat) et les cellules primaires (cardiomyocytes adultes de souris). La caractérisation des canaux TRPV1 dans les cardiomyocytes adultes de souris a fait l'objet d'une thèse de 2013 à 2016 par Lucille Païta. Ces travaux de thèse seront résumés dans la partie suivante. Le but de ma thèse est donc de caractériser les canaux TRPV1 dans la lignée cellulaire H9C2 et de comprendre le rôle de ces canaux dans les échanges calciques entre le réticulum et la mitochondrie dans un contexte d'hypoxie-réoxygénation.

## 2- Résultats préliminaires obtenus sur les cardiomyocytes adultes de souris

Les travaux précédents, réalisés au cours de la thèse Lucille Païta au sein du laboratoire, ont permis de démontrer que TRPV1 est exprimé dans les cardiomyocytes adultes de souris où il remplit le rôle d'un canal de fuite calcique réticulaire fonctionnel. Par ailleurs, TRPV1 apparaît par immunofluorescence localisé à la membrane du RS, à proximité des récepteurs RyR et IP3R et absent de la membrane plasmique des CMA. Dans un second temps, ces travaux montrent que TRPV1 est une cible de l'isoflurane, connu pour ses effets cardioprotecteurs. L'application de cet anesthésique volatil sur les cellules entraîne une diminution de la [Ca<sup>2+</sup>] réticulaire. La spécificité de ces différents résultats a été vérifiée dans les cardiomyocytes adultes issus de souris KO TRPV1.

Enfin par des techniques d'échographie et de microscopie électronique, aucune différence phénotypique sur les fonctions cardiaques n'a pu être mise en évidence entre les souris WT et les souris KO. D'un

point de vue structurel, les cardiomyocytes ne sont pas différents, à l'exception de la morphologie de l'enveloppe nucléaire plus crénelée pour les noyaux KO.

Compte tenu de ces résultats, TRPV1 semble être une cible intéressante dans l'ischémie-reperfusion myocardique.

### 3- Discussion des résultats de cette étude

#### 3-1 Modèle utilisé

Les cellules primaires et notamment les cardiomyocytes sont certes plus représentatifs de la physiologie cardiaque que des lignées cellulaires. En revanche, comme tout modèle, ces cellules ont leurs limites. En effet, le protocole d'isolation est complexe et comporte de nombreuses étapes. De plus, après l'isolation de ces cellules, nous ne pouvons pas les conserver plus de 5 à 6 heures en culture car elles se dédifférencient. Dans l'article d'O'Connell<sup>330</sup>, les cardiomyocytes sont conservés pendant 72 heures. Néanmoins, au sein du laboratoire, nous avons vérifié la présence au cours du temps des courants calciques, entre autres facteurs. Dans ces cellules après 72 heures de culture, les cellules sont complètement différentes de par leurs caractéristiques originales (morphologie mitochondriale notamment). Par conséquent, ces cellules sont incompatibles avec des stratégies de transfection, rendant l'utilisation de sondes génétiques impossible. C'est pourquoi, actuellement, au laboratoire, nous sommes en train de créer des adénovirus dérivés des plasmides que nous possédons pour la mesure calcique et de l'ATP dans les différents organites. Comme décrit dans la partie « matériels et méthodes », nous sommes en cours de développement de trois adénovirus : ErGAP1, n33D1CPV et Ateam<sub>mito</sub>. Nous possédons actuellement 4mtD3CPV et D4ER. Cette dernière sonde pourrait nous permettre de vérifier la fonctionnalité de TRPV1 dans les cardiomyocytes adultes de souris mais malheureusement son Kd (312  $\mu\text{M}$ ) ne permet pas de mesurer de faibles variations de  $\text{Ca}^{2+}$  au sein du RE comme le permet ErGAP1 (Kd = 16  $\mu\text{M}$ ).

Les cellules H9C2, bien que ce soit une lignée de cardiomyoblastes de rat, ont l'avantage d'être « cardiaques » contrairement à des cellules HEK-293. En effet, ces dernières sont des cellules embryonnaires de rein et sont, de mon point de vue, moins adaptées à nos projets de recherche en cardiologie. Les avantages principaux de la lignée H9C2 sont que ces cellules sont simples à mettre en culture, se dédoublent rapidement (24 heures) et sont facilement transfectables avec un rendement correct (entre 40 et 50 % de cellules transfectées). En revanche, elles n'expriment pas tous les partenaires de l'homéostasie calcique tels que les récepteurs à la ryanodine. Dans la partie « perspectives », je donnerai des pistes de progrès à mon étude et notamment un modèle alternatif.

Les cellules H9C2 permettent d'utiliser les outils d'imagerie calcique (sonde génétique fluorescente). Elles nécessitent une séquence d'hypoxie-réoxygénation de longue durée (4h50 d'hypoxie et 2h de réoxygénation), permettant d'effectuer les expériences sur une journée complète. En revanche, pour la microscopie, cette séquence est trop longue mais l'utilisation du dithionite de sodium permet de faire des séquences de 30 minutes d'hypoxie (voire anoxie) suivie de 30 minutes de reperfusion. En effet, cette molécule est un réducteur d'oxygène et permet d'atteindre rapidement un pourcentage d' $\text{O}_2$  suffisant pour une hypoxie. Ces séquences ont donné de bons résultats sur l'évolution de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  cytosolique, mitochondriale et réticulaire mais également sur l'évolution de la  $[\text{ATP}]$  cytosolique et mitochondriale. Ces données sont actuellement en cours de soumission dans EMBO par Gouriou *et al.* Les cellules H9C2 sont donc un outil adapté à l'étude de TRPV1 dans l'ischémie-reperfusion myocardique.

### 3-2 Localisation subcellulaire de TRPV1

L'expression et la localisation subcellulaire a été une étape compliquée à mettre au point dans ce projet. J'ai testé de nombreux anticorps et j'ai mis au point un nouveau protocole d'extraction des protéines puisque le protocole classiquement utilisé au laboratoire permet d'extraire des protéines cytosoliques ou mitochondriales mais non des protéines enchâssées dans une endomembrane lipidique. Pour se faire, un protocole plus long avec une lyse différente a donné des résultats positifs sur les Western blots. Nous obtenons ainsi deux bandes protéiques de HEK-TRPV1 qui seraient issues de la lyse de la fusion entre TRPV1 et mCherry.

Au cours de cette thèse, au moyen de plusieurs approches complémentaires, nous avons montré que TRPV1 est exclusivement localisé à la membrane du RE dans les cellules H9C2. Ce résultat est en accord avec ce que nous avons mis en évidence dans le muscle strié squelettique<sup>263</sup> et les cardiomyocytes adultes de souris (données non publiées). En effet, dans le muscle strié squelettique, il a été démontré que TRPV1, réticulaire, est localisé à proximité des pompes SERCA<sup>173</sup> alors que dans les cardiomyocytes TRPV1 est localisé à proximité d'IP3R. Nous avons également montré que TRPV1 se situe à proximité d'IP3R dans les cellules H9C2.

Cette localisation, exclusivement réticulaire, est contradictoire avec un article publié en 2016 par Hurt *et al*<sup>67</sup>. En effet, cette équipe démontre par des techniques d'imagerie confocale et d'immunogold que TRPV1 serait localisé dans la mitochondrie dans les cardiomyocytes néonataux de rats. Ils suggèrent également, en imagerie confocale, une colocalisation de la protéine TRPV1 avec la protéine TOM20 (Translocase outer mitochondrial membrane 20). Cependant, dans cet article, le marquage mitochondrial ne ressemble en rien à un marquage spécifique. Les figures 58B et 60B de ce manuscrit illustrent un marquage en forme de « spaghetti », typique du réseau mitochondrial des cellules H9C2, qui n'est pas retrouvé dans la figure de l'article.

Par ailleurs, afin de valider la présence réticulaire de TRPV1, nous avons utilisé trois techniques différentes et complémentaires (Western blot, immunofluorescence sur cellules vivantes et sur cellules fixées), toutes indiquant que TRPV1 n'est pas exprimé dans la mitochondrie. Nous avons reproduit le même immunomarquage TRPV1 et TOM20 que dans l'étude de Hurt *et al*. Le marquage de TOM20 n'était pas spécifique de la mitochondrie et avait une répartition très diffuse. En revanche, le marquage GRP75 semble plus spécifique de la mitochondrie et donne un coefficient de colocalisation avec TRPV1 faible (Pearson : 0.52 et Manders : 0.55).

De plus, contrairement aux neurones, ou aux cellules C2C12 (lignée cellulaire de myoblaste de souris), ou même aux cellules HEK<sup>312</sup>, nous avons montré que TRPV1 n'est pas localisé à la membrane plasmique<sup>345</sup> dans les cellules H9C2.

En conclusion de cette partie, TRPV1 est exclusivement localisé au sein du réticulum sarcoplasmique dans les fibres squelettiques et cardiaques adultes de souris ainsi que dans les cellules H9C2. Ce positionnement subcellulaire est peut-être une caractéristique commune aux fibres musculaires striées et aux lignées cellulaires qui en découlent. Pour rappel, la forme humaine de TRPV1 et ses variants, exprimés dans des cellules squelettiques de souris KO-TRPV1, ont également une localisation identique<sup>312</sup>.

### 3-3 Fonctionnalité de TRPV1

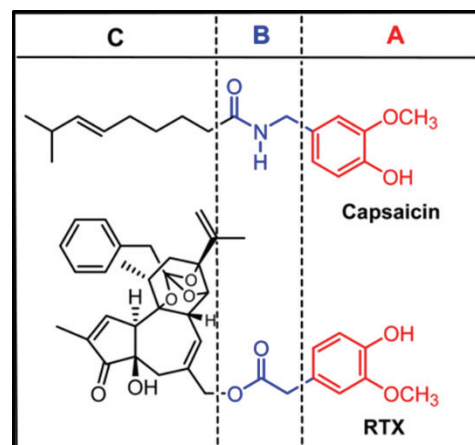
Ce projet de thèse a été initié en 2016. J'ai effectué mon stage de recherche de Master sur le même sujet. Cette étude m'a notamment permis de comprendre l'importance de la dose-réponse lorsqu'on initie une nouvelle étude. En effet, au cours de mon Master 2, j'avais repris la concentration de CAP initialement utilisée sur les cardiomyocytes adultes de souris, soit 100  $\mu$ M. De plus, à cette période, nous ne

possédions pas la sonde génétique ErGAP1 et dans le but de comparer les résultats obtenus avec les cardiomyocytes, j'ai donc utilisé la sonde Fluo-5N AM pour évaluer la  $[Ca^{2+}]$  dans le réticulum. Au cours de ce stage, j'ai mis en évidence que TRPV1 pouvait être activé avec la CAP à 100  $\mu$ M mais que ces concentrations avaient un réel impact sur la bioénergétique de la cellule. En effet, un prétraitement de 30 minutes avec la CAP ou la CPZ à 100  $\mu$ M entraîne drastiquement une diminution du contenu en ATP dans la mitochondrie. J'ai également observé en microscopie que les mitochondries avaient tendance à être fissionnées après ces différents traitements.

Mes premiers travaux de thèse ont donc débuté par l'élaboration d'une mesure dose-réponse avec la CAP et un autre agoniste, la RTX. Les résultats obtenus ont mis en évidence que la concentration utilisée pendant le Master 2 était cinq fois supérieure à celle nécessaire pour induire une libération de  $Ca^{2+}$  du RE vers le cytoplasme. La concentration utilisée par la suite est donc 20  $\mu$ M.

### 3-3.1 Différences de réponse entre CAP et RTX sur la $[Ca^{2+}]$ réticulaire.

Avec des mesures de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$ , nous avons mis en évidence que les deux agonistes déclenchent une vidange du RE vers le cytoplasme. En revanche, CAP et RTX ne génèrent pas la même vitesse de rechargement du calcium réticulaire. En effet, l'application de la CAP induit une diminution presque instantanée de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  alors que la RTX induit une réponse plus lente. De plus, l'amplitude de réponse entre ces deux agonistes est différente. Ceci est d'autant plus surprenant qu'à concentration égale, la RTX est normalement plus puissante que la CAP. À noter cependant que cette comparaison a été effectuée directement sur le canal TRPV1. Ici, nous considérons un canal sur une endomembrane. CAP et RTX appartiennent à la famille des vanilloïdes. Elles sont lipophiles et peuvent traverser la membrane plasmique. En revanche, leur structure lipophile est différente<sup>281,291,346</sup>, comme illustré sur la figure 96. En effet, la CAP est amphiphile, alors que la RTX possède plus de noyaux aromatiques, rendant sa structure plus complexe.



**Figure 89.** Différence de structure entre la CAP et la RTX.

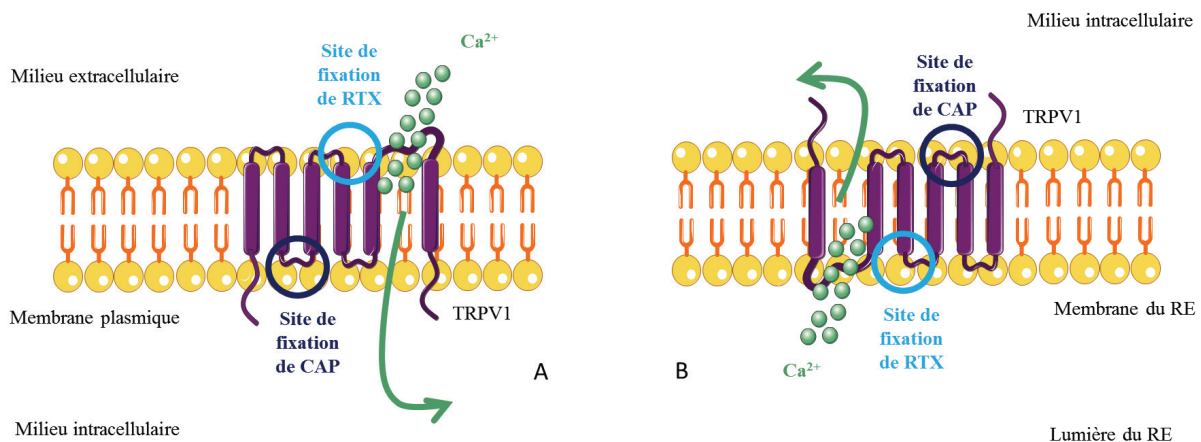
Source : Structural insights into transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) from homology modeling, flexible docking, and mutational studies

D'autre part, sur le canal TRPV1, quatre sites de liaison aux vanilloïdes ont été détectés<sup>347,348</sup>. Les sites de liaison précis de la CAP et de la RTX ne sont actuellement pas connus (identifiés entre les segments S2 et S3 pour la CAP et pour la RTX sur le segment S4 en extracellulaire). Les mêmes auteurs ont également montré, comme au cours de ma thèse, que la réponse à RTX est plus lente que celle de la CAP en mesurant un courant TRPV1 après application des agonistes dans des ovocytes. Mes résultats sont donc en accord avec cette étude.

En revanche, il a été mesuré que la RTX a une meilleure affinité avec TRPV1 que la CAP<sup>349</sup>. Ceci a été vérifié chez le rat où des mesures de températures corporelles ont été prises. La synthèse de ces résultats est donc difficile à interpréter : la RTX possède une meilleure affinité pour TRPV1 mais entraîne une libération de Ca<sup>2+</sup> du RE plus faible et plus lente alors que la CAP souffre d'une moins bonne affinité pour TRPV1 mais entraîne une libération de Ca<sup>2+</sup> du RE plus rapide.

Mon hypothèse est que la différence de structure de ces agonistes entraîne un acheminement plus lent de la molécule au RE pour la RTX (elle a une chaîne lipophile plus importante). Il faut plus de temps à la molécule pour arriver à sa cible. Ma seconde hypothèse est que le site de fixation de la CAP se trouve sur la partie cytosolique du canal et le site de fixation de la RTX se situerait sur la partie réticulaire du canal. Cette hypothèse est discutable, la figure 39 montre un site de fixation des vanilloïdes sur une boucle entre le segment S2 et S3 qui se trouve dans le milieu intracellulaire. De plus, une étude de Chou *et al* montre que la RTX se fixe sur la partie extracellulaire de la protéine<sup>348</sup>. En revanche, la question est : de quelle façon est orienté le canal TRPV1 à la membrane du RE ?

En effet, les études précédemment citées s'intéressent à la structure du canal lorsqu'il est localisé à la membrane plasmique. A cet emplacement, TRPV1 permet de faire entrer des ions Ca<sup>2+</sup> dans le milieu intracellulaire (figure 97A). En revanche, lorsque le canal est localisé à la membrane du RE, il permet de faire sortir des ions Ca<sup>2+</sup> du RE vers le cytoplasme. Nous pouvons alors penser que ce qui est considéré comme partie « extracellulaire » à la membrane plasmique se situe dans la lumière RE lorsque TRPV1 est à la membrane du RE. Par conséquent, ce qui forme la partie « intracellulaire » lorsque TRPV1 (figure 97B) est à la membrane plasmique se trouve alors dans le cytoplasme lorsque TRPV1 est à la membrane du RE. Ceci a été confirmé par Ambudkar *et al*<sup>350</sup>.



**Figure 90.** Positionnement hypothétique de TRPV1 sur la membrane plasmique et sur la membrane du RE.

Les sites de fixation de la CAP et de la RTX sont représentés en bleu foncé et bleu clair respectivement.

Si TRPV1 est orienté, comme l'illustre la figure 97B, sur la membrane RE et que la RTX traverse plus difficilement les membranes que la CAP, les différences de cinétiques que nous observons entre ces deux molécules pharmacologiques seraient expliquées.

Quoiqu'il en soit, nous avons donc mis en évidence lors de cette étude, que TRPV1 est un canal calcique réticulaire fonctionnel au sein des cellules H9C2.

### 3-3.2 Résultats obtenus pour la $[Ca^{2+}]$ dans les différents compartiments

Le tableau 33 regroupe les résultats obtenus et présentés dans la partie 2 des résultats. Compte tenu de l'hétérogénéité des résultats et de la complexité des réponses, ce tableau facilitera leur discussion.

Compartiment	Aigu		Court terme			
	CAP	RTX	CAP/CPZ		RTX/iRTX	
$[Ca^{2+}]_{RE}$	$\searrow [Ca^{2+}]$	$\searrow [Ca^{2+}]$	Pas d'effet $[Ca^{2+}]_{basale}$ Pas d'effet sur amplitude	Pas d'effet $[Ca^{2+}]_{basale}$ Pas d'effet sur amplitude	Pas d'effet $[Ca^{2+}]_{basale}$ $\searrow$ amplitude	Pas d'effet $[Ca^{2+}]_{basale}$ Pas d'effet sur amplitude
$[Ca^{2+}]_{cytosolique}$	Pas de réponse	Pas de réponse	$\nearrow [Ca^{2+}]_{basale}$ $\nearrow$ amplitude	$\nearrow [Ca^{2+}]_{basale}$ Pas d'effet sur amplitude	$\nearrow [Ca^{2+}]_{basale}$ $\searrow$ amplitude	Pas d'effet $[Ca^{2+}]_{basale}$ $\searrow$ amplitude
$[Ca^{2+}]_{mitochondriale}$ (R-GECO)	$\nearrow [Ca^{2+}]$	$\nearrow [Ca^{2+}]$	$\nearrow$ amplitude	$\nearrow$ amplitude	A réaliser	A réaliser
$[Ca^{2+}]_{mitochondriale}$ (4mtD3CPV)	Pas de réponse	Pas de réponse	$\searrow [Ca^{2+}]_{basale}$ Pas d'effet sur amplitude	$\searrow [Ca^{2+}]_{basale}$ $\nearrow$ amplitude	$\searrow [Ca^{2+}]_{basale}$ Pas d'effet sur amplitude	Pas d'effet $[Ca^{2+}]_{basale}$ Pas d'effet sur amplitude
$[Ca^{2+}]_{hot\ spots}$ mitochondriaux	$\nearrow [Ca^{2+}]$	$\nearrow [Ca^{2+}]$	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet

**Tableau 33.** Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors de la modulation de TRPV1 sur la  $[Ca^{2+}]$  cytotolique, réticulaire, mitochondriale et dans les hot spots mitochondriaux

Dans un premier temps, nous observons des différences de réponse entre les deux agonistes. Comme décrit précédemment, ces agonistes n'ont pas le même site de fixation ni les mêmes propriétés lipophiles rendant par conséquent leurs réponses différentes. De plus, nous pensons que la CAP et la CPZ, aux doses utilisées ont probablement des effets aspécifiques sur le récepteur, ou sur d'autres protéines rendant leur interprétation complexe.

- *Effets aigus de l'activation pharmacologique de TRPV1*

Dans un premier temps, toutes les réponses mesurées lors d'une application de la CAP ou de la RTX en aigu sont cohérentes et explicables. En effet, comme l'illustre la figure 98, l'application de la CAP ou de la RTX entraîne une vidange du  $Ca^{2+}$  du RE via TRPV1. Suite à cette libération réticulaire, nous n'avons pas détecté de variation de  $[Ca^{2+}]$  au niveau du cytoplasme. Cette absence d'effet cytoplasmique peut s'expliquer de différentes manières :

- i) Soit la quantité de  $Ca^{2+}$  mobilisé par TRPV1 est très faible et n'est pas compatible avec le  $K_d$  de la sonde Fura2 (0.14  $\mu M$ ),
- ii) Soit le  $Ca^{2+}$  libéré via TRPV1 passe directement dans les hot spots mitochondriaux et donc dans les MAMs.
- iii) Soit  $Ca^{2+}$  libéré via TRPV1 active les récepteurs IP3 par un mécanisme de CICR qui eux, secondairement libèrent du  $Ca^{2+}$  dans les hot spots mitochondriaux et donc dans les MAMs.



Quelque soit l'explication véritable, la résultante reste la même à savoir que la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  via TRPV1 reste invisible à l'échelle du cytoplasme entier.

Notons que les hypothèses ii et iii sont renforcées par le fait que TRPV1 colocalise avec IP3R dans les cellules H9C2. Les données que nous avons collectées jusqu'à présent ne nous permettent néanmoins pas de choisir entre ces deux hypothèses. Autrement dit, est-ce que le  $\text{Ca}^{2+}$  qui est mobilisé à proximité des mitochondries provient directement ou indirectement (via IP3R) des canaux TRPV1 ? Les similarités (durée, amplitude) des réponses  $\text{Ca}^{2+}$  enregistrées au niveau des hot spots (figure 76) favorisent l'hypothèse iii où le  $\text{Ca}^{2+}$  libéré par TRPV1 servirait d'amorce à une libération par les récepteurs IP3. Une série d'expérience en présence d'inhibiteur des R-IP3 permettra d'éclaircir cette hypothèse.

De même, il serait intéressant de pouvoir mesurer la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{réticulaire}}$  en même temps que la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mitochondriale}}$ . En effet, nous pourrions alors comparer leurs cinétiques (amplitudes, délais, vitesses...). De même qu'une combinaison entre la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{réticulaire}}$  et la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{hot spots mitochondriaux}}$  ou entre la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mitochondriale}}$  et la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{hot spots mitochondriaux}}$  pourrait apporter des informations supplémentaires sur la cinétique de modulation de la  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Actuellement, pour combiner les enregistrements simultanés dans les différents compartiments, de nouvelles sondes sont générées au sein du laboratoire en modifiant les couples de fluorochromes des sondes génétiques existantes (données non publiées).

- *Effets à court terme de la modulation pharmacologique de TRPV1*

A la connaissance des liens fonctionnels existant entre TRPV1 dans le réticulum et les mitochondries via les hot spots, nous nous sommes intéressés par la suite aux rôles potentiels de TRPV1 lors d'un prétraitement de 30 minutes avec nos molécules d'intérêt. Les résultats obtenus sont plus complexes à analyser.

#### ➤ Mesures des concentrations $\text{Ca}^{2+}$ réticulaires

Globalement, l'activation chronique de TRPV1 avec la CAP diminue comme attendu la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{réticulaire}}$  basale. Ce résultat n'a cependant pas été retrouvé avec la RTX. Cette hétérogénéité pourrait être expliquée par deux points :

- La CAP entraîne une forte libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE qui ne serait pas compensée ou compensable par les SERCAs.
- La RTX entraîne une lente libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE qui serait compensée, notamment pas les SERCA.

En revanche, les deux traitements diminuent l'amplitude de réponse de la TG montrant que l'activation prolongée de TRPV1 diminue à moyen terme les stocks calciques réticulaires mobilisables par la TG.

#### ➤ Mesures des concentrations $\text{Ca}^{2+}$ cytosoliques

La concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique au repos (resting) est augmentée lors d'un prétraitement avec la CAP ou la RTX. Ces données intéressantes stipulent donc que la fuite calcique via TRPV1 a un impact sur le contenu global à court terme du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. De manière inattendue, la CPZ a le même effet. Ceci nous amène à penser la CAP et la CPZ, aux doses utilisées génèreraient des effets aspécifiques ou enclencheraient des mécanismes de régulation plus complexes que les équilibres fuite calcique/repompement par les SERCAs. De plus, avec la CAP nous observons une augmentation de l'amplitude de réponse à la TG, qui n'est pas en accord avec ce que nous avons mesuré dans le réticulum. Par contre, logiquement, un prétraitement à la RTX, entraîne une diminution de la réponse à la TG. Les stocks mobilisables par la TG au cours du prétraitement avec la RTX sont donc réduits et de ce fait, la hausse de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cytosolique}}$  est diminuée.

➤ Mesures des concentrations  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondriales

Les deux traitements avec les couples CAP/CPZ et RTX/iRTX vont entraîner une diminution du contenu global de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie. Ces résultats sont difficilement explicables car une activation transitoire de TRPV1 entraîne une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  dans la mitochondrie mais une activation à court terme va entraîner une diminution de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  basale. La fuite calcique de RE est absorbée par la mitochondrie puis par la suite, la mitochondrie extrude le calcium, via notamment NCLX, et nous pourrions alors avoir une baisse de la concentration calcique mitochondriale. Il serait intéressant d'étudier la vitesse de capture du  $\text{Ca}^{2+}$  et de comparer la vitesse du  $\text{Ca}^{2+}$  entrant dans la mitochondrie et celle du  $\text{Ca}^{2+}$  sortant de la mitochondrie.

L'augmentation de l'amplitude de réponse à TG avec CAP et CPZ reflète les résultats obtenus avec la mesure de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  cytosolique. Ceci renforce l'idée que la CAP et la CPZ ont des effets aspécifiques. L'augmentation de l'amplitude de réponse à la ionomycine avec les deux traitements montre que globalement les prétraitements vont augmenter les stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et notamment le contenu en calcium cytosolique.

➤ Mesures des concentrations  $\text{Ca}^{2+}$  dans les hot spots mitochondriaux

Enfin, les prétraitements n'ont pas d'effet sur la  $[\text{Ca}^{2+}]$  dans les hot spots mitochondriaux. Ceci renforce notre idée que l'activation transitoire de TRPV1 a un effet sur le contenu de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les MAMs, mais n'a pas d'effet visible sur une durée prolongée. Il existe tellement de régulation dans ces microdomaines notamment par les pompes SERCA que cela explique l'absence d'effet des traitements.

### 3-3.3 TRPV1 et mesure de la [ATP] mitochondriale

Comme indiqué dans l'introduction, la synthèse en ATP mitochondriale nécessite de l'oxygène. Au cours de l'infarctus du myocarde, l'approvisionnement en  $\text{O}_2$  de la zone infarctée est réduit. Il se produit alors une chute brutale de l'activité métabolique mitochondriale, de la concentration en ATP cytosolique et de ce fait, se produit une fuite massive de calcium du réticulum vers le cytoplasme (via les canaux de fuite) et la mitochondrie. Cette surcharge calcique, cytosolique et mitochondriale, engendre à terme la mort des cellules.

Du point de vue physiologique, la synthèse d'ATP mitochondriale est dépendante du calcium<sup>76</sup>. De ce fait, un approvisionnement régulier en calcium, par le réticulum sarcoplasmique, via les canaux de fuite et les R-IP3 au sein des MAMs, est nécessaire et génère un cycle du calcium entre les deux organites.

Nous avons donc voulu vérifier si TRPV1, en tant que canal de fuite calcique réticulaire, peut moduler la synthèse d'ATP mitochondriale. Nous posons l'hypothèse que l'activation de TRPV1 pourrait induire une hausse de l'activité métabolique des mitochondries. A l'inverse, l'inhibition de TRPV1 pourrait diminuer la concentration en ATP de l'organite au fil du temps. Nous avons montré que l'activation de TRPV1 entraîne une augmentation transitoire de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie. Pour aller plus loin, nous pensons que le déclenchement d'une fuite de calcium réticulaire lors d'un préconditionnement est cardioprotecteur. Ceci a déjà été vérifié *in vivo* sur des souris soumises à un préconditionnement avec une concentration faible de TG<sup>172</sup>. L'activation préventive de TRPV1 lors d'un préconditionnement serait donc bénéfique pour les cellules cardiaques en augmentant le contenu des stocks d'ATP en amont de l'ischémie.

Au cours de mon master 2, j'ai mesuré la concentration en ATP dans la mitochondrie suite à des prétraitements avec la CAP et la CPZ à 100  $\mu\text{M}$ . En effet, il a été montré qu'au cours de l'ischémie-reperfusion la concentration en ATP s'effondre. De plus, la synthèse d'ATP mitochondriale nécessite une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie. Le  $\text{Ca}^{2+}$  provient notamment du RE via les canaux de fuites.

Ces enzymes ont été détaillées dans la partie 3-4.5 de la partie « introduction » et sont les suivantes : la FAD<sup>+</sup> glycérol phosphate déshydrogénase, la pyruvate déshydrogénase phosphatase, la NAD<sup>+</sup> isocitrate déshydrogénase, la 2-oxoglutarate déshydrogénase et la F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> ATP synthase. Le canal TRPV1 pourrait donc être impliqué dans la régulation de ces enzymes puisque nous avons montré que TRPV1 est un canal de fuite fonctionnel dans les cellules H9C2. L'idée est qu'un PréC par l'activation de TRPV1 pour potentialiser la synthèse d'ATP par TRPV1 en amont de l'ischémie-reperfusion.

Malheureusement, ces prétraitements ont généré des réponses identiques, c'est-à-dire une diminution du contenu basal en ATP dans les mitochondries mais également une diminution de l'amplitude de réponse à l'oligomycine-A (inhibiteur sélectif de l'ATP synthase). Ces résultats étant incohérents, nous ne les avons pas inclus dans le manuscrit. Les fortes concentrations de ces deux molécules (100 µM au lieu des 20 µM employés par la suite) ont certainement eu des effets délétères sur la bioénergétique mitochondriale.

### 3-3.4 Absence d'effet de TRPV1 sur le potentiel de membrane mitochondrial.

Les travaux de Hurt *et al* ont mis en évidence, par microscopie confocale, un effet de la CAP, notamment à 10 µM, sur le potentiel de membrane mitochondrial. L'activation de TRPV1, par rapport aux cellules contrôles, diminue l'intensité de fluorescence des cardiomyocytes néonataux de rats. Dans cette étude le ratio de fluorescence évolue de 1 à 0.4. Dans notre étude, au contraire, nous avons montré, par cytométrie en flux, que les agonistes et antagonistes de TRPV1 n'avait pas d'effet sur le potentiel de membrane mitochondrial par rapport aux cellules contrôles. Nos résultats sont renforcés par l'utilisation de deux sondes différentes (DiIC1 et TMRM).

### 3-4 Rôle de TRPV1 lors de de l'hypoxie-réoxygénation des cellules H9C2

Tout d'abord, il faut noter que le taux d'oxygène dans les organes est différent de celui de l'atmosphère. En effet, dans le cœur *in vivo*, le taux d'oxygène varie de 4 à 8%<sup>351</sup>. Lorsque les cellules sont en culture *in vitro*, le taux d'oxygène se rapproche de celui de l'atmosphère (20,9%) et est proche de 20% (5% de CO<sub>2</sub> et 75% de N<sub>2</sub>)<sup>352</sup>. On peut alors considérer que les cellules, dans nos conditions de culture, ne sont pas en normoxie mais plutôt en hyperoxie.

Nous avons mis en évidence que la modulation pharmacologique de TRPV1 génère des effets hétérogènes sur la mortalité cellulaire après une séquence d'hypoxie réoxygénation des cellules H9C2.

L'activation de TRPV1 par la RTX a eu un effet protecteur. Cet effet bénéfique pourrait être expliqué par une augmentation transitoire de la [Ca<sup>2+</sup>] dans la mitochondrie, et par extrapolation, une augmentation de la synthèse d'ATP dans ce même organelle. La cellule serait donc plus apte et résistante à l'hypoxie. En revanche, l'effet délétère de l'activation de TRPV1 par la RTX sur le long terme (toute la séquence d'hypoxie-réoxygénation en PerC<sup>+</sup>/-PréC) pourrait être expliqué par une vidange complète du contenu de Ca<sup>2+</sup> du RE, entraînant alors un stress du RE. Cette vidange est renforcée au cours de l'hypoxie puisque les pompes SERCA, ATP-dépendantes, ne fonctionnent plus.

Les résultats bénéfiques du PréC par activation de TRPV1 sont retrouvés dans la littérature. En effet, certaines études ont montré l'effet cardioprotecteur de l'activation de TRPV1 en PréC sur des rats qui réduit la taille de l'infarctus<sup>324</sup>. A contrario, une autre étude a montré que l'activation de TRPV1 exacerbe l'apoptose induite par l'hypoxie-réoxygénation. Cette différence de réponse pourrait être, comme expliqué précédemment, due à la durée de stimulation de TRPV1 : une activation prolongée est délétère alors qu'une stimulation de courte durée est bénéfique.

A ce stade, il est important de discuter des travaux de Sun *et al*<sup>265</sup>. Ces auteurs montrent dans leur étude que TRPV1 est certes exprimé dans les cellules H9C2, mais en plus faible quantité que dans les neurones

de l'hippocampe. Les molécules pharmacologiques utilisées (CAP ou CPZ) sont incubées pendant toute la séquence d'hypoxie-réoxygénation (5h et 1h respectivement). Ils indiquent dans un premier temps que l'hypoxie-réoxygénation active TRPV1 (phosphorylation). Dans un second temps, ils démontrent que l'activation de TRPV1 au cours de cette séquence augmente la mort cellulaire. Ces résultats sont en accord avec les nôtres : une activation prolongée de TRPV1 est nocive sur la survie cellulaire. Le point discutable de ce papier est que l'activation de TRPV1 induit également une mortalité cellulaire en normoxie. Curieusement, la mort cellulaire serait même plus importante au cours de la normoxie qu'au cours de l'hypoxie-reoxygénation. Dans le cadre de ma thèse, nous avons effectué ces contrôles et nous avons montré qu'une activation de TRPV1 au cours de la normoxie n'a aucun effet sur la mortalité cellulaire (figure 83).

Concernant les effets possiblement bénéfiques de l'inhibition de TRPV1, nous avons émis l'hypothèse qu'il faut, au cours d'une séquence d'hypoxie-réoxygénation, ralentir le relargage calcique du réticulum en direction de la mitochondrie. Ainsi, les antagonistes de TRPV1 pourraient par ce biais favoriser la survie cellulaire. La CPZ a eu, à la dose utilisée (20  $\mu$ M) un effet cytoprotecteur lors d'un PerC et d'un PréC+PerC. La iRTX (10  $\mu$ M) a, quant à elle, diminué la mortalité cellulaire lors d'un PerC, d'un PréC et d'un PréC+PerC. Malheureusement, ni la CPZ, ni la iRTX n'ont été efficaces lors d'un PostC. Cela signifie donc que l'inhibition préventive de TRPV1 en amont de la réoxygénation, c'est-à-dire avant l'hypoxie et au cours de cette dernière, ralentirait la vidange calcique générale. Il semble donc que le blocage seul de TRPV1 ne peut en effet stopper complètement le relargage calcique. D'une part, parce qu'il existe d'autres canaux de fuite réticulaires dont le translocon qui fait l'objet d'autres travaux de thèse et d'autre part, parce qu'en conditions hypoxiques, le blocage de TRPV1 s'accompagne d'un ralentissement des pompes ATP-dépendantes telle que les pompes SERCA. Il serait donc intéressant de mesurer les flux calciques (réticulaires, cytoplasmiques et mitochondriaux) au cours de séquences d'hypoxie-réoxygénation dans les différentes conditions décrites ci-dessus. Ce point fait partie des perspectives importantes de ces travaux de thèse. Pour aller plus loin, nous pourrions également associer l'inhibition de plusieurs canaux de fuite (TRPV1, translocon et autres) afin de favoriser une survie cellulaire plus importante sans augmenter les concentrations de modulateurs de TRPV1 et ainsi ne pas atteindre de concentrations cytotoxiques et aspécifiques.

### 3-5 Conclusion

En conclusion de cette étude, les résultats obtenus ont été obtenus et vérifiés au moyen de plusieurs techniques et de plusieurs molécules pharmacologiques. Nous avons montré que TRPV1 est un canal de fuite calcique fonctionnel du RE dans les cellules H9C2. Cette étude éclaire également le rôle important de TRPV1 dans le maintien de l'homéostasie calcique mais aussi au cours de l'ischémie-reperfusion myocardique. En revanche, il serait important de compléter ces expériences avec des siRNA dirigés contre TRPV1. En effet, l'étude présentée ici se base sur une validation pharmacologique pharmacologique avec ses avantages : facilité d'exécution mais avec ses inconvénients : aspécificités et toxicités éventuelles des molécules employées. C'est pourquoi, au cours de ma thèse, j'ai essayé de mettre au point plusieurs siRNA dirigés contre TRPV1. Malheureusement, après les 6 siRNA testés, aucun d'entre eux n'a permis de diminuer suffisamment l'expression de TRPV1 dans les cellules H9C2. L'une des principales perspectives à court terme de cette étude est donc de mettre au point un siRNA fonctionnel afin de corroborer les résultats pharmacologiques.

Nous sommes également conscients des limites de notre approche expérimentale. D'une part, nous n'oublions pas que TRPV1 est un canal non sélectif, laissant donc transiter d'autres cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , etc.) important pour l'équilibre, non pas uniquement calcique, mais ionique de la cellule. Puis, en regardant les variations calciques, compartiment par compartiment, nous réalisons un découpage des événements calciques en termes de spatialité. Enfin, en réalisant nos expériences d'imagerie en absence

de calcium externe, nous nous affranchissons des phénomènes d'entrée capacitive et simplifions les événements, (alors que la contribution de NCX et son éventuel passage en mode reverse sont primordiaux lors d'une I/R). Mais ces trois clauses restrictives nous permettent d'appréhender pas à pas le fonctionnement de TRPV1.

A l'inverse, nos séquences *in vitro* d'I/R incorporent ces différents paramètres, ce qui explique les divergences avec nos observations séquentielles et qui rend difficile l'interprétation intégrée des différents résultats (obtenus dans des conditions expérimentales différentes) sans tomber dans la surinterprétation.

#### 4- Les adénovirus, un compromis entre les deux modèles, lignée H9C2 et cardiomyocytes primaires ?

Comme décrit précédemment, nous sommes en cours de développement des adénovirus correspondant aux sondes génétiques : ErGAP1, n33D1CPB et Ateam<sub>mito</sub>. Actuellement au laboratoire, nous possédons déjà les adénovirus pour 4mtD3CPV et D4ER. Des expériences ont été réalisées avec ces sondes sur des cardiomyocytes adultes de souris, et vont être publiées prochainement (Dia *et al*, Al-Mawla *et al*). Ces deux adénovirus nous permettent de suivre la concentration en Ca<sup>2+</sup> dans la mitochondrie et dans le RS respectivement. En revanche, ils nécessitent une chirurgie puisqu'ils sont injectés en intracardiaque chez la souris. Ce protocole demande du personnel compétent mais également un suivi particulier des souris pendant 10 jours. La chirurgie présente également un autre inconvénient puisqu'elle va créer de l'inflammation au niveau de la zone d'injection. De plus, l'efficacité d'infection des cellules par les adénovirus est assez faible : nous obtenons entre 15 et 20 cellules infectées par cœur et par jour de microscopie. Ce ratio est faible par rapport à un ratio de transfection classique. Les cardiomyocytes étant fragilisés au cours de la dissociation, nous estimons que les premières cellules à mourir seront celles infectées.

Néanmoins, cette technique est innovante et nous permet de suivre le Ca<sup>2+</sup> dans les différents compartiments préalablement cités dans des cardiomyocytes adultes primaires. Nous allons donc mettre au point ces adénovirus dans les cardiomyocytes de souris. Dans le futur, nous développerons également les AAV (adeno associated virus), des petits virus à ADN, non pathogènes. Ils peuvent être injectés directement dans la queue des souris. Cette injection serait à la portée de toutes les personnes formées à la manipulation des animaux. Ici, l'efficacité de l'infection serait probablement augmentée puisque ces virus ont l'avantage d'être très attractifs comme vecteur de transfert de gènes. Il serait donc plus simple de faire exprimer dans les souris les différentes sondes fluorescentes. Derniers avantages et non des moindres l'injection caudale permettrait de limiter l'inflammation en post-injection et bien naturellement ne nécessite pas les interventions lourdes cardiaques.



# **Conclusion et perspectives**



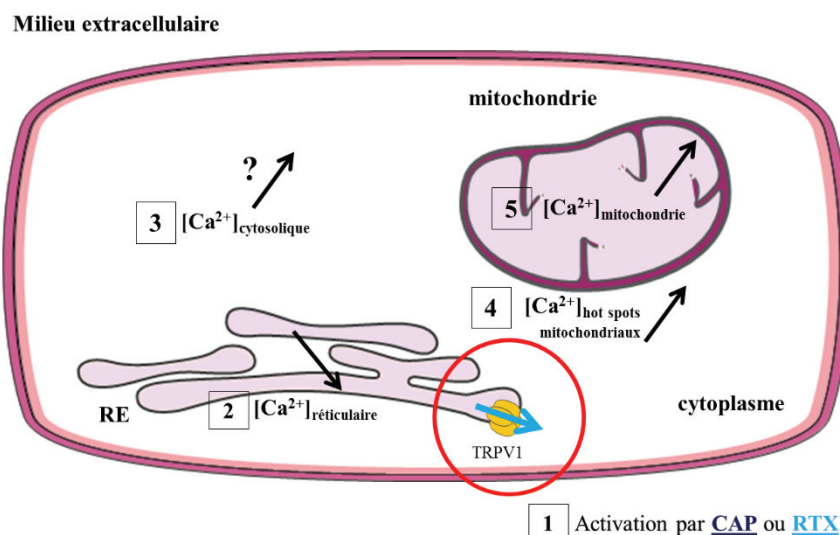


## 1- Bilan des résultats

Dans un premier temps, nous avons montré au moyen de différentes techniques complémentaires que TRPV1 est exprimé dans la lignée H9C2 et localisé à la membrane du RE et probablement présent dans les MAMs. Le caractère fonctionnel de TRPV1 comme canal de fuite calcique réticulaire a par la suite été démontré. Dans cette partie, j'ai synthétisé les résultats obtenus lors de stimulation aigues du canal. En revanche, les résultats obtenus au cours d'applications de courte durée sont encore difficiles à analyser pour en faire une synthèse. En effet, pendant les 30 minutes de prétraitement, de l'étude, des mécanismes complexes se mettent en route. Il existe probablement des compensations entre les différents partenaires de l'homéostasie calcique (IP3R, SERCA, les autres canaux de fuite, PMCA...). La compréhension de ces processus nécessitera des expériences complémentaires décrites en perspectives.

La séquence des résultats obtenus au cours de mes travaux de thèse est la suivante (figure 98):

- 1- L'activation de TRPV1 par ces agonistes (par la CAP et la RTX)
- 2- Entraîne une vidange calcique et une diminution de la  $[Ca^{2+}]$  réticulaire
- 3- L'activation en aigu de TRPV1 n'a pas montré de modulation de la  $[Ca^{2+}]$  cytosolique globale. L'amplitude de réponse TG est diminuée lors qu'un prétraitement avec la RTX.
- 4- L'activation de TRPV1 entraîne une augmentation de la  $[Ca^{2+}]$  au niveau des hot spots mitochondriaux
- 5- L'activation en aigu de TRPV1 a pour conséquence une hausse significative de la  $[Ca^{2+}]$  mitochondriale. L'amplitude de la réponse à la ionomycine est augmentée lors d'un prétraitement avec la RTX.



**Figure 91.** Zoom sur l'effet de la modulation de TRPV1 sur le contenu calcique des différents compartiments cellulaires des cellules H9C2

De manière intéressante, nous avons mis en évidence que la modulation pharmacologique de TRPV1 a un impact sur la mortalité cellulaire après une séquence d'hypoxie-réoxygénation. En effet, nous avons démontré qu'une activation supérieure à 2h de TRPV1 pendant l'hypoxie-réoxygénation était délétère, en revanche, une pré-activation du canal pendant 30 minutes permet de diminuer les lésions cellulaires.

Enfin, nous avons également montré qu'une inhibition du canal, en PréC ou en PerC permet d'augmenter la viabilité cellulaire.

Ces résultats obtenus sont encourageants et démontrent le rôle potentiel de TRPV1 comme cible pharmacologique potentielle afin de diminuer les lésions de reperfusion dans le cadre de l'infarctus du myocarde. Tout aussi important, TRPV1 ne se situe pas au sein de la partie jonctionnelle (zone responsable de la libération de calcium via les RyRs) mais dans la partie longitudinale du RS. Ainsi, la modulation pharmacologique de TRPV1 pourrait favoriser la survie cellulaire sans altérer les stocks calciques responsables du déclenchement de la contraction. Ces derniers points seront naturellement à vérifier.

## 2- Perspectives de l'étude

### 2-1 Suite des travaux sur la lignée H9C2

#### 2-1.1 **Poursuite de la localisation subcellulaire de TRPV1**

Les perspectives de cette étude sont de poursuivre les études confortant la localisation subcellulaire de TRPV1 dans les cellules H9C2. En effet, nous avons montré par différentes techniques que TRPV1 est exprimé à la membrane du RE. Nous aimerions également par électrophysiologie exclure sa potentielle localisation de TRPV1 à la membrane plasmique. Nous allons donc tester les agonistes de TRPV1 et mesurer les courants TRPV1-dépendants.

Puis, comme l'indique les résultats sur le contenu de  $Ca^{2+}$  dans les hot spots mitochondriaux, il semblerait que TRPV1 soit localisé à proximité d'IP3R (démontré par immunofluorescence) et par conséquent dans les MAMs. Nous n'avons pas retrouvé ce résultat par Western blot, mais comme l'échantillon n'était trop visqueux, nous allons répéter cette expérience.

En parallèle et comme décrit précédemment, l'une des perspectives de cette étude est de mettre au point un siRNA fonctionnel contre TRPV1 afin de répéter une partie des expériences déjà réalisées telles que la mesure de la concentration de  $Ca^{2+}$  dans le RE et dans les hot spots mitochondriaux après stimulation avec les agonistes de TRPV1. En effet, à l'heure actuelle, nous avons confirmé la fonctionnalité de TRPV1 uniquement par modulation pharmacologique. L'obtention du siRNA serait un atout pour la validation de TRPV1 comme canal calcique fonctionnel dans les cellules H9C2.

Il serait intéressant de mesurer la concentration calcique dans les différents compartiments étudiés (réticulaire, cytosolique, mitochondrial et dans les hot spots mitochondriaux) au cours d'une hypoxie-réoxygénation. Dans un premier temps, la séquence de 4h50 d'hypoxie et 2h de reperfusion pourrait être utilisée mais elle est peu compatible pour tester différentes conditions sur une même journée. C'est pourquoi au sein du laboratoire la séquence a été adaptée : 30 minutes d'hypoxie suivies de 30 minutes reperfusion. Pour que l'hypoxie génère une mort cellulaire rapidement, de la dithionite est ajoutée dans le milieu d'hypoxie afin de chélater l'oxygène dans le milieu. Nous pourrions alors évaluer les conséquences de la modulation de TRPV1 au cours de l'hypoxie-réoxygénation sur les concentrations calciques dans ces différents compartiments.

#### 2-1.2 **Activation de potentielle de TRPV1 par l'acidose induite par l'hypoxie-réoxygénation**

Lorsque les mesures de calcium auront été effectuées dans les compartiments d'intérêt, il serait également intéressant de mesurer l'évolution du pH intracellulaire au cours de l'hypoxie-réoxygénation. En effet, la question posée serait est-ce que « l'acidose induite au cours de l'hypoxie serait-elle suffisante pour activer TRPV1 ? La réponse à cette question pourrait potentiellement nous renseigner sur les résultats obtenus lorsque TRPV1 est activé par la RTX au cours de l'hypoxie. En effet, nous avons

mesuré une très nette augmentation de la mortalité lorsque la RTX est appliquée durant toute la durée de la séquence. Nous supposons que si TRPV1 est d'autant plus activé avec l'acidification du pH, cela serait délétère pour la cellule. Cela expliquerait également le fait qu'une meilleure cardioprotection puisse être obtenue à partir cette fois d'inhibiteur de TRPV1. L'acidification du pH cytosolique ne pourrait plus stimuler des canaux TRPV1 inhibés en préC et/ou en perC. Dans la même logique, le postC avec des inhibiteurs de TRPV1 serait alors inefficace car survenant, dans le temps, après l'activation massive du canal par l'acidose.

### **2-1.3 Rôles de TRPV1 dans la synthèse d'ATP mitochondriale**

Il est connu que la synthèse d'ATP dans une cellule est issue de la glycolyse anaérobie et de la phosphorylation oxydative. Au cours de séquences d'ischémie-reperfusion, la seconde voie de synthèse sera impactée. Nous désirons donc, *in vitro*, suivre l'évolution des stocks d'ATP mitochondriaux et cytosoliques grâce aux sondes génétiques à notre disposition durant des épisodes d'hypoxie-réoxygénation. Ces travaux se feront tout d'abord sur la lignée H9C2, puis, si les AAV correspondants sont mis au point, sur des cardiomyocytes primaires. Bien naturellement, seront appréhendés les effets de la modulation de TRPV1 sur la bioénergétique des cellules (PréC, PerC, postC, ...) sur l'évolution de ces stocks d'ATP en amont de l'hypoxie, durant l'hypoxie, pendant la réoxygénation et par la suite.

### **2-1.4 Une autre lignée cellulaire d'intérêt ?**

Enfin, pour contrebalancer les inconvénients des cellules H9C2 immortalisées, nous pourrions utiliser des cardiomyoblastes de rat non-immortalisés et que nous différencierions en cardiomyocytes. Ces cellules auraient l'avantage d'exprimer une protéine très importante pour l'homéostasie calcique : les RyR. En effet, les cellules H9C2 que nous utilisons ne possèdent pas cette protéine et donc sont non contractiles. C'est pourquoi avoir des cellules H9C2 contractiles permettrait d'avoir un modèle plus physiologique qui se rapprocherait davantage des cardiomyocytes adultes de souris.

## **2-2 Perspectives de recherche sur le modèle cardiomyocytes primaires de souris.**

### **2-2.1 Caractérisation des cardiomyocytes primaires de souris WT et KO TRPV1**

Tout d'abord, il est important de poursuivre l'évaluation de l'expression des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique telles que SERCA, IP3R, RyR, PMCA, et NCX des cardiomyocytes issus de souris WT et KO-TRPV1. Nous souhaiterions vérifier si l'absence de canal fonctionnel chez ces animaux génère éventuellement des mécanismes de compensation au niveau de l'homéostasie calcique.

Dans une approche similaire à celle détaillée plus haut pour les cellules H9C2, il serait intéressant de compléter les expériences initiales de mesures des concentrations de calcium réticulaire, mitochondriale, des hot spots avec d'autres outils que des sondes chimiques c'est-à-dire au moyen des adénovirus (détaillé dans la partie 4 de la discussion). Les contenus des stocks calciques sont-ils similaires à ceux des souris WT ?

### **2-2.2 Etude de TRPV1 en cytométrie en flux**

Grâce aux développements méthodologiques, en cytométrie en flux, réalisés au cours de ma thèse sur les cardiomyocytes adultes de souris, nous pourrions étudier le rôle et les effets de la modulation de TRPV1 après une séquence d'hypoxie-réoxygénation sur ces cellules. Nous avons mis au point une séquence de 45 minutes d'hypoxie, suivie de 3 heures de reperfusion. Cette séquence est suffisante pour obtenir des lésions d'hypoxie et de reperfusion. Les travaux préliminaires de l'équipe ont mis en évidence que ces lésions pouvaient être reversées via l'utilisation d'une molécule pharmacologique : la CsA. Contrairement à la microscopie où nous étions un champ focal à la fois, la cytométrie en flux permet de mesurer différents paramètres en parallèle (mortalité cellulaire, potentiel de membrane

mitochondrial, ROS et masse mitochondriale) sur un nombre important de cellules (1000 cellules par tube).

Il serait donc intéressant par la suite de moduler TRPV1 avec les mêmes agonistes et antagonistes utilisés sur les cellules H9C2 et de mesurer ces paramètres.

### 2-3 Expérimentations *in vivo* du rôle de TRPV1 dans l'ischémie-reperfusion cardiaque.

Les perspectives de cette étude sont de compléter les différents groupes *in vivo*. Dans un premier temps, nous allons vérifier les données de la littérature en les reproduisant éventuellement. Nous allons donc effectuer des PréC et des PostC mécaniques sur des souris WT et des souris KO TRPV1 afin de vérifier, dans nos mains, que les souris KO TRPV1 ne sont pas protégées<sup>234,235</sup>.

Dans un second temps, nous allons vérifier si la modulation de TRPV1, en préC et en postC au cours d'une séquence d'ischémie-reperfusion peut générer une diminution de la taille d'infarctus. Les effets cytoprotecteurs obtenus *in vitro* seront-ils retrouvés *in vivo* ?

## Liste des communications

**Avril 2017** – Poster commenté au printemps de la cardiologie (Nantes) - Étude du rôle cardioprotecteur des canaux TRPV1 dans la lignée cellulaire H9C2

**Septembre 2017** – Communication orale au congrès international canaux ioniques (Sète) - Cardioprotective role of TRPV1 channels in H9C2 cell line

**Octobre 2017** – Communication orale à la journée scientifique de l'école doctorale EDISS (Lyon) - Cardioprotective role of TRPV1 channels in H9C2 cell line

**Décembre 2017** – Poster commenté à la journée scientifique de la SFR santé Lyon Est (Lyon) - Cardioprotective role of TRPV1 channels in H9C2 cell line

**Avril 2018** – Poster commenté au printemps de la cardiologie (Montpellier) - Cardioprotective role of TRPV1 channels in H9C2 cell line

**Juin 2018** – Poster commenté à la journée scientifique du CRCL (Lyon) - Role of calcium buffering by CALB1 in regulating Oncogene-Induced Senescence

*Poster présenté par Clotilde Bernard, une collaboration avec le CLB*

**Septembre 2018** – Poster commenté au congrès international canaux ioniques (Sète) - TRPV1 inhibition supports cell survival during hypoxia/reoxygenation in the rat cardiomyoblast H9C2 cell line

**Mars 2019** – Communication orale aux jours pros à l'université catholique de l'Ouest (Angers) - Témoignage d'anciens étudiants de licence SVT - De la licence à une thèse (invitation)

**Avril 2019** – Poster commenté au printemps de la cardiologie (Lille) - TRPV1 inhibition supports cell survival during hypoxia/reoxygenation in the rat cardiomyoblast H9C2 cell line

## Liste des publications

### Articles publiés :

**An innovative sequence of hypoxia-reoxygenation on adult mouse cardiomyocytes in suspension to perform multilabeling analysis by flow cytometry.**

Alexandre Paccalet\*, Nolwenn Tessier\*, Mélanie Paillard, Lucille Païta, Ludovic Gomez, Noëlle Gallo Bona, Christophe Chouabe, Christelle Léon, Michel Ovize and Claire Crola Da Silva. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019

**A modified calcium retention capacity assay clarifies the roles of extra-and intracellular calcium pools in mitochondrial permeability transition pore opening**

Rania Harisseh\*, Maryline Abrial\*, Pascal Chiari, Ribal Al-Mawla, Camille Villedieu, Nolwenn Tessier, Gabriel Bidaux, Michel Ovize, and Abdallah Gharib. *Journal of Biological Chemistry.* 2019

**Pathophysiological role of TRPV1 in malignant hyperthermia: identification of new variants**

Nolwenn Tessier\*, Mallory Ducrozet\*, Sylvie Ducreux, Julien Fauré<sup>□</sup>, Fabien Van Coppenolle<sup>□</sup>. *Biomed J Sci & Tech Res.* 2018

**Role of the anti-ageing protein Klotho in IGF-1 signaling and reticular calcium leak: impact on the chemosensitivity of Dedifferentiated Liposarcomas**

Delcroix V, Mauduit O, Tessier N, Montillaud A, Ducret T, Chibon F, Van Coppenolle F, Ducreux S, Vacher P. *Cancers.* 2018

**TRPV1 variants impair intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling and confer susceptibility to malignant hyperthermia**

Fabien Vanden Abeele\*, Sabine Lotteau\*, Sylvie Ducreux, Charlotte Dubois, Nicole Monnier, Amy Hanna, Dimitra Gkika, Caroline Romestaing, Lucile Noyer, Matthieu Flourakis, Nolwenn Tessier, Ribal Al-Mawla, Christophe Chouabe, Etienne Lefai, Joël Lunardi, Susan Hamilton, Julien Fauré, Fabien Van Coppenolle, and Natalia Prevarskaya. *Genetics in medicine.* 2018

### Articles en cours de publication ou d'écriture :

**Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) operates as a reticular Ca<sup>2+</sup> leak channel in adult mouse cardiomyocytes**

Tessier N\*, Païta L\*, Al-Mawla R, Chouabe C, Bidaux G, Thibault H, Hage C-H, Augeul L, Crola Da Silva C, Pillot B, Ovize M, Ducreux S\* and Van Coppenolle F\*. En cours d'écriture (soumission 2019)

**TRPV1 inhibition supports cell survival during hypoxia/reoxygenation in the rat cardiomyoblast H9C2 cell line**

Nolwenn Tessier, Sally Badawi, Mallory Ducrozet, Christophe Chouabe, Claire Crola Da Silva, Gabriel Bidaux, Michel Ovize, Fabien Van Coppenolle\*, Sylvie Ducreux\*. En cours d'écriture (soumission 2019)



**Diet reversal counteracts the early stage of diabetic cardiomyopathy by maintaining the reticulum-mitochondria interactions**

Maya Dia, Ludovic Gomez, Hélène Thibaut, Nolwenn Tessier, Christophe Chouabe, Sylvie Ducreux, Emily Tubbs, Nadia Bendridi, Aymeric Leray, Name EdyP, Mazen Kurdi, Michel Ovize\*, Jennifer Rieusset\*, Melanie Paillard. Soumis 2019.

**Acute induction of translocon-mediated Ca<sup>2+</sup> leak from longitudinal sarcoplasmic reticulum protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury**

Ribal Al-Mawla\*, Nolwenn Tessier\*, Mallory Ducrozet\*, Gabriel Bidaux, Lucille Paita, Bruno Pillot, Yves Gouriou, Ludovic Gomez, Camille Villedieu, Zeina Harhous, Mallory Ducrozet, Robert Bonvallet, Michel Ovize, Sylvie Ducreux\$, Fabien Van-Coppenolle\$. *PNAS*. Soumis 2019.



# Annexes



## Annexe 1

An innovative sequence of hypoxia-reoxygenation on adult mouse cardiomyocytes in suspension to perform multilabeling analysis by flow cytometry

1 **An innovative sequence of hypoxia-reoxygenation on adult mouse cardiomyocytes in suspension**  
2 **to perform multilabeling analysis by flow cytometry**

3 Alexandre Paccalet<sup>1</sup>, Nolwenn Tessier<sup>1</sup>, Melanie Paillard<sup>1</sup>, Lucille Païta<sup>1</sup>, Ludovic Gomez<sup>1</sup>, Noëlle  
4 Gallo Bona<sup>1</sup>, Christophe Chouabe<sup>1</sup>, Christelle Léon<sup>1</sup>, Sally Badawi<sup>1</sup>, Zeina Harhous<sup>1</sup>, Michel Ovize<sup>1,2</sup>  
5 and Claire Crola Da Silva<sup>1\*</sup>

6 \*These authors contributed equally to this work

7 (1) Univ Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM, INRA, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon  
8 1, 69500, BRON, France

9 (2) Service d'Explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires and CIC de Lyon, Hôpital Louis Pradel,  
10 Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

11

12 Running Head : Innovative hypoxia-reoxygenation sequence in suspension

13

14 \*Corresponding author :

15 Crola Da Silva Claire

16

17 [claire.crola-da-silva@univ-lyon1.fr](mailto:claire.crola-da-silva@univ-lyon1.fr)

18 IHU OPERA-INSERMU1060 CarMeN  
19 Groupement Hospitalier EST-Batiment B13  
20 59 Boulevard Pinel  
21 69500 BRON  
22 +33 478777091  
23

24 KEYWORDS : myocardial infarction, cardiomyocytes, flow cytometry

25 List of Abbreviations

CM	Cardiomyocytes
H/R	Hypoxia-reoxygenation
HB	Hypoxia Buffer
PostC	Postconditioning
BSA	Bovine Serum Albumin
CsA	Cyclosporine A
PI	Propidium Iodide
H	Hypoxia
R	Reoxygenation
Calcein	Calcein AM
DilC1(5)	DilC1(5) iodide
MitoSOX	MitoSOX <sup>TM</sup> Red Mitochondrial Superoxyde Indicator red
TMRM	Tetramethylrhodamine, MethylEster, Perchlorate
Sytox Green	Sytox <sup>TM</sup> Green Dead Cell stain
MTR	MitoTracker <sup>TM</sup> Deep Red FM

26

27

28

29 Abstract :

30 Cardiovascular diseases remain the leading cause of death worldwide. Although major therapeutic  
31 progress has been made during the past decades, a better understanding of the underlying mechanisms  
32 will certainly help to improve patient's prognosis. *In vitro* models, particularly adult mouse  
33 cardiomyocytes, have been largely used; however, their fragility and large size are major obstacles  
34 to the use of flow cytometry. Conventional techniques such as cell imaging, require the use of large  
35 numbers of animals and are time-consuming. Here, we described a new, simple and rapid one-day  
36 protocol using living adult mouse cardiomyocytes in suspension exposed to hypoxia-reoxygenation  
37 that allows a multilabeling analysis by flow cytometry. Several parameters can be measured by  
38 fluorescent probes labeling to assess cell viability (Propidium Iodide, Calcein-AM and Sytox Green),  
39 mitochondrial membrane potential (DiI C1(5), TMRM), reactive oxygen species production  
40 (MitoSOX Red) and mitochondrial mass (MitoTracker Deep Red). We address the robustness and  
41 sensitivity of our model using a cardioprotective agent, cyclosporine A (CsA). Overall, our new  
42 experimental set up offers a high-speed quantitative multilabeling analysis of adult mouse  
43 cardiomyocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. Our model might be interesting to investigate  
44 other cellular stresses (oxidative, inflammation) or to perform pharmacological screening.

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67



68 **Introduction**

69 Coronary artery diseases are among the leading causes of death worldwide. Despite major progress  
70 made during the past three decades, the incidence of mortality and heart failure after a prolonged  
71 myocardial ischemia-reperfusion remains way too high. Despite very encouraging experimental data  
72 and proof-of-concept clinical studies, most protective intervention, e.g. “conditioning strategies” have  
73 failed so far to bring significant clinical benefit (6, 12, 13). Obviously, insufficient understanding of  
74 the mechanisms of ischemia-reperfusion injury of cardiomyocytes (CM) exposed to a prolonged  
75 hypoxia-reoxygenation (H/R) precludes the development of successful therapies.

76 To decipher these molecular mechanisms, various cellular models have been developed over the years.  
77 Several cardiac cell lines are available and many studies have been performed using newborn mice or  
78 rat primary CM culture (1, 16). A more relevant model for studying cardiac function would however  
79 be the isolated adult CM, owing to the preservation of the contractile apparatus and cellular  
80 electrophysiological properties. However, resistance of adult CM to ischemia-reperfusion injury varies  
81 according to species and the duration of the experiment, in part because of the inability to detach them  
82 after plating. These cells are not easily transfectable by lipofection methods and the required  
83 adenovirus strategy is not compatible with their conservation time. Despite reports mentioning the  
84 possibility of preserving mouse CM several days, studies have shown that they differentiate after 24  
85 hours (2, 21).

86 As a matter of fact, these cells are mainly used with conventional techniques, including single-cell  
87 imaging or fluorometry. As opposed to flow cytometry, these techniques are time-consuming and  
88 necessitate a large sample size to achieve sufficient statistical power and reproducibility. Flow  
89 cytometry has been performed in mouse heart cells suspensions for different goals like sorting non-  
90 myocyte cardiac lineage (2, 26, 27, 31), assessing the size of rabbit fixed CM (20) and evaluating the  
91 purification yield or one labeling function performed in mouse and rat CM (9, 17, 27). These studies  
92 did not take advantage of flow cytometry to perform a wide array of cellular functions under a cellular  
93 stress.

94 In the present study, we describe how an innovative sequence of hypoxia-reoxygenation applied to  
95 CM in suspension combined with flow cytometry provides a high-speed quantitative multilabeling  
96 analysis. We have built a one-day sequence to study key factors of the adaptation to *in vitro* ischemia-  
97 reperfusion injury. We propose, for example, the use of various fluorescent probes to measure several  
98 intracellular physiological parameters such as mitochondrial membrane potential, reactive oxygen  
99 species (ROS) production, cell viability and cell death pathways. Our new protocol sequence holds  
100 promise for a better understanding of the underlying mechanisms of ischemia-reperfusion damages in  
101 CM, together with a more efficient screening of protective treatments.

102

103

104 **Methods**

105  
106 **Animals**

107 Eight to twelve-weeks old C57Bl/6J mice (Charles River®) were housed in our laboratory animal  
108 facility under controlled-temperature (23°C) conditions, with a 12hrs light/12hrs dark cycle and free  
109 access to water and food (Standard Diet / SAFE®). All mice used in this study were males. All  
110 procedures were applied in accordance with the principles and guidelines established by the European  
111 Convention for the Protection of Laboratory Animals and were approved by the Lyon 1 Claude  
112 Bernard University Committee for animal research. In all experimental protocols, the n value indicates  
113 one CM preparation from one mouse.

114 All reagents, buffers, culture media and the troubleshootings concerning the following protocols are  
115 described in Supplemental methods sections I, II and III.

116  
117 The first objective was to keep CM in suspension, a prerequisite step for flow cytometry. We propose  
118 a methodological chain to allow the multilabeling of cardiomyocytes in order to investigate physiological  
119 functions under hypoxia-reoxygenation stress conditions (Fig.1).

120  
121 **Isolation of adult cardiomyocytes**

122 Following the protocol of O'Connell (23), the mouse heart was perfused using the Langerdorff  
123 technique for 3 minutes with the perfusion buffer at 37°C. Then, the perfusion buffer was replaced by  
124 myocyte digestion buffer for a duration of 2 minutes. CaCl<sub>2</sub> (final concentration 40 µM) was added to  
125 the myocyte digestion buffer, and digestion was continued for 6 minutes. Once the digestion was  
126 completed, the heart was removed and placed in a 100-mm dish and cut into small pieces with  
127 myocyte digestion buffer. Pipetting was repeated for optimal dissociation of the heart.

128 To check cell viability at the end of the isolation, 250 µL of this suspension was collected into a  
129 cytometry tube containing 250 µL of stopping buffer. CM morphology was also checked under the  
130 microscope using a single drop of cellular suspension. The cell suspension was then centrifuged for 3  
131 min at 20 g at room temperature. The pellet was resuspended in 10 mL of stopping buffer containing  
132 200 mM of ATP prior to calcium reintroduction. Calcium lifts were realized by successive  
133 centrifugations (3 min, 20 g) and changing buffer with increased calcium concentrations until reaching  
134 a final calcium concentration at 0.9 mM.

135 **Adult cardiomyocyte quantification**

136 At this step, CM were already placed in 900 µM calcium solution. The supernatant was removed and  
137 1 mL of complete medium (42.5 mL of MEM, 5 mL of foetal bovine serum (10 %), 10mM of 2,3-  
138 Butanedione monoxime (BDM), 100 U/mL Penicillin/streptomycin, 2 mM glutamine and 2 mM Na-  
139 ATP was added to the pellet (Fig. 2).

140 2 µL of the cellular suspension were diluted 25 times and used to quantify the protein concentration of  
141 this solution. This quantification was repeated in triplicates to ensure its accuracy. Standard curve was  
142 done with BSA (bovine serum albumin) at the following concentrations: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and  
143 1 mg/mL. Bio-Rad DC Protein Assay Kit 2 was used to quantify the protein concentration. Following  
144 quantification, 9 mL of complete medium were added to the previous tube, to adjust the final calcium  
145 concentration to 1.8 mM.

146 To check cell viability by flow cytometry at the end of calcium gradient, 250 µL of this suspension  
147 was collected in a cytometry tube containing 250 µL of complete medium. Of note, a mortality rate  
148 less than 30% at the end of the Ca<sup>2+</sup> lifts was necessary to proceed with the H/R sequence.

149

150

## 151 Sequence of hypoxia-reoxygenation

152 The suspension of CM was divided into two tubes (Fig. 2): 3.3 mL in the first tube for the normoxia  
153 group and 6.6 mL in the second for the hypoxia group. These two tubes were centrifuged for 3 minutes  
154 at 20 g. The cell pellets were either rinsed with 5 mL of complete medium or 5 mL of hypoxia buffer  
155 (HB) (140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES, 2mM CaCl<sub>2</sub>) in the hypoxia group to  
156 remove any nutrients. They were then centrifuged for 3 min at 20 g. Eventually, the volume of  
157 hypoxia buffer or CM complete medium was adjusted to get 1 mg/mL of CM in each tube following  
158 the protein quantification.

- 159 - Hypoxia : Isolated CM (250 µg proteins) were put on a glass petri dish according to the number of  
160 experimental groups. Importantly, glass petri dishes combined with gentle shaking were used to  
161 avoid fixation of the CM to the plate during the experiment. Hypoxic cells were incubated with 2  
162 mL hypoxia buffer and then transferred into an hypoxia incubator (Eppendorf Galaxy 48R) on a  
163 rocking platform (Grant-bio PS-M3D: 50 rpm orbital 360° reciprotal 0° vibro) at 37°C. The O<sub>2</sub>  
164 percentage was set to 0.5 %. Cells were exposed to different durations of hypoxia (from 45 to 90  
165 minutes).
- 166 - Reoxygenation: At the end of the hypoxia phase, the medium was replaced step by step by  
167 complete medium. A volume of 500 µL was replaced by 500 µL of complete medium. This step  
168 was repeated three times in order to gently change the medium after hypoxia. At the end of the  
169 series of medium changing, 500 µL of complete medium was added to adjust the final volume at 2  
170 mL of complete medium. Cells were then placed in an incubator at 37°C (atmospheric O<sub>2</sub> without  
171 CO<sub>2</sub>) to explore a range of reoxygenation durations (from 1 to 3 hours). In the treated group, 1µM  
172 of CsA was added at the onset of the reoxygenation.

## 173 Probes multilabeling

### 174 - Description of fluorescent probes

175 We focused our attention on variables commonly assessed during H/R. MitoSOX was used to measure  
176 the production of the superoxide anion. The Mitotracker Deep Red evaluated the total mitochondrial  
177 mass. In order to address cell viability, we used three different probes: Propidium Iodide (PI), the gold  
178 standard for dead cells labeling acting as an intercalating and impermeable agent; Sytox Green,  
179 comparable to PI but with possibly used in another fluorescent channel together with other probes (not  
180 compatible with PI); Calcein, often used to assess the opening probability of the mitochondrial  
181 permeability transition pore. In the present study, calcein was considered as a viability index since it is  
182 retained by living cells. Mitochondrial membrane potential was measured using TMRM, the gold  
183 standard for membrane potential measurement, or with DiIC<sub>1</sub>(5), according to their emission  
184 wavelength specificity. (Table 1). The list and reference of all probes are described in Supplemental  
185 Methods V.

186

	Probes	Extracted Information	Concentration	Loading time	Excitation/Emission max (nm)
Panel 1	Propidium Iodide	Viability	1 µg/mL	extemporarily (before acquisition)	535/620
	DiIC <sub>1</sub> (5)	Mitochondrial membrane potential	15 nM	10 min	638/658
	Calcein AM	Viability	1 µM	10 min	488/520

Panel 2	MitoSOX red	Superoxyde indicator	2 $\mu$ M	10 min	510/580
	Mitotracker Deep Red FM	Mitochondrial mass	50 nM	10 min	644/665
Panel 3	TMRM	Mitochondrial membrane potential	20 nM	10 min	548/574
	Sytox Green	Viability	1 $\mu$ M	10 min	504/523

187

188 **Table 1** : Fluorescent probes used in adult CM exposed to hypoxia-reoxygenation. The probes are  
 189 separated into three panels according to their optical properties (excitation and emission wavelengths).  
 190

### 191 - Probes loading

192 10 min before the end of the reperfusion phase, cells were loaded for 10 min at 37°C with one of the  
 193 labeling panels (Table 1), except for PI which was added directly in the FACS tube right before the  
 194 acquisition.

195 100  $\mu$ L of concentrated probe were added to the petri dish with the loading being performed under  
 196 gentle agitation. Cells were then collected and transferred into cytometer tubes. Tubes were  
 197 centrifuged for 3 min at 20 g; this step was used to wash away the dyes from the cells. Cells were then  
 198 resuspended into 500  $\mu$ L of complete medium and immediately analyzed by flow cytometry.

### 199 Flow cytometry acquisition

200 Flow cytometry experiments were conducted using a BD Fortessa X-20 flow cytometer with the  
 201 configuration described in the online methods section IV. The flow cell size of the BD Fortessa X-20  
 202 was 430 x180  $\mu$ m, i.e. compatible with the adult mouse cardiomyocyte size. Because the size of the  
 203 flow cell is standardized for any flow cytometer in any company (Table in supplemental methods  
 204 section IV), our approach can be applied to all flow cytometers. Because the CM size varies between  
 205 80 and 120  $\mu$ m, the 488 nm laser needs to be set at 25 mW and the “HIGH” speed was chosen to  
 206 ensure a better fluidity of the sample, but not to acquire more events. Data were analyzed by DIVA  
 207 Software (BD Biosciences). The population of interest was gated in P1. A threshold of FSC (5000)  
 208 allowed to eliminate debris and non CM cells. We decided to record 1000 events in triplicates to  
 209 ensure the quality of the CM. The viability was checked at the beginning of the H/R sequence by PI  
 210 staining. Acquisitions were performed according to the fluorescent channel corresponding to each  
 211 fluorescent probe in histogram plots.

212 As shown in Fig. 1, our goal was to provide an easy and fast protocol sequence to assess CM main  
 213 functions following H/R. A pre-requisite of this method was to proceed to the settings of the  
 214 population of interest and to the cytometer parameters.

215

### 216 - Gating of events

217 To confirm that our analysis was specific for CM, the gating of the cardiomyocytes was based on two  
 218 combined parameters. First, the removal of cellular debris due to the primary cell preparation was  
 219 done by threshold of population, based on both SSC and FSC, leading to the P1 gating (in red in  
 220 Fig.S1A). Second, to check the enrichment of the CM population after isolation, we performed an  
 221 immunostaining of the cells by flow cytometry with an antibody against troponin T as a CM specific  
 222 marker. Cells in the P1 gate were positive for troponin T, which reflects an enrichment of pure CM  
 223 population after isolation and calcium lifts (Fig.S1A). Thus, combination of these two gating strategies  
 224 allowed us to proceed for acquisition on our population of interest, i.e. CM. Cell viability was checked  
 225 throughout the experiment by PI staining (Fig.S1B).

226

227 - **Settings of flow cytometer parameters to perform multilabeling analysis of CM : control**  
228 **with unstained cells**

229 The settings of each photomultiplier tube (PMT) for each fluorescent channel were done using  
230 unstained versus stained cardiomyocytes. The unstained CM were arbitrarily set to the low logarithmic  
231 scale by adjusting the PMT in order to better discriminate the stained cells. The goal of the experiment  
232 was to compare the effect of H/R in a control (placebo) versus a treated (cyclosporine A) group. In  
233 order to perform our multilabeling panels, settings for panel 1 (Calcein, DilC1(5) and Propidium  
234 Iodide (3A)), for panel 2 (MitoSOX Red and Mitotracker Deep Red) and for panel 3 (Sytox Green and  
235 TMRM) were realized according to the configuration of the Fortessa X-20 flow cytometer (emission  
236 filters for each fluorescent channel: Table 1). Some probes were read on the same channel and for  
237 MTR and DilC1(5), the same unstained control was used (data not shown). As for the subsequent  
238 analysis, results were expressed as a percentage of positively-stained population (PI, Sytox Green,  
239 MitoSOX) or negatively-stained population corresponding in that case to the loss of fluorescence  
240 intensity (DilC1(5), TMRM and Calcein). MTR variations were analysed by the median of  
241 fluorescence intensity since the mitochondrial mass gives a global fluorescence intensity.

242

243 **Statistical analysis**

244 The non-parametric statistical test of Kruskal-Wallis with Dunn's post hoc test was used in figure 4,  
245 which presents non-ranked data sets. The non-parametric statistical test of Friedman , for ranked data,  
246 followed by Student-Newman-Keuls post hoc test was used in figure 5. Data were expressed as  
247 median of relative fluorescent intensity or of percentage of population  $\pm$  interquartile (25%-75%). All  
248 statistical analyses were done with Sigma Plot software. Differences were considered significant when  
249 p-value was  $< 0.05$ . The sample size for each experiment is reported in the figure legends.

250

251

## 252 **Results**

### 253 **Optimization of the H/R sequence in suspension by flow cytometry analysis in CM**

254 Our primary goal was to design a new and innovative one-day long protocol to explore the  
255 mechanisms of the tolerance of CM to H/R and screen protective treatments. We set up a modified  
256 version of the routinely used protocols of H/R. Since plated CM cannot be detached without affecting  
257 their viability and functions, we decided to perform the H/R sequence in a suspension of CM, under  
258 gentle shaking. Light shaking was effectively required to avoid potential plating of CM on the dish  
259 and glass petri dishes were also used to decrease cell adhesion. The time duration of the H/R stress  
260 sequence was optimized in order to induce cell death, yet still enabled the evaluation of the protective  
261 effect. Based on our previous H/R protocols (10, 24), we first considered three durations of hypoxia at  
262 0.5 % O<sub>2</sub>: 45, 60 and 90 minutes (Fig. 4A). Flow cytometry analysis of PI-positive CM revealed that  
263 60 and 90 minutes of hypoxia induced high levels of cell death (60 min: 87 ± 4 %, 90 min: 84 ± 8 %),  
264 leading to a very narrow window to reverse cell damage or create additional reoxygenation injury. Cell  
265 death averaged 63 ± 7 % after 45 minutes of hypoxia (Fig. 4B); so we chosen 45 minutes as the  
266 hypoxia duration.. Then,we selected the optimal time of reoxygenation in order to obtain a major  
267 reoxygenation damage (Fig. 4C). There was a significant 28% increase in CM death between 1 and 3  
268 hours of reoxygenation, depicting the reoxygenation injury. Importantly, the percentage of dead CM in  
269 each group was comparable to that previously obtained in a plated model (10). Eventually, we set our  
270 H/R protocol in suspension to 45 minutes of hypoxia followed by 3 hours of reoxygenation. This  
271 sequence was the optimal to induce CM death, and to define the potential window for protective  
272 strategies.

273

### 274 **Multilabeling flow cytometry analysis of CM allows assessment of protection against H/R**

275 We designed this new methodology both for screening putative protective interventions and for  
276 investigating the potential role of proteins in cardiovascular diseases using transgenic animals. To test  
277 the ability of our model to evaluate protective interventions (Fig. 5), we used CsA that has previously  
278 been shown to attenuate ischemia-reperfusion injury in various animal models (15, 29). We designed  
279 three complementary panels to simultaneously assess the effect of the administration at the time of  
280 reoxygenation of 1µM CsA, on both cell viability and mitochondrial functions, including: 1) PI,  
281 DilC1(5) and Calcein, 2) MitoSOX and Mitotracker Deep Red, and 3) TMRM and Sytox Green. The  
282 baseline normoxia (BN) controls were used to address cells before exposure to H/R. The effect of CsA  
283 on reperfusion injury was evaluated by comparing groups exposed to H/R with or without CsA.

284 CsA significantly and consistently decreased cell death as measured either by PI or Sytox Green (i.e.  
285 due to the permeabilization of damaged cells) and Calcein (Fig.5A). Because CsA was added at the  
286 time of reoxygenation, the observed 13-15 % decrease in cell death in the CsA-treated CM suggests a  
287 near 50% attenuation of the reoxygenation injury (Fig.4.), in agreement with the well-known  
288 protective effect of this drug. TMRM and DilC1(5) were used to measure mitochondrial membrane  
289 potential in two different panels. No significant change in mitochondrial membrane potential was  
290 observed with DilC1(5). In contrast, TMRM detected a decrease of negatively stained cells, suggesting  
291 a mild recovery of HR-reduced mitochondrial membrane potential in CM after CsA treatment (Fig.  
292 5B). CsA did not prevent the HR-induced increase in superoxide anion production (MitoSOX), and  
293 did not modify the mitochondrial mass (MitoTracker Deep Red) (Fig. 5C). Overall, our multilabeling  
294 analysis by flow cytometry was able to confirm that CsA can attenuate CM cell death following H/R  
295 and further showed that this protection is not mediated by oxidative stress and does not involve any  
296 change in mitochondrial morphology. Data supplements can be found here:

297 <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.11416749>

298

299



300

301

## 302 **Discussion**

303 Up to now, the use of flow cytometry for mechanistic studies in adult mouse CM has been limited by  
304 the high fragility and large size of these cells. Multilabeling analysis by flow cytometry allows an  
305 individual, qualitative and quantitative unbiased characterization of cells. We here report and validate  
306 a new protocol that overcomes the cellular size and fragility issues.

307 There has been many attempts during the past three decades to develop new therapies that would  
308 attenuate ischemia-reperfusion injury and improve clinical outcomes in patients with acute ischemic  
309 heart disease (3, 19, 25, 30). Unfortunately, most studies were neutral or negative (7, 8, 11, 28, 32,  
310 33). Part of the explanation might be due to insufficient in-depth understanding of the mechanisms of  
311 CM cell death after a prolonged ischemic insult. Although the adult mouse CM is recognized as a  
312 fragile cell model, it remains the most relevant for *in vitro* cardiac analysis when compared to cell  
313 lines or neonatal CM (4). Isolation of adult mouse CM has not been standardized and there is still no  
314 reference method. A major challenge is to keep cells viable with preserved morphological and  
315 metabolic characteristics. Investigation of adult CM functions remains complex and usually done  
316 using spectrophotometry, spectrofluorometry and microscopy. These techniques are time and material-  
317 consuming, have low statistical power and carry a risk of biased analysis, notably in single-cell  
318 imaging.

319 We endeavored to adapt the powerful analytic potential of flow cytometry to isolated adult mouse CM.  
320 The originality of our protocol sequence comes from the ability to keep the CM in suspension, to  
321 validate the gating of CM by flow cytometry and to combine a hypoxia-reoxygenation stress to a  
322 multilabeling analysis. A disadvantage of the suspension method is that it leads to some extra cell  
323 death when compared to the plating model in which dead cells are washed away and only living cells  
324 stay attached to the matrix coating.

325 The constant development of new analytical tools and new fluorescent probes allowed us to perform  
326 multilabeling analysis in one single sample. We used H/R and a known protective treatment, CsA, in  
327 order to examine the sensitivity of our methodology. In line with previous *in vitro* and *in vivo* studies  
328 (5, 18, 22, 29), our new model was able to show the protective effect of CsA on cell death, as assessed  
329 by three different markers with a limited variability and a good sensitivity. PI and Sytox Green,  
330 working as intercalating agents, showed comparable results to the cell-permeant fluorescent probe,  
331 Calcein, i.e. validating the combination of these probes in different panels. Currently available  
332 fluorescent probes allow to assess other cell death pathway (apoptosis, autophagy) as well as various  
333 functions such as calcium fluxes (Fluo 4, Rhod 2) or intracellular pH variations (SNARF indicators).

334 Our protocol can be applied with all existing and to-be-developed fluorescent probes. It can also be  
335 extended to compare transgenic animals for proteins supposedly involved in cardiovascular diseases.  
336 This method is particularly suitable for studying valuable samples, with limited amount of tissue, such  
337 as cardiomyocytes isolated from patient left ventricle biopsies during cardiac surgery.

338 In conclusion, we expect that this new method will expand and accelerate innovative research in the  
339 field of cardiac biology. It could be applied to studies of other stresses, such as oxidative stress and  
340 inflammation, that are two major processes involved into irreversible tissue damage during acute  
341 myocardial infarction.

342

343

344



345

346

347

#### 348 **Strengths and limitations**

349 Strengths: We set up a new original method to keep the adult mouse CM in suspension and allow  
350 multilabeling analysis by flow cytometry. We used a sequence of hypoxia-reoxygenation as a stress to  
351 demonstrate the possibility to measure cellular parameters after a combined stress and  
352 pharmacological treatment (CsA). This new approach not only enables the measurements of several  
353 physiological parameters from a single preparation of primary cardiac cells, but it also represents a  
354 time-saving method, limiting the number of animals used to achieve the required statistical power, in  
355 line with the 3R rules of the applicable regulations of animal experimentation.

356 Compared to routinely used sequences of plated H/R followed by microscopy analysis, our new  
357 approach provides several advantages (Table 1): 1) it enables the measurements of several  
358 physiological parameters from a single preparation of primary cardiac myocytes, 2) it represents a  
359 time-saving method, 3) it limits the number of animals used to achieve the required statistical power,  
360 in agreement with the 3R rules imposed by the applicable regulations of animal experimentation, and,  
361 4) it decreases the risk of biased data.

362 Limitations: This method has been set up based on the material available in our laboratory and  
363 according to the CM isolation protocol described in this article. Depending on the animal species  
364 (mouse, rat, pig, human...), the isolation method (Langendorf, syringe, enzyme type...) and the  
365 material used to realize the sequence (incubator, shaking platform) may be adjusted. Our *in vitro*  
366 proposed method should be considered as a first step in a screening strategy to eliminate the toxic and  
367 non-effective candidates, and should be used in combination with *in vivo* cardiac ischemia-reperfusion  
368 models in mice to validate the *in vivo* efficiency of potential candidates (14). The demonstrated  
369 dedifferentiation of mouse CM after 24 hours unfortunately precludes a longer reoxygenation time to  
370 assess long-term effect of H/R.

371

#### 372 **Author Contributions**

373 CCDS and LP conceived the project. CCDS, AP, NT and MP designed the experiments. CCDS, CC,  
374 NGB, AP and NT analyzed data. CCDS, MP, AP and NT wrote the paper. CCDS supervised the  
375 project. CCDS, AP, NT, CC, NGB, LG and CL conducted the experiments. CCDS, AP, NT, SB, ZH  
376 and MP, LG and MO revised the manuscript.

#### 377 **Additional Information**

378 **Competing Interests**: The authors declare that they have no competing interests.

#### 379 **Sources of funding**

380 This work was supported by the IHU OPeRa (ANR-10-IBHU-004) within the program  
381 “Investissements d’Avenir” operated by the French National Research Agency (ANR), and by the  
382 RHU-MARVELOUS within the program “Investissements d’Avenir” operated by the French National  
383 Research Agency (ANR).

384

385

386

387

388

389

390

391

392 **References**

- 393 1. **Abas L, Bogoyevitch MA, Guppy M.** Mitochondrial ATP production is necessary for  
394 activation of the extracellular-signal-regulated kinases during ischaemia/reperfusion in rat  
395 myocyte-derived H9c2 cells. *Biochem J* 349: 119–126, 2000.
- 396 2. **Ackers-Johnson Matthew, Li Peter Yiqing, Holmes Andrew P., O'Brien Sian-Marie,**  
397 **Pavlovic Davor, Foo Roger S.** A Simplified, Langendorff-Free Method for Concomitant  
398 Isolation of Viable Cardiac Myocytes and Nonmyocytes From the Adult Mouse Heart. *Circ Res*  
399 119: 909–920, 2016.
- 400 3. **Araszkiwicz A, Grygier M, Pyda M, Rajewska J, Michalak M, Lesiak M, Grajek S.**  
401 Postconditioning Reduces Enzymatic Infarct Size and Improves Microvascular Reperfusion in  
402 Patients with ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Cardiology* 129: 250–257, 2014.
- 403 4. **Bøtker HE, Hausenloy D, Andreadou I, Antonucci S, Boengler K, Davidson SM, Deshwal**  
404 **S, Devaux Y, Di Lisa F, Di Sante M, Efentakis P, Femminò S, García-Dorado D, Gircz Z,**  
405 **Ibanez B, Iliodromitis E, Kaludercic N, Kleinbongard P, Neuhäuser M, Ovize M, Pagliaro**  
406 **P, Rahbek-Schmidt M, Ruiz-Meana M, Schlüter K-D, Schulz R, Skyschally A, Wilder C,**  
407 **Yellon DM, Ferdinandy P, Heusch G.** Practical guidelines for rigor and reproducibility in  
408 preclinical and clinical studies on cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 113: 39, 2018.
- 409 5. **Cour M, Abrial M, Jahandiez V, Loufouat J, Belaïdi E, Gharib A, Varennes A, Monneret**  
410 **G, Thibault H, Ovize M, Argaud L.** Ubiquitous protective effects of cyclosporine A in  
411 preventing cardiac arrest-induced multiple organ failure. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* 117:  
412 930–936, 2014.
- 413 6. **Cung T-T, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, Bonnefoy-**  
414 **Cudraz E, Guérin P, Elbaz M, Delarche N, Coste P, Vanzetto G, Metge M, Aupetit J-F,**  
415 **Jouve B, Motreff P, Tron C, Labeque J-N, Steg PG, Cottin Y, Range G, Clerc J, Claeys**  
416 **MJ, Coussement P, Prunier F, Moulin F, Roth O, Belle L, Dubois P, Barragan P, Gilard M,**  
417 **Piot C, Colin P, De Poli F, Morice M-C, Ider O, Dubois-Randé J-L, Untersee T, Le Breton**  
418 **H, Béard T, Blanchard D, Grollier G, Malquarti V, Staat P, Sudre A, Elmer E, Hansson**  
419 **MJ, Bergerot C, Boussaha I, Jossan C, Derumeaux G, Mewton N, Ovize M.** Cyclosporine  
420 before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 373: 1021–1031, 2015.
- 421 7. **Dwyer NB, Mikami Y, Hilland D, Aljizeeri A, Friedrich MG, Traboulsi M, Anderson TJ.**  
422 No cardioprotective benefit of ischemic postconditioning in patients with ST-segment elevation  
423 myocardial infarction. *J Intervent Cardiol* 26: 482–490, 2013.
- 424 8. **Freixa X, Bellera N, Ortiz-Pérez JT, Jiménez M, Paré C, Bosch X, De Caralt TM, Betriu A,**  
425 **Masotti M.** Ischaemic postconditioning revisited: lack of effects on infarct size following  
426 primary percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 33: 103–112, 2012.
- 427 9. **Givvimani S, Pushpakumar SB, Metreveli N, Veeranki S, Kundu S, Tyagi SC.** Role of  
428 mitochondrial fission and fusion in cardiomyocyte contractility. *Int J Cardiol* 187: 325–333,  
429 2015.

- 430 10. **Gomez L, Thiebaut P-A, Paillard M, Ducreux S, Abrial M, Crola Da Silva C, Durand A,**  
431 **Alam MR, Van Coppenolle F, Sheu S-S, Ovize M.** The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk  
432 is regulated by GSK3 $\beta$  during reperfusion injury. *Cell Death Differ* 23: 313–322, 2016.
- 433 11. **Hahn J-Y, Song YB, Kim EK, Yu CW, Bae J-W, Chung W-Y, Choi S-H, Choi J-H, Bae J-**  
434 **H, An KJ, Park J-S, Oh JH, Kim S-W, Hwang J-Y, Ryu JK, Park HS, Lim D-S, Gwon H-**  
435 **C.** Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention: the effects of  
436 postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial  
437 infarction (POST) randomized trial. *Circulation* 128: 1889–1896, 2013.
- 438 12. **Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, Ariti C, Jenkins DP, Kolvekar S, Knight R, Kunst G,**  
439 **Laing C, Nicholas J, Pepper J, Robertson S, Xenou M, Clayton T, Yellon DM, ERICCA**  
440 **Trial Investigators.** Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N*  
441 *Engl J Med* 373: 1408–1417, 2015.
- 442 13. **Heusch G.** Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and  
443 remote conditioning. *Circ Res* 116: 674–699, 2015.
- 444 14. **Ibanez B, Aletras AH, Arai AE, Arheden H, Bax J, Berry C, Bucciarelli-Ducci C, Croisille**  
445 **P, Dall’Armellina E, Dharmakumar R, Eitel I, Fernández-Jiménez R, Friedrich MG,**  
446 **García-Dorado D, Hausenloy DJ, Kim RJ, Kozierke S, Kramer CM, Salerno M, Sánchez-**  
447 **González J, Sanz J, Fuster V.** Cardiac MRI Endpoints in Myocardial Infarction Experimental  
448 and Clinical Trials: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol* 74: 238–256, 2019.
- 449 15. **Ikeda G, Matoba T, Nakano Y, Nagaoka K, Ishikita A, Nakano K, Funamoto D, Sunagawa**  
450 **K, Egashira K.** Nanoparticle-Mediated Targeting of Cyclosporine A Enhances Cardioprotection  
451 Against Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibition of Mitochondrial Permeability  
452 Transition Pore Opening. *Sci Rep* 6: 20467, 2016.
- 453 16. **Kamiya K, Guo W, Yasui K, Toyama J.** Hypoxia inhibits the changes in action potentials and  
454 ion channels during primary culture of neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 31:  
455 1591–1598, 1999.
- 456 17. **Larcher V, Kunderfranco P, Vacchiano M, Carullo P, Erreni M, Salamon I, Colombo FS,**  
457 **Lugli E, Mazzola M, Anselmo A, Condorelli G.** An autofluorescence-based method for the  
458 isolation of highly purified ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 114: 409–416, 2018.
- 459 18. **Lemoine S, Pilot B, Augeul L, Rabeyrin M, Varennes A, Normand G, Baetz D, Ovize M,**  
460 **Juillard L.** Dose and timing of injections for effective cyclosporine A pretreatment before renal  
461 ischemia reperfusion in mice. *PLoS One* 12: e0182358, 2017.
- 462 19. **Lønborg J, Kelbaek H, Vejstrup N, Jørgensen E, Helqvist S, Saunamäki K, Clemmensen**  
463 **P, Holmvang L, Treiman M, Jensen JS, Engstrøm T.** Cardioprotective effects of ischemic  
464 postconditioning in patients treated with primary percutaneous coronary intervention, evaluated  
465 by magnetic resonance. *Circ Cardiovasc Interv* 3: 34–41, 2010.
- 466 20. **López JE, Jaradeh K, Silva E, Aminololama-Shakeri S, Simpson PC.** A method to increase  
467 reproducibility in adult ventricular myocyte sizing and flow cytometry: Avoiding cell size bias in  
468 single cell preparations. *PLoS ONE* 12, 2017.
- 469 21. **Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM.** Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene  
470 transfer. *J Mol Cell Cardiol* 51: 288–298, 2011.

- 471 22. **Nighoghossian N, Ovize M, Mewton N, Ong E, Cho T-H.** Cyclosporine A, a Potential  
472 Therapy of Ischemic Reperfusion Injury. A Common History for Heart and Brain. *Cerebrovasc*  
473 *Dis Basel Switz* 42: 309–318, 2016.
- 474 23. **O’Connell TD, Rodrigo MC, Simpson PC.** Isolation and culture of adult mouse cardiac  
475 myocytes. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 357: 271–296, 2007.
- 476 24. **Paillard M, Tubbs E, Thiebaut P-A, Gomez L, Fauconnier J, Da Silva CC, Teixeira G,**  
477 **Mewton N, Belaidi E, Durand A, Abrial M, Lacampagne A, Rieusset J, Ovize M.**  
478 Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-  
479 reoxygenation injury. *Circulation* 128: 1555–1565, 2013.
- 480 25. **Sloth AD, Schmidt MR, Munk K, Kharbanda RK, Redington AN, Schmidt M, Pedersen L,**  
481 **Sørensen HT, Botker HE.** Improved long-term clinical outcomes in patients with ST-elevation  
482 myocardial infarction undergoing remote ischaemic conditioning as an adjunct to primary  
483 percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 35: 168–175, 2014.
- 484 26. **Smith AJ, Lewis FC, Aquila I, Waring CD, Nocera A, Agosti V, Nadal-Ginard B, Torella**  
485 **D, Ellison GM.** Isolation and characterization of resident endogenous c-Kit<sup>+</sup> cardiac stem cells  
486 from the adult mouse and rat heart. *Nat Protoc* 9: 1662–1681, 2014.
- 487 27. **Strijdom H, Muller C, Lochner A.** Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult  
488 cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *J Mol*  
489 *Cell Cardiol* 37: 897–902, 2004.
- 490 28. **Tarantini G, Favaretto E, Marra MP, Frigo AC, Napodano M, Cacciavillani L, Giovagnoni**  
491 **A, Renda P, De Biasio V, Plebani M, Mion M, Zaninotto M, Isabella G, Bilato C, Iliceto S.**  
492 Postconditioning during coronary angioplasty in acute myocardial infarction: the POST-AMI  
493 trial. *Int J Cardiol* 162: 33–38, 2012.
- 494 29. **Teixeira G, Abrial M, Portier K, Chiari P, Couture-Lepetit E, Tourneur Y, Ovize M,**  
495 **Gharib A.** Synergistic protective effect of cyclosporin A and rotenone against hypoxia-  
496 reoxygenation in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 56: 55–62, 2013.
- 497 30. **Thibault Hélène, Piot Christophe, Staat Patrick, Bontemps Laurence, Sportouch**  
498 **Catherine, Rioufol Gilles, Cung Thien Tri, Bonnefoy Eric, Angoulvant Denis, Aupetit**  
499 **Jean-François, Finet Gérard, André-Fouët Xavier, Macia Jean Christophe, Raczka**  
500 **Franck, Rossi Rolland, Itti Rolland, Kirkorian Gilbert, Derumeaux Geneviève, Ovize**  
501 **Michel.** Long-Term Benefit of Postconditioning. *Circulation* 117: 1037–1044, 2008.
- 502 31. **Valiente-Alandi I, Albo-Castellanos C, Herrero D, Arza E, Garcia-Gomez M, Segovia JC,**  
503 **Capecchi M, Bernad A.** Cardiac Bmi1(+) cells contribute to myocardial renewal in the murine  
504 adult heart. *Stem Cell Res Ther* 6: 205, 2015.
- 505 32. **Woo JS, Kim W, Ha SJ, Kim JB, Kim S-J, Kim W-S, Seon HJ, Kim KS.** Cardioprotective  
506 effects of exenatide in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction undergoing  
507 primary percutaneous coronary intervention: results of exenatide myocardial protection in  
508 revascularization study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 2252–2260, 2013.
- 509 33. **Xu X, Zhou Y, Luo S, Zhang W, Zhao Y, Yu M, Ma Q, Gao F, Shen H, Zhang J.** Effect of  
510 remote ischemic preconditioning in the elderly patients with coronary artery disease with  
511 diabetes mellitus undergoing elective drug-eluting stent implantation. *Angiology* 65: 660–666,  
512 2014.

513

514

515

516

517

518

519

520

521

## 522 **Figures legends**

523 **Fig. 1.: Combining in suspension hypoxia-reoxygenation protocol with multilabeling flow**  
524 **cytometry analysis to unravel new protective strategies using mouse adult cardiomyocytes.**  
525 Schematic representation of the one-day sequence from adult mouse cardiomyocyte isolation to  
526 acquisition by flow cytometry.

527 **Fig. 2.: Experimental design of the CM preparation for the H/R sequence.** While the protein  
528 content of CM was quantified, based on the Lowry method, the CM suspension was separated into two  
529 tubes according to the experimental groups: in this study, 2/3 for hypoxia and 1/3 for basal normoxia.  
530 One rinsing step was performed to remove any nutrients contamination from the complete medium in  
531 the hypoxic group. Finally, based on the protein quantification obtained, CM were resuspended in the  
532 desired volume to be at 1 mg/ml in order to be dispensed at 250 µg per glass petri dish.

533

534 **Fig. 3.: Validation of the settings of each fluorescent channel.** Left histograms represent the basal  
535 normoxic conditions. Right histograms display the peak distribution of stained cells after H/R: **(A)** for  
536 panel 1, probes: Calcein, DilC1(5) and PI, **(B)** for panel 2, probes: Mitotracker Deep Red and  
537 MitoSOX Red, **(C)** for panel 3, probes: TMRM and Sytox Green. Note: the same unstained cells were  
538 used for MTR and DilC1(5).

539 **Fig. 4.: Optimization of the sequence of hypoxia-reoxygenation on adult mouse cardiomyocytes.**  
540 **(A)** Design of experimental procedure to optimize both hypoxia and reoxygenation times. **(B)** Cell  
541 viability was evaluated by PI staining at the end of the different hypoxia durations (45, 60 and 90  
542 minutes). Data are collected from 4 to 6 independent mice. **(C)** Cell viability was also evaluated by PI  
543 staining at the end of the different reoxygenation times (1, 2 and 3 hours) following 45min hypoxia in  
544 Data are from 8 independent mice. All data were expressed as a percentage of PI-positive cells. The  
545 non-parametric statistical test of Kruskal-Wallis with Dunn's post hoc test was performed. \* p<0.05.  
546 Data were expressed as median of percentage of population ± interquartile (25%-75%).

547 **Fig. 5.: CsA postconditioning as a typical example of drug effect on CM after H/R by**  
548 **multilabeling flow cytometry analysis.** Results were presented for the 3 experimental groups : Basal  
549 Normoxia (BN), H/R, H/R+CsA. **(A)** Cell viability was assessed by staining with three fluorescent  
550 probes: PI, Calcein and Sytox Green. Data are from 8 independent mice. **(B)** Impact of CsA on  
551 mitochondrial membrane potential, assessed by DilC1(5) and TMRM probes. Data are from 6  
552 independent mice. **(C)** MitoSOX and Mitotracker Deep Red allowed to measure ROS production and  
553 mitochondrial mass respectively. Data are from 8 independent mice. The non-parametric statistical test  
554 of Friedman followed by Student-Newman-Keuls post hoc test was performed. \* p<0.05. Data were  
555 expressed as median of percentage of population ± interquartile (25%-75%) except for  
556 MitotrackerDeep Red, where results are represented as median of Fluorescence Intensity ±  
557 interquartile (25%-75%).

558

Fig. 1.

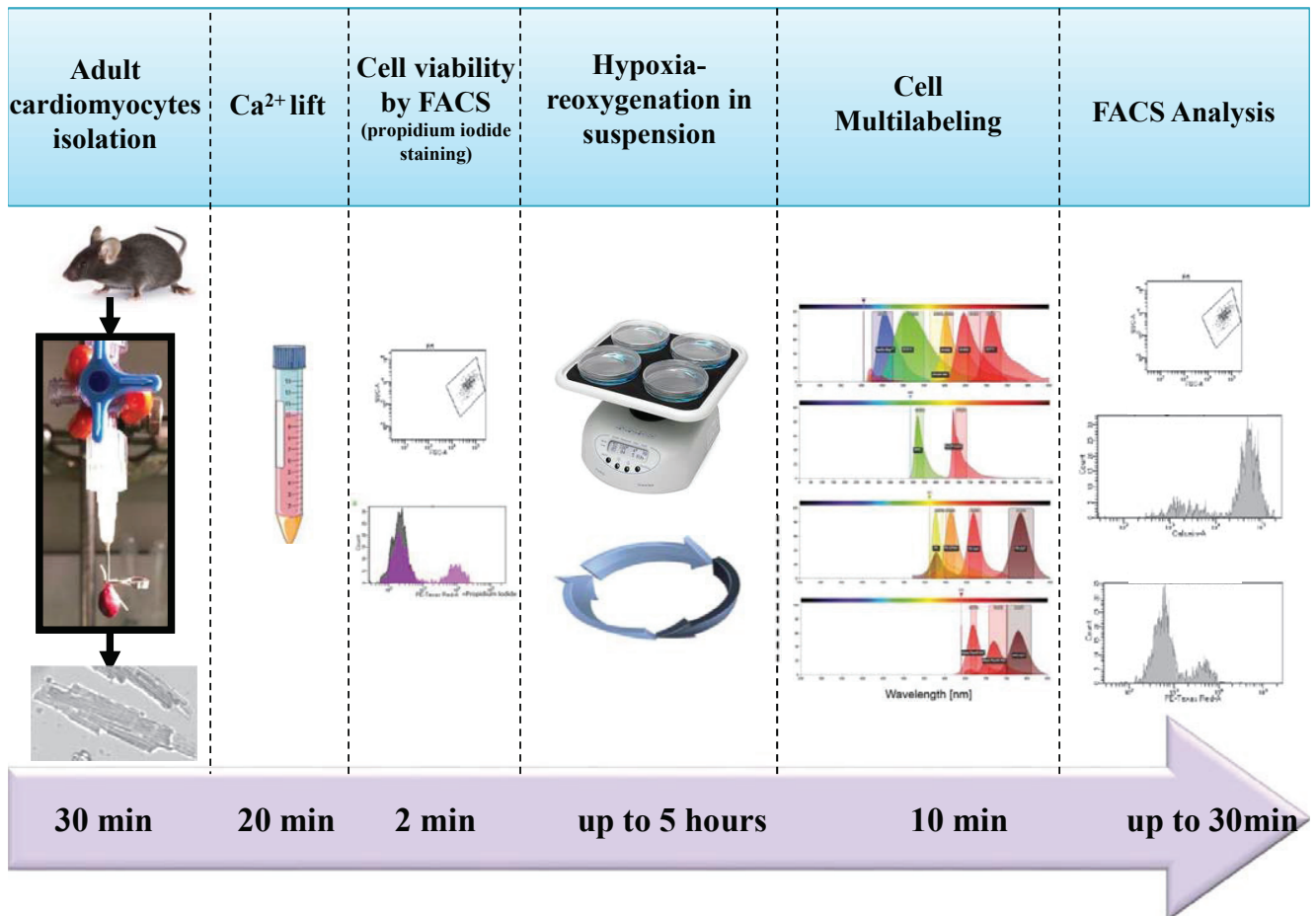
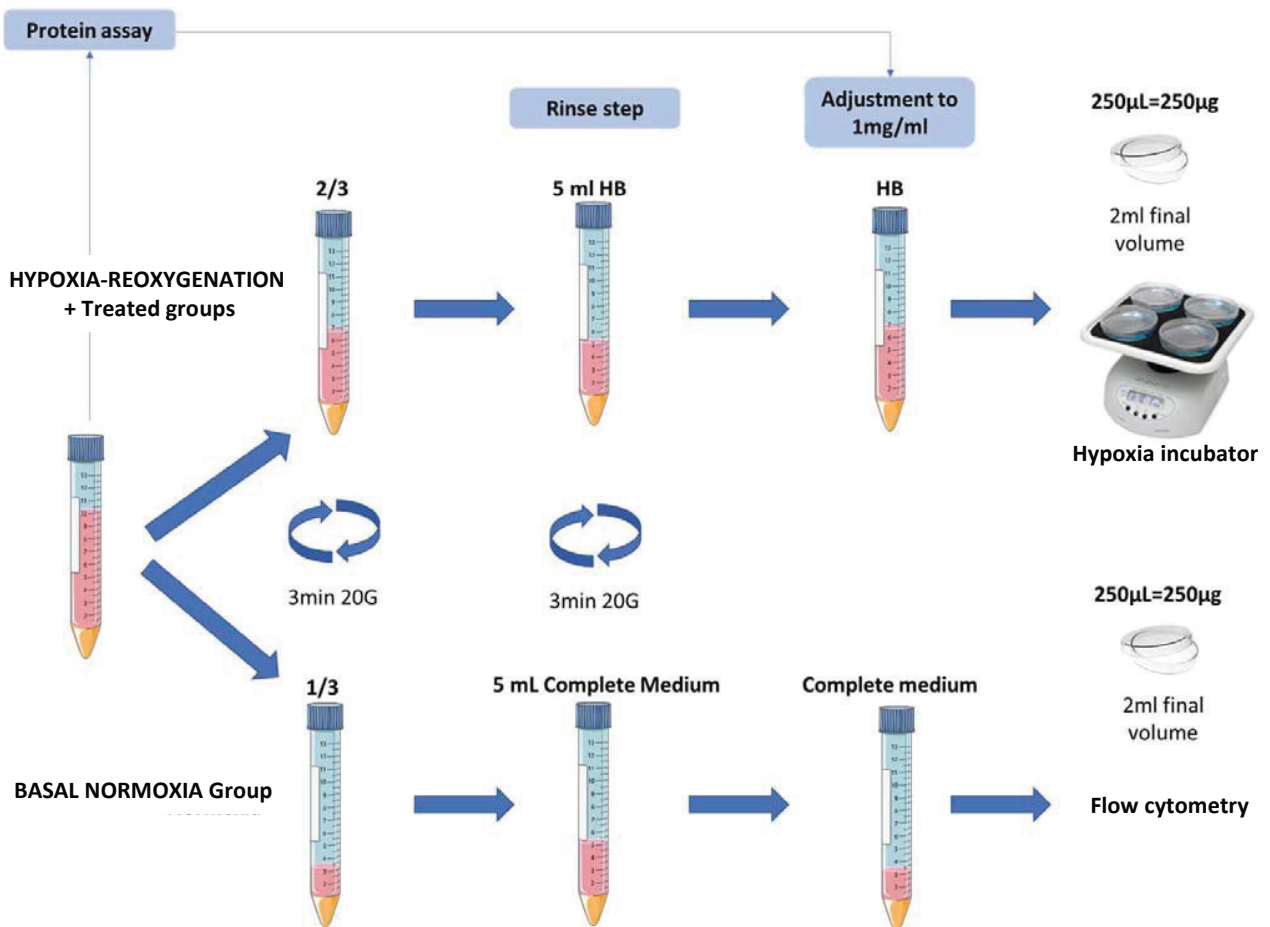




Fig. 2.





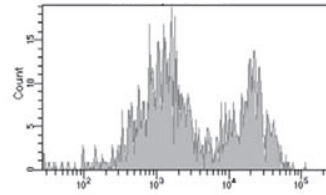
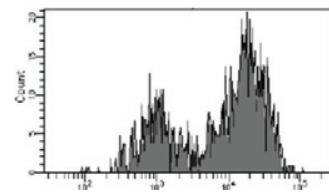
**A : panel 1**

BN CELLS

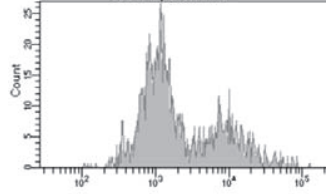
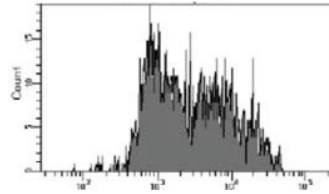
H/R CELLS

Fig. 3.

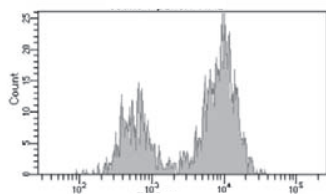
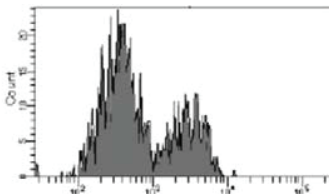
FITC channel:  
Calcein



APC channel :  
DiIC1 (5)

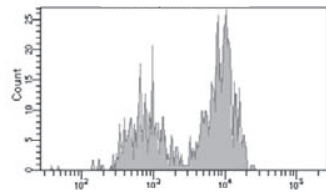
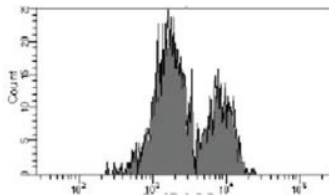


PE-Texas Red  
channel:  
propidium Iodide

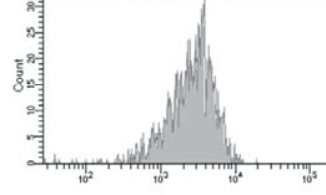
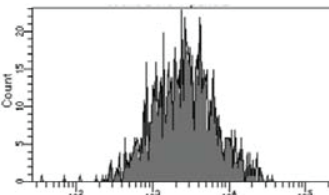


**B: panel 2**

PerCP-Cy5.5  
Red channel:  
Mitoxox red

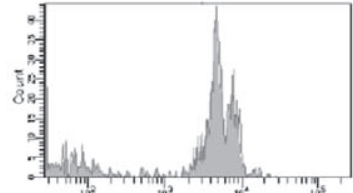
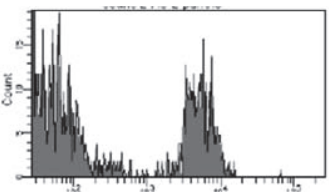


APC channel :  
Mitotracker  
Deep Red



**C : panel 3**

FITC channel:  
sytox green



TMRM channel

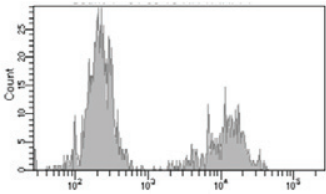
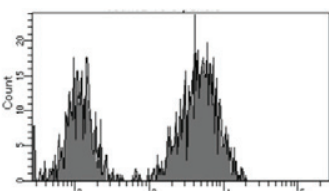


Fig. 4.

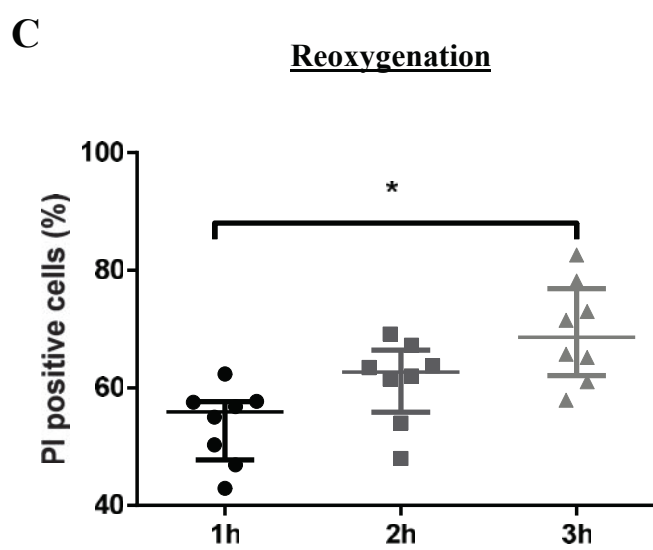
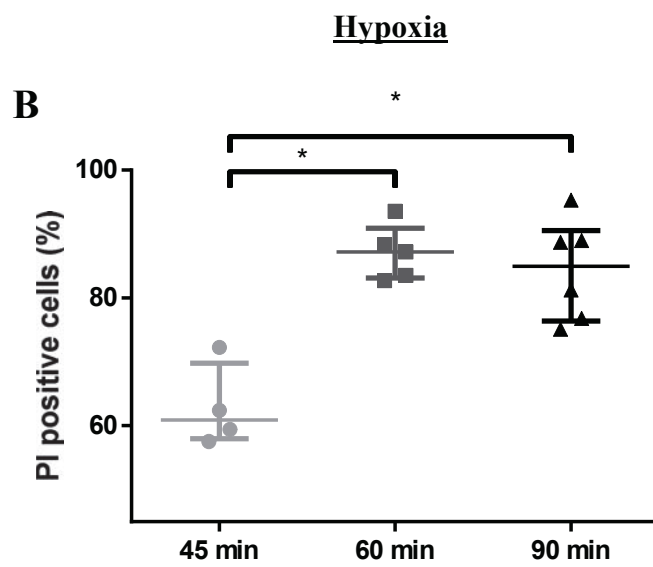
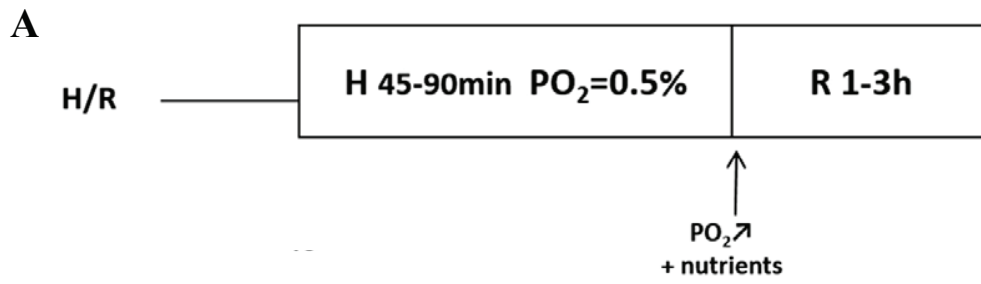
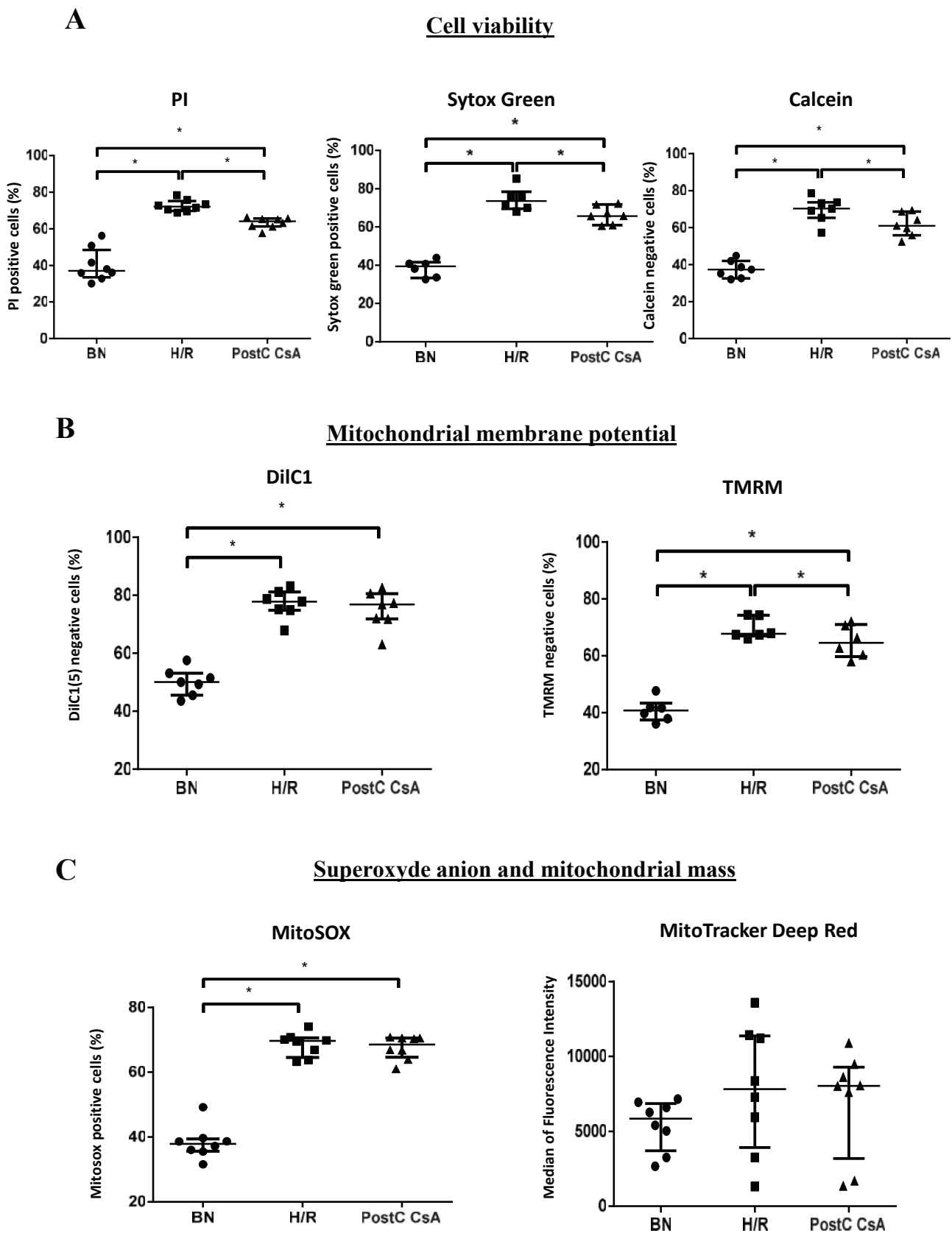


Fig. 5.



## Annexe 2

A modified calcium retention capacity assay clarifies the roles of extra-and intracellular calcium pools in mitochondrial permeability transition pore opening



# A modified calcium retention capacity assay clarifies the roles of extra- and intracellular calcium pools in mitochondrial permeability transition pore opening

Received for publication, May 22, 2019, and in revised form, August 20, 2019. Published, Papers in Press, August 21, 2019, DOI 10.1074/jbc.RA119.009477

Rania Harisseh<sup>†1</sup>, Maryline Abrial<sup>†1</sup>, Pascal Chiari<sup>†5,2</sup>, Ribal Al-Mawla<sup>‡</sup>, Camille Villedieu<sup>‡</sup>, Nolwenn Tessier<sup>‡</sup>, Gabriel Bidaux<sup>‡</sup>, Michel Ovize<sup>†¶</sup>, and Abdallah Gharib<sup>‡</sup>

From the <sup>†</sup>INSERM UMR 1060, CarMeN laboratory, Université Lyon 1, IHU OPERA, the <sup>‡</sup>Service d'Anesthésie Réanimation, and the <sup>¶</sup>Service d'Explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires and Centre d'Investigation Clinique de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, F-69677 Lyon, France

Edited by Roger J. Colbran

Calcium homeostasis is essential for cell survival and is precisely controlled by several cellular actors such as the sarco/endoplasmic reticulum and mitochondria. Upon stress induction, Ca<sup>2+</sup> released from sarco/endoplasmic reticulum stores and from extracellular Ca<sup>2+</sup> pools accumulates in the cytosol and in the mitochondria. This induces Ca<sup>2+</sup> overload and ultimately the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), promoting cell death. Currently, it is unclear whether intracellular Ca<sup>2+</sup> stores are sufficient to promote the mPTP opening. Ca<sup>2+</sup> retention capacity (CRC) corresponds to the maximal Ca<sup>2+</sup> uptake by the mitochondria before mPTP opening. In this study, using permeabilized cardiomyocytes isolated from adult mice, we modified the standard CRC assay by specifically inducing reticular Ca<sup>2+</sup> release to investigate the respective contributions of reticular Ca<sup>2+</sup> and extracellular Ca<sup>2+</sup> to mPTP opening in normoxic conditions or after anoxia-reoxygenation. Our experiments revealed that Ca<sup>2+</sup> released from the sarco/endoplasmic reticulum is not sufficient to trigger mPTP opening and corresponds to ~50% of the total Ca<sup>2+</sup> levels required to open the mPTP. We also studied mPTP opening after anoxia-reoxygenation in the presence or absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>. In both conditions, Ca<sup>2+</sup> leakage from internal stores could not trigger mPTP opening by itself but significantly decreased the CRC. Our findings highlight how a modified CRC assay enables the investigation of the role of reticular and extracellular Ca<sup>2+</sup> pools in the regulation of the mPTP. We propose that this method may be useful for screening molecules of interest implicated in mPTP regulation.

Ca<sup>2+</sup> homeostasis supports the cell ability to integrate stimuli, trigger Ca<sup>2+</sup> signals, and ultimately control molecular pathways essential for cellular physiology. This cascade of events is accurately controlled in space and time (reviewed in Ref. 1). Ca<sup>2+</sup> channeling between the sarco/endoplasmic reticulum

and the mitochondria occurs in microdomains known as mitochondria-associated membranes, which have been reported to control specific cell functions (reviewed in Ref. 2) such as mitochondrial bioenergetics, lipid metabolism, and cell fate. Disruption of mitochondria-associated membranes has been associated to different pathologies including hypoxia-reoxygenation (3–5). Ischemia or hypoxia induces a drop in ATP content, which in turn decreases ATP-dependent Ca<sup>2+</sup> pumps in both sarcolemma (plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase) and sarco/endoplasmic reticulum (SERCA),<sup>3</sup> leading to an increase in cytosolic (6) and consequently mitochondrial (7) Ca<sup>2+</sup> concentration. This Ca<sup>2+</sup> overload and enhancing factors like reactive oxygen species (8), partial mitochondrial membrane depolarization (9), pH restoration at reperfusion (10, 11), gangliosides (12), P<sub>i</sub> (13), and outer mitochondrial membrane components (14) induce mitochondrial swelling and the opening of mPTP and ultimately promote cell death (1, 15, 16).

Although mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload has been well-identified as being a main contributor to the latter phenomena, the origin of this Ca<sup>2+</sup> is still unclear. Little is known about whether the internal Ca<sup>2+</sup> stores alone are sufficient to promote mPTP opening in cardiomyocytes or whether extracellular Ca<sup>2+</sup> entry is also required. Growing evidences have involved sarcolemmal channels and transporters such as the connexin and pannexin hemichannels (17) or the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger NCX (18). Their inhibition reduced Ca<sup>2+</sup> overload and decreased myocardial injury, suggesting the involvement of extracellular Ca<sup>2+</sup>. However, none of these studies have evaluated the respective participation of this extracellular Ca<sup>2+</sup> and the internal Ca<sup>2+</sup> stores to the mitochondria Ca<sup>2+</sup> overload process. Answering this question may help rationalizing therapeutic strategies relying on Ca<sup>2+</sup> fluxes modulation.

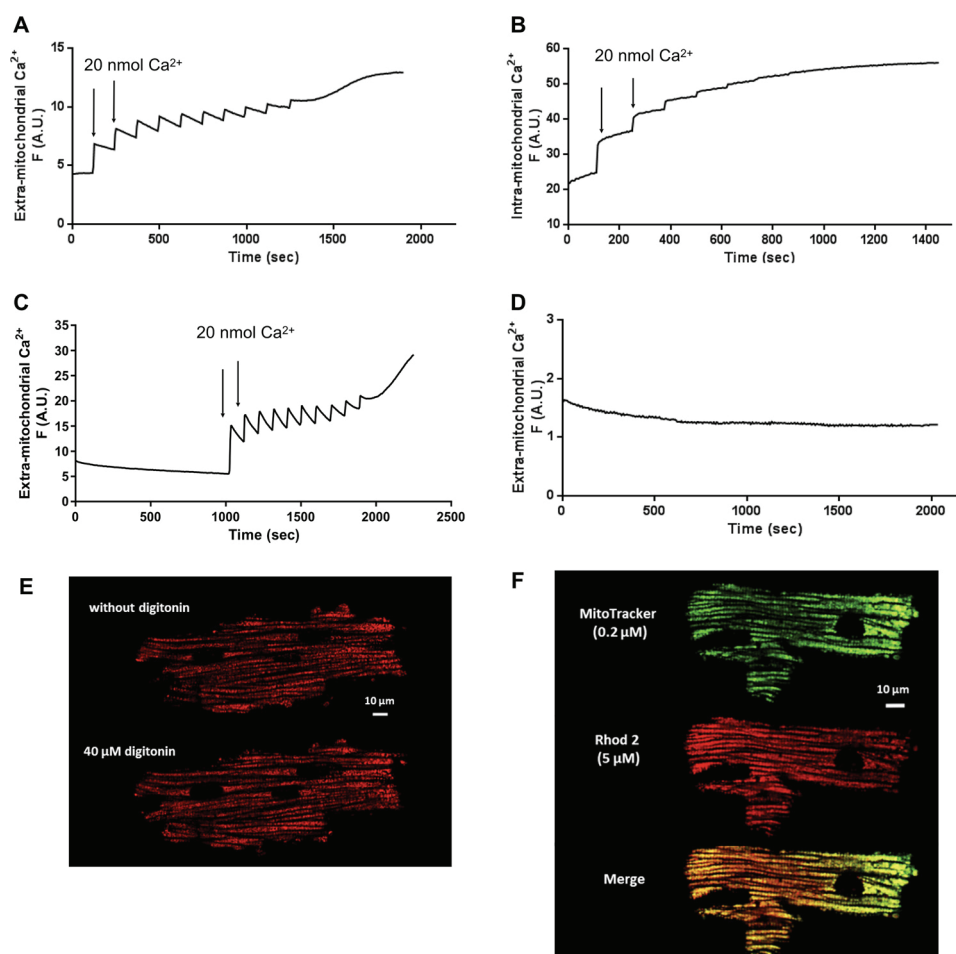
This maximum ability of Ca<sup>2+</sup> uptake by mitochondria before mPTP opening and mitochondrial swelling is defined as Ca<sup>2+</sup> retention capacity (CRC) (reviewed in Ref. 19). This feature of mitochondria may vary according to the cell type, as well as the physiological (e.g. oxidative stress and pH) or pathologi-

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, U1060, Lyon, France). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed: Service d'Anesthésie Réanimation, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, F-69677, Lyon, France. Tel.: 33-4-72-11-89-33; Fax: 33-4-72-35-73-14; E-mail: pascal.chiari@chu-lyon.fr.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: SERCA, sarco/endoplasmic Ca<sup>2+</sup> ATPase; CRC, Ca<sup>2+</sup> retention capacity; AR, anoxia-reoxygenation; mPTP, mitochondria permeability transition pore; CsA, cyclosporine A; CypD, cyclophilin D; CICR, Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release; FCCP, carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone; A.U., arbitrary unit(s); ANOVA, analysis of variance.

External and reticular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in mPTP opening

**Figure 1. CRC in adult cardiomyocytes.** *A* and *B*, CRC was performed in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N probe to detect extramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  (*A*) or in the presence of Rhod2-AM probe to detect intramitochondrial free  $\text{Ca}^{2+}$  (*B*). *C*, cardiomyocytes were incubated for 900 s in CRC medium before CRC measurement. *D*, cardiomyocytes were incubated in CRC medium and recorded for 2000 s in the presence only of  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N to assess cellular integrity and stability. For all experiments, fluorescence (*F*) is expressed in A.U.  $\text{Ca}^{2+}$  was added every 120 s by increments of 20 nmol/injection. *E*, confocal microscopy images were acquired after 30 min incubation of cardiomyocytes with 5  $\mu\text{M}$  Rhod2-AM in the presence or absence of 40  $\mu\text{M}$  digitonin. *F*, confocal microscopy images were acquired after 30 min of incubation of cardiomyocytes with 5  $\mu\text{M}$  Rhod2-AM and 0.2  $\mu\text{M}$  MitoTracker Green. 1024  $\times$  1024 pixels images were acquired with an average of four scanning lines. Displayed graphs and images are representative of three independent experiments.

cal cellular state. CRC measurement is experimentally performed on isolated mitochondrial preparations or on cellular models and is conventionally realized with the addition of exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  enabling the simple quantification of the  $\text{Ca}^{2+}$  amount required to open mPTP. Therefore, the role of reticular  $\text{Ca}^{2+}$  stores (the major  $\text{Ca}^{2+}$  store besides the mitochondria) in the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload was not studied.

Although several factors are implicated in mPTP opening, numerous studies have shown evidence of the crucial implication of  $\text{Ca}^{2+}$  overload in mPTP opening especially during ischemia reperfusion (20, 21). In this work we focused particularly on  $\text{Ca}^{2+}$  contribution. However, we ensure that the other factors contributing to mPTP opening are still present in our experimental condition by using a cellular environment. We investigated concomitantly the role of reticular and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in the regulation of mPTP on a model of isolated cardiomyocytes. We modified the standard CRC method by combining the effect of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (depicted by the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  pulses) and reticular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization by stimulating ryanodine receptors using caffeine or ryanodine. We validated our experimental model by showing that, as expected, both

pharmacological treatment of cardiomyocytes with cyclosporine A (CsA), an inhibitor of cyclophilin D (CypD), or the genetic ablation of CypD in cyclophilin D knockout (CypD-KO) cardiomyocytes required a greater amount of  $\text{Ca}^{2+}$  in the mitochondria to open mPTP. In addition, we demonstrated that in both normoxia and anoxia-reoxygenation (AR) conditions, reticular  $\text{Ca}^{2+}$  stores alone were not sufficient to trigger mPTP opening and that extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  import ( $\text{Ca}^{2+}$  pulses addition) was required to open mPTP. Finally, we proposed an estimation of these  $\text{Ca}^{2+}$  sources contributions to mPTP opening.

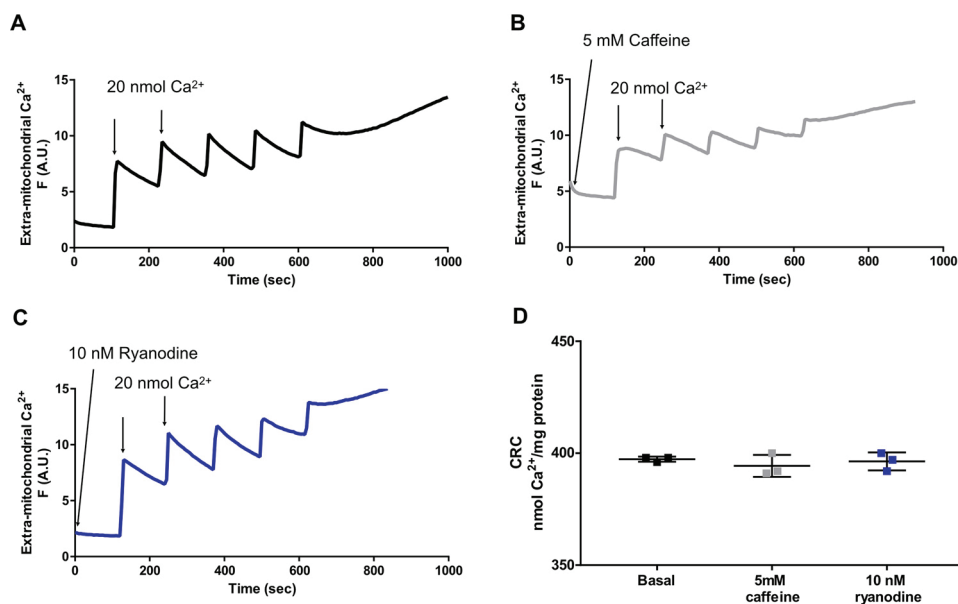
## Results

### Validation of the experimental model

As shown in Fig. 1 (*A* and *B*),  $\text{Ca}^{2+}$  transfers were properly recorded with both probes in isolated cardiomyocyte preparation.  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N probe reported  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the mitochondria after each  $\text{Ca}^{2+}$  pulse, followed by a spontaneous cytoplasmic release indicating mPTP opening (Fig. 1*A*). Conversely,  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by mitochondria was reported by the increase in Rhod2-AM fluorescence after each  $\text{Ca}^{2+}$  pulse (Fig.



## External and reticular $\text{Ca}^{2+}$ stores in mPTP opening



**Figure 2. Effect of caffeine and ryanodine on isolated mitochondria.** A–C, the effect of caffeine and ryanodine was tested on isolated mitochondria. CRC was performed on isolated cardiac mitochondria using  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N probe in basal condition (A) or in the presence of 5 mM caffeine (B) or 10 nM ryanodine (C). D, CRC values were quantified for all conditions. Fluorescence (F) is expressed in A.U.  $\text{Ca}^{2+}$  was added every 120 s by increments of 20 nmol/injection. Displayed graphs are representative of three independent experiments. The CRC values in D are presented as means  $\pm$  S.D. nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein of three independent experiments (Kruskal–Wallis;  $H = 0.6382$ ,  $p = 0.7786$ ).

1B), proving that exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  added during the assay was indeed taken up by the mitochondria. When cardiomyocytes were subjected to  $\sim 900$  s of incubation before  $\text{Ca}^{2+}$  pulses (Fig. 1C), CRC was still similar to basal condition (Fig. 1A) (*i.e.* 10  $\text{Ca}^{2+}$  pulses were needed to open mPTP). In addition, cardiac mitochondria *in situ* and permeabilized cellular integrity was preserved during at least 2000 s of incubation in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N probe (Fig. 1D). Fluorescence was stable throughout the experiment reflecting the absence of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  leak and the absence of fluorescence bleaching. We also used Rhod2-AM staining to confirm that the mitochondrial network was not affected in permeabilized cardiomyocytes (40  $\mu\text{M}$  digitonin) (Fig. 1E) and that Rhod2-AM colocalized with MitoTracker Green, proving a strict mitochondrial localization of Rhod2-AM staining in our experimental conditions (Fig. 1F).

Another control experiment for our method validation was performed on isolated mitochondria (250  $\mu\text{g}$  of protein). Standard CRC was performed in basal conditions (Fig. 2A), and in the presence of 5 mM caffeine (Fig. 2B) or 10 nM ryanodine (Fig. 2C). CRC values were similar in all experiments (Fig. 2D), indicating that, at the used concentrations, these ryanodine receptors agonists had no direct mitochondrial targets.

### Effects of the reticular $\text{Ca}^{2+}$ release on mPTP opening

To study the effect of reticular  $\text{Ca}^{2+}$  on mPTP opening, CRC was evaluated either by adding exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  pulses alone (Fig. 3A, black panel) or by using 5 mM caffeine or 10 nM ryanodine followed by exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  pulse addition (Fig. 3A, gray and blue panels, respectively). In basal conditions (Fig. 3, B and C, black plots), 10 pulses (20 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /pulse) of exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  were needed to open mPTP. The addition of caffeine (Fig. 3B, gray plot) or ryanodine (Fig. 3C, blue plot) did not induce fluorescence elevation, suggesting that mitochondria take up

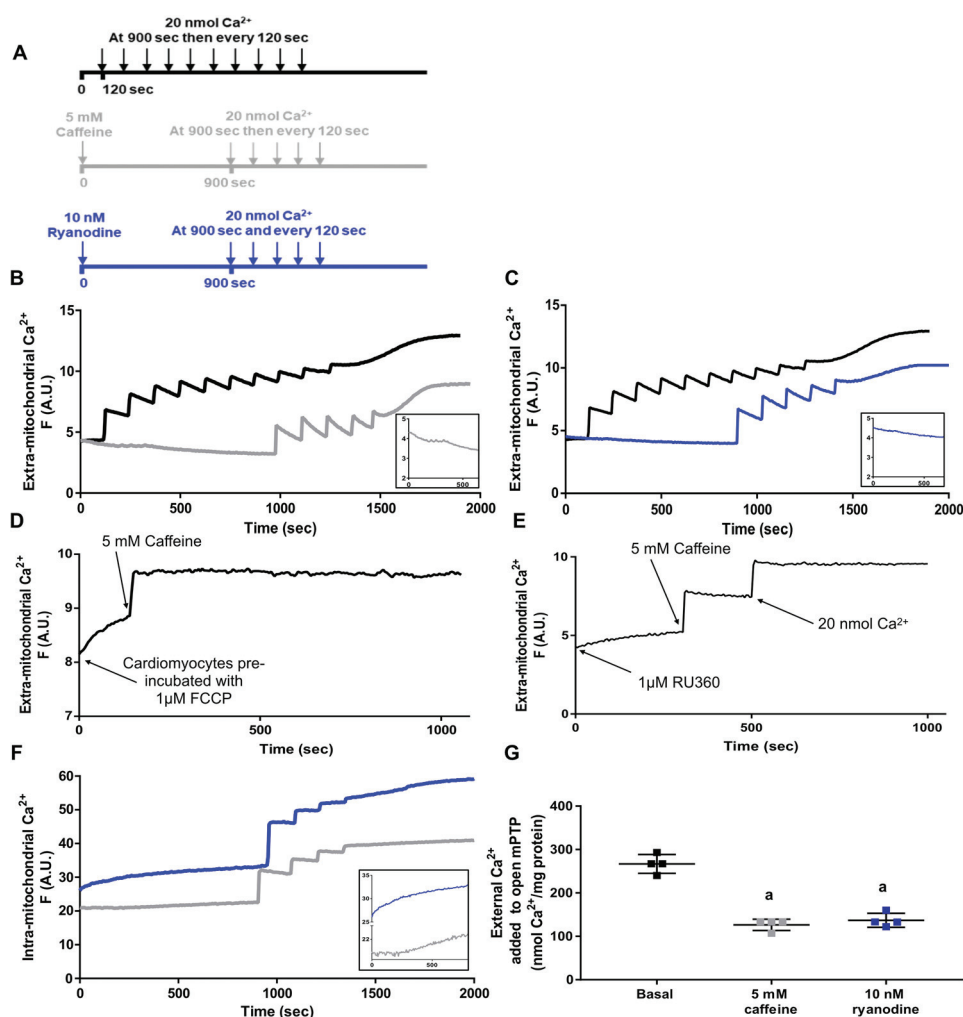
the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  released by caffeine or ryanodine stimulation (Fig. 3, B and C, insets). This was confirmed when cardiomyocytes preincubated with 1  $\mu\text{M}$  FCCP were stimulated with 5 mM caffeine: an increase in extramitochondrial fluorescence was observed (Fig. 3D), representing the caffeine-induced reticular  $\text{Ca}^{2+}$  release that cannot be taken up by the mitochondria. The same observation was made after stimulation with 5 mM caffeine in the presence of 1  $\mu\text{M}$  RU360, a specific mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  intake inhibitor (Fig. 3E).

No massive  $\text{Ca}^{2+}$  depletion from mitochondria was observed after a 900-s caffeine treatment, indicating that the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  released from reticulum stores was not sufficient to open mPTP. Five additional pulses of 20 nmol of  $\text{Ca}^{2+}$  were required to induce mPTP opening (Fig. 3, B and C). The same experiments performed in Rhod2-AM-loaded cardiomyocytes showed an increase in fluorescence after stimulation with 5 mM caffeine (Fig. 3F, gray plot and inset) or 10 nM ryanodine (Fig. 3F, blue plot and inset). Overall, these experiments show that the caffeine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  is quickly and efficiently taken up by mitochondria with a limited  $\text{Ca}^{2+}$  leak toward cytosol.

Maximal release of reticular  $\text{Ca}^{2+}$  was triggered by three repetitive stimulations with 5 mM caffeine. However, the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  released was still insufficient, and additional pulses of 20 nmol  $\text{Ca}^{2+}$  were necessary to open mPTP (data not shown).

After stimulation with 5 mM caffeine or 10 nM ryanodine, the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  necessary to open mPTP significantly decreased to  $127 \pm 13$  nmol/mg protein ( $p = 0.0286$ ) and  $137 \pm 16$  nmol/mg protein ( $p = 0.0375$ ), respectively, when compared with basal condition value ( $267 \pm 22$  nmol/mg protein) (Fig. 3G). In our conditions, reticular  $\text{Ca}^{2+}$  released after stimulation with 5 mM caffeine or 10 nM ryanodine represents  $\sim 50\%$  ( $48 \pm 7\%$  and  $52 \pm 6\%$ , respectively) of the  $\text{Ca}^{2+}$  amount necessary for





**Figure 3. Reticular  $\text{Ca}^{2+}$  contribution to mPTP opening.** A, CRC measurement was performed using  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N probe and conditions. B and C,  $\text{Ca}^{2+}$  pulses added in basal condition (black plots) were compared with  $\text{Ca}^{2+}$  pulses added after stimulation with 5 mM caffeine (B, gray plot) or 10 nM ryanodine (C, blue plot) in adult cardiomyocytes. D and E, as a control, extramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence was measured in cardiomyocytes preincubated with 1  $\mu\text{M}$  FCCP (D) or in the presence of 1  $\mu\text{M}$  RU360 (E) after reticular  $\text{Ca}^{2+}$  release stimulation with 5 mM caffeine. Mitochondrial free  $\text{Ca}^{2+}$  was also stained using Rhod2-AM after 5 mM caffeine or 10 nM ryanodine stimulation (F, gray plot and blue plot, respectively). At 900 s, a series of 20 nmol of  $\text{Ca}^{2+}$  pulses were necessary to induce mPTP opening. In B and C, insets represent  $\text{Ca}^{2+}$  Green fluorescence variation from 0 to 500 s and reflect extramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  after ryanodine receptor stimulation. In F, the inset represents Rhod2-AM fluorescence variation from 0 to 500 s and reflects mitochondrial free  $\text{Ca}^{2+}$  uptake after ryanodine receptor stimulation. G,  $\text{Ca}^{2+}$  amount added to open mPTP in basal condition or after reticular  $\text{Ca}^{2+}$  stimulation was quantified and presented as dot plots. Fluorescence (F) is expressed in A.U.  $\text{Ca}^{2+}$  was added every 120 s by increments of 20 nmol/injection. The displayed graphs are representative of three or four independent experiments. The values in G are presented as means  $\pm$  S.D. nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein of four independent experiments (Kruskal–Wallis;  $H = 7.69$ ,  $p = 0.0081$ ), followed by Dunn's post-test. a,  $p < 0.05$  versus basal.

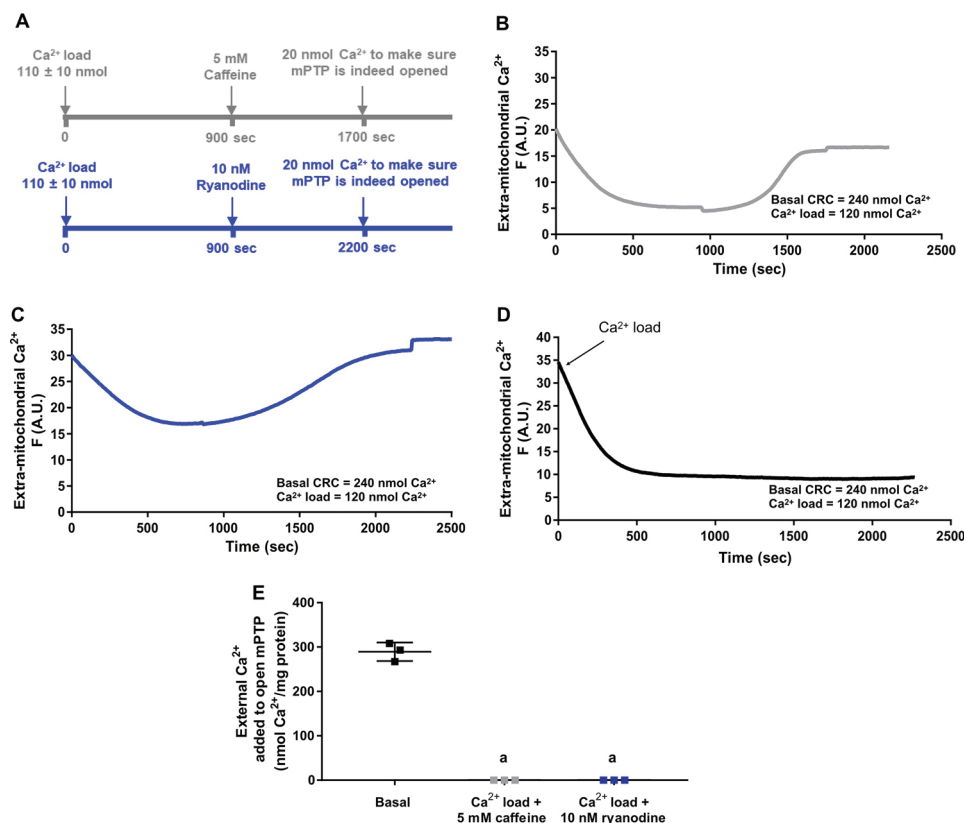
mPTP opening in the basal condition (Fig. 3G). This suggests that the reticular  $\text{Ca}^{2+}$  stores of cardiomyocytes cannot induce mPTP opening by itself.

#### Involvement of extracellular $\text{Ca}^{2+}$ in mPTP opening

To confirm our previous results, we assessed whether preloading cardiac mitochondria with 50% of the  $\text{Ca}^{2+}$  amount necessary to open mPTP could allow the reticular  $\text{Ca}^{2+}$  content to drive mPTP opening (Fig. 4A). In three independent experiments, the addition of 5 mM caffeine (Fig. 4B) or 10 nM ryanodine (Fig. 4C) induced a strong and sustained increase in fluorescence intensity indicating a massive mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  leak. The reticular  $\text{Ca}^{2+}$  release induced by either caffeine or ryanodine was sufficient to trigger mPTP opening when cardiomyocytes were loaded with 50% of the  $\text{Ca}^{2+}$  amount necessary to open mPTP. Both caffeine and ryanodine induced a

massive reticular  $\text{Ca}^{2+}$  release after mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$  preloading, suggesting an absence of or a limited induction of the  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release (CICR) mechanism. This was confirmed by the addition of one 20-nmol  $\text{Ca}^{2+}$  pulse after the massive fluorescence increase induced by caffeine and ryanodine. This  $\text{Ca}^{2+}$  pulse was not taken up by the mitochondria, ensuring that the mPTP was indeed opened. As a control of the potential effect of the experiment duration on mPTP opening, we preloaded cardiomyocytes with the same  $\text{Ca}^{2+}$  amount and recorded fluorescence without the addition of caffeine or ryanodine. In this condition, mPTP did not open, even after 2000 s of incubation time (Fig. 4D), demonstrating that mPTP opening observed in Fig. 4 (B and C) was triggered by caffeine- or ryanodine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release. In the presence of  $110 \pm 10$ -nmol  $\text{Ca}^{2+}$  load, no additional external  $\text{Ca}^{2+}$  was needed to open mPTP after internal  $\text{Ca}^{2+}$  stimulation with caffeine or

## External and reticular $\text{Ca}^{2+}$ stores in mPTP opening



**Figure 4. mPTP opening triggered by a combination of external and reticular calcium.** *A*, measurements conditions. CRC was measured after the addition of a  $\text{Ca}^{2+}$  load with 50% of the  $\text{Ca}^{2+}$  amount necessary to open mPTP. *B* and *C*, at 900 s, ryanodine receptors were stimulated with 5 mM caffeine (*B*) or 10 nM ryanodine (*C*). In both situations, mPTP was opened. An additional pulse of 20 nmol of  $\text{Ca}^{2+}$  was added but was not taken up by the mitochondria, confirming mPTP opening. *D*, as a control, cardiomyocytes were recorded during 2000 s after the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  load without caffeine or ryanodine stimulation. *E*, the amount of external  $\text{Ca}^{2+}$  added to open mPTP was quantified in basal condition and in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  load (110 ± 10 nmol) followed by caffeine or ryanodine stimulation. All experiments were performed in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N probe. Fluorescence (*F*) is expressed in A.U. and represents extramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  was added every 120 s by increments of 20 nmol/injection. Displayed graphs are representative of three independent experiments. The values in *E* are presented as means ± S.D. nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein of three independent experiments (Kruskal–Wallis;  $H = 7.624$ ,  $p = 0.0357$ ), followed by Dunn's post-test. *a*,  $p < 0.05$  versus basal.

ryanodine (Fig. 4E). These results are consistent with the previous observation from Fig. 3 and confirm our estimation that caffeine/ryanodine-induced reticular  $\text{Ca}^{2+}$  release represented ~50% of the  $\text{Ca}^{2+}$  amount necessary to open mPTP.

One of the most studied cardioprotective strategy within the last decade has relied on either the pharmacological inhibition or the genetic ablation of cyclophilin D, which, under  $\text{Ca}^{2+}$  stimulation, is known to enhance mPTP opening. Assuming that the reticular  $\text{Ca}^{2+}$  content is stable, we wondered whether CypD inhibition/suppression would also shift the amount of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  required to open mPTP in our experimental model. We first determined the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  necessary to open mPTP after CypD inhibition/suppression and then loaded cardiomyocytes with 50% of this amount prior to inducing reticular  $\text{Ca}^{2+}$  release with 10 nM ryanodine (Fig. 5A). When CsA was added to the preparation, an additional  $63.3 \pm 14.5$  nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein were necessary to induce mPTP opening after ryanodine stimulation (Fig. 5B, blue plot). If rotenone, a complex I inhibitor, was added to CsA, the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  required to open mPTP was raised to  $133.7 \pm 27.0$  nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein (Fig. 5C, blue plot). Similar results were observed in CypD-KO adult cardiomyocytes (Fig. 5D, blue plot), in which the addition of  $177.7 \pm 15.3$  nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein was necessary to induce mPTP opening. Compared with the control condition tested in Fig. 4C (where no addi-

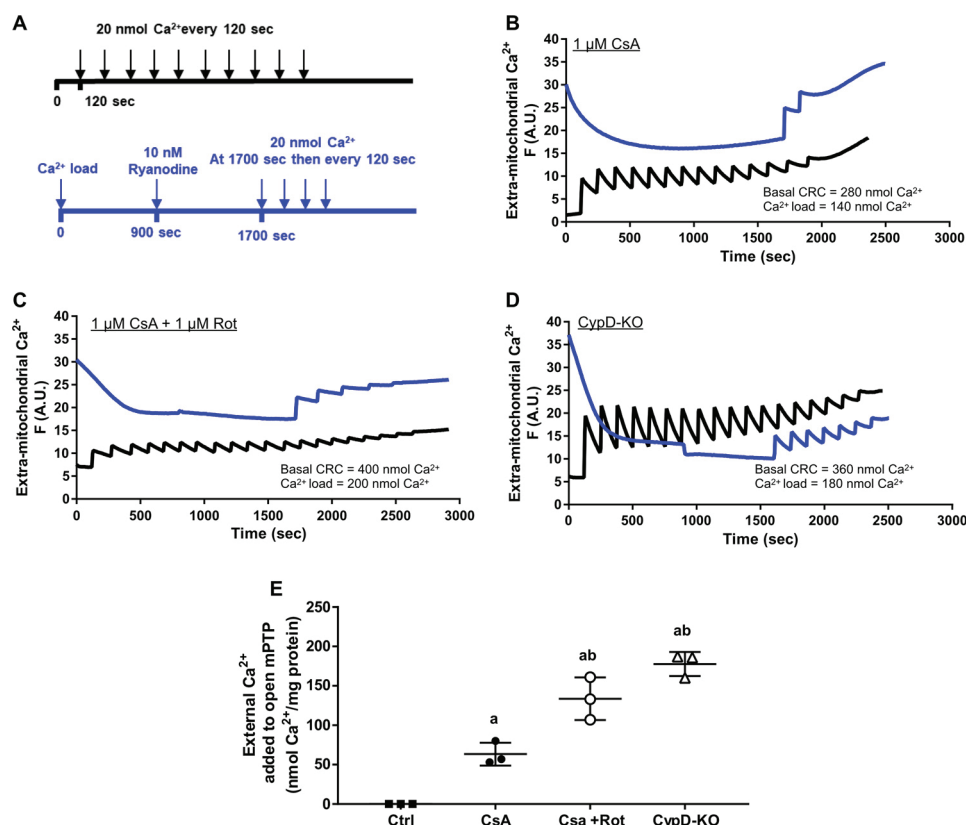
tional  $\text{Ca}^{2+}$  was needed to open mPTP after stimulation of reticular  $\text{Ca}^{2+}$  release), the inhibition/suppression of CypD in our model significantly increase mitochondria capacity to uptake  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 5E).

### Effect of reticular $\text{Ca}^{2+}$ mobilization on mPTP opening after AR

Altogether, our results emphasized the major contribution of both internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  to mitochondrial/cellular fate in normoxic condition. We next assessed whether AR would modify this dynamic.

Cardiomyocytes were subjected to 30 min of anoxia followed by a 15-min reoxygenation period (in the presence or absence of 1 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ ) prior to CRC measurement. As a control (sham groups), cardiomyocytes were incubated for 45 min in normoxic condition also in the presence or absence of 1 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 6A).

AR protocol was determined based on our previous work and on a recent study from Panel *et al.* (22), to guarantee a sufficient amount of viable cardiomyocytes after AR and to achieve a valuable measurement of mPTP opening. The amount of  $\text{Ca}^{2+}$  needed to open mPTP was determined (as in Fig. 3) either using only  $\text{Ca}^{2+}$  pulses addition (sham groups and AR1 groups) or

External and reticular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in mPTP opening

**Figure 5. Effects of pharmacological and genetic protection on mPTP opening.** A,  $\text{Ca}^{2+}$  amount necessary to induce mPTP opening was determined without reticular  $\text{Ca}^{2+}$  stimulation (black) or after stimulation with 10 nM ryanodine (blue). B–D, measurements were performed in the presence of 1  $\mu\text{M}$  CsA (B) or 1  $\mu\text{M}$  CsA + 1  $\mu\text{M}$  rotenone (C) in WT adult cardiomyocytes or in CypD-KO adult cardiomyocytes (D). CRC was measured after the addition of 50% of the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  necessary to open the mPTP. This amount was calculated based on basal CRC (black plots) with each CypD inhibition or suppression. At 900 s, ryanodine receptors were stimulated with 10 nM ryanodine. 900 s later, fluorescence level did not increase, indicating no mPTP opening. Further pulses of 20 nmol of  $\text{Ca}^{2+}$  were added to induce mPTP opening (B–D, blue plots). E, amount of  $\text{Ca}^{2+}$  added to open mPTP after ryanodine stimulation: in control (without CypD inhibition/suppression (i.e. Fig. 4C) or when CypD is inhibited/suppressed. The data are presented as means  $\pm$  S.D. nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein of three independent experiments: one-way ANOVA ( $F(3, 8) = 62.41$ ;  $p < 0.0001$ ), followed by Tukey post-test. a,  $p < 0.05$  versus control; b,  $p < 0.005$  versus CsA. All experiments were performed in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N probe. Fluorescence (F) is expressed in A.U. and represents extramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  was added every 120 s by increments of 20 nmol/injection. Displayed graphs are representative of three independent experiments.

using 5 mM caffeine (to induce reticular  $\text{Ca}^{2+}$  release) followed by  $\text{Ca}^{2+}$  pulse addition (AR2 groups) (Fig. 6A).

As expected, the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  added to open mPTP decreased after AR protocol. AR1 with or without 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  compared with respective sham (Fig. 6B):  $108 \pm 19$  versus  $210 \pm 35$  nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein ( $p < 0.0001$ ; with 1 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ ) and  $193 \pm 22$  versus  $290 \pm 40$  nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein ( $p < 0.0001$ ; without 1 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ ). In AR2, our results showed that even after AR protocol, either with or without 1 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , reticular  $\text{Ca}^{2+}$  release after caffeine stimulation was not sufficient to open mPTP. Additional  $\text{Ca}^{2+}$  pulses were added to trigger mPTP opening.

Moreover, in the presence of 1 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , CRC values significantly decreased when compared with the respective condition in the absence of 1 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (sham, AR1, and AR2 with 1 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  versus sham, AR1, and AR2 without 1 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , respectively;  $p < 0.0001$ ). Strikingly, in none of these conditions were intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores sufficient to trigger mPTP opening, even though the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  during AR facilitates mPTP opening. In all these conditions, the addition of exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  pulses was needed to induce mPTP opening. Interest-

ingly, other biophysical features can be evaluated using our measurement method, which is described below.

**The mobilized internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores**—These stores can be estimated by measuring the difference between CRC value in sham without extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and the CRC value in AR2 without extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Table 1). The mobilized internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores in our model would be  $\sim 187 \pm 38$  nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein.

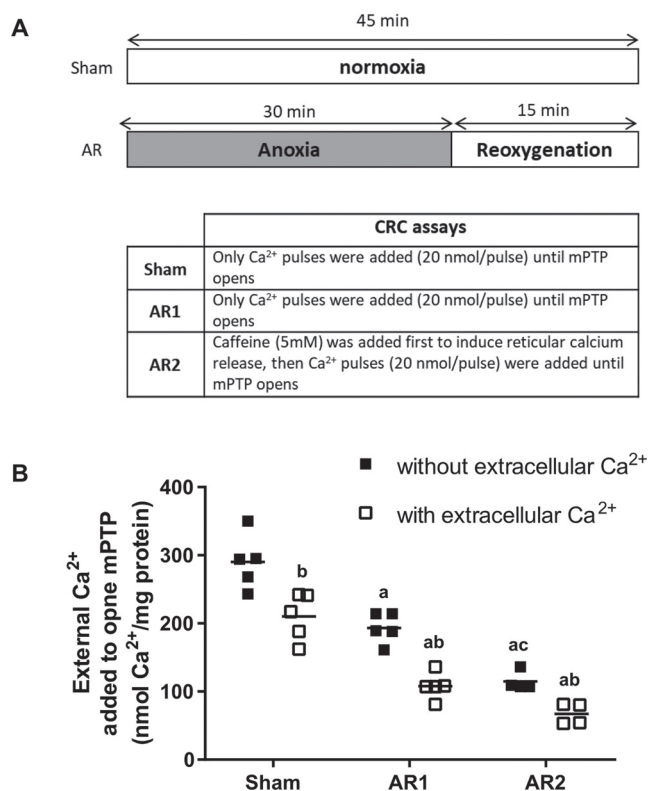
**The remaining internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores after AR**—The measured CRC values without 1 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  were significantly different in AR1 compared with AR2 ( $p < 0.005$ ). Therefore, the remaining internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores after AR can be estimated by subtracting CRC value in AR1 from CRC value in AR2 without 1 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and were equivalent to  $80 \pm 39$  nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein (Table 1).

**The proportion of internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores leak during AR**—Knowing both the total internal  $\text{Ca}^{2+}$  amount ( $187 \pm 38$  nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein) and the remaining internal  $\text{Ca}^{2+}$  after AR ( $80 \pm 39$  nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein), we can estimate the internal  $\text{Ca}^{2+}$  that leaked during AR to  $57 \pm 23\%$  (Table 1).

**The extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  amount that entered the cell during AR**—The difference between the CRC values of AR2 in the absence and the presence of 1 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  represents



## External and reticular $\text{Ca}^{2+}$ stores in mPTP opening



**Figure 6. CRC value variations after AR in the absence or presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ .** A, design of the AR protocol and CRC measurement methods are presented. Adult cardiomyocytes were stored for 45 min in normoxic conditions (sham groups) or subjected to 30 min of anoxia followed by 15 min of reoxygenation (AR groups). Both sham and AR were performed in the presence or in the absence of 1 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Two methods were used to measure CRC: in sham groups and AR1 groups, only  $\text{Ca}^{2+}$  pulses were added (20 nmol/pulse) until mPTP opens. In AR2 groups, caffeine (5 mM) was added first to induce reticular  $\text{Ca}^{2+}$  release, and then  $\text{Ca}^{2+}$  pulses were added (20 nmol/pulse) until mPTP opens. B, values of  $\text{Ca}^{2+}$  amount added to open mPTP are presented as means  $\pm$  S.D. nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein of four or five independent experiments. Two-way ANOVA was conducted on the influence of the presence of 1 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on mPTP opening in the different above protocols. Both AR ( $F(2, 22) = 81.27; p < 0.0001$ ) and 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  addition ( $F(1, 22) = 48.2; p < 0.0001$ ) had a significant effect on CRC. Tukey post-test showed significant differences: a,  $p < 0.0001$  versus respective sham; b,  $p < 0.0001$  with extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  versus without extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ ; c,  $p < 0.005$  AR1 versus AR2. The interaction was, however, not significant ( $F(2, 22) = 1.228; p = 0.3121$ ). Ctrl, control.

an estimation of the amount of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  that entered the cells during AR and was equal to  $48 \pm 14$  nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein (Table 1). The  $48 \pm 14$  nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein represented approximately half of the internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores that leaked to the mitochondria ( $187 - 80 = 107$  nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein). Overall, we can conclude that in our experimental conditions, two-thirds of the  $\text{Ca}^{2+}$  loaded to the mitochondria during AR may come from internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores (mainly from the reticulum), whereas approximately one-third seems to be of extracellular origin.

### Discussion

Mitochondria are involved in multiple cell processes such as the control of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  level because of their  $\text{Ca}^{2+}$  uptake capacity. This participation is particularly important when the cellular environment is subjected to major stress such as ischemia–reperfusion during which the absence of oxygen induces the drop of ATP synthesis and consequently the inhi-

bition of SERCA activity contributing thus to several physiological mishandling including a massive intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  overload (23). In such a situation, mPTP transient activity could act as a safety valve, which enables  $\text{Ca}^{2+}$  leak with an increase rate of efflux. Ultimately, this mechanism triggers mitochondrial swelling, which has been associated with cell death. This finely tuned regulation, balanced by  $\text{Ca}^{2+}$  and mediated by CypD, has been extensively studied (24–26). However, in most of the studies, no distinctions were made regarding the origin of  $\text{Ca}^{2+}$  (internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores and/or extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ ) inducing the opening of mPTP, more likely because there was no reliable method to investigate it.

The proposed method in this study is derived from classical CRC assay and proposes a simple mean to quantitatively estimate the respective contribution of internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  toward mPTP opening. CRC can be achieved by the addition of exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  pulses to isolated mitochondria (27) or permeabilized cells (28). However, this classical CRC method does not allow the study of reticular  $\text{Ca}^{2+}$  input. In parallel to CRC experiment, most of the standard protocols use  $\text{Ca}^{2+}$  ionophores and  $\text{Ca}^{2+}$  addition to induce mPTP opening. These  $\text{Ca}^{2+}$  ionophores can induce artifacts in cellular models including in isolated adult cardiomyocytes (22) and can also induce a release of internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores in a nonspecific manner, as compared with caffeine or ryanodine treatment, which specifically induces reticular  $\text{Ca}^{2+}$  release.

Interestingly, our presented method relies on the analysis of mitochondria–reticulum interaction *in situ*. We used freshly isolated adult murine cardiomyocytes as a cellular model. Cardiomyocytes plasma membranes were permeabilized with 40  $\mu\text{M}$  digitonin. This chemical agent and the used concentration are both respectful of the intracellular membrane structure (29–31). The intracellular microdomains and organelle interactions are thus preserved in this model, allowing the study of mitochondria–reticulum interaction within an integrated physiological-like cellular environment (31, 32). This was also shown by confocal microscopy images showing no impact of 40  $\mu\text{M}$  digitonin on the mitochondrial network in our model (Fig. 1E). We also confirmed the reliability of our cellular model and our experimental conditions, as well as the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N fluorescence bleaching throughout the duration of our experiments.

In our permeabilized model, the low ATP level ensures a natural inhibition of SERCA activity and therefore excludes reticular  $\text{Ca}^{2+}$  uptake (33). In addition, with this method, one can activate the reticular  $\text{Ca}^{2+}$  release via ryanodine receptors with specific agonists such as caffeine or ryanodine (34, 35) to estimate its involvement in mPTP opening. In isolated adult cardiomyocytes, we estimated that reticular  $\text{Ca}^{2+}$  represents  $\sim 50\%$  of the  $\text{Ca}^{2+}$  amount necessary to open mPTP in basal conditions. This proportion may represent an indicator of physiological  $\text{Ca}^{2+}$  steady state between the mitochondria and the reticulum. A second biophysical parameter that can be deduced with this method is the proportion of  $\text{Ca}^{2+}$  content that leaks from the internal stores during AR:  $\sim 57\%$  during a 15-min reoxygenation. Finally, the third biophysical parameter that can be estimated is the proportion of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entering the cells during AR, which represents  $\sim 50\%$  of the

**Table 1****Estimation of the mobilized Ca<sup>2+</sup> cross-talk during AR**

The values represent means ± S.D. of four or five independent experiments.

Mobilized internal Ca <sup>2+</sup> stores	Remaining internal Ca <sup>2+</sup> stores	Proportion of internal stores Ca <sup>2+</sup> leak during AR	External Ca <sup>2+</sup> amount that entered the cell during AR
(Sham without Ca <sup>2+</sup> ) – (AR2 without Ca <sup>2+</sup> )	(AR1 without Ca <sup>2+</sup> ) – (AR2 without Ca <sup>2+</sup> )	100 – [(2) × 100/(1)]	(AR2 without Ca <sup>2+</sup> ) – (AR2 without Ca <sup>2+</sup> )
187 ± 38 nmol/mg protein (1)	80 ± 39 nmol/mg protein (2)	57 ± 23%	48 ± 14 nmol/mg protein

internal Ca<sup>2+</sup> leaking during AR protocol. Considering these two last parameters, we can suggest that ~15–20% of the total Ca<sup>2+</sup> content inducing mPTP opening comes from the extracellular Ca<sup>2+</sup> pulses added during the CRC experiments measured after AR protocol. To our knowledge, this is the first demonstration that internal Ca<sup>2+</sup> leaks during AR require additional factors like external Ca<sup>2+</sup> to open mPTP.

Another advantage offered by this method is the quantification estimate of the relationship between extracellular Ca<sup>2+</sup> content and steady-state mitochondrial Ca<sup>2+</sup> content. It has always been assumed that Ca<sup>2+</sup> homeostasis translates extracellular Ca<sup>2+</sup> changes to shifts in Ca<sup>2+</sup> concentration in the cytosol and organelles. Although the quantification of this interdependence could be realized in live cells with fluorescent probes, the calibration of these probes in mitochondria is much harder than in the cytosol. With our method, we found that the CRC value in cardiomyocytes incubated for 45 min (sham groups) in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> was increased by 80 nmol Ca<sup>2+</sup>/mg protein compared with an incubation in the presence of 1 mM extracellular Ca<sup>2+</sup>. This emphasizes the fact that extracellular Ca<sup>2+</sup> contribute to the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis. Future experiments will be performed as a dose-effect response to fully quantify and understand this interdependence.

One limitation of our method could be that a proportion of the Ca<sup>2+</sup> released by caffeine leaks in the medium instead of entering the mitochondria. However, this would mean that upon caffeine stimulation, the fluorescence of Ca<sup>2+</sup> Green-5N probe should rise. The dissociation constant of Ca<sup>2+</sup> Green-5N probe is ~14 μM. In our experimental conditions, the caffeine-mediated Ca<sup>2+</sup> released is ~70 μM (187 nmol Ca<sup>2+</sup>/mg protein with 750 μg of protein in 2 ml of CRC medium). It is thus very unlikely that the probe could not detect a reticular Ca<sup>2+</sup> leak, if there is any. Along the same line, it should be noted that the insets in Fig. 3 (B and C) showed no significant Ca<sup>2+</sup> variation in the cytosol, suggesting that it was rapidly taken up by the mitochondria, whereas a fluorescence increase was observed in the mitochondria as shown by a Rhod2-AM probe, which is sensitive to free Ca<sup>2+</sup> variation (insets Fig. 3F). This was also confirmed by the absence of reticular Ca<sup>2+</sup> uptake in the presence of the mitochondrial uncoupler FCCP (Fig. 3D) and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake inhibitor, RU360 (Fig. 3E). These results highlight the efficiency of mitochondria–reticulum connection to channel Ca<sup>2+</sup> between both organelles in isolated adult cardiomyocytes.

Another limitation is that in our experimental model, CICR is very limited because of cellular permeabilization and very low ATP amount. However, in the situation of ischemia–reperfusion injury, the absence of ATP production makes CICR

unlikely to occur, suggesting the absence of CICR contribution to mPTP opening during ischemia–reperfusion (36) similarly to our experimental model.

Finally, pH restoration during reperfusion, one of the factors that could participate in enhancing mPTP opening (11, 37), is probably underestimated in our experimental model because of the use of buffered medium in AR protocol. Further experiments are needed to assess any synergetic activation of mPTP with this factor.

In this work, we showed that the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> level required to open mPTP exceeded the reticular Ca<sup>2+</sup> content in both sham and AR experimental conditions either when the protocol was performed in the presence or in the absence of 1 mM extracellular Ca<sup>2+</sup>. In all these conditions, additional Ca<sup>2+</sup> pulses were needed to induce mPTP opening. This work emphasizes the prior knowledge that both extracellular Ca<sup>2+</sup> and internal Ca<sup>2+</sup> stores are important triggers of mPTP opening, by discerning, estimating, and contextualizing their respective contribution. Our results highlight the involvement of extracellular Ca<sup>2+</sup> to mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis but also suggest that the mPTP opening process requires additional mechanisms such as protein and membrane oxidation by reactive oxygen species (38) or pH restoration (10, 11).

This original and simple approach could be applied to a large panel of cell types and cellular models to detect *in situ* reticulum–mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer dysfunction and would open new perspectives for the study and screening of pharmacological molecules for mitochondrial and reticular targets. This method could thus bring new and valuable insights into the physiopathological investigation of numerous diseases.

## Experimental procedures

### Animals

We obtained 8–12-week-old male C57BL/6J mice from Charles River Laboratories (L'arbresle, France). CypD-KO mice under C57Bl/6/SV129 background were issued from Korsmeyer's laboratory (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA). CypD-KO male mice (8–12 weeks old, 20–30 g) were obtained by homozygous intercross in our laboratory.

The present study was in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication 85-23, revised 1996), and all experiments were approved by the University of Lyon Ethics Committee (UCBL1 approval BH2007-07).

### Cardiomyocytes isolation

Adult mouse cardiomyocytes were freshly isolated using two different enzymatic digestions as previously described (39, 40). Briefly, hearts from cervically dislocated male mice were

## External and reticular $\text{Ca}^{2+}$ stores in mPTP opening

quickly removed and retrogradely perfused with Krebs–Henseleit buffer. Ventricular cardiomyocytes were isolated using enzymatic digestion with  $0.167 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  Liberase (Roche) and  $0.14 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  trypsin 2.5% (Invitrogen), or with  $2.4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  collagenase type II (Gibco). Cellular protein concentration was measured using the Bradford method. Isolated cardiomyocytes viability was between 85 and 95%. The cells were used within 5 h after isolation.

### Mitochondria isolation

Isolated mitochondria were used as part of the validation of the study model. After being removed, the hearts were quickly placed in an ice-cold isolation buffer (70 mM sucrose, 210 mM mannitol, and 10 mM EGTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4). Myocardial tissue was finely minced and then homogenized in the same buffer. Mitochondria were isolated in accordance with our previous studies (39, 41). Briefly, the homogenate was centrifuged at  $1300 \times g$  for 3 min, and the supernatant was centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min. The mitochondrial pellet was then suspended in a cold buffer containing: 70 mM sucrose and 210 mM mannitol in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, and centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min. Mitochondrial protein concentration was measured using the Bradford method. Mitochondria were used within 3 h after isolation.

### $\text{Ca}^{2+}$ retention capacity assay

This study was mainly based on the measurement of CRC, an *in vitro* surrogate for the susceptibility of mPTP opening following a  $\text{Ca}^{2+}$  overload. Briefly, the sample was placed in the CRC medium (150 mM sucrose, 50 mM KCl, 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM Tris-HCl, and 5 mM succinate-Tris) and under continuous stirring in the spectrofluorometer. After 120 s of stabilization time, 20 nmol of  $\text{CaCl}_2$  (pulses) were added every 120 s. Modification of extramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was continuously recorded in the presence of a  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescent probe. After sufficient  $\text{Ca}^{2+}$  loading, an increase in fluorescence intensity represents an elevation of extramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, indicating a massive release of  $\text{Ca}^{2+}$  by mitochondria caused by mPTP opening. The amount of  $\text{Ca}^{2+}$  necessary to trigger a massive  $\text{Ca}^{2+}$  release, expressed as the CRC value, was used as an indicator of mPTP susceptibility to  $\text{Ca}^{2+}$  overload.

CRC assay can be performed on isolated mitochondria or permeabilized cells and uses only exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  addition to achieve mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload. The purpose of the present study was to evaluate mitochondria–reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  cross-talk.

Consequently, (a) CRC was specifically performed on a model of permeabilized cardiomyocytes to benefit from the entire intracellular environment. (b) Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  store release was triggered using caffeine or ryanodine addition. Another specification of the permeabilized cell context is the very low ATP amount. ATP is diluted in the assay medium and is not sufficient to induce SERCA activity (33), which guarantees no refilling of the sarco/endoplasmic stores and prevent CICR. (c) CRC assay was then performed as previously described.  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence was measured using a spectrofluorometer (F-2500, Hitachi, High-tech) with two different

$\text{Ca}^{2+}$  probes:  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N and Rhod2-AM (Invitrogen). (d)  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N probe (excitation, 506 nm; emission, 530 nm) detects extramitochondrial calcium. Cardiomyocytes (750  $\mu\text{g}$  of protein) were added in 2 ml of CRC medium. This medium was supplemented with  $0.4 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N and  $40 \mu\text{M}$  digitonin for cardiomyocytes permeabilization (42). (e) Rhod2-AM probe (excitation, 551 nm; emission, 582 nm) detects free intramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  and attests that  $\text{Ca}^{2+}$  was actually taken up by the mitochondria. Cardiomyocytes (750  $\mu\text{g}$  of protein) were incubated with  $5 \mu\text{M}$  of Rhod2-AM for 30 min at room temperature and then washed for 30 min with a buffer containing 50 mM Tris-HCl, 70 mM saccharose, and 210 mM of mannitol, pH 7.4, to remove remaining Rhod2-AM, as well as  $\text{Ca}^{2+}$  traces.

### Confocal microscopy

Cardiomyocytes (750  $\mu\text{g}$  of protein) were incubated with  $5 \mu\text{M}$  of Rhod2-AM and  $0.2 \mu\text{M}$  MitoTracker Green under the same conditions described above. Images were taken on a confocal microscope Nikon A1r using an oil-immersion  $40\times$  objective (N.A. 1.3). MitoTracker Green and Rhod2-AM were excited with 488 and 560-nm wavelength laser lines, respectively. The emitted light was filtered by  $525 \pm 25$  and  $595 \pm 25$  bandpass filters, respectively.  $1024 \times 1024$  pixels images were acquired with an average of four scanning lines.

### Anoxia–reoxygenation protocol

The effect of depleting reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  stores on mPTP opening (as described above) was evaluated after AR in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N. Cardiomyocytes (750  $\mu\text{g}$  of protein) were subjected to 30 min of hypoxia followed by 15 min of reoxygenation in the presence or absence of 1 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (nonpermeabilized cardiomyocytes). Anoxia was achieved using CRC medium (with or without 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) degassed for 5 min with nitrogen and supplemented with 0.5 mM dithionite. At the end of anoxia, the cells were washed and centrifuged at  $20 \times g$  for 3 min and resuspended with 2 ml of fresh oxygenated CRC medium. Sham groups (cardiomyocytes placed for 45 min in normoxic conditions) were subjected to centrifugation/resuspension and used as controls for AR groups. At the end of reoxygenation time, CRC was measured following two different procedures: either using only  $\text{Ca}^{2+}$  pulses addition (Sham groups and AR1 groups) or after the addition of 5 mM caffeine first (to release reticular  $\text{Ca}^{2+}$ ) followed by the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  pulses to complete the measurement (AR2 groups).

### Data processing and presentation

The animals were randomly distributed between groups. The data were analyzed using GraphPad Prism 6 (GraphPad software, San Diego, CA). Displayed graphs are representative of three independent experiments and presented as fluorescence arbitrary unit (A.U.) as a function of time in seconds.

Histograms and scatter plots are represented as means  $\pm$  S.D. nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein of three to five distinct experiments. Interactions and comparisons between groups were made using one-way ANOVA or two-way ANOVA followed by Tukey multicomparison post-test. Kruskal–Wallis followed by



Dunn's multicomparison post-test were used as nonparametric tests in absence of Gaussian normality. The values for  $p < 0.05$  were considered significant.

**Author contributions**—R. H., M. A., R. A.-M., C. V., and A. G. conceptualization; R. H., M. A., P. C., R. A.-M., C. V., and A. G. data curation; R. H., N. T., and A. G. formal analysis; R. H., G. B., and A. G. validation; R. H., M. A., P. C., G. B., and A. G. investigation; R. H., M. A., P. C., R. A.-M., N. T., G. B., and A. G. methodology; R. H., P. C., G. B., and A. G. writing-original draft; R. H., M. A., P. C., G. B., M. O., and A. G. writing-review and editing; C. V. and A. G. resources; G. B., M. O., and A. G. funding acquisition; M. O. and A. G. project administration; A. G. supervision.

**Acknowledgments**—We thank Noelle Gallo Bona, Zeina Harhous, and Dr. Ludovic Gomez for technical help.

## References

- Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Roderick, H. L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 517–529 [CrossRef Medline](#)
- Szymanski, J., Janikiewicz, J., Michalska, B., Patalas-Krawczyk, P., Perrone, M., Ziolkowski, W., Duszynski, J., Pinton, P., Dobrzyn, A., and Wieckowski, M. R. (2017) Interaction of mitochondria with the endoplasmic reticulum and plasma membrane in calcium homeostasis, lipid trafficking and mitochondrial structure. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, pii: E1576 [CrossRef Medline](#)
- Paillard, M., Tubbs, E., Thiebaut, P. A., Gomez, L., Fauconnier, J., Da Silva, C. C., Teixeira, G., Mewton, N., Belaidi, E., Durand, A., Abrial, M., Lacampagne, A., Rieusset, J., and Ovize, M. (2013) Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation* **128**, 1555–1565 [CrossRef Medline](#)
- Tubbs, E., Chanon, S., Robert, M., Bendridi, N., Bidaux, G., Chauvin, M. A., Ji-Cao, J., Durand, C., Gauvrit-Ramette, D., Vidal, H., Lefai, E., and Rieusset, J. (2018) Disruption of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity contributes to muscle insulin resistance in mice and humans. *Diabetes* **67**, 636–650 [CrossRef Medline](#)
- Rieusset, J. (2018) Mitochondria-associated membranes (MAMs): an emerging platform connecting energy and immune sensing to metabolic flexibility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **500**, 35–44 [CrossRef Medline](#)
- Hong, S., Lee, J., Seo, H. H., Lee, C. Y., Yoo, K. J., Kim, S. M., Lee, S., Hwang, K. C., and Choi, E. (2015)  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  exchanger targeting miR-132 prevents apoptosis of cardiomyocytes under hypoxic condition by suppressing  $Ca^{2+}$  overload. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **460**, 931–937 [CrossRef Medline](#)
- Hall, A. R., Burke, N., Dongworth, R. K., Kalkhoran, S. B., Dyson, A., Vicencio, J. M., Dorn, G. W., II, Yellon, D. M., and Hausenloy, D. J. (2016) Hearts deficient in both Mfn1 and Mfn2 are protected against acute myocardial infarction. *Cell Death Dis* **7**, e2238 [CrossRef Medline](#)
- Brustovetsky, N., Brustovetsky, T., Purl, K. J., Capano, M., Crompton, M., and Dubinsky, J. M. (2003) Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition. *J. Neurosci.* **23**, 4858–4867 [CrossRef Medline](#)
- Doczi, J., Turiák, L., Vajda, S., Mándi, M., Töröcsik, B., Gerencser, A. A., Kiss, G., Konrád, C., Adam-Vizi, V., and Chinopoulos, C. (2011) Complex contribution of cyclophilin D to  $Ca^{2+}$ -induced permeability transition in brain mitochondria, with relation to the bioenergetic state. *J. Biol. Chem.* **286**, 6345–6353 [CrossRef Medline](#)
- Seidlmayer, L. K., Juettner, V. V., Kettlewell, S., Pavlov, E. V., Blatter, L. A., and Dedkova, E. N. (2015) Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia-reperfusion: contributions of  $Ca^{2+}$ , ROS, pH, and inorganic polyphosphate. *Cardiovasc. Res.* **106**, 237–248 [CrossRef Medline](#)
- Kim, J. S., Jin, Y., and Lemasters, J. J. (2006) Reactive oxygen species, but not  $Ca^{2+}$  overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H2024–H2034 [CrossRef Medline](#)
- García-Ruiz, C., Colell, A., París, R., and Fernández-Checa, J. C. (2000) Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome *c* release, and caspase activation. *FASEB J.* **14**, 847–858 [CrossRef Medline](#)
- Seidlmayer, L. K., Gomez-Garcia, M. R., Blatter, L. A., Pavlov, E., and Dedkova, E. N. (2012) Inorganic polyphosphate is a potent activator of the mitochondrial permeability transition pore in cardiac myocytes. *J. Gen. Physiol.* **139**, 321–331 [CrossRef Medline](#)
- Lê-Quôc, K., and Lê-Quôc, D. (1985) Crucial role of sulfhydryl groups in the mitochondrial inner membrane structure. *J. Biol. Chem.* **260**, 7422–7428 [Medline](#)
- Hunter, D. R., and Haworth, R. A. (1979) The  $Ca^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria: I. The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* **195**, 453–459 [CrossRef Medline](#)
- Bernardi, P., and Di Lisa, F. (2015) The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **78**, 100–106 [CrossRef Medline](#)
- Rodríguez-Sinovas, A., Sánchez, J. A., Fernandez-Sanz, C., Ruiz-Meana, M., and Garcia-Dorado, D. (2012) Connexin and pannexin as modulators of myocardial injury. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 1962–1970 [CrossRef Medline](#)
- Satoh, H., Ginsburg, K. S., Qing, K., Terada, H., Hayashi, H., and Bers, D. M. (2000) KB-R7943 block of  $Ca^{2+}$  influx via  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange does not alter twitches or glycoside inotropy but prevents  $Ca^{2+}$  overload in rat ventricular myocytes. *Circulation* **101**, 1441–1446 [CrossRef Medline](#)
- Del Arco, A., Contreras, L., Pardo, B., and Satrustegui, J. (2016) Calcium regulation of mitochondrial carriers. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 2413–2421 [CrossRef Medline](#)
- Talukder, M. A., Zweier, J. L., and Periasamy, M. (2009) Targeting calcium transport in ischaemic heart disease. *Cardiovasc. Res.* **84**, 345–352 [CrossRef Medline](#)
- Bompotis, G. C., Deftereos, S., Angelidis, C., Choidis, E., Panagopoulou, V., Kaoukis, A., Vassilikos, V. P., Cleman, M. W., and Giannopoulos, G. (2016) Altered calcium handling in reperfusion injury. *Med. Chem.* **12**, 114–130 [CrossRef Medline](#)
- Panel, M., Ghaleh, B., and Morin, D. (2017)  $Ca^{2+}$  ionophores are not suitable for inducing mPTP opening in murine isolated adult cardiac myocytes. *Sci. Rep.* **7**, 4283 [CrossRef Medline](#)
- Barry, W. H. (1991) Calcium and ischemic injury. *Trends Cardiovasc. Med.* **1**, 162–166 [CrossRef Medline](#)
- Argaud, L., Gateau-Roesch, O., Muntean, D., Chalabreysse, L., Loufouat, J., Robert, D., and Ovize, M. (2005) Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **38**, 367–374 [CrossRef Medline](#)
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., Brunskill, E. W., Sayen, M. R., Gottlieb, R. A., Dorn, G. W., Robbins, J., and Molkenin, J. D. (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**, 658–662 [CrossRef Medline](#)
- Giorgio, V., Guo, L., Bassot, C., Petronilli, V., and Bernardi, P. (2018) Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium* **70**, 56–63 [CrossRef Medline](#)
- Gharib, A., De Paulis, D., Li, B., Augeul, L., Couture-Lepetit, E., Gomez, L., Angoulvant, D., and Ovize, M. (2012) Opposite and tissue-specific effects of coenzyme Q2 on mPTP opening and ROS production between heart and liver mitochondria: role of complex I. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**, 1091–1095 [CrossRef Medline](#)
- Li, B., Chauvin, C., De Paulis, D., De Oliveira, F., Gharib, A., Vial, G., Lablanche, S., Leverve, X., Bernardi, P., Ovize, M., and Fontaine, E. (2012) Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D. *Biochim. Biophys. Acta* **1817**, 1628–1634 [CrossRef Medline](#)
- Korn, E. D. (1969) Cell membranes: structure and synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **38**, 263–288 [CrossRef Medline](#)



## External and reticular $\text{Ca}^{2+}$ stores in mPTP opening

30. Comte, J., Maisterrena, B., and Gautheron, D. C. (1976) Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **419**, 271–284 [CrossRef Medline](#)
31. Vercesi, A. E., Bernardes, C. F., Hoffmann, M. E., Gadelha, F. R., and Docampo, R. (1991) Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *J. Biol. Chem.* **266**, 14431–14434 [Medline](#)
32. Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R., and Kunz, W. S. (2008) Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat. Protoc.* **3**, 965–976 [CrossRef Medline](#)
33. Vanden Abeele, F., Skryma, R., Shuba, Y., Van Coppenolle, F., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Mauroy, B., Wuytack, F., and Prevarskaya, N. (2002) Bcl-2-dependent modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* **1**, 169–179 [CrossRef Medline](#)
34. Meissner, G. (1986) Ryanodine activation and inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **261**, 6300–6306 [Medline](#)
35. Lattanzio, F. A., Jr, Schlatterer, R. G., Nicar, M., Campbell, K. P., and Sutko, J. L. (1987) The effects of ryanodine on passive calcium fluxes across sarcoplasmic reticulum membranes. *J. Biol. Chem.* **262**, 2711–2718 [Medline](#)
36. Kohlhaas, M., and Maack, C. (2013) Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovasc. Res.* **98**, 259–268 [CrossRef Medline](#)
37. Lemasters, J. J. (1999) The mitochondrial permeability transition and the calcium, oxygen and pH paradoxes: one paradox after another. *Cardiovasc. Res.* **44**, 470–473 [CrossRef Medline](#)
38. Becker, L. B., vanden Hoek, T. L., Shao, Z. H., Li, C. Q., and Schumacker, P. T. (1999) Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am. J. Physiol.* **277**, H2240–H2246 [Medline](#)
39. Teixeira, G., Abrial, M., Portier, K., Chiari, P., Couture-Lepetit, E., Tourneur, Y., Ovize, M., and Gharib, A. (2013) Synergistic protective effect of cyclosporin A and rotenone against hypoxia–reoxygenation in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **56**, 55–62 [CrossRef Medline](#)
40. O'Connell, T. D., Rodrigo, M. C., and Simpson, P. C. (2007) Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol. Biol.* **357**, 271–296 [Medline](#)
41. Harisseh, R., Chiari, P., Villedieu, C., Sueur, P., Abrial, M., Fellahi, J. L., Ovize, M., and Gharib, A. (2017) Cyclophilin D modulates the cardiac mitochondrial target of isoflurane, sevoflurane, and desflurane. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **69**, 326–334 [CrossRef Medline](#)
42. Harisseh, R., Pillot, B., Gharib, A., Augeul, L., Gallo-Bona, N., Ferrera, R., Loufouat, J., Delale, T., Allas, S., Abribat, T., Crola Da Silva, C., and Ovize, M. (2017) Unacylated ghrelin analog prevents myocardial reperfusion injury independently of permeability transition pore. *Basic Res. Cardiol.* **112**, 4 [CrossRef Medline](#)

**A modified calcium retention capacity assay clarifies the roles of extra- and intracellular calcium pools in mitochondrial permeability transition pore opening**

Rania Harisseh, Maryline Abrial, Pascal Chiari, Ribal Al-Mawla, Camille Villedieu, Nolwenn Tessier, Gabriel Bidaux, Michel Ovize and Abdallah Gharib

*J. Biol. Chem.* 2019, 294:15282-15292.

doi: 10.1074/jbc.RA119.009477 originally published online August 21, 2019

---

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.RA119.009477](https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009477)

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 42 references, 10 of which can be accessed free at <http://www.jbc.org/content/294/42/15282.full.html#ref-list-1>

## Annexe 3

### Pathophysiological Role of Trpv1 In Malignant Hyperthermia: Identification of New Variants

# Pathophysiological Role of Trpv1 In Malignant Hyperthermia: Identification of New Variants



Nolwenn Tessier<sup>1#</sup>, Mallory Ducrozet<sup>1#</sup>, Sylvie Ducreux<sup>1</sup>, Julien Faure<sup>\*2</sup> and Fabien Van Coppenolle<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>CarMeN laboratory, France

<sup>2</sup>Laboratory of Genetic and Molecular Biochemistry, France

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>\*</sup>These authors jointly supervised this work

Received:  November 24, 2018; Published:  December 11, 2018

**\*Corresponding author:** Fabien Van Coppenolle, France

Julien Faure, Laboratory of Genetic and Molecular Biochemistry, France

## Abstract

Malignant hyperthermia is a pharmacogenetic disorder caused by volatile anesthetics that trigger severe muscle contraction and a hypermetabolic state. Outside triggered crisis, patients are asymptomatic. The molecular mechanisms of MH involve an uncontrolled increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in skeletal muscles, which contributes to excessive muscle contraction and rigidity, increased body temperature, severe rhabdomyolysis and a generalized acidosis and hypermetabolic state. Mutations altering the function of the 2 main calcium channels involved in muscle contraction were so far linked to Malignant Hyperthermia. Recently, we showed that mutations in the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) cation channel could also be involved in MH. We propose that TRPV1, acting as a Ca<sup>2+</sup> leak channel, is a target of volatile anesthetics such as isoflurane as well as a mechanism that could explain its implication in MH.

**Abbreviations:** MH: Malignant Hyperthermia; TRPV1: Transient Receptor Potential Vanilloid 1; RyR1: Ryanodine Receptor type 1; Ca<sup>2+</sup>: Calcium

## Introduction

Malignant Hyperthermia (MH) is a well described skeletal muscle disorder and a hypermetabolic response to inhalation of volatile anesthetics such as halothane, desflurane, sevoflurane and isoflurane. This disease is characterized by an increase of body temperature with cardinal associated clinical signs such as an elevation of expired CO<sub>2</sub>, increased ventilation rhythm, muscle rigidity, rhabdomyolysis, acidosis, hyperkalemia and tachycardia, during anesthesia. Without appropriate care, MH crisis during anesthesia can be fatal. It is impossible to diagnose patient before surgery without exposing them to triggers, hence specific diagnostic testing was developed, based on the response to a muscle biopsy to volatile anesthetics, together with genetic testing of susceptible patients. It is difficult to estimate the prevalence of the mutations leading to MH but the incidence of MH episodes during anesthesia was reported between 1:10 000 and 1:250 000. Mutations in 3 genes were so far associated to MH, involving 3 proteins of the calcium release complex leading to skeletal muscle contraction.

Most of the mutations are found in the RYR1 gene, that encodes the giant calcium channel of sarcoplasmic reticulum responsible

for cytosolic Ca<sup>2+</sup> raise in response to the cell depolarization [1,2]. More than 200 mutations in RyR1 were linked to MH, most of them being non-sense substitutions and conserved in three "hot spots" located in the N-terminal (C35-R614), central (D2129-R2458) and C-terminal regions (I3916-G4942), respectively. In accordance to the genetic bases of MH, it was also described that patients with dominant or recessives forms of myopathies caused by RYR1 mutations (central core disease, multi-minicore disease, central nuclear myopathy and king-denborough syndrome) may also predisposed to episodes of MH [1] during anesthesia. However, although the genetic bases of MH are well studied, mutations are not found for 40 to 30% of the patients. Recently, we have were identified as new target gene for MH, the ion channel TRPV1.

## Trpv1 May Confer Susceptibility to Malignant Hyperthermia

TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) is a non-cationic channel that belongs to the ion channel family of the transient receptor potential. This channel is activated by heat (> 42°C), acidosis (pH < 6), lipids<sup>3</sup> and volatile anesthetics such as

isoflurane. TRPV1 expression has been demonstrated in skeletal muscle and the channel is localized in the longitudinal part of the sarcoplasmic reticulum, where it plays the role of a reticular calcium leak channel [3,4]. Recently the residues in the outer pore region of TRPV1 channel that are critical for a specific activation by the volatile anesthetics like isoflurane [5] were precisely mapped (E600 and Y653). Then, we made the hypothesis that TRPV1 could be implicated in the triggering of malignant hyperthermia crisis and search for mutations in this gene in a cohort of MH patients. Two rare TRPV1 variants were identified in a cohort of 28 MH patients. These patients had either suffered from a MH crisis or were classified as sensitive to MH on the base of a pre-symptomatic test relying on the contraction developed by a skeletal muscle biopsy upon either caffeine or halothane stimulation. Two rare genetic variations were found in two patients.

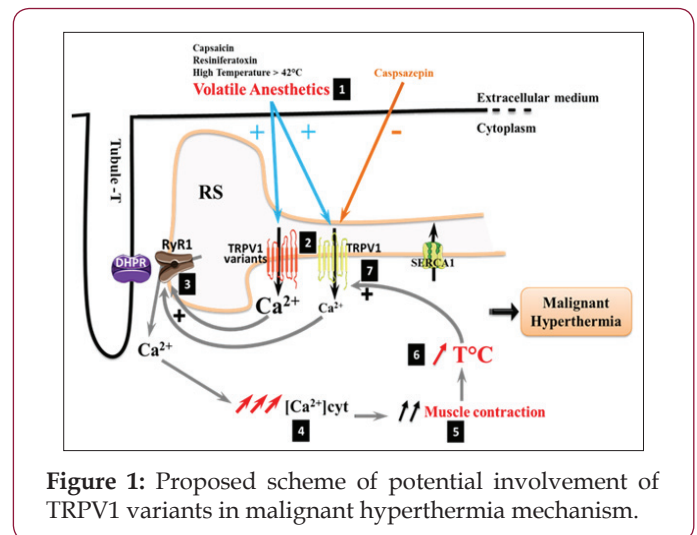
The first variant corresponds to a non-sense variation leading to the substitution of threonine 612 by a methionine (c.1834C>T; p. Thr612Met). The second one corresponds to the inframe deletion of three nucleotides leading to the deletion of asparagine 394 (c.1180-82delAAC;p.Asn394del). The impact of these two TRPV1 variations were first by ectopic expression in HEK-293 cells, and it was shown that their  $Ca^{2+}$  response to volatile anesthetic such as isoflurane cells was faster and more transient compared to a WT form of TRPV1.

To summarize, volatile molecules like isoflurane, halothane and sevoflurane are used in surgeries as anesthetics [1]. At cellular level, these molecules induce  $Ca^{2+}$  release through TRPV1 variant channels - given that their higher sensitivity to volatile anesthetics than wild type TRPV1 - from sarcoplasmic reticulum to cytoplasm [2].  $Ca^{2+}$  released by TRPV1 channels directly activates RyR1-mediated  $Ca^{2+}$  release [3]. This activation induces an uncontrolled increase in cytosolic  $Ca^{2+}$  [4], that allows an enhancement of skeletal muscle contraction [5]. This phenomenon leads to a muscle rigidity, hypermetabolism and causes a rise of temperature in muscle cells [6]. Finally, this increase in temperature would activate TRPV1 channels, triggering a higher  $Ca^{2+}$  leak from RS to cytosol [7]. Then, this leakage would activate RyR1-mediated  $Ca^{2+}$  release and would increase temperature in a vicious circle.

Heterologous expression of the human wild type TRPV1 and the two variants in skeletal muscle of *trpv1*<sup>-/-</sup> mice showed a longitudinal localization for the channels like that of the mouse wild type TRPV1. Furthermore, using  $Ca^{2+}$  imaging experiments and confocal microscopy, an enhanced reticular  $Ca^{2+}$  release was recorded during halogenated anesthetic perfusion, suggesting that mutated TRPV1 channels could trigger deleterious  $Ca^{2+}$  flux during anesthesia. In addition, when the TRPV1 antagonist capsazepine was used on a mouse model of MH (mice knock-in for the mutation Y524S in the RYR1 gene), it reduced significantly the heat-induced hypermetabolic response of the animal, showing that antagonizing TRPV1 may affect the molecular mechanisms of an MH crisis linked to this RYR1 mutation.

## Conclusion

It is now established that TRPV1 is a functional  $Ca^{2+}$  channel in adult skeletal muscle, sensitive to volatile anesthetics. The discovery in patients with MH of TRPV1 variants more sensitive to volatile anesthetics strongly suggests that the TRPV1 channel plays a role in the molecular mechanism of the disease (Figure 1) and that it could be a new therapeutic target in triggered hyperthermia treatments.



**Figure 1:** Proposed scheme of potential involvement of TRPV1 variants in malignant hyperthermia mechanism.

## Acknowledgment

This study was supported by grants from the French Ministry of National Education and the National Institute of Health and Medical Research. The study was part of the Opera IHUB research program (ANR-10-IBHU-0004) within the "Investments of Future" operated by the French National Research Agency (ANR).

## References

- Rosenberg H, Pollock N, Schiemann A, Bulger T, Stowell K, et al. (2015) Malignant hyperthermia: A review. *Orphanet J Rare Dis* 10: 93.
- Betzenhauser MJ, Marks AR (2010) Ryanodine receptor channelopathies. *Pflugers Arch* 460(2): 467-480.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, et al. (1997) The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389(6653): 816-824.
- Lotteau S, Ducreux S, Romestaing C, Legrand C, Van Coppenolle F, et al. (2013) Characterization of Functional TRPV1 Channels in the Sarcoplasmic Reticulum of Mouse Skeletal Muscle. *PLoS ONE* 8(3): e58673.
- Kimball C, Luo J, Yin S, Hu H, Dhaka A, et al. (2015) The Pore Loop Domain of TRPV1 Is Required for Its Activation by the Volatile Anesthetics Chloroform and Isoflurane. *Mol Pharmacol* 88(1): 131-138.
- FA Abeel, Sabine L, S Ducreux, Charlotte D, N Monnier, et al. (2018) TRPV1 variants impair intracellular  $Ca^{2+}$  signaling and may confer susceptibility to malignant hyperthermia. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*.

ISSN: 2574-1241

DOI: 10.26717/BJSTR.2018.12.002181

Fabien Van Coppenolle, Julien F. Biomed J Sci & Tech Res



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 License

Submission Link: <https://biomedres.us/submit-manuscript.php>



#### Assets of Publishing with us

- Global archiving of articles
- Immediate, unrestricted online access
- Rigorous Peer Review Process
- Authors Retain Copyrights
- Unique DOI for all articles

<https://biomedres.us/>

#### Annexe 4

TRPV1 variants impair intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling and may confer susceptibility to malignant hyperthermia



Open

# TRPV1 variants impair intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling and may confer susceptibility to malignant hyperthermia

Fabien Vanden Abeele, PhD<sup>1</sup>, Sabine Lotteau, PhD<sup>2,3,4</sup>, Sylvie Ducreux, PhD<sup>2,3</sup>, Charlotte Dubois, PhD<sup>1</sup>, Nicole Monnier, PhD<sup>5</sup>, Amy Hanna, PhD<sup>6</sup>, Dimitra Gkika, PhD<sup>1</sup>, Caroline Romestaing, PhD<sup>7</sup>, Lucile Noyer, MS<sup>1</sup>, Matthieu Flourakis, PhD<sup>1</sup>, Nolwenn Tessier, MS<sup>2,3</sup>, Ribal Al-Mawla, MS<sup>2,3</sup>, Christophe Chouabe, PhD<sup>2,3</sup>, Etienne Lefai, PhD<sup>2,3</sup>, Joël Lunardi, PharmD-PhD<sup>5</sup>, Susan Hamilton, Pr, PhD<sup>6</sup>, Julien Fauré, PhD<sup>5,8,9</sup>, Fabien Van Coppenolle, Pr, PhD<sup>2,3</sup> and Natalia Prevarskaya, Pr, PhD<sup>1</sup>

**Purpose:** Malignant hyperthermia (MH) is a pharmacogenetic disorder arising from uncontrolled muscle calcium release due to an abnormality in the sarcoplasmic reticulum (SR) calcium-release mechanism triggered by halogenated inhalational anesthetics. However, the molecular mechanisms involved are still incomplete.

**Methods:** We aimed to identify transient receptor potential vanilloid 1 (*TRPV1*) variants within the entire coding sequence in patients who developed sensitivity to MH of unknown etiology. In vitro and in vivo functional studies were performed in heterologous expression system, *trpv1*<sup>-/-</sup> mice, and a murine model of human MH.

**Results:** We identified *TRPV1* variants in two patients and their heterologous expression in muscles of *trpv1*<sup>-/-</sup> mice strongly enhanced calcium release from SR upon halogenated anesthetic stimulation, suggesting they could be responsible for the MH

phenotype. We confirmed the in vivo significance by using mice with a knock-in mutation (Y524S) in the type I ryanodine receptor (*Ryr1*), a mutation analogous to the Y522S mutation associated with MH in humans. We showed that the *TRPV1* antagonist capsazepine slows the heat-induced hypermetabolic response in this model.

**Conclusion:** We propose that *TRPV1* contributes to MH and could represent an actionable therapeutic target for prevention of the pathology and also be responsible for MH sensitivity when mutated.

*Genetics in Medicine* (2019) 21:441–450; <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0066-9>

**Keywords:** TRP channel; *TRPV1*; Calcium; Hereditary disease; Malignant hyperthermia

## INTRODUCTION

The role of Ca<sup>2+</sup> as the main regulatory and signaling molecule in skeletal muscle contraction is well described, and pathogenic variants in several genes encoding Ca<sup>2+</sup> signaling and handling molecules are responsible for various myopathies, yet understanding of the molecular mechanisms involved is still incomplete.<sup>1–3</sup>

Altered regulation of Ca<sup>2+</sup> release is a key contributor to the pathophysiology of core myopathies such as central core disease (CCD, OMIM 117000), as well as in the hypermetabolic response associated with anesthesia-induced malignant hyperthermia (MH, OMIM 145600), a triggered muscle disease.<sup>4</sup> These pathologies have so far been mainly linked

to mutations in the *RYR1* gene, which encodes the main intracellular Ca<sup>2+</sup>-release channel of skeletal muscle.<sup>5,6</sup> Generally, these mutations lead to a hypersensitivity of the RyR1 channel to activation by a wide range of triggers, including caffeine, halothane, and Ca<sup>2+</sup>, or to a decrease in voltage-induced activation.<sup>6–8</sup> The enhanced intracellular Ca<sup>2+</sup> results in abnormal skeletal muscle metabolism manifesting as activation of muscle contraction mediated by the binding of Ca<sup>2+</sup> on troponin, thereby allowing the movement of tropomyosin on actin filaments. This abnormal skeletal muscle metabolism is also characterized by increased oxygen consumption, adenosine triphosphate (ATP) hydrolysis, and heat production.<sup>9,10</sup> Although linkage to the *RYR1*

<sup>1</sup>Inserm U1003, Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics, Equipe Labélisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, SIRIC ONCOLille, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq 59656, France; <sup>2</sup>Université de Lyon, Lyon, Cedex 07, France; <sup>3</sup>Univ-Lyon, CarMeN laboratory, Inserm U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon1, INSA Lyon, Hospital Cardiology, IHU OPERA Cardioprotection, B13 Building, Lyon East, 59 Boulevard Pinel, Fr-69500 Bron, France; <sup>4</sup>School of Biomedical Sciences, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK; <sup>5</sup>Laboratoire de Biochimie Génétique et Moléculaire, IBP, CHU Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France; <sup>6</sup>Department of Molecular Physiology and Biophysics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas 77030, USA; <sup>7</sup>Université de Lyon, UMR 5023 Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Université Lyon 1, ENTPE, CNRS, 6 rue Raphaël Dubois, 69622 Villeurbanne, France; <sup>8</sup>INSERM U1216, F-38000 Grenoble, France; <sup>9</sup>Univ. Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, GIN, F-38000 Grenoble, France. Correspondence: Fabien Vanden Abeele (Fabien.vanden-abeele@inserm.fr) or Fabien Van Coppenolle (Fabien.Van-Coppenolle@univ-lyon1.fr)

These authors contributed equally: Fabien Vanden Abeele and Sabine Lotteau.

These authors jointly supervised this work: Fabien Vanden Abeele, Fabien Van Coppenolle, and Natalia Prevarskaya.

Submitted 21 February 2018; accepted: 4 May 2018

Published online: 21 June 2018

gene is shown for more than 50% of all MH cases, mutations in two other genes were associated to MH: *CACNA1S* encoding the L-type plasma membrane channel regulating RyR1, and *STAC3*, a small adaptor protein interacting with both channels.

The search for a new candidate potentially involved in MH led us to the TRPV1 channel. To date, although playing a widely accepted role in nociception, this channel is not clearly linked to any hereditary disease.<sup>11</sup> Efforts have been mainly focused on its implication in chronic pain syndromes,<sup>11</sup> however, the latest available data suggest that TRPV1, as a highly Ca<sup>2+</sup>-permeable channel, also plays an important role in the physiology of skeletal muscle.<sup>12</sup> Indeed, after initial discovery as a neuronal sensory channel, TRPV1 was subsequently found in a few non-neuronal tissues, including skeletal muscle, and recent studies have clearly highlighted its functional role as a sarcoplasmic reticulum (SR) Ca<sup>2+</sup> channel.<sup>13,14</sup> Interestingly, TRPV1 has recently been shown to be sensitive to volatile anesthetics in neurons.<sup>15,16</sup> However, the potential implication of TRPV1 channel in the mechanism leading to altered regulation of Ca<sup>2+</sup> signaling in the pathophysiology of MH has not yet been investigated.

Here, using complementary approaches and models, we identify and functionally characterize human variants of the TRPV1 channel that confer muscle sensitivity to anesthetics exposure. Our results suggest that TRPV1 plays a critical role in the aberrant Ca<sup>2+</sup> homeostasis in MH.

## MATERIAL AND METHODS

### Patients

The 28 patients tested were referred to the laboratory for genetic screening of the *RYR1* (OMIM 180901) gene in the context of malignant hyperthermia (MH, OMIM 145600). In all cases a familial history of MH during anesthesia was reported. They were all tested for MH susceptibility with an in vitro contracture test (IVCT) according to recommendation of the European Malignant Hyperthermia Group (emhg.org). All were sensitive for halothane but not for caffeine, hence diagnosed as MHS(h).

### Genetic analysis

Blood samples used for genetic screening were obtained after a written informed consent was signed by patients according to the French regulation for genetic studies. For each patient, the 15 coding exons of the *TRPV1* gene were amplified from genomic DNA (OMIM 602076, transcript: NM\_018727.5, protein: 839 AA, Q8NER1, primer sequences available upon request). The analysis of the entire coding sequence of *TRPV1* was performed by direct sequencing on an ABI 3130 DNA sequencer (PE Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). Variations in the sequence were compared with databases (National Center for Biotechnology Information's dbSNP, 1000 Genomes, and the Exome Variant Server), and selected for the study when allele frequency was less than 1%.

### Cells

HEK-293 cells (American Type Culture Collection) were cultured in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) and GlutaMAX (Invitrogen, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich). Cells were maintained in 5% CO<sub>2</sub>, 95% air at 37 °C in a humidified incubator. Cells (50–60% confluency) were transiently transfected by either 1 µg (in 35-mm dishes) of plasmid (transfecting either TRPV1 wild-type or mutants plus pEGFP-N1 at a 5:1 ratio (pEGFP-N1 was used as a positive control of transfection)) using X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics, France) as described by the manufacturer. Cells transfected with 1 µg of pEGFP-N1 alone were used as control (CTL) condition. Cells were mycoplasma-free.

### Cloning

The coding sequence of human *TRPV1* was amplified from the pCAGGSM2-IRES-GFP-TrpV1 vector (a gift from B. Nilius, Leuven, Belgium) and cloned into the pcDNA5/FRT vector (Invitrogen, LifeTechnologies). TRPV1 mutants were obtained using in vitro mutagenesis (QuikChange Site-directed Mutagenesis kit, Agilent Technologies-Stratagene products) and the following primer pairs: T612M ccgtctgagtcacatgacgacaggtgg / ccacctgtgacatggactcagacgg, R722C gtgaggcgtcaagtgc accctgagcttc/gaagctcagggtgcacttgacgcctcac, and V1394del cacctgcgagaagtcggtgctggagg/cctccagcaccgacttctcaggtg. TRPV1 wild-type and mutants were subcloned into the pmCherry-C1 vector as an EcoRI-KpnI fragment. All long polymerase chain reactions (PCRs) mentioned above were carried out with the High Fidelity Phusion DNA Polymerase (Finnzymes) and all constructs were verified by sequence analysis.

### Ethics statement

All experiments were performed in accordance with the guidelines of the French Ministry of Agriculture (87/848) and of the European Community (86/609/EEC). They were approved by the local animal ethics committee of Rhône-Alpes, approval number 692660602.

### Indirect calorimetry

Wild-type (WT) and YS (heterozygous RyR1<sup>Y524S/WT</sup> knock-in) male mice (on C57/B6 background, 6–10 weeks old) were weighed and injected with 5 mg/kg (IP) capsazepine dissolved in 2% DMSO and 10% Tween 20 in sterile saline (vehicle) or with vehicle alone. Ten minutes after injection, mice were placed individually into indirect calorimetry chambers (Oxymax System, Columbus Instruments) contained with a temperature controlled environment chamber set at 37 °C. Maximum oxygen consumption (VO<sub>2</sub>, mL/kg/min) was monitored for 15 min before mice were removed from the chambers. All procedures were approved by the Animal Care Committee at Baylor College of Medicine.

### Isolation of muscle fibers

Single skeletal muscle fibers were isolated from the flexor digitorum brevis muscles of 4 to 8-week-old wild-type (C57BL6J from Charles Rivers Laboratories) or TRPV1<sup>-/-</sup> (from Jackson Laboratories) male mice. Mice were killed by cervical dislocation. Muscles were removed and treated with type 1 collagenase (45–60 min at 37 °C) in the presence of Tyrode as external solution. Single fibers were then obtained by triturating muscles within the experimental chamber. Cells were mounted into a glass bottom dish. Fibers were bathed in the presence of Fluo-4 AM (5 μM) during 30 min. Cells were then washed with Tyrode solution.

### In vivo transfection

Expression of TRPV1 variants by electroporation was performed in the flexor digitorum brevis of 4 to 8-week-old *trpv1*<sup>-/-</sup> male mice using a previously described procedure.<sup>17–19</sup> Mice were anesthetized by isoflurane inhalation (5 min, 3% in air, air flow at 300 ml.min<sup>-1</sup>) using a commercial delivery system (Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Zejtun, Malta). During anesthesia, 25 μl of a solution containing 2 mg/ml hyaluronidase dissolved in sterile saline was injected into the footpads of each hind paw. Mice recovered from anesthesia. Forty minutes later, mice were reanesthetized by isoflurane inhalation. First, 20 μl of plasmid DNAs (mcherry-hTRPV1, mcherry-T612M, or mcherry-N394del) were injected into the footpads of the animal (1.5 mg/ml in standard Tyrode solution). Then, 10 min after plasmid injection, two gold-plated stainless steel acupuncture needles connected to the electroporation apparatus were inserted under the skin, near the proximal and distal portion of the foot, respectively. Twenty pulses of 110 V/cm amplitude and 20 ms duration were delivered at a 2-Hz frequency by a BTX ECM 830 square wave pulse generator (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Mice recovered from anesthesia and experimental observations and measurements were carried out 8 days later.

### Immunostaining

Fluorescence of immunostaining was measured on a Zeiss LSM 5 Exciter laser scanning confocal microscope.

### Confocal Ca<sup>2+</sup> imaging and image analysis

Unless otherwise specified, imaging was achieved on a Zeiss LSM 5 Exciter laser scanning confocal microscope. The microscope was equipped with a 63× oil immersion objective (numerical aperture (NA) = 1.4). Fluo-4 was excited with 488-nm argon laser. The emitted fluorescent light was measured at wavelengths >505 nm. Because Ca<sup>2+</sup> responses to TRPV1 agonists revealed slow kinetics, images (512/512 pixels) were taken with a 5- or 15-second interval. Fluorescence of regions of interest was normalized to baseline fluorescence (F<sub>0</sub>). Experiments realized on HEK cells were performed using the membrane-permeable Ca<sup>2+</sup>-sensitive dye fura-2AM, as detailed previously.<sup>20</sup> Each experiment was repeated three times (field of 35 to 45 cells) and representative experiments are presented (mean ± SE).

### Reagents and preparation of anaesthetics

Capsaicin, capsazepine, and halothane were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France); isoflurane from Laboratoires Belamont (Neuilly Sur Seine, France). Other reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

### Biotinylation

Cells were transfected with 2 μg of each construct. Control experiments were performed by transfecting the empty vectors. Forty-eight hours after transfection, cells were subjected to cell-surface biotinylation and precipitated after lysis with neutravidin-agarose beads (Pierce Rockford, IL, USA) as described in.<sup>21</sup> Anti-TRPV1 antibody (1/500, Santa Cruz) and anti-calnexin (1/2000, Millipore) were used.

### Data analysis

Results were expressed as the means ± S.E.M. Normality was checked using the D'Agostino–Pearson test. Normally distributed data are expressed as mean ± S.E.M and statistical comparison were made using Student's *t* test. Data that were not normally distributed were made using the Mann–Whitney test or the Kruskal–Wallis tests with Dunn's post hoc test. Differences were considered significant when *p* < 0.05 and Origin 5 software was used (Microcal Software, Inc.). Skeletal muscle fibers data were obtained from ≥6 cells from at least four different flexor digitorum brevis muscle from four mice. For animal studies, no randomization was used and no blinding was done. The investigators were not blinded to the group allocation during the experiment and/or when assessing the outcome. The variance is similar between the groups that are statistically compared.

## RESULTS

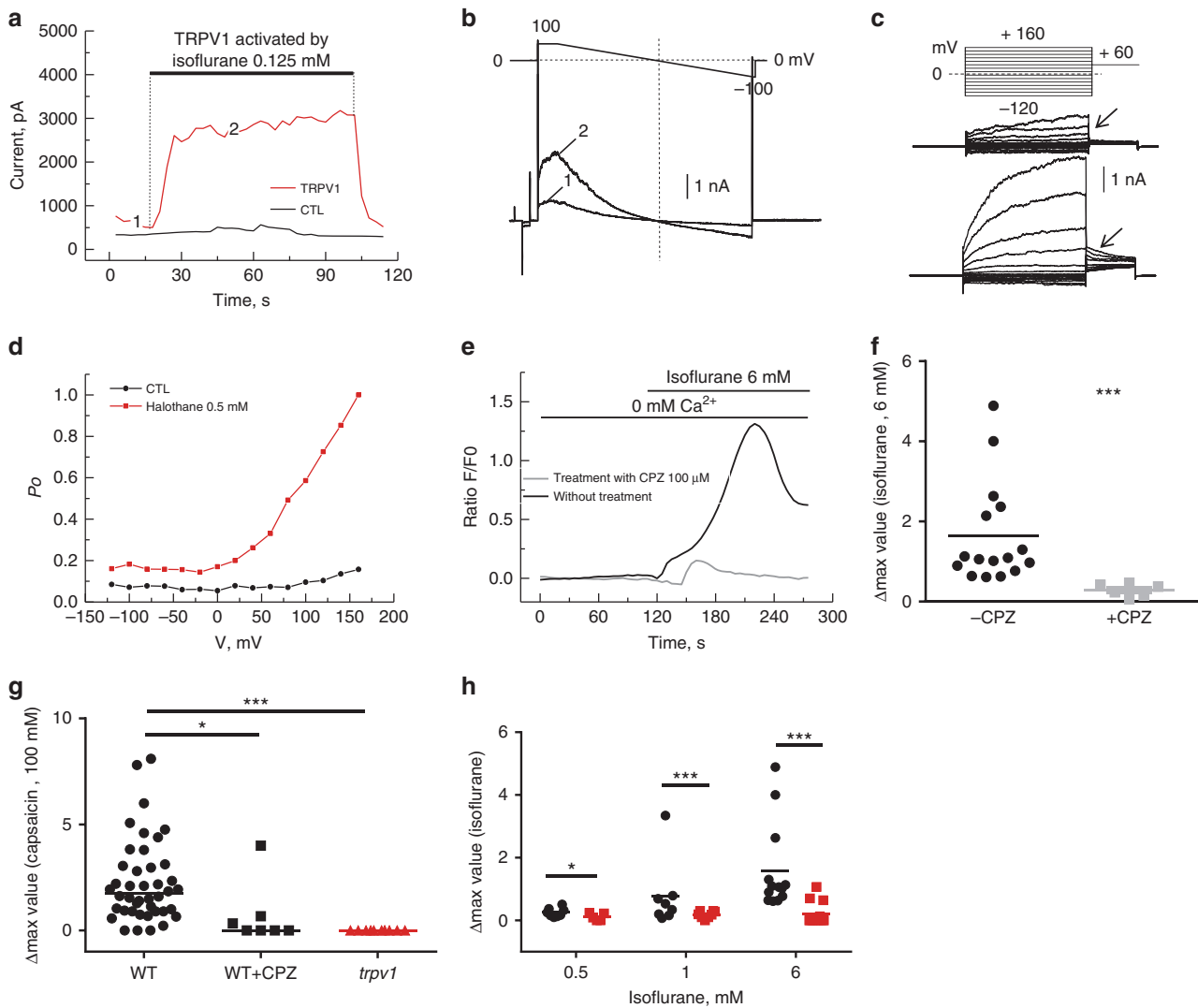
### TRPV1 expressed in HEK-293 cells is activated by volatile anaesthetics

First, to assess the clinical relevance of studying TRPV1 in MH, we tested the effects of volatile anaesthetics (VAs) on TRPV1 activity expressed in HEK-293 cells. Whole-cell patch-clamp experiments showed that isoflurane activated TRPV1 (Fig. 1a,b). No currents were observed in similar condition in untransfected HEK-293 cells as well as in cells transfected with pEGFP-N1 alone (CTL condition; see Materials and methods section). Next, we asked how VAs activate TRPV1. To address this, we hypothesized that VAs sensing could be tightly linked to voltage-dependent sensing as it has been demonstrated for temperature or the chemical agonist capsaicin.<sup>22</sup> We investigated this possibility by performing the same patch-clamp protocol that has been used to demonstrate that the agonist capsaicin functions as a gating modifier shifting activation curves toward physiological membrane potentials.<sup>22</sup> Comparison of the steady-state activation curves of the background membrane current carried through TRPV1 channels (ITRPV1) in HEK-293 cells with or without exposure to halothane showed that

anesthetic produces a depolarizing shift in the voltage dependence of the TRPV1 channel activation by about 100 mV (Fig. 1c,d), which may underlie its agonistic action mechanism.

**TRPV1 is a SR Ca<sup>2+</sup> channel activated by VAs in skeletal muscle cells**

We have previously shown that *Trpv1* is a functional SR Ca<sup>2+</sup>-leak channel in adult mouse skeletal muscle cells.<sup>14</sup> The



**Fig. 1** Volatile anesthetics activate TRPV1 channels heterologously expressed in HEK-293 cells and in flexor digitorum brevis (FDB) isolated fibers. (a,b) Original recordings of the baseline TRPV1 current ( $I_{TRPV1}$ ) (acquired at point 1 of the time course in (a)) and isoflurane-activated (0.125 mM) (acquired at point 2 of the time course) in response to pulse protocol with voltage-ramp portion shown above the recordings. Isoflurane activated a membrane current with biophysical properties, such as a prominent outward rectification and close to 0 mV reversal potential, which is similar to the current activated by the established TRPV1 stimulus, capsaicin (data not shown) ( $n = 7$ ). (c) Examples of the baseline and halothane-activated  $I_{TRPV1}$  in response to the depicted voltage-clamp protocol, which were used to measure voltage dependence of TRPV1 channel open probability ( $P_o$ ) in (d); experiments were performed at 20 °C; arrows in (c) point to the  $I_{TRPV1}$  tail currents at +60 mV. Tail currents were measured during the first millisecond of the final step +60 mV and normalized to the maximal tail current. Normalized amplitude as a function of conditioning depolarizing pulse (ranging from -120 to +160 mV) corresponds to the apparent  $P_o$  (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3$ ). Membrane currents were recorded in the whole cell configuration using the Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Union City, CA). Extracellular solution containing (in mM): 150 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 glucose, 10 HEPES, pH 7.3. Intracellular solution containing (in mM): 150 NaCl, 3 MgCl<sub>2</sub>, 5 EGTA, 10 HEPES, pH 7.3. (e) Traces show representative curve obtained after stimulation of single fibers with isoflurane (6 mM; black line) or in presence of capsazepine (CPZ; 100  $\mu$ M; light gray line). (f) Changes in fluorescence ratio F/F<sub>0</sub> (peak-resting) induced by drugs as indicated in table above graphs. Capsazepine was added 25 min prior to isoflurane. Corresponding scatterplots of  $\Delta$  max expressed as median; data are from 16 cells (without CPZ) and 6 cells (with CPZ) from at least 4 independent fibers preparations. Changes in fluorescence ratio F/F<sub>0</sub> (peak-resting) induced by (g) capsaicin (100  $\mu$ M) or by (h) isoflurane (0.5 mM; 1 mM; 6 mM) in C57Bl6J (black) or *trpv1*<sup>-/-</sup> mice (red). Corresponding scatterplots of max value expressed as median; for the capsaicin response, data are from 42 cells (wild-type, WT), 7 cells (WT + CPZ), and 10 cells (*trpv1*<sup>-/-</sup>) from at least 4 independent fibers preparations. For the isoflurane response, data are from 6 and 5 cells (0.5 mM isoflurane, WT and TRPV1<sup>-/-</sup> respectively); 9 and 8 cells (1 mM isoflurane, WT and TRPV1<sup>-/-</sup> respectively); and 12 and 10 cells (6 mM isoflurane, WT and TRPV1<sup>-/-</sup> respectively) from at least 4 independent fiber preparations. Mann-Whitney tests were used: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$



question remained as to whether endogenous *Trpv1* could be involved in halothane-induced release of  $\text{Ca}^{2+}$  from internal stores in skeletal muscle. We tested this possibility on skeletal muscle cells isolated from C57BL6J mice flexor digitorum brevis (FDB) muscle in an external  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution. Fig. 1e shows that Fluo-4-loaded cells undergo massive increase of cytosolic  $[\text{Ca}^{2+}]$  after isoflurane perfusion (median of  $\Delta\text{max} = 1.09$ ;  $n = 29$ ) (Fig. 1e,f). Interestingly a pretreatment with capsazepine (CPZ), an inhibitor of *Trpv1* significantly reduces isoflurane-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (median of  $\Delta\text{max} = 0.3$ ;  $n = 6$ ), suggesting that muscle response to isoflurane is linked with *Trpv1* activation. To confirm these results, we repeated those experiments in *trpv1*<sup>-/-</sup> mice muscle cells. As expected for these cells, the response to capsaicin (100  $\mu\text{M}$ ) was not observed (Fig. 1g). Next a dose-dependent response to isoflurane on SR  $\text{Ca}^{2+}$  release in WT and *trpv1*<sup>-/-</sup> muscle cells was tested. Isoflurane's maximal effect was obtained at a concentration of 1 mM isoflurane in WT cells, but in the same conditions a clear reduction in *trpv1*<sup>-/-</sup> muscle cells'  $\text{Ca}^{2+}$  release was recorded. This strongly suggests that SR  $\text{Ca}^{2+}$ -store release in differentiated skeletal muscle cells stimulated by isoflurane is mediated by the *Trpv1* channel (Fig. 1h).

#### Identification of *TRPV1* rare variants from patients who suffer from malignant hyperthermia

To date, *TRPV1* has not been clearly linked to any hereditary disease, but we hypothesized that *TRPV1* channel may be involved at a genetic level in MH, because it is well established that other MH-susceptible genes than *RYR1* exist, and that *TRPV1* can be activated by volatile anesthetics and mediate  $\text{Ca}^{2+}$  release in skeletal muscle. We sequenced the *TRPV1* gene in a cohort of 28 MH patients who had been previously shown to have enhanced in vitro sensitivity to halothane in a presymptomatic test relying on the contraction developed by a skeletal muscle biopsy upon either caffeine or halothane stimulation (in vitro contracture test, IVCT), which is the gold standard for screening MH-susceptible patients. Because muscle biopsies from patients with *RYR1* mutations trigger strong contractions in the presence of both caffeine and halothane, we focused our search on patients showing only hypersensitivity to halothane, and not caffeine, during IVCT. These patients are referred to as MHSh. Two rare genetic variations in the *TRPV1* gene were found in two independent patients (Fig. 2a, b). The first variant corresponded to a missense variation (c.1836C>T;p.Thr612Met), leading to the substitution of threonine 612 by a methionine (T612M), and was identified in a patient who developed postoperative hyperthermia after anesthesia. The patient was tested MHSh several months after the event. The second variant (c.1180-82delAAC;p.Asn394del) corresponded to the inframe deletion of three nucleotides leading to the deletion of asparagine 394 (N394del) in an asymptomatic patient tested MHSh during a family study. The *RYR1* gene of the two patients was completely sequenced and only one displayed a significant change in the *RyR1* sequence. The patient with the N394del variant was also carrier of a nonsense *RYR1* mutation in the

heterozygous state. This mutation leading to a premature stop codon in one allele of the gene could however not account for a MHS phenotype. Indeed, MH has a dominant mode of inheritance and a pathophysiology related to a hypersensitive *RyR1* channel only caused by missense or inframe deletion variants. The T612M variation was found in the databases (rs199539626) with a minor allele frequency (MAF) of 0.0013 (ExAC browser), and classified as tolerated or benign by SIFT and Polyphen prediction software. The N394del was not reported, but the Asn in the 394 position was found to have mutated to Ser in only one allele in the ExAC database. Overall, the two *TRPV1* variants were either unknown or below a low MAF threshold, as compatible with rare and triggered diseases such as MH.

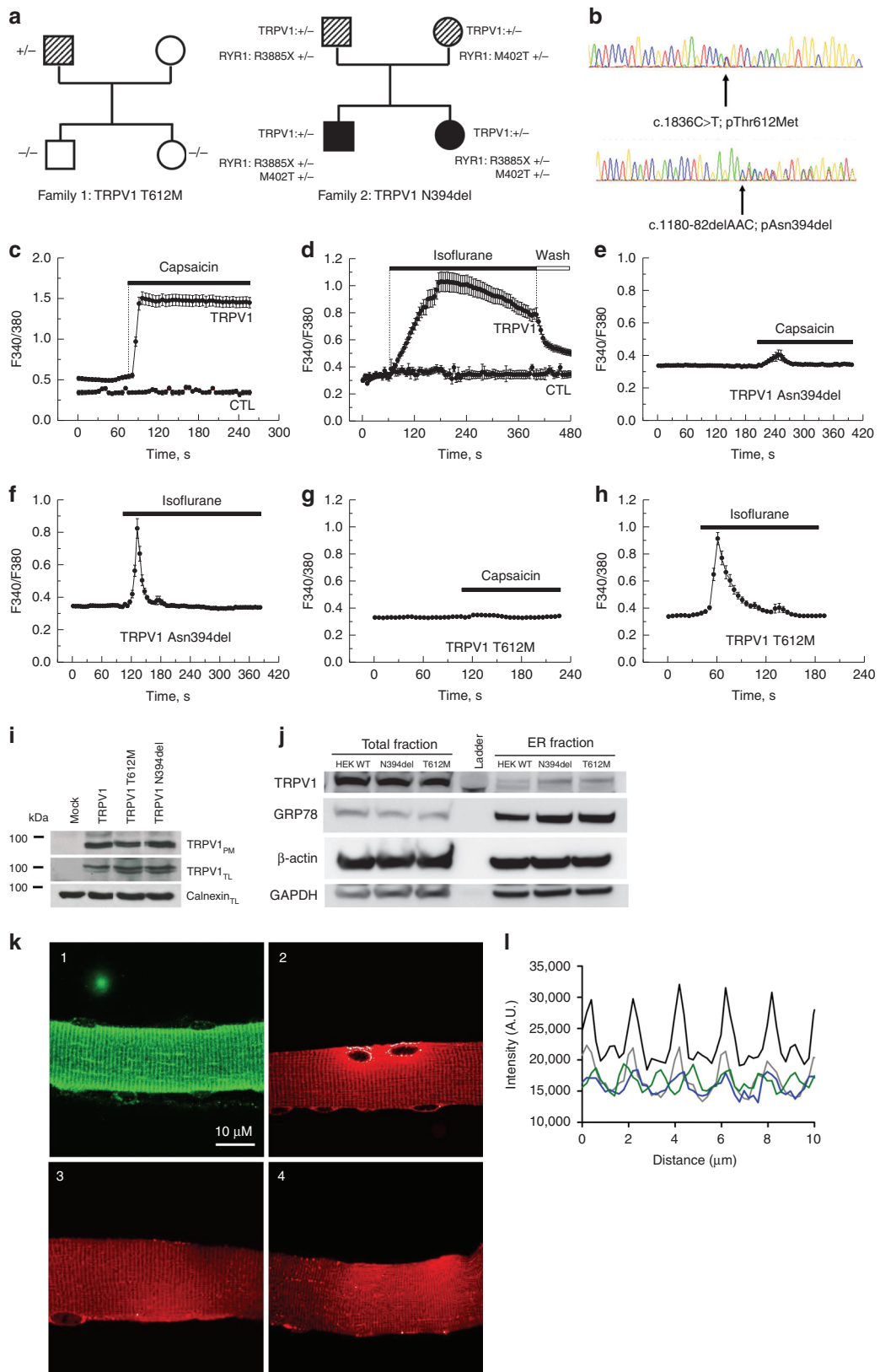
#### Impact of the *TRPV1* variants on $\text{Ca}^{2+}$ homeostasis

We characterized the impact of the two *TRPV1* variants on  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis by performing  $\text{Ca}^{2+}$  imaging experiments in HEK-293 cells. We found that both *TRPV1* variants display a fast and transient  $\text{Ca}^{2+}$  response to isoflurane exposure compared with wild-type *TRPV1* transfected cells (CTL) (Fig. 2c-h). Importantly, capsaicin does not alter  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in cells transfected with the variant. We checked that the same level of *TRPV1* proteins (wild-type or variants) were expressed at the plasma membrane as detected by cell-surface biotinylation assays (Fig. 2i). We also confirmed similar level of total fraction and ER enrichment of *TRPV1*WT, *TRPV1* N394del, and *TRPV1* T612M transiently transfected in HEK-293 (Fig. 2j). This suggests that the modification of the channel activity is not due to an altered trafficking of the mutated channels.

#### *TRPV1* variants transfected in skeletal muscle cells are highly sensitive to VAs

We evaluated the consequences of the *TRPV1* variants on SR  $\text{Ca}^{2+}$ -leak in skeletal muscle. For this, we transfected *trpv1*<sup>-/-</sup> FDB muscles with plasmids coding for the wild-type or mutants human *TRPV1* (T612M or N394del). Previously, we localized native mouse *Trpv1* in the longitudinal part of SR in skeletal muscle fibers<sup>14</sup> as illustrated in Fig. 2k. We confirmed with tagged versions of the human or mutant *TRPV1* that they were also expressed in longitudinal SR (Fig. 2, panels 2, 3, 4). Intensity profiles clearly show single peaks repeated every 2  $\mu\text{M}$ , similar to the *Trpv1* native profile previously obtained in mouse skeletal cells.<sup>14</sup> Thus, human *Trpv1* and its mutated forms seem to localize in the longitudinal part of SR (Fig. 2k, I). In accordance with our previous results, we did not notice any plasma membrane labeling.

To assess the role of *TRPV1* mutants in the SR  $\text{Ca}^{2+}$  response to general anesthetics or capsaicin, we compared the sensitivity to isoflurane and capsaicin of WT mouse *Trpv1* (C57BL6J) and human *TRPV1* (h*TRPV1*), *TRPV1*, T612M, or *TRPV1* N394del expressed in the FDB fibers of *trpv1*<sup>-/-</sup> mice. Nontransfected cells of *trpv1*<sup>-/-</sup> mice were used as a negative control. Cells were loaded with Fluo-4 AM to measure the increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  level due to



**Fig. 2** *TRPV1* variations from patients who suffer from malignant hyperthermia. (a) Segregation of *TRPV1* variations. Individuals tested MHEh are depicted with hatched symbols. Black symbols refer to patients diagnosed with a congenital myopathy and MH sensitivity. Arrows indicate probands referred to the laboratory for genetic studies according to initial diagnosis: malignant hyperthermia crisis for family 1 and myopathy for family 2. Family 1: the proband was referred to genetic investigation for postoperative hyperthermia after anesthesia. No significant variant was found in the *RYR1* gene sequence. The c.1836C>T; pThr612Met variation was found in targeted analysis of the gene. Family 2: the proband was referred to genetic investigation for muscle weakness. He responded positively to the in vitro contracture test (MHS) and further familial studies were undertaken for MH sensitivity. Two mutations in the *RYR1* gene (c.1205T>C; p.Met402Thr and c.11653C>T; p.Arg3885X) were found inherited from each of the parents in the proband and his symptomatic sister's DNA. The haplo insufficiency that was revealed during sequencing of the father *RYR1* messenger RNA (mRNA) cannot account for its MH sensitivity to halothane in the in vitro contracture test (MHS). The c.1180-82delAAC; pAsn394del variant was found in a targeted analysis of the *TRPV1* gene. The variation was also found in his daughter's DNA. (b) Electropherograms from DNA sequencing showing *TRPV1* variation c.1835C>T; pThr612Met and c.1180-82delAAC; pAsn394del respectively for family 1 and 2. (c-h)  $Ca^{2+}$  imaging experiments were performed using the cytosolic  $Ca^{2+}$  probe fura-2 (at 37 °C). Representative time course of cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration following capsaicin (10  $\mu$ M) or isoflurane (0.5 mM) exposure in HEK-293 cells transfected with the wild-type TRPV1 or the TRPV1 mutants. Each experiment was repeated three times (field of 35–45 cells) and representative experiments are presented (mean  $\pm$  SE). (i) Cell-surface biotinylation analysis of TRPV1 wild-type and mutants transfected cells. The empty vector was used as a control (mock). TRPV1 expression was analyzed by immunoblotting for the biotinylated plasma membrane fraction (TRPV1PM) or total cell lysates (TRPV1TL) and calnexin was used as a loading control. (j) Endoplasmic reticulum (ER) enrichment of WT HEK or transiently transfected with TRPV1 N394del or T612M and total fraction. GRP78 is used as an ER loading control, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) for the cytosol compartment, and B-actin as a general loading control. (k,l) Patterns of expression of human or mutant (T612M and N394del) TRPV1 transfected in flexor digitorum brevis (FDB) muscle fibers of *trpv1*<sup>-/-</sup> mice. Representative confocal images of immunofluorescence labeling of (1) Trpv1, (2) human TRPV1-mcherry, (3) TRPV1 T612M-mcherry, and (4) TRPV1 N394del-mcherry. (l) Average intensity profiles superposed: native Trpv1 (black line), hTRPV1-mcherry (gray line), TRPV1 T612M-mcherry (blue line), and TRPV1 N394del-mcherry (green line)

SR  $Ca^{2+}$  release. As illustrated by Fig. 3a, b, except for the nontransfected FDB muscle fibers of *trpv1*<sup>-/-</sup> mice, capsaicin (100  $\mu$ M) induced an increase in cytosolic  $Ca^{2+}$  level. Capsaicin response was similar in endogenous mouse Trpv1 and hTRPV1 (median of max value = 1.74;  $n$  = 42 and 2.81;  $n$  = 11 respectively). Nevertheless, we noticed a significant decrease in amplitude of capsaicin response in cells expressing T612M variant (median of max value = 0.76;  $n$  = 12) and in cells expressing N394del variant (median of max value = 0.61;  $n$  = 10).

We further measured the amplitude of isoflurane response of these constructs (Fig. 3c, d) and found no differences between endogenous mouse Trpv1 and human TRPV1 (median of max value = 1.09;  $n$  = 29 and median of max value = 0.98;  $n$  = 18 respectively). Interestingly, the amplitude of isoflurane response in *trpv1*<sup>-/-</sup> cells expressing T612M and N394del variants was significantly higher (2.80;  $n$  = 11 and 3.65;  $n$  = 12 respectively). The delay and time to peak of isoflurane responses were similar (data not shown). Altogether, these experiments strongly suggest that the T612M and N394del variants of TRPV1 have an altered channel function and are in particular much more sensitive to isoflurane than the wild-type channel.

On the basis of our previous experiments, we hypothesized that the TRPV1 channel could be an important part in the pathophysiology of MH triggering. We reasoned that TRPV1 activation could either directly result in massive  $Ca^{2+}$  release whenever mutations enhance its sensitivity to VAs, or that initial  $Ca^{2+}$  release by TRPV1 stimulated by VAs could trigger or enhance RYR1-mediated  $Ca^{2+}$  release. To explore this hypothesis, we investigated the role of Trpv1 in the phenotype of an MH mice model, the mice line with a knocked-in Y524S mutation in Ryr1 channel. These mice bear a mutation analogous to the Y522S mutation that is associated with MH in humans,<sup>23</sup> and die after exposure to 37 °C for longer than 15 min. The Y524S mice display a dramatic heat-

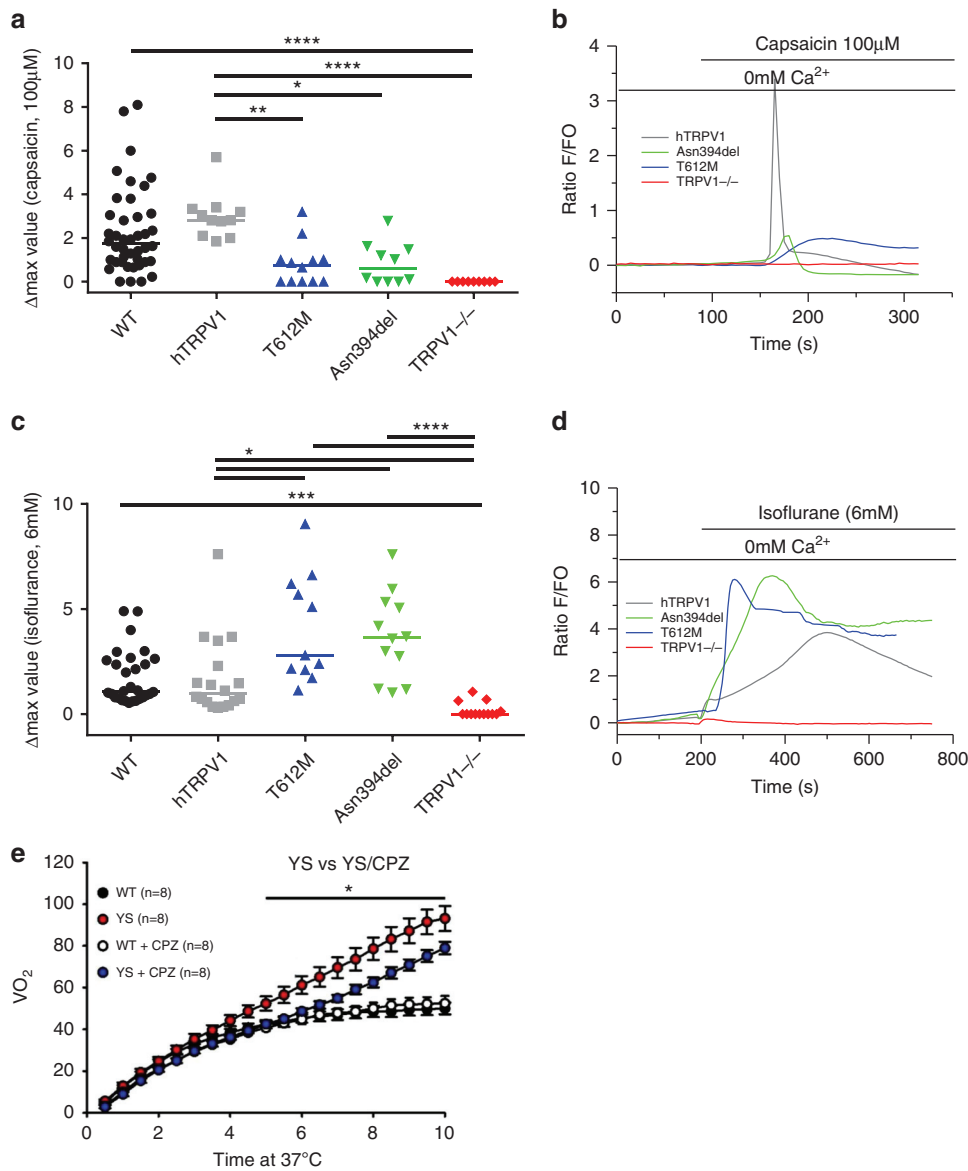
induced hypermetabolic response when exposed to 37 °C compared with WT mice that can be measured by  $VO_2$  consumption. We showed that treatment with the Trpv1 antagonist capsazepine significantly slows down the heat-induced hypermetabolic response in this mouse model (Fig. 3e). This suggested that Trpv1 may be contributing to the mechanism underlying the hyperthermia response of this Y524S Ryr1 model. These findings suggest that TRPV1 and related mutants could be a new therapeutic target for treating muscle diseases due to altered regulation of  $Ca^{2+}$  release.

## DISCUSSION

In the present study, we show that Trpv1 functions as a  $Ca^{2+}$ -release/ $Ca^{2+}$ -leak channel in adult skeletal muscle in response to VAs exposure. TRPV1 is a well-known polymodal cellular sensor for heat and other physiological stimuli.<sup>24–27</sup> However, how this channel is activated by diverse physical and chemical stimuli remains largely unknown. Recently, we demonstrated that anesthetic produces a depolarizing shift in the voltage dependence of the TRPM8 channel activation,<sup>28</sup> which might underlie its agonistic action mechanism. Our results suggest that TRPV1 shares a similar behavior, because VA exposure also produces a depolarizing shift in the voltage dependence of TRPV1.

Here, we also identified a new role of TRPV1 in a human pathology and we proposed it as a new therapeutic target. We have also identified, for the first time, two *TPV1* mutations in patients suffering from a human pathology and, to our knowledge, TRPV1 has never been involved before in any genetic disorders. Indeed, regarding our previous data<sup>14</sup> and the fact that we identified VAs as potent activators of this channel in skeletal muscle cells, we hypothesized that TRPV1 could be part of malignant hyperthermia (MH) crisis. MH is a triggered muscle disease and is known to be a hereditary disease. Moreover,  $Ca^{2+}$  signaling is so far known to be linked to different muscle





**Fig. 3** Decrease in capsaicin sensitivity and increase in isoflurane sensitivity in mutants *TRPV1* (T612M; N394del) transfected in FDB muscles fibers of *trpv1*<sup>-/-</sup> mice and effect of *Trpv1* inhibition by capsazepine on heat-induced sudden death in Y524S mice heat challenged at 37 °C. **C.** Changes in fluorescence ratio F/F0 (peak-resting) induced by (a,b) (100 μM) capsaicin or (c,d) isoflurane (6 mM) in C57Bl6J (black), *TRPV1*<sup>-/-</sup> (red), human*TRPV1*-mcherry (gray), *TRPV1* T612M-mcherry (blue), or *TRPV1* N394del-mcherry (green). Corresponding scatterplots of max value expressed as median. For the capsaicin response, data are from 42 cells (WT), Eleven cells (h*TRPV1*), 12 cells (T612M), 10 cells (N394del), and 9 cells (*TRPV1*<sup>-/-</sup>) from at least 4 independent fiber preparations. For the isoflurane response, data are from 29 cells (WT), 18 cells (h*TRPV1*), 11 cells (T612M), 12 cells (N394del), and 13 cells (*TRPV1*<sup>-/-</sup>) from at least 4 independent fiber preparations. Kruskal–Wallis tests with Dunn’s post hoc tests were performed: \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.001, \*\*\**p* < 0.0001, \*\*\*\**p* < 0.0001. (e) Oxygen consumption (VO<sub>2</sub>) during a 15 min exposure of mice at 37 °C in Y524S RYR1 mouse model (YS) or in WT mouse (WT). *n* = 8 for each condition

pathologies such as MH. For this reason, the regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling is an area of intense research to better understand muscle pathophysiology. Concerning MH, the pathogenic implications of different mutants of the main intracellular Ca<sup>2+</sup> channel, RYR1, are well accepted in MH, where the release of Ca<sup>2+</sup> through an abnormal RYR1 in the presence of volatile anesthetic activates an uncontrolled increase in Ca<sup>2+</sup> release. This increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> leads to the hypermetabolic response characteristic of MH.

Although central for MH susceptibility, RYR1 mutations do not constitute the exclusive genetic cause for this pathology. Accordingly, two *TRPV1* variants were discovered in patients who tested MH sensitive. The first *TRPV1* variant (T612M) was found in a patient with a postoperative hyperthermia after anesthesia. The second variant (N394del) was discovered in an asymptomatic patient. The two variations were either unknown or with very low prevalence in human genetic databases, as compatible with a triggered

pathology such as MH, but genetic evidence that these *TRPV1* variations were responsible for MH was difficult to obtain for these cases. In the second family (N394del), *RYR1* compound heterozygous mutations led to myopathy in the two children. Moreover, family members studied were limited, thus it is difficult to clearly establish a genotype to phenotype correlation.

We have also shown previously that  $\text{Ca}^{2+}$  release in skeletal muscle stimulated by the *TRPV1* agonist capsaicin was a two-phase process consisting of a first step of  $\text{Ca}^{2+}$  release that is dantrolene resistant and a second step that is inhibited by dantrolene, which is a known inhibitor of *RYR1* function.<sup>14</sup> This suggested that  $\text{Ca}^{2+}$  released directly by *TRPV1* from the SR could in turn activate a *RYR1*-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release. Therefore, *TRPV1* could also directly be related to *RYR1* function as an intracellular channel able to prime massive  $\text{Ca}^{2+}$  release by *RYR1*. To check this hypothesis, we performed *in vivo* experiments in transgenic mice expressing a *ryr1* mutation responsible for MH.<sup>23</sup> As already described, environmental heat induces increase in body temperature of these animals and a hypermetabolic response that can lead to death. A pretreatment of the mice with capsazepine, an inhibitor of *Trpv1*, significantly decreased the hypermetabolic crisis, suggesting that *Trpv1*-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release at least participates to the pathophysiology of this MH mouse model. Altogether, our data highlight the potential role of *TRPV1* in skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. It raises the possibility that mutations in *TRPV1* could induce uncontrolled  $\text{Ca}^{2+}$  release, either directly raising intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration above a threshold sufficient to trigger MH or able to trigger *RYR1*-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release that will reach this threshold. Accordingly, we propose a new mechanism in MH pathogenesis induced by an initial reticular  $\text{Ca}^{2+}$  release through endogenous *TRPV1* channels activated by volatile anesthetics. Our data also suggest that  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization occurring through a channel composed of *TRPV1* would represent a dantrolene-resistant step in *RYR1* activation by drugs during MH. Dantrolene represents the only drug to reverse anesthetic-induced MH episodes approved by the US Food and Drug Administration (FDA); however, because it is not always effective, other drugs are needed. Finally, *TRPV1* could represent a new therapeutic target for treating various myopathies characterized by a key altered regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  release. This study also uncovers the possibility that *TRPV1* mutants may contribute to various muscle phenotypes related to  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis.

In conclusion, our study provides crucial understandings concerning the SR  $\text{Ca}^{2+}$ -release/ $\text{Ca}^{2+}$ -leak mechanism and highlights a potential actionable therapeutic target, thereby opening up a new avenue of research into the physiology and physiopathology of skeletal muscle.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the French Ministère de l'Éducation Nationale and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. The study was part of the OPeRa

IHU<sub>B</sub> research program (ANR-10-IBHU-0004) within the "Investissements d'Avenir" operated by the French National Research Agency (ANR).

## DISCLOSURE

The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Missiaen L, Robberecht W, van den Bosch L, et al. Abnormal intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and disease. *Cell Calcium*. 2000;28:1–21.
- Vallejo-Illarramendi A, Toral-Ojeda I, Aldanondo G, López de Munain A. Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. *Expert Rev Mol Med*. 2014;16:e16.
- Burr AR, Molkenkin JD. Genetic evidence in the mouse solidifies the calcium hypothesis of myofiber death in muscular dystrophy. *Cell Death Differ*. 2015;22:1402–12.
- Canato M, Capitanio P, Reggiani C, Cancellara L. The disorders of the calcium release unit of skeletal muscles: what have we learned from mouse models? *J Muscle Res Cell Motil*. 2015;36:61–69.
- Brislin RP, Theroux MC. Core myopathies and malignant hyperthermia susceptibility: a review. *Paediatr Anaesth*. 2013;23:834–41.
- Betzenhauser MJ, Marks AR. Ryanodine receptor channelopathies. *Pflüg Arch Eur J Physiol*. 2010;460:467–80.
- Lanner JT. Ryanodine receptor physiology and its role in disease. *Adv Exp Med Biol*. 2012;740:217–34.
- Jiang D, Chen W, Xiao J, et al. Reduced threshold for luminal  $\text{Ca}^{2+}$  activation of *RyR1* underlies a causal mechanism of porcine malignant hyperthermia. *J Biol Chem*. 2008;283:20813–20.
- Riazi S, Kraeva N, Hopkins PM. Malignant hyperthermia in the post-genomics era: new perspectives on an old concept. *Anesthesiology*. 2018;128:168–80.
- Galińska-Rakoczy A, Engel P, Xu C, et al. Structural basis for the regulation of muscle contraction by troponin and tropomyosin. *J Mol Biol*. 2008;379:929–35.
- Nilius B, Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol Rev*. 2014;66:676–814.
- Ito N, Ruegg UT, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Activation of calcium signaling through *Trpv1* by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy. *Nat Med*. 2013;19:101–6.
- Xin H, Tanaka H, Yamaguchi M, Takemori S, Nakamura A, Kohama K. Vanilloid receptor expressed in the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332:756–62.
- Lotteau S, Ducreux S, Romestaing C, Legrand C, Van Coppenolle F. Characterization of functional *TRPV1* channels in the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. *PLoS ONE*. 2013;8:e58673.
- Kimball C, Luo J, Yin S, Hu H, Dhaka A. The pore loop domain of *TRPV1* is required for its activation by the volatile anesthetics chloroform and isoflurane. *Mol Pharmacol*. 2015;88:131–8.
- Cornett PM, Matta JA, Ahern GP. General anesthetics sensitize the capsaicin receptor transient receptor potential V1. *Mol Pharmacol*. 2008;74:1261–8.
- Trollet C, Bloquel C, Scherman D, Bigey P. Electrotransfer into skeletal muscle for protein expression. *Curr Gene Ther*. 2006;6:561–78.
- DiFranco, M, Quinonez, M, Capote, J, and Vergara, J (2009). DNA transfection of mammalian skeletal muscles using *in vivo* electroporation. (United States). *J Vis Exp*. 2009; pii: 1520. <https://doi.org/10.3791/1520>.
- Lefebvre R, Legrand C, Gonzalez-Rodriguez E, Groom L, Dirksen RT, Jacquemond V. Defects in  $\text{Ca}^{2+}$  release associated with local expression of pathological ryanodine receptors in mouse muscle fibres. *J Physiol*. 2011;589:5361–82.
- Vanden Abeelle F, Bidaux G, Gordienko D, et al. Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *J Cell Biol*. 2006;174:535–46.
- Gkika D, Flourakis M, Lemonnier L, Prevarskaya N. PSA reduces prostate cancer cell motility by stimulating *TRPM8* activity and plasma membrane expression. *Oncogene*. 2010;29:4611–6.
- Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature*. 2004;430:748–54.

23. Lanner JT, Georgiou DK, Dagnino-Acosta A, et al. AICAR prevents heat-induced sudden death in RyR1 mutant mice independent of AMPK activation. *Nat Med*. 2012;18:244–51.
24. Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*. 2013;504:113–8.
25. Yang F, Xiao X, Cheng W, et al. Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nat Chem Biol*. 2015;11:518–24.
26. Hazan A, Kumar R, Matzner H, Priel A. The pain receptor TRPV1 displays agonist-dependent activation stoichiometry. *Sci Rep*. 2015;5:12278.
27. Bertin S, Aoki-Nonaka Y, de Jong PR, et al. The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol*. 2014;15:1055–63.
28. Vanden Abeele F, Kondratskyi A, Dubois C, et al. Complex modulation of the cold receptor TRPM8 by volatile anaesthetics and its role in complications of general anaesthesia. *J Cell Sci*. 2013;126:4479–89.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.



© The Author(s) 2018

## Annexe 5

The Role of the Anti-Aging Protein Klotho in IGF-1 Signaling and Reticular Calcium Leak: Impact on the Chemosensitivity of Dedifferentiated Liposarcomas

Article

# The Role of the Anti-Aging Protein Klotho in IGF-1 Signaling and Reticular Calcium Leak: Impact on the Chemosensitivity of Dedifferentiated Liposarcomas

Vanessa Delcroix <sup>1,2,\*</sup>, Olivier Mauduit <sup>1,3,4</sup>, Nolwenn Tessier <sup>4,5</sup>, Anaïs Montillaud <sup>1,2</sup>, Tom Lesluyes <sup>1,3,†</sup>, Thomas Ducret <sup>2,6</sup>, Frédéric Chibon <sup>1,3,†</sup>, Fabien Van Coppenolle <sup>4,5</sup>, Sylvie Ducreux <sup>4,5</sup>  and Pierre Vacher <sup>1,2,\*</sup> 

<sup>1</sup> INSERM U1218, F-33076 Bordeaux, France; olivier.mauduit@live.fr (O.M.)

anais.montillaud@hotmail.fr (A.M.); tom.lesluyes@inserm.fr (T.L.); frederic.chibon@inserm.fr (F.C.)

<sup>2</sup> Department of Life and Health Sciences, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France;

thomas.ducret@u-bordeaux.fr

<sup>3</sup> Department of Pathology, Bergonié Cancer Institute, F-33076 Bordeaux, France

<sup>4</sup> University of Lyon, F-69361 Lyon CEDEX 07, France; nolwenn.tessier@univ-lyon1.fr (N.T.);

fabien.van-coppenolle@univ-lyon1.fr (F.V.C.); sylvie.ducreux@univ-lyon1.fr (S.D.)

<sup>5</sup> Univ-Lyon, CarMeN laboratory, Inserm U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon 1,

INSA Lyon, Hospital Cardiology, B13 Building, Lyon East, F-69500 Bron, France

<sup>6</sup> INSERM U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux (CRCTB), F-33000 Bordeaux, France

\* Correspondence: vanessa.delcroix@orange.fr (V.D.); pierre.vacher@inserm.fr (P.V.);

Tel.: +33-556-330425 (P.V.)

† Current affiliations: INSERM U1037, Cancer Research Center of Toulouse (CRCT) and Department of Pathology, Institut Claudius Regaud, IUCT-Oncopole, F-31037 Toulouse, France.

Received: 22 October 2018; Accepted: 9 November 2018; Published: 14 November 2018



**Abstract:** By inhibiting Insulin-Like Growth Factor-1-Receptor (IGF-1R) signaling, Klotho (KL) acts like an aging- and tumor-suppressor. We investigated whether *KL* impacts the aggressiveness of liposarcomas, in which IGF-1R signaling is frequently upregulated. Indeed, we observed that a higher *KL* expression in liposarcomas is associated with a better outcome for patients. Moreover, *KL* is downregulated in dedifferentiated liposarcomas (DDLPS) compared to well-differentiated tumors and adipose tissue. Because DDLPS are high-grade tumors associated with poor prognosis, we examined the potential of *KL* as a tool for overcoming therapy resistance. First, we confirmed the attenuation of IGF-1-induced calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-response and Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) phosphorylation in *KL*-overexpressing human DDLPS cells. *KL* overexpression also reduced cell proliferation, clonogenicity, and increased apoptosis induced by gemcitabine, thapsigargin, and ABT-737, all of which are counteracted by IGF-1R-dependent signaling and activate  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent endoplasmic reticulum (ER) stress. Then, we monitored cell death and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ -responses and demonstrated that *KL* increases the reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage by maintaining TRPC6 at the ER and opening the translocon. Only the latter is necessary for sensitizing DDLPS cells to reticular stressors. This was associated with ERK1/2 inhibition and could be mimicked with IGF-1R or MEK inhibitors. These observations provide a new therapeutic strategy in the management of DDLPS.

**Keywords:** klotho; cancer; liposarcoma; calcium; ER stress; translocon; IGF-1; ERK; gemcitabine; TRPC6; channels

## 1. Introduction

The heterogeneous family of soft-tissue sarcomas (STS) encompasses rare malignant tumors that arise from mesenchymal tissue. The histological and molecular analyses of these tumors

allow for the identification of numerous histotypes, including liposarcomas (LPS) that display an adipocytic differentiation and are divided into four histological subtypes: well-differentiated (WDLPS), dedifferentiated (DDLPS), myxoid round cell (MRCLPS), and pleomorphic (PLPS) liposarcomas [1,2]. WDLPS are the most frequent LPS (40% of cases) and are associated with good prognosis. However, in 10% of cases, they can dedifferentiate and give rise to DDLPS that are high-grade tumors. DDLPS mainly occur de novo and account for 25% of all LPS. These tumors are associated with a poor outcome [3] due to metastatic progression (17–30%), high local recurrence rates (41–57%) [4,5] and high chemoresistance. By contrast, MRCLPS are radiosensitive and chemoresponsive. PLPS are highly aggressive but, fortunately, very rare tumors (5% of LPS).

For now, complete surgical resection is the mainstay of therapy for LPS patients. Due to the resistance of these tumors to standard chemotherapies [6], patients suffering from advanced, unresectable, or metastatic LPS receive adriamycin- or gemcitabine-based regimens as palliative treatments. Identifying new therapeutic strategies and response biomarkers is of the utmost importance in order to manage high-grade LPS.

One of the altered pathways that is subject to targeted therapy is IGF-1R signaling. Indeed, IGF-1R is upregulated in osteosarcoma (OS) tumors compared to normal tissue [7] and is associated with a poor overall [8] and metastasis-free survival in cohorts of OS and STS patients [8,9]. Moreover, its downstream effectors p-AKT and p-ERK were suggested as biomarkers for the local recurrence in STS [10]. Both *IGF-1* and *IGF-2* mRNA [11] and IGF-1R [12] are upregulated in LPS tumors compared to adipose tissue. Considering the importance of insulin/IGF-1 signaling in adipose tissue homeostasis, as demonstrated by mice lacking *IGF-1R/IR* (Insulin Receptor) expression [13], and in oncogenesis [14], IGF-1R inhibitors are attractive for LPS therapy. A drug synergistic screen suggested the combined inhibition of IGF-1R and Cyclin-Dependent Kinase 4 (CDK4) as a promising strategy for DDLPS [15]. However, IGF-1R targeted therapies have proved to be disappointing in clinical trials [16], even in OS and STS [17]. So, new strategies for inhibiting insulin/IGF-1 signaling are still needed as a monotherapy or in combination with other drugs to overcome resistance.

*KL* (*klotho*) was first discovered in mice mutated for this gene: the animals displayed multiple aging-like phenotypes and died prematurely [18]. The overexpression of *kl* in mice increases their lifespan up to 19–30% [19]. *KL* encodes a transmembrane protein whose extracellular domain can be shed by secretases and act as a soluble hormone [20]. The alternative splicing of the gene can also produce a soluble form of the protein (KLs) that will be directly secreted into the extracellular environment [21]. The transmembrane protein is an obligatory co-factor for FGF23 (Fibroblast Growth Factor 23) and so, has a crucial role in the normal renal function and in phosphate and calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) homeostasis [22]. Moreover, KLs and membrane-bound KL exhibit anti-aging properties mainly by inhibiting insulin/IGF-1 signaling and reducing oxidative stress [19]. Interestingly, *kl* knockout in mice results in the absence of adipose tissue [18]. Indeed, Klotho regulates proliferation and adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells [23].

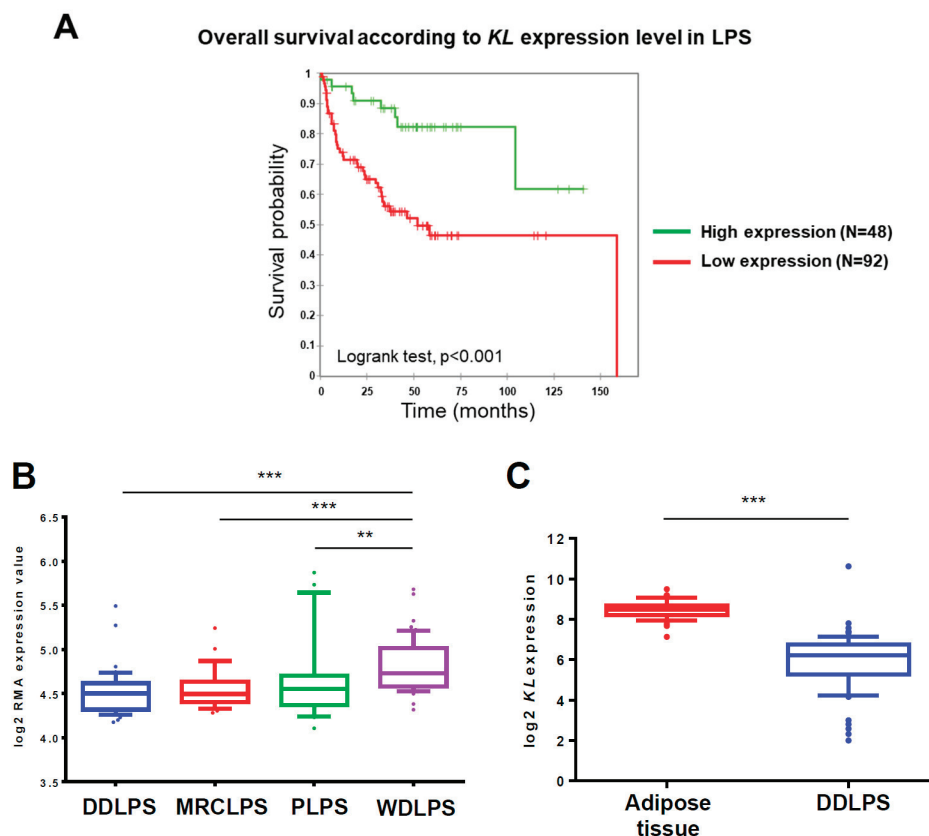
Numerous studies have shown that *KL* is frequently downregulated in cancer (gliomas, breast, colorectal, lung cancers, etc.). *KL* exerts a tumor suppressive effect mainly through inhibition of IGF-1 signaling [24,25]. Considering its role in adipose tissue homeostasis, we examined the clinical relevance of *KL* in terms of the survival of LPS patients and the hypothetical alteration of its expression in these tumors. Then, in a DDLPS cell line, we investigated the effect of *KL* overexpression on IGF-1 signaling and on tumoral phenotypes, especially chemoresistance. Finally, we identified the molecular targets of *KL* and confirmed the involved mechanisms with two other DDLPS cell lines. Based on our findings, we suggest a new potential therapeutic approach for the management of DDLPS, relying on the disruption of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis combined with endoplasmic reticulum (ER) stressors.



## 2. Results

### 2.1. *KL* Expression Has a Prognostic Value for Liposarcoma Patients and Is Downregulated in DDLPS Tumors

First, we examined whether *KL* expression has a clinical relevance in terms of survival for LPS patients. A Kaplan Meier analysis of 140 primary human LPS samples profiled on gene expression microarrays (GSE30929) revealed a significant difference in survival times between the two groups dividing patients according to *KL* expression level in tumors (Figure 1A). In the same cohort, we compared histotypes and noticed that the *KL* expression is higher in WDLPS compared to other tumors (Figure 1B). We next focused on DDLPS because of their relatively high prevalence and chemoresistance.



**Figure 1.** Klotho (*KL*) expression has a prognostic value for liposarcoma patients and is downregulated in dedifferentiated liposarcomas (DDLPS) tumors (A) Kaplan-Meier curves of the overall survival in 140 liposarcoma patients divided into high- and low-risk groups according to the expression level of *KL* in tumors (high or low, cut-off = mean) determined by microarrays (dataset ID: GSE30929). Higher *KL* expression is significantly associated with a better survival for liposarcomas (LPS) patients (Log-rank test,  $p < 0.001$ ). (B) A boxplot of *KL* mRNA expression in dedifferentiated (DDLPS,  $n = 40$ ), myxoid round cell (MRCLPS,  $n = 28$ ), pleomorphic (PLPS,  $n = 20$ ), and well-differentiated (WDLPS,  $n = 52$ ) liposarcomas profiled on a gene expression microarray (dataset ID: GSE30929). *KL* expression is significantly (\*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ) higher in WDLPS tumors compared to other histotypes. (C) A boxplot of *KL* mRNA expression in adipose tissue ( $n = 49$ ) and DDLPS tumors ( $n = 61$ ) profiled on gene expression microarray (GSE13506 and GSE21050, respectively) and normalized by GENT database. *KL* expression is significantly ( $p < 0.001$ ) reduced in DDLPS tumors compared to adipose tissue. On the boxplots, the line in the middle of the box is the median; the whiskers are drawn down to the 10th percentile and up to the 90th. Points below and above the whiskers are represented as individual points.



Since *KL* is expressed in normal adipose tissue [26], we investigated whether its expression is significantly altered in DDLPS tumors. For that purpose, we used free publicly available data from the GENT database, which provides processing and normalization of datasets produced by different laboratories (Figure 1C). The data pointed out that *KL* is significantly downregulated in the 61 DDLPS samples (GSE21050) analyzed by a gene expression microarray as compared to the 49 samples of normal adipose tissue (GSE13506). As for now, unfortunately, there is no available dataset on *KL* expression in tumors at the protein level. These results altogether show that *KL* mRNA expression is downregulated in DDLPS, compared to normal tissue and well-differentiated tumors, and that a lower expression is associated with a poorer prognosis for LPS patients. This turns Klotho into a potential clinical biomarker in high-grade LPS and suggests that its loss could be a selective advantage for tumor development. We hypothesized that this might be related to its action on IGF-1R signaling [27].

## 2.2. In the DDLPS Cell Line, Klotho Reduces IGF-1R-Dependent Signaling

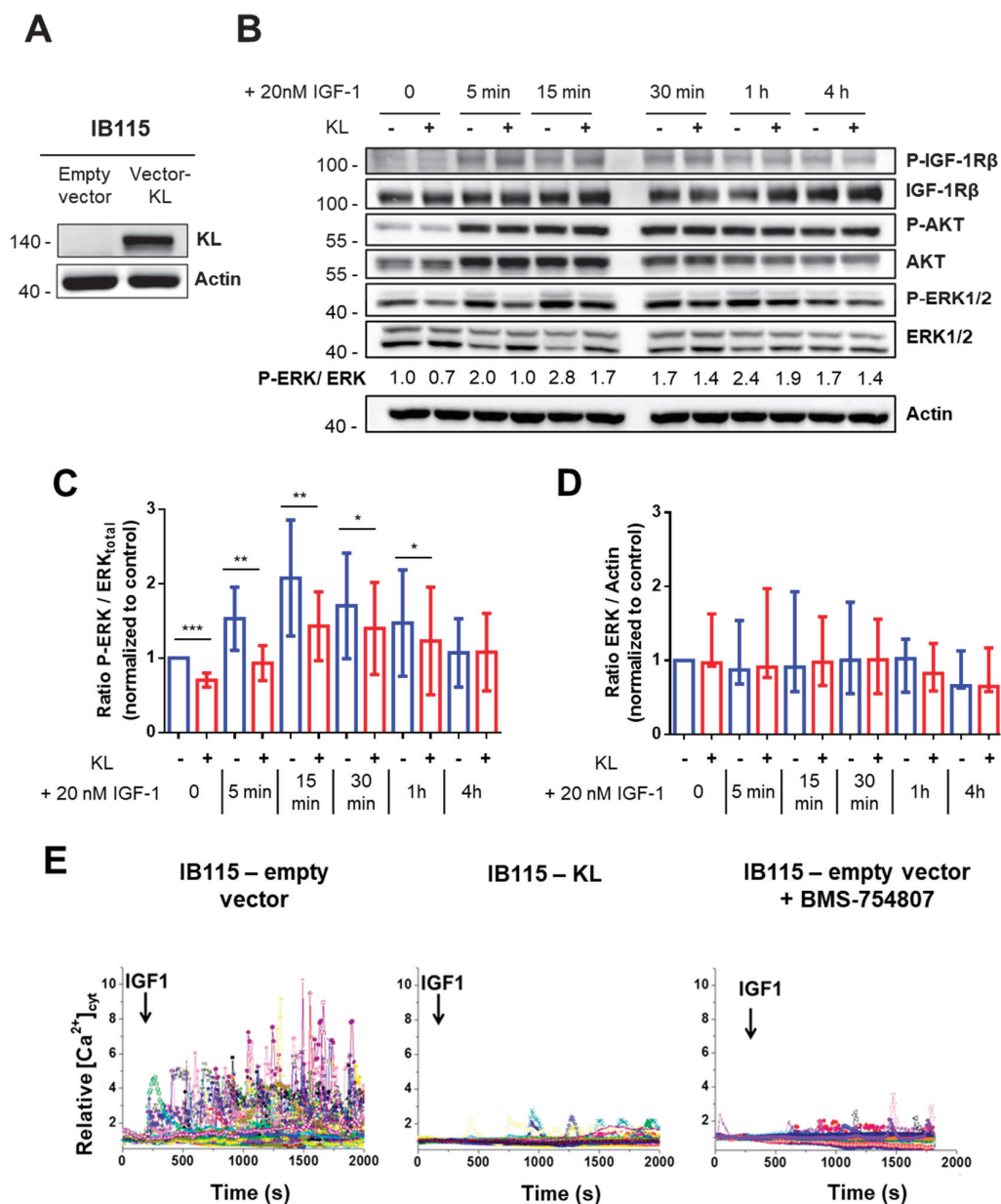
To assess the cellular role of Klotho in high-grade LPS, we established a DDLPS cell line stably expressing *KL* (IB115-KL) (Figure 2A). No *KL* expression was detected by western blotting in the control cell line (IB115-empty vector). Then, we investigated whether Klotho inhibits IGF-1 signaling in these cells.

Ligand binding induces IGF-1R auto-phosphorylation and activates two major pathways: the Ras-Raf-mitogen activated protein kinase (MEK)-ERK (MAPKs) and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT pathways. In addition, it also promotes an intracellular  $Ca^{2+}$ -response whose effectors remain to be clearly elucidated but include PI3K [28,29] and MEK activity (Supplemental Figure S1A).

First, AKT and ERK1/2 phosphorylation during IGF-1 stimulation were analyzed by western blotting (Figure 2B). In contrast to previously published work on breast cancer [27], no difference regarding IGF-1R auto-phosphorylation on Tyr1131 and no reproducible AKT inhibition were observed between the control and *KL*-overexpressing cells. However, in resting conditions, Klotho significantly reduced the ERK1/2 phosphorylation ratio about 30% compared to the control cell line (Figure 2B,C). Moreover, upon IGF-1 stimulation, the ERK1/2 phosphorylation ratio remained significantly higher in IB115-empty vector cells than in IB115-KL cells until 1 h of treatment. Maximal ERK1/2 phosphorylation was reached 15 min after IGF-1 addition, with a ratio of around 2.1 and 1.4 for control and *KL*-overexpressing cell lines, respectively. Of note, ERK1/2 abundance did not significantly vary across time and between cell lines (Figure 2D). Therefore, in the IB115 cell line, Klotho reduces ERK1/2 phosphorylation level and prevents its hyperactivation during IGF-1 stimulation.

Then, we studied the cytosolic  $Ca^{2+}$ -response to IGF-1 (Figure 2E). Whereas control cells responded by large  $Ca^{2+}$  oscillations, only rare and small  $Ca^{2+}$  transients were obtained in *KL*-overexpressing cells. Pretreating control cells with BMS-754807, a specific inhibitor of IGF-1R/insulin receptor (Supplemental Figure S1B), mimicked the response profile of IB115-KL cells (Figure 2E). Klotho has been described as an inhibitor of Transient Receptor Potential Canonical 6 (TRPC6) channel by blocking its exocytosis stimulated by serum growth factors as IGF-1 (through PI3K) and reducing its plasma membrane expression [30–32]. Therefore, we investigated the implication of TRPC6 in an IGF-1-induced  $Ca^{2+}$ -response (Supplemental Figure S1C). No cytosolic oscillations were observed in IB115 cells stimulated with IGF-1 in a  $Ca^{2+}$ -free medium, thus showing that the  $Ca^{2+}$ -entry at the plasma membrane is necessary for an IGF-1-induced  $Ca^{2+}$ -response. Furthermore, pretreating control cell line with larixyl acetate, the specific inhibitor of TRPC6, prevented cytosolic  $Ca^{2+}$  oscillations following IGF-1 stimulation.

This demonstrates that Klotho abrogates an IGF-1-induced  $Ca^{2+}$ -response, which requires TRPC6-dependent currents and is not completely inhibited by MEK inhibition (Supplemental Figure S1A). So, in addition to ERK1/2, Klotho might eventually inhibit PI3K signaling independently of AKT activation.



**Figure 2.** In the DDLPS cell line, Klotho reduces IGF-1R-dependent signaling (A) Validation of *KL*-overexpression in the IB115 cell line by western blotting after lentiviral transduction. The 135 kDa-band was not detected in the control cell line expressing the empty vector. Actin was used as a loading control. (B) Western blot analysis of IGF-1R $\beta$ , AKT, and ERK1/2 phosphorylation statuses during stimulation with 20 nM IGF-1. For the comparison of the ratios between the phosphorylated form and total protein during treatment, the results were all normalized to the control condition (IB115-empty vector,  $t_0$ ) set to 1. Actin was used as the loading control. Images shown are representative of at least three independent experiments. (C) Evolution of the ratio between phosphorylated ERK1/2 and the total ERK1/2 (normalized to control condition set to 1) during IGF-1 (20 nM) stimulation. Histograms sum up six independent experiments and correspond to the mean  $\pm$  Standard Deviation (SD) (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ). (D) Evolution of the total ERK1/2 abundance (normalized to control condition set to 1) during IGF-1 (20 nM) stimulation. Data shown summarize six independent experiments and correspond to medians with the interquartile range (IQR). (E) Variations of relative cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) were monitored by fluorescence video imaging in Fluo2-loaded cells bathed in HBSS (2 mM  $Ca^{2+}$ ) medium, pretreated or not during 24 h with BMS-754807 (50 nM). Human IGF-1 (20 nM) was added in the bath medium at 200 s. Each trace corresponds to the evolution of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  in one cell. Data shown are representative of three independent experiments.

### 2.3. *KL* Overexpression in a DDLPS Cell Line Decreases Its Tumorigenic Phenotypes

Since *KL* overexpression affects IGF-1R signaling in DDLPS cells, we investigated its effect on several tumoral phenotypes modulated by IGF-1R including cell proliferation, clonogenicity, and chemoresistance.

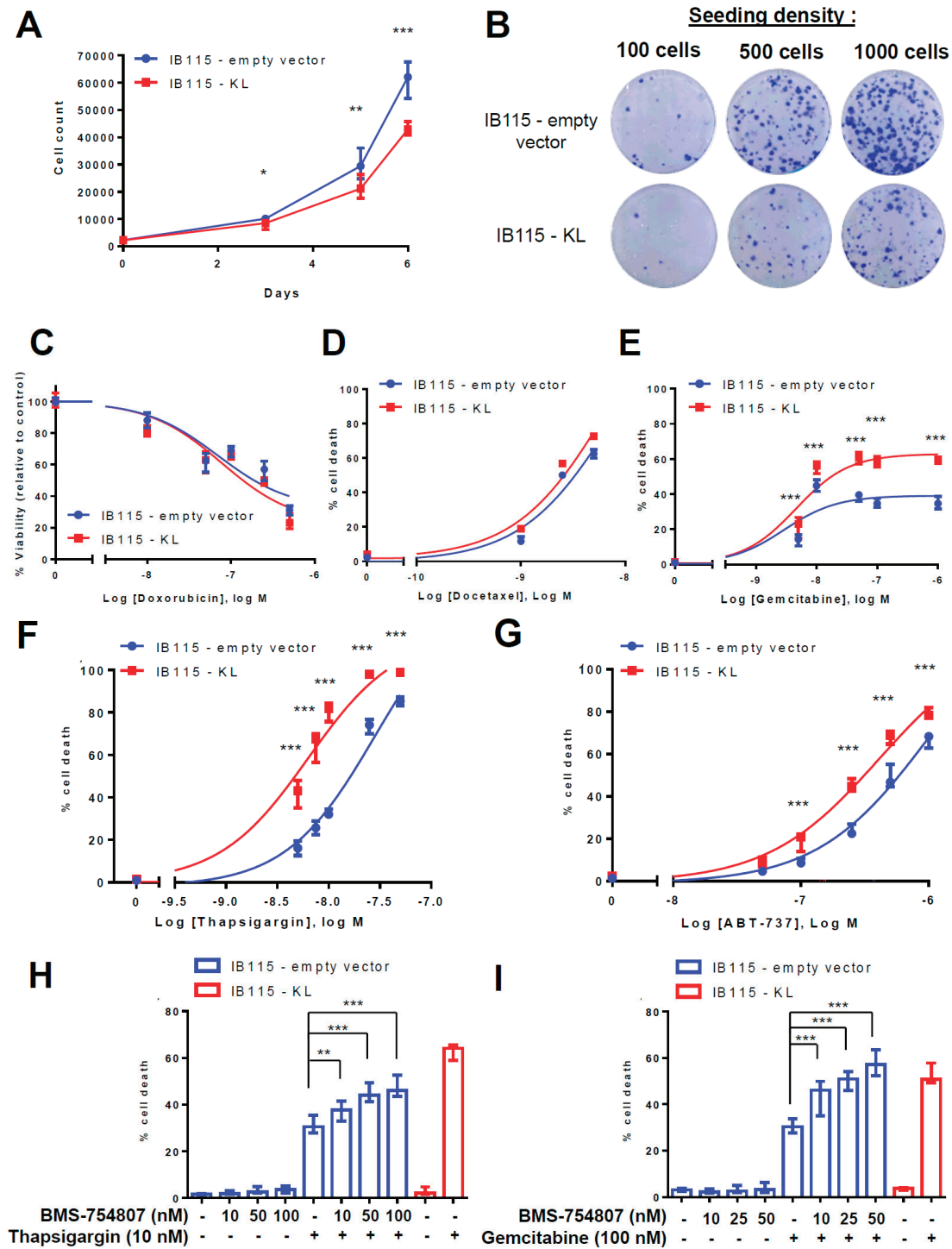
*KL* overexpression significantly decreased cell proliferation from the third day on, resulting in about 30% reduction of cell count (on average 61,204 and 42,993 cells for the IB115-empty vector and IB115-*KL* cell lines, respectively) after 6 days of cell culture (Figure 3A). Moreover, IB115-*KL* cells had fewer clonogenic capacities than the control cell line (Figure 3B), thus confirming its tumor suppressor role. On the other hand, the main cytotoxic molecules used for LPS patients were screened (Figure 3C–E). After 72 h treatment, cell death was assessed using TMRM-staining (gemcitabine, docetaxel) or MTT assay (doxorubicin). No relevant difference between the two cell lines was observed with doxorubicin (Figure 3C) and docetaxel (Figure 3D). In contrast, *KL* overexpression significantly sensitized to gemcitabine-induced cell death (Figure 3E). *KL* overexpression does not decrease EC50 but rather enhances the magnitude of the plateau observed on the dose-response curve: maximal cell death rates reach about 39% and 63% in the IB115-empty vector and IB115-*KL* cells, respectively.

Gemcitabine targets dividing cells and differently alters cell cycle depending on the concentration, as described by Cappella and collaborators [33] and noticed in IB115 cells (Supplemental Figure S2). Indeed, after its activation by phosphorylation, gemcitabine has a biphasic effect: first a cytostatic and then a cytotoxic effect. This explains the delayed apoptosis, but alterations of cell cycle vary from one concentration to another. Considering that Klotho does not interfere with the cell cycle disruption induced by gemcitabine (Supplemental Figure S2), we hypothesized that, after 72 h of treatment, its pro-apoptotic action mainly occurs at moderate (100 nM) and high concentrations (100  $\mu$ M) of gemcitabine at the end of the cytostatic phase and during the recovery phase. The fact that Klotho promotes caspase-dependent apoptotic signaling was confirmed with a dual AnnexinV/PI staining (Supplemental Figure S3).

These results are consistent with previous work showing that IGF-1 signaling protects cells from gemcitabine-induced cell death in pancreatic cancer [34]. It is worth noting that IGF-1 signaling is also well-known for protecting cells from ER stress-induced apoptosis by increasing the adaptive capacity of ER [35]. ER stress was already implicated in resistance to gemcitabine [36,37]. Therefore, we tested the hypothesis that, by inhibiting IGF-1 signaling, Klotho could sensitize DDLPS cells to ER stress-inducing agents. Therefore, DDLPS cell lines were incubated with thapsigargin (TG), an inhibitor of Sarco-Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) pumps (Figure 3F) and thus, an ER stress inducer. TMRM-staining demonstrates that Klotho dramatically sensitizes DDLPS cells to TG-induced cell death (EC50 = 28.2 vs. 6.32 nM for IB115-empty vector and IB115-*KL* cells, respectively). Similar results were obtained with ABT-737, a BH3-mimetic that inhibits anti-apoptotic proteins and consequently increases the  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from ER to mitochondria, thus reducing reticular  $\text{Ca}^{2+}$  content [38] (Figure 3G). Indeed, the EC50 of ABT-737 was shifted from 995 nM in IB115-empty vector cells to 407 nM in IB115-*KL* cells.

These results indicate the specific role of Klotho in gemcitabine and ER-stress-induced apoptosis in DDLPS cells. In order to confirm IGF-1R implication in resistance to apoptosis, the control cell line was incubated with sub-lethal concentrations of BMS-754807 (Figure 3H,I). IGF-1R inhibition significantly increased the cell death caused by TG (Figure 3H) or gemcitabine (Figure 3I) in a dose-dependent manner.

These data confirm that IGF-1R signaling, which is partially inhibited by Klotho, promotes DDLPS cell survival during TG and gemcitabine treatments.



**Figure 3.** KL overexpression in a DDLPS cell line decreases its tumorigenic phenotypes. (A) Cell proliferation was assessed by flow cytometry as described in Material and Methods. KL significantly decreased the cell number at days 3, 5, and 6 (with \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ , respectively). Results summarize the three independent experiments and correspond to the medians with IQR. (B) Clonogenicity was measured by crystal violet staining in accordance with the protocol explained in the Material and Methods. Data shown are representative of the results obtained in three independent experiments. (C) The viability of IB115 cell lines after 72 h of incubation with several concentrations of doxorubicin was assessed by MTT assay. The results are represented as a percentage of the control condition (with the median and IQR) and summarize three independent experiments. (D–G) Mitochondrial potential loss assay was evaluated by flow cytometry with TMRM-loaded cells



after 72 h of incubation with (D) docetaxel, (E) gemcitabine, (F) thapsigargin (TG), and (G) ABT-737, according to the protocol described in the Material and Methods. Compared to corresponding conditions with IB115-empty vector cells, *KL*-overexpression significantly ( $p < 0.001$ ) enhanced cell death induced by gemcitabine, thapsigargin, and ABT-737. Dose-response curves were interpolated as standard slopes. The data shown summarize the results obtained in at least three independent experiments and correspond to median and IQR. Cell death of IB115 cell lines was measured by TMRM-staining and flow cytometry. IB115 cell lines were pretreated for 1 h with indicated concentrations of BMS-7548074 and then treated for 72 h with (H) 10 nM thapsigargin (TG) or (I) 100 nM gemcitabine. Compared to non-pretreated IB115-empty vector cells, BMS-7548074 significantly increased the TG and gemcitabine-induced cell death in a dose-dependent manner. Histograms sum up (H) four and (I) three independent experiments. Data shown correspond to medians with IQR.

#### 2.4. *KL*-Overexpression Sensitizes DDLPS to ER Stress by Disrupting Intracellular Calcium Homeostasis

Klotho might sensitize cells to TG by affecting the SERCA expression. According to gene expression microarray analysis, SERCA1 and SERCA3 genes are not (or only a few) transcribed while the SERCA2 gene is highly expressed in IB115 cells (Supplemental Figure S4). Furthermore, in adipose tissue, no SERCA1 protein is detected and SERCA3 is only slightly expressed according to the Human Protein Atlas database. In contrast, SERCA2 is upregulated in LPS compared to normal tissues and high SERCA2 expression is associated with high malignant LPS such as DDLPS [39,40]. Through western blotting, we found that Klotho does not affect the expression of SERCA2 (Figure 4A).

Long-term exposition to TG induces ER stress and activation of the Unfolded Protein Response (UPR), which encompasses several pathways that activate both cell death and survival mechanisms. The balance between these pathways determines cell fate and is modulated by IGF-1 signaling. In pancreatic cancer, actors of the UPR are activated by gemcitabine and some of them, especially XBP-1 (X-box binding protein 1), are implicated in chemoresistance [36,37]. We hypothesized that Klotho might sensitize DDLPS cells to apoptosis by affecting ER stress pathways.

The analysis of the activation of several arms of the UPR (Figure 4A) confirmed that gemcitabine treatment activates ER stress signaling in the IB115 cell line, although it has only a modest effect on the expression of the chaperone protein GRP78/BiP (Binding immunoglobulin Protein), which is a well-known marker of ER stress and so, is massively expressed during TG treatment.

Interestingly, Klotho enhances BiP expression (Figure 4A), even in resting conditions with about a 4-fold increase, suggesting either a basal reticular stress in these cells or an effect related to the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding activity of BiP in the lumen of the ER.

During the TG treatment, *KL* overexpression reduces XBP-1 splicing but enhances the eIF2 $\alpha$  activation as illustrated by the stronger induction of the pro-apoptotic CHOP (Figure 4A), an observation that is consistent with increased apoptosis and reduced IGF-1 signaling [41]. With gemcitabine, this effect of Klotho on eIF2 $\alpha$ -dependent signaling is also observed, while the detection of spliced XBP-1 here rather reflects a more intense ER stress. An increased cell death in *KL*-overexpressing cells is illustrated by higher PARP cleavage (Figure 4A).

Enhanced ER stress in IB115-*KL* cells might originate from a depletion of reticular  $\text{Ca}^{2+}$ . To address whether Klotho increases the ER stress by modulating the ER  $\text{Ca}^{2+}$ -content, we measured the relative cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) in cells bathed in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium and applied TG (Figure 4B), which passively depletes ER stores, or ionomycin (Figure 4C), a  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore that reveals the size of the  $\text{Ca}^{2+}$  stores. Strikingly, the  $\text{Ca}^{2+}$ -release following TG treatment was greatly increased in *KL*-overexpressing cells, as the subsequent capacitive  $\text{Ca}^{2+}$ -entry (Figure 4B), whereas the  $\text{Ca}^{2+}$ -response to ionomycin was similar in both cell lines. These data suggested that the *KL* overexpression enhances reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -leak but has no effect on the size of the  $\text{Ca}^{2+}$  stores. Direct assessment of reticular calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ ) with a genetic  $\text{Ca}^{2+}$ -sensor specifically targeted to ER confirmed that Klotho neither alters resting  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  nor enhances the reticular  $\text{Ca}^{2+}$  pools releasable by ionomycin, but significantly enhances the amplitude of the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  decrease induced by TG (Supplemental Figure S5).

This implies that, in resting conditions, an increased  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage is compensated by active ER re-filling, probably through the increased activity of SERCA pumps. On the other hand,  $\text{Ca}^{2+}$  released into cytosol might probably be buffered by mitochondria. The estimation of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -content by addition of CCCP (mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupler) confirmed a greater accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  in mitochondria of IB115-KL cells (Supplemental Figure S6A). Moreover, the application of TG into the extracellular medium induced a significantly higher increase of relative mitochondrial  $[\text{Ca}^{2+}]$  in KL-overexpressing cells compared to the control cell line (Supplemental Figure S6B). Therefore, during the long-term TG treatment, increased cell death observed in IB115-KL cells may originate from increased ER stress (through reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -stores depletion) and a probable mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload.

Afterward, we investigated the effect of gemcitabine on reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -content of control cell line after 24 and 48 h of treatment (Figure 4D,E). Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilization following TG addition and subsequent capacitive  $\text{Ca}^{2+}$ -entry are increased in a time-dependent manner (Figure 4D): the amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$ -responses have doubled after 48 h of treatment with gemcitabine. However, no significant difference is observed with ionomycin (Figure 4E). So, gemcitabine-induced ER stress is associated with a reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -leak that increases over time.

In this context, increased capacitive  $\text{Ca}^{2+}$ -entry seems to be a consequence of enhanced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilization rather than a direct target of Klotho. Moreover, the inhibition of Calcium Release-Activated Channels (CRAC) by BTP2 did not protect IB115-KL cells from gemcitabine-induced cell death (Supplemental Figure S7). Actually, BTP2 even tended to sensitize control cell line to gemcitabine, although the differences were not statistically significant. So, the enhanced capacitive  $\text{Ca}^{2+}$ -entry might be mainly involved in intracellular stores refilling and does not play a major role in gemcitabine-induced cell death.

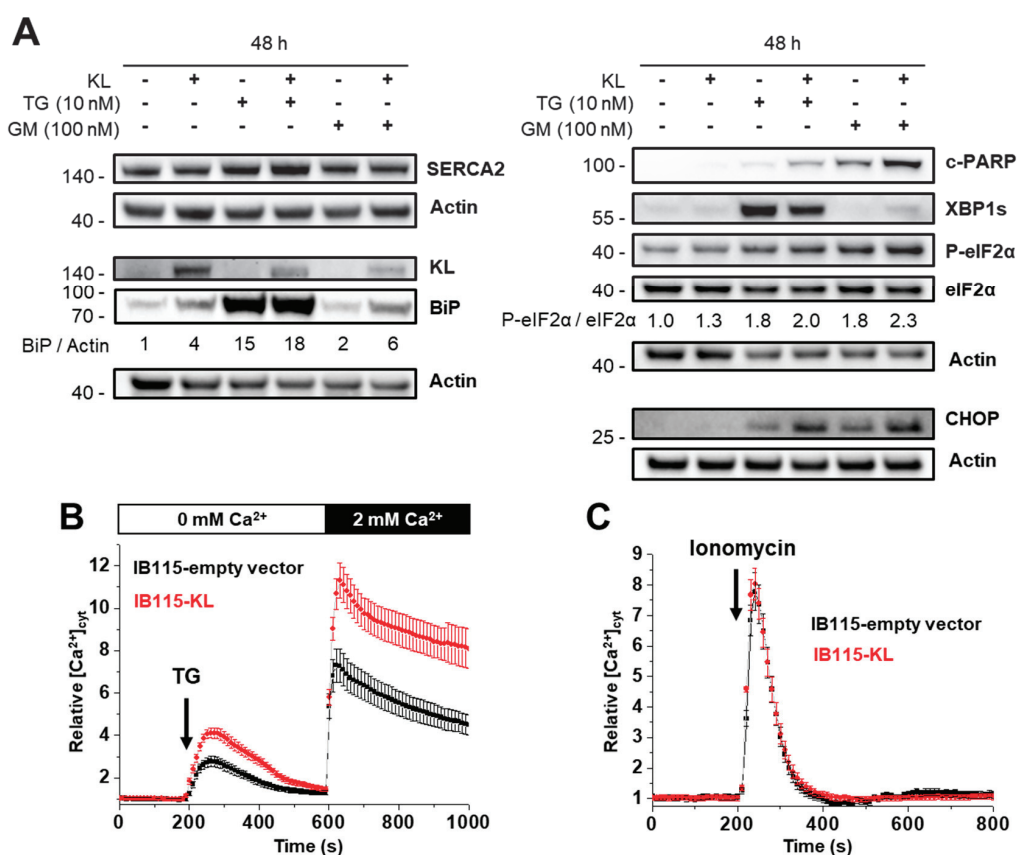
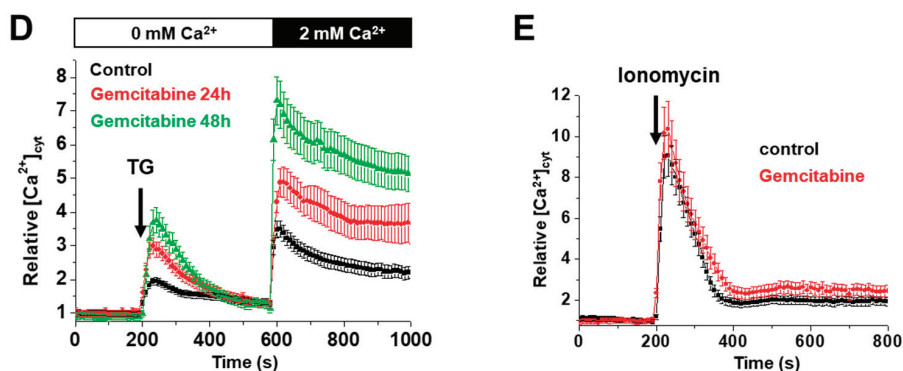


Figure 4. Cont.



**Figure 4.** KL-overexpression sensitizes DDLPS to endoplasmic reticulum (ER) stress by disrupting the intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis. (A) Abundance and phosphorylation ratios of proteins implicated in ER stress were analyzed by western blotting after 48 h of incubation with no drugs, 10 nM thapsigargin (TG) or 100 nM gemcitabine. Actin was used as a loading control. To compare the ratios between phosphorylated form and the total protein during treatments, the results were all normalized to control condition (IB115-empty vector, no treatment) set to 1. Results are representative of three independent experiments. (B–E) Variations of relative cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration were monitored by fluorescence videomicroscopy in Fluo2-loaded cells bathed in a  $Ca^{2+}$ -free HBSS medium. Results are represented as means  $\pm$  SD. (B,D) TG (10 nM) was added at 200 s to evaluate the intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization and (B) 2 mM  $Ca^{2+}$  was applied at 600 s to measure the capacitive  $Ca^{2+}$ -entry. (C,E) Ionomycin (100 nM) was added at 200 s to visualize the ER  $Ca^{2+}$ -content. (B) KL overexpression increased intracellular  $Ca^{2+}$  response to TG and the subsequent capacitive  $Ca^{2+}$  entry ( $n = 143$  and  $n = 183$  for the IB115-empty vector and IB115-cells, respectively), but (C) did not affect the  $Ca^{2+}$  ER content, compared to IB115-empty vector cell line ( $n = 79$  and  $n = 123$  for the IB115-empty vector and IB115-cells, respectively). (D,E) IB115-empty vector cells were pretreated with gemcitabine (100 nM) during 24 and 48 h. Gemcitabine increased (D) TG-induced  $Ca^{2+}$  response (control  $n = 96$ ; 24 h,  $n = 82$ ; 48 h,  $n = 34$ ) but (E) did not alter the size of the reticular  $Ca^{2+}$  pools (control  $n = 102$ ; gemcitabine  $n = 81$ ).

To conclude, TG application revealed that Klotho promotes a constitutive reticular  $Ca^{2+}$ -leakage. This probably contributes to the greater sensitivity to ER stressors such as TG, ABT-737, or gemcitabine, resulting in a higher CHOP induction, possible mitochondrial  $Ca^{2+}$ -overload, and cell death.

### 2.5. Intracellular Localization of TRPC6 Contributes to Reticular $Ca^{2+}$ -Leakage in KL-Overexpressing DDLPS Cells

In order to identify the molecular mechanisms by which Klotho increases reticular  $Ca^{2+}$ -leakage, we first hypothesized that this could involve the Transient Receptor Potential Canonical 6 (TRPC6) channel. Indeed, in neural cancer cells, TRPC6 can be translocated to the reticulum and this localization results in an increase in passive  $Ca^{2+}$ -efflux without any modification of the reticular  $Ca^{2+}$  content [42]. So, as previously reported in other models, Klotho could modulate the TRPC6 intracellular localization in DDLPS cells, thereby explaining its inhibitory action on the IGF-1-induced  $Ca^{2+}$ -response.

To test this hypothesis, DDLPS cells were stimulated with 50  $\mu$ M of OAG, a structural analog of DAG (DiAcylGlycerol) that activates  $Ca^{2+}$  entry through TRPC-3,-6 channels [43]. After the OAG addition, a large cytosolic  $[Ca^{2+}]$  increase was observed in IB115-empty vector cells bathed in the  $Ca^{2+}$ -containing medium, but not in  $Ca^{2+}$ -free medium, meaning that the previous cytosolic  $Ca^{2+}$  increase was due to a  $Ca^{2+}$  influx through TRPC channels at the plasma membrane (Figure 5A). In IB115-KL cells bathed in a  $Ca^{2+}$ -containing extracellular medium, OAG induced a smaller (about 50% decrease) transient  $Ca^{2+}$  peak, which was only partially affected by the absence of  $Ca^{2+}$  in the extracellular medium (Figure 5B). This suggests that in these cells, OAG mainly mobilized calcium ions stored in an intracellular compartment. The pretreatment of IB115-KL cells with TG abolished OAG-induced intracellular  $Ca^{2+}$  release (Figure 5C), suggesting that the OAG-sensitive channels are mainly located at the ER membrane and mobilize  $Ca^{2+}$  from TG-sensitive reticular stores.



To confirm the TRPC6 implication, the cells were bathed in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium and stimulated with Hyp9, a specific activator of TRPC6. Similar to OAG stimulation, a cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ -response was recorded in IB115-KL but not the B115-empty vector cells (Figure 5D). The pretreatment of IB115-KL cells with TRPC6 inhibitors (U73343 or larixyl acetate) significantly reduced the amplitude of the  $\text{Ca}^{2+}$ -response to OAG (Figure 5E) and to TG (Figure 5F), thus confirming the role of TRPC6 in both OAG-induced response and the passive reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -leak. Pretreatment with a specific inhibitor of TRPC3 (Pyr3) combined to larixyl acetate suppressed OAG-response (Supplemental Figure S8). Therefore, it can be hypothesized that the residual  $\text{Ca}^{2+}$ -response to OAG in larixyl acetate-treated cells is mediated by TRPC3 channels. However, to our knowledge, there is no evidence of the role of TRPC3 at the ER or for a link between IGF-1, KL, and TRPC3 in the literature. So, the mechanisms involving TRPC3 would require further investigation. Comparing  $\text{Ca}^{2+}$ -response of Pyr3- and larixyl acetate-treated cells suggests that TRPC3 is less implicated than TRPC6 in  $\text{Ca}^{2+}$ -response to OAG (Supplemental Figure S8).

The analysis of TRPC6 abundance by western blotting revealed that TRPC6 expression is increased after 48 h incubation with 10 nM TG or 100 nM gemcitabine and, more importantly, in IB115-KL cells (Figure 5G). This suggests that TRPC6 might play a role in TG- and gemcitabine-induced cell death.

Though larixyl acetate (the specific TRPC6 inhibitor) reduced the TG-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -response, no protection against TG-induced apoptosis was observed in IB115-KL cells (Figure 5H). Actually, TRPC6 inhibition aggravated TG-induced apoptosis in both cell lines (Figure 5H), while it did not meaningfully modify cell death after gemcitabine treatment (Figure 5I). However, larixyl acetate does not allow for the distinction between respective roles of reticular- and plasma membrane-located TRPC6 channels. Previous studies reported that TRPC6 takes part in the  $\text{Ca}^{2+}$ -entry induced by TG [44–46]. The sensitization to apoptosis observed in IB115-empty vector cells (Figure 5H) suggests that the influx of  $\text{Ca}^{2+}$  through the TRPC6 channels at the plasma membrane is involved in cell survival.

Despite the fact that intracellular TRPC6 channels take part in TG-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release and so, probably promote ER stress, these last results altogether suggest that TRPC6 sequestration at the ER is probably not the only and major mechanism by which Klotho sensitizes to TG- and gemcitabine-induced cell death.

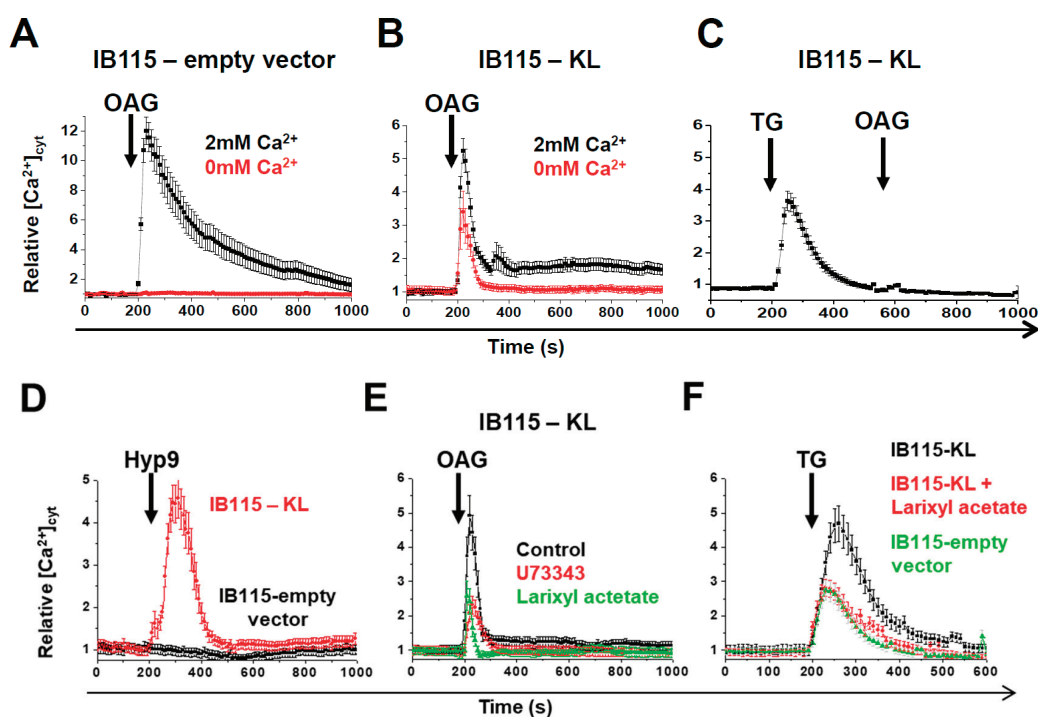
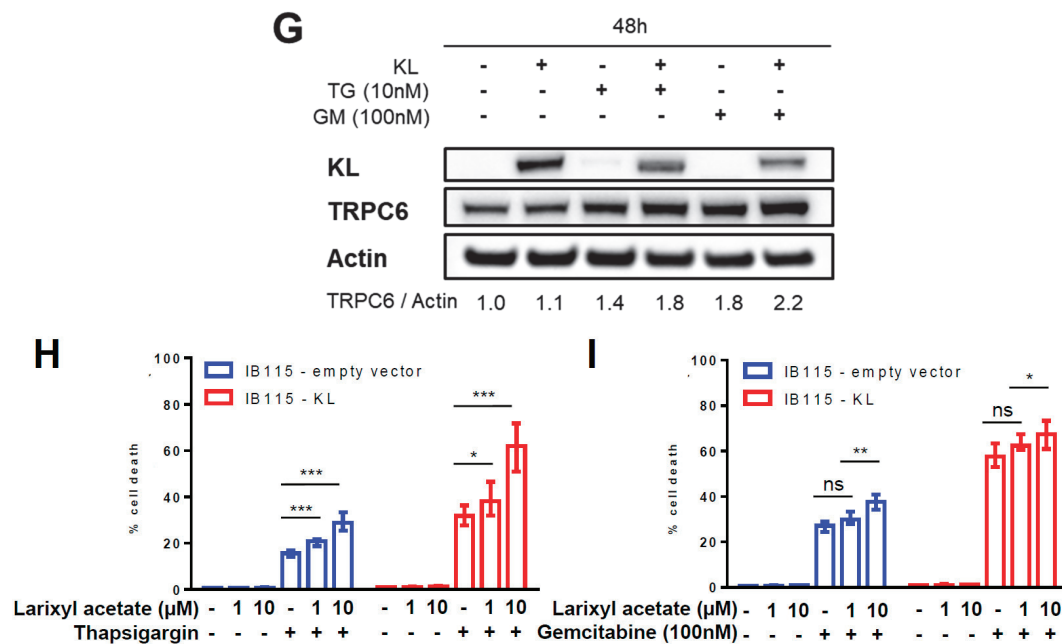


Figure 5. *Cont.*

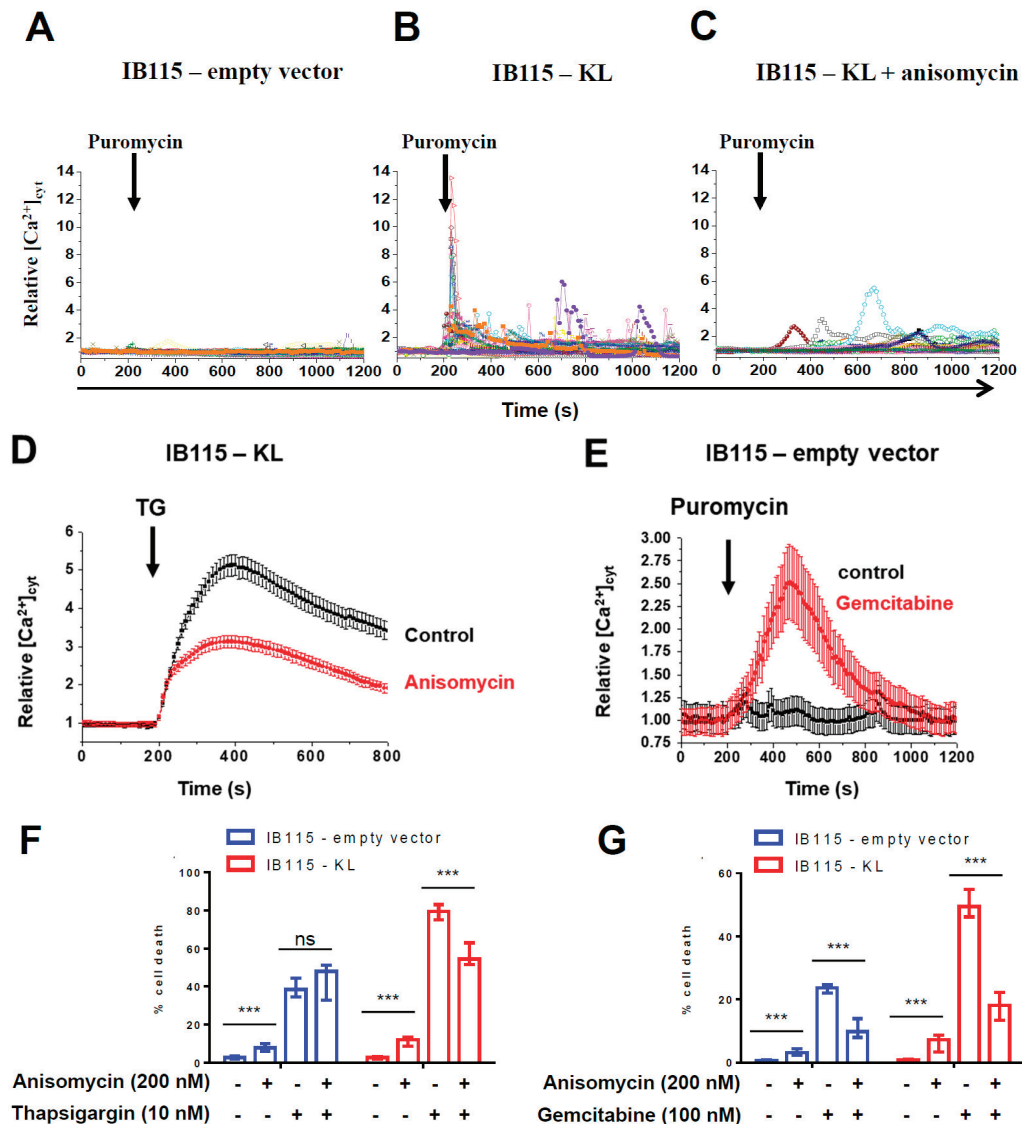


**Figure 5.** The intracellular localization of TRPC6 contributes to reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage in KL-overexpressing DDLPS cells, but is not necessary to increase cell death. (A–F) Variations of relative cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration were monitored by fluorescence videomicroscopy in Fluo2-loaded cells. Each experiment was repeated three times and the average of more than 20 single-cell traces was analyzed. The effect of OAG (50  $\mu\text{M}$ ) addition was evaluated in (A) IB115-empty vector or (B) IB115-KL cells bathed in HBSS medium  $\pm$  2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , and in (C) IB115-KL cells pretreated with TG (10 nM) at 200 s in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free HBSS medium. (D) IB115 empty-vector and IB115-KL cells were bathed in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free HBSS medium and stimulated at 200 s by the specific activator of TRPC6 Hyp9 (1  $\mu\text{M}$ ). (E) OAG (50  $\mu\text{M}$ ) was added at 200 s to  $\text{Ca}^{2+}$ -free HBSS medium on IB115-KL cells control or pretreated with inhibitors of TRPC6 (U73343 and larixyl acetate both at 1  $\mu\text{M}$ , 1 h). (F)  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage was estimated by the application of 10 nM TG at 200 s on IB115-empty vector or IB115-KL cells, which were pretreated or not with larixyl acetate (1  $\mu\text{M}$ , 1 h), in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free HBSS medium. (G) The abundance of TRPC6 was analyzed in IB115-empty vector and IB115-KL cells by western blotting after 48 h of incubation with no drugs, 10 nM TG, or 100 nM gemcitabine. Actin was used as a loading control. To compare TRPC6 abundance between conditions, results were all normalized to control conditions (IB115-empty vector, no treatment). Results shown are representative of three independent experiments. (H,I) Cell death was measured with a TMRM-staining analyzed by flow cytometry after 72 h incubation of IB115 cell lines, which were pretreated during 1 h with indicated concentrations of larixyl acetate and then treated with (H) 20 nM and 10 nM TG for the IB115-empty vector and IB115-KL cells, respectively (in order to have nearly similar cell death rates), or (I) 100 nM gemcitabine. Histograms sum up (H) four and (I) two independent experiments. Data shown correspond to medians (IQR).

## 2.6. In DDLPS Cells, Klotho Promotes Reticular $\text{Ca}^{2+}$ Leakage and Apoptosis by Opening the Translocon

According to the literature, the major effector of the reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -leak is the translocon (TLC) [47], a protein complex that allows for the translocation of nascent polypeptides into the ER lumen for elongation and maturation. When the polypeptidic chain is released,  $\text{Ca}^{2+}$  leaks through the pore of the TLC, which is, at that time, in an open state for  $\text{Ca}^{2+}$ . Puromycin and anisomycin are antibiotics that inhibit protein synthesis but, respectively, open and close the TLC [47].

Interestingly, puromycin had no effect in IB115-empty vector cells (Figure 6A), whereas it elicited a huge transient increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  followed by  $\text{Ca}^{2+}$ -oscillations in IB115-KL cells (Figure 6B). These were drastically reduced by anisomycin pretreatment (Figure 6C). TLC closure by anisomycin significantly reduced the TG-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release (Figure 6D), thereby confirming that TLC is implicated in the basal reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage.



**Figure 6.** In DDLPS cells, Klotho promotes reticular Ca<sup>2+</sup>-leakage and apoptosis by opening the translocon. (A–E) Variations of relative cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration were monitored by fluorescence videomicroscopy in Fluo2-loaded cells. Data shown are representative of three independent experiments. (A–C) In a Ca<sup>2+</sup>-free HBSS medium, puromycin (25 μg/mL) was applied at 200 s on (A) IB115-empty vector cells, (B) IB115-KL cells, and on (C) IB115-KL cells pretreated 30 min with 200 nM anisomycin, a translocon-closing molecule. Each trace corresponds to the evolution of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> in one cell. (D) In a Ca<sup>2+</sup>-free HBSS medium, IB115-KL cells, pretreated (*n* = 114) or not (*n* = 76) with 200 nM anisomycin during 30 min, were stimulated at 200 s with TG (10 nM) to evaluate reticular Ca<sup>2+</sup>-leakage. Results are represented as means ± SD. (E) In a Ca<sup>2+</sup>-free HBSS medium, IB115-empty vector cells, pretreated (*n* = 78) or not (*n* = 81) with 100 nM gemcitabine during 24 h, were stimulated at 200 s with puromycin (25 μg/mL) to assess Ca<sup>2+</sup>-leakage through the translocon. Results are represented as means ± SD. (F,G) Cell death was measured by TMRM-staining and flow cytometry in IB115 cell lines pretreated for 1 h with 200 nM anisomycin and then incubated for 72 h with (F) 10 nM TG or (G) 100 nM gemcitabine. Histograms sum up (F) three and (G) four independent experiments. Data shown correspond to medians and IQR.

In addition, puromycin triggered a cytosolic Ca<sup>2+</sup>-response in IB115-empty vector cells pretreated with gemcitabine (Figure 6E). This demonstrates that the gemcitabine-induced Ca<sup>2+</sup>-leakage is mediated at least in part by opening the TLC.

Anisomycin significantly reduced the death rates of IB115-KL cells after 72 h incubation with TG (Figure 6F) or gemcitabine (Figure 6G). The protective effect towards gemcitabine in both cell lines was not due to protein synthesis inhibition because puromycin did the opposite and was counteracted by anisomycin on the wild-type IB115 cell line (Supplemental Figure S9A). Moreover, the long-term treatment with anisomycin did not affect *KL*-overexpression (Supplemental Figure S9B). Furthermore, anisomycin reduced BiP expression in resting conditions and during gemcitabine treatment, but not the other reticular chaperone protein calreticulin (Supplemental Figure S9B). To conclude, anisomycin reduces ER stress by limiting the TLC-mediated  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage, which is induced by gemcitabine and enhanced by Klotho.

Altogether, these results demonstrate that in *KL*-overexpressing cells, a higher proportion of TLCs is in an open-state. This contributes to the basal reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage revealed by TG treatment and aggravates the gemcitabine-induced TLC opening. This results in reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -depletion in IB115-KL cells after 48 h of treatment (Supplemental Figure S9C), in contrast to control cells (Figure 4D,E), and in increased apoptosis.

All major results concerning the effect of Klotho on TLC opening and reticular stress were confirmed in two other DDLPS cell lines (IB111 and IB143) (Supplemental Figure S10). Indeed, *KL* overexpression increases BiP expression (Supplemental Figure S10A),  $\text{Ca}^{2+}$ -response to puromycin (Supplemental Figure S10B) and to TG (Supplemental Figure S10C), and also cell death rates following long-term treatment with TG (Supplemental Figure S10D) or gemcitabine (Supplemental Figure S10E). To conclude, despite different genetic backgrounds and an intrinsic greater resistance to ER stress in IB111 and IB143 compared to IB115, Klotho increases TLC-opening and reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage in both cell lines and significantly sensitizes them to cell death induced by TG or gemcitabine. Lower expression of *KL* in transduced IB111 and IB143 cells compared to IB115-KL cell line is one possible explanation for the more discrete effects on the phenotypes (Supplemental Figure S10A).

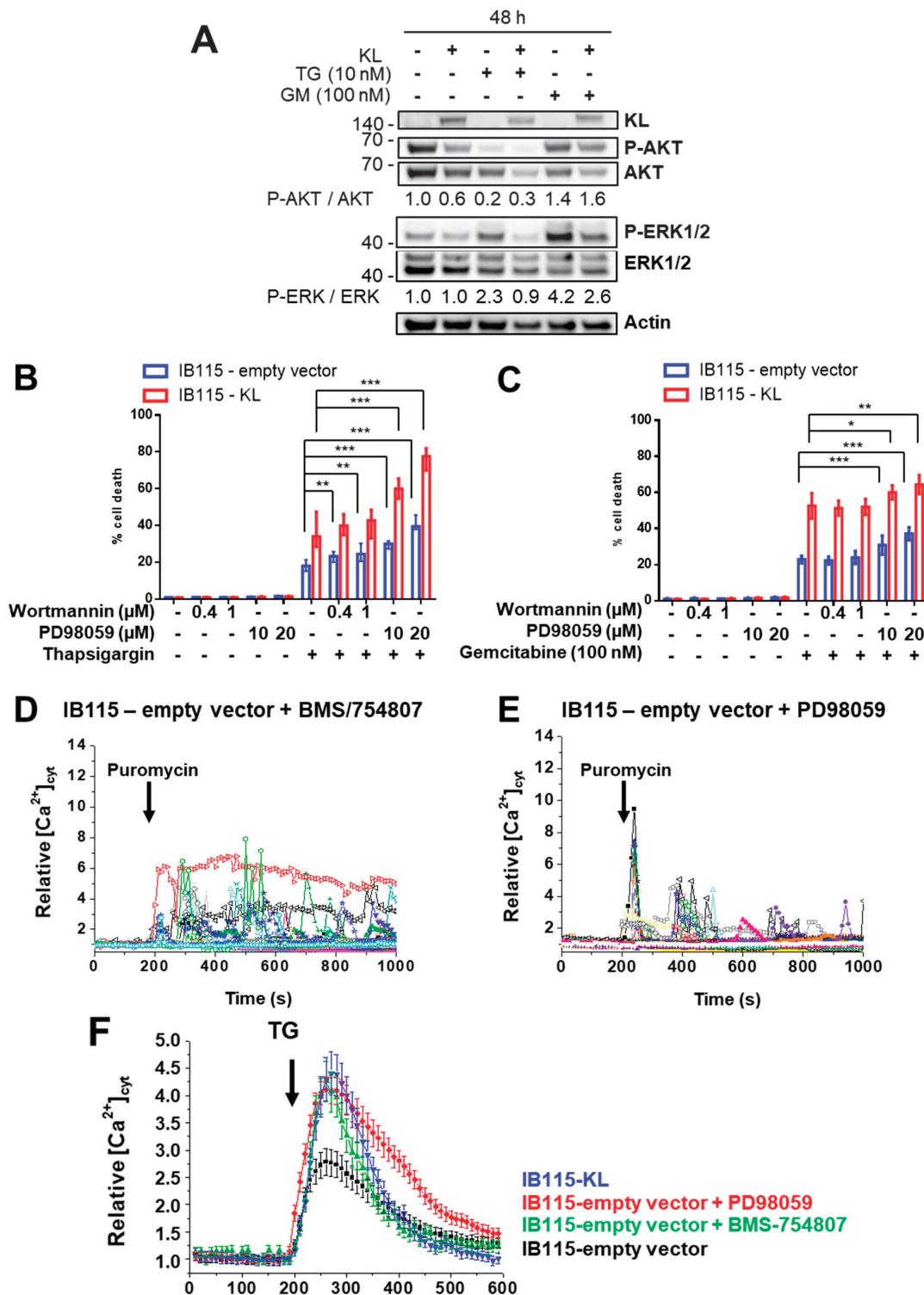
Then, we investigated which IGF-1 signaling pathway is implicated in the resistance to ER stressors and is inhibited by Klotho and addressed its impact on reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage.

### 2.7. Klotho Regulates Drug Sensitivity and Reticular $\text{Ca}^{2+}$ -Leakage by Inhibiting ERK1/2 Signaling

Two pathways of the IGF-1R signaling, *ras/raf/MEK/ERK* and *PI3K/AKT*, are known to play a role in the resistance to gemcitabine [48,49] and ER stress [50–52]. Since Klotho inhibits the IGF-1-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -response (mainly dependent on PI3K, see Supplemental Figure S1A) and ERK1/2 activation, we have studied the phosphorylation status of AKT and ERK1/2 after the TG and gemcitabine treatments (Figure 7A). AKT was de-phosphorylated after incubation with TG and only slightly phosphorylated after gemcitabine treatment. In contrast, ERK1/2 is phosphorylated in control cells after each treatment, but this activation is inhibited in *KL*-overexpressing cells. Thus, suggesting that ERK1/2 is implicated in resistance to TG and gemcitabine but not AKT.

This was confirmed with the use of PI3K (Wortmannin) and MEK (PD98059) inhibitors (Supplemental Figure S11). The Wortmannin pretreatment had only a slight effect on TG-induced cell death of IB115-empty vector cells (Figure 7B), but not of IB115-KL cells, and had no significant effect on apoptosis induced by gemcitabine (Figure 7C) in both cell lines. By contrast, PD98059 significantly potentiated the apoptotic response to TG and gemcitabine (Figure 7B,C) in both cell lines. These results altogether demonstrate that ERK1/2 but not AKT exerts a relevant pro-survival activity against ER stressors and is inhibited by Klotho in this DDLPS cell line.

Finally, we addressed the consequence of IGF-1R and MEK inhibition on reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage. First, the pretreatment of control cells with BMS-754807 (Figure 7D) or PD98059 (Figure 7E) restored the reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage induced by puromycin and observed in IB115-KL cells. Then, both inhibitors mimicked the effect of Klotho on TG-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -response (Figure 7F) without affecting the ER  $\text{Ca}^{2+}$ -content (Supplemental Figure S12). Therefore, IGF-1R and, more precisely, the ERK inhibition is at least one mechanism by which Klotho promotes reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage through the TLC and so, sensitizes these DDLPS cells to ER stressors releasing  $\text{Ca}^{2+}$  from reticular stores (such as TG, gemcitabine, and ABT-737).



**Figure 7.** Klotho regulates drug sensitivity and reticular  $Ca^{2+}$ -leakage by inhibiting ERK1/2 signaling (A) Analysis by Western blotting of the abundance of phosphorylated AKT and ERK1/2 compared to total protein expression, in IB115-empty vector and IB115-KL cells after 48 h of incubation with no drugs, 10 nM thapsigargin (TG) or 100 nM gemcitabine. Actin was used as a loading control. To compare the ratios between phosphorylated form and total protein during treatments, results were all normalized to the control condition (IB115-empty vector, no treatment) set to 1. Results are representative of three independent experiments. (B,C) Cell death was measured by TMRM-staining and flow cytometry. IB115 cell lines were pretreated for 2 h with Wortmannin or PD98059 as indicated



and then incubated for 72 h with (B) 20 nM or 10 nM TG for IB115-empty vector and IB115-KL cells, respectively (in order to have an almost similar cell death), or (C) 100 nM gemcitabine. Histograms sum up (B) four (with median and IQR) and (C) three (represented as means  $\pm$  SD) independent experiments. (D–F) Variations of relative cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration were monitored by fluorescence videomicroscopy, in Fluo2-loaded cells bathed in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free HBSS medium. (D,E) Puromycin (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was added at 200 s to IB115-empty vector cells pretreated with (D) BMS-754807 (50 nM, 24 h) or (E) PD98059 (1  $\mu\text{M}$ , 2 h). Each trace corresponds to the evolution of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  in one cell. Data shown are representative of three independent experiments. (F) TG (10 nM) was added at 200 s to IB115-KL cells ( $n = 83$ ) and IB115-empty vector cells, which were not pretreated ( $n = 77$ ) or pretreated with BMS-754807 (50 nM, 24 h,  $n = 78$ ) or PD98059 (1  $\mu\text{M}$ , 2 h,  $n = 75$ ). Results correspond to means  $\pm$  SD.

### 3. Discussion

In this work, we evaluated the relevance of Klotho as a biomarker and as a tool for overcoming drug resistance in high-grade LPS.

We reported that a higher *KL* expression is associated with better survival of LPS patients. Moreover, its expression is detected at higher levels in WDLPS, which has a good prognosis. *KL* expression is critical for adipose tissue homeostasis but is altered in DDLPS, probably by epigenetic regulations as in several other cancers [53,54]. If in the future the normal tissue of each patient were to be systematically sampled during tumor excision, it would be interesting to confirm these clinical results at the protein level by comparing *KL* abundance in DDLPS tumors with matched-adipose tissue. Meanwhile, considering our observations at the transcriptomic level, *KL* downregulation may represent a selective advantage for tumor cells and so, may be associated with tumor evolution as for DDLPS.

In compliance with this observation, we did not detect, by western blotting, endogenous *KL* expression in any of the six DDLPS cell lines, isolated from the patients' tumors, available in the lab. Moreover, for most of these cell lines, *KL* overexpression was rapidly eliminated by the transduced cells despite effective lentiviral transduction and cell selection.

To assess the cellular role of Klotho in DDLPS, we successfully established a DDLPS cell line stably overexpressing *KL*. Its inhibitory action on IGF-1-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling was shown through TRPC6 sequestration at the ER and on ERK1/2 activation. Analysis of tumor phenotypes indicated that Klotho reduces cell proliferation, clonogenicity, and has a major effect on drug sensitivity and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis.

Because  $\text{Ca}^{2+}$  signaling is involved in several hallmarks of cancer,  $\text{Ca}^{2+}$  remodeling in cancer cells is a research field of growing interest [55]. Here, we have demonstrated for the first time, in three DDLPS cell lines, that Klotho increases reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage by opening the TLC. This effect on the TLC is supported by the compensatory upregulation of BiP in *KL*-overexpressing cells because BiP interacts with the TLC complex and by this way limits  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage through the pore [56]. However, to the best of our knowledge, the link between the permeability of the TLC to  $\text{Ca}^{2+}$  and IGF-1R or ERK1/2 activity is unknown. This new and unexpected mechanism will require further investigation.

The constitutive  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage confers to the DDLPS cells overexpressing *KL* a greater susceptibility to apoptosis mediated by ER-stressors such as thapsigargin (TG), ABT-737, and gemcitabine, whose effect on TLC openings had never been described until now. This sensitization by Klotho is also related to a greater induction of CHOP, which promotes the transcription of pro-apoptotic genes and aggravates the reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -leakage [57]. In addition, an increased  $\text{Ca}^{2+}$ -transfer from the ER to mitochondria might stimulate ATP production in resting conditions and promote ER refilling by SERCA pumps, but probably also results in mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -overload and mitochondrial membrane potential loss during the exposure to these ER stressors.

These results are in conflict with previous work showing that Klotho protects from ER stress [58]. However, *KL*-overexpressing DDLPS cells share interesting similarities with *dwarf* fibroblasts during TG treatment, like increased apoptosis, reduced XBP-1 splicing, and preserved activation of eIF2 $\alpha$  [41].

These fibroblasts were isolated from *Snell dwarf* mice, a longevity model that bears a homozygous mutation in the gene encoding Pit-1, resulting in several deficiencies in growth hormones including IGF-1. Indeed, insulin/IGF-1 signaling inhibition is a mechanism shared by many animal longevity models including *KL*-overexpressing mice [19,59]. Moreover, IGF-1 signaling was reported as a cytoprotective pathway against canonical ER stress [35,60], but also against gemcitabine [34] and ABT-737 [61]. All these observations are consistent with our results showing a potentiated apoptotic response to ER stressors mediated by the inhibition of IGF-1-dependent signaling in *KL*-overexpressing DDLPS cells. Therefore, the role of Klotho on ER stress might depend on a cellular context. Discrepancies between results might also arise from the fact that Banerjee et al. overexpressed mouse KL [58], which is not identical to human KL and could differ in terms of interactions with human proteins.

The inhibition of IGF1-R and MEK mimicked the effect of Klotho on  $Ca^{2+}$  homeostasis and sensitized to TG- and gemcitabine-induced cell death. Actually, there are numerous crosstalks between MAPK signaling and ER stress [62]. The MEK-ERK pathway was shown to promote cell survival during ER stress. ER stress signaling can also directly activate ERK1/2. Indeed, IRE-1 activation can stimulate ERK1/2 through an unknown mechanism. Reduced XBP-1 splicing in *KL*-overexpressing cells, which suggests a reduced IRE-1 activation, can be involved in attenuated ERK1/2 activation and so, in increased cell death. In addition, BiP can be translocated to the plasma membrane and activate the signaling cascade Ras-Raf-MEK-ERK. So, given that ERK1/2 is less activated in *KL*-overexpressing cells despite enhanced ER stress, Klotho may probably act through additional pathways in parallel to IGF-1R in order to avoid the hyperactivation of MAPK signaling. Considering that  $Ca^{2+}$  and the reactive oxygen species can modulate ERK1/2 activity and that Klotho regulates both, this provides new possibilities for investigation. Moreover, Klotho is a regulator of pathways that are commonly altered in cancer and activate MAPK, such as Wnt and FGF [25]. Its use in the therapeutic management of DDLPS is thus probably not restricted to IGF-1R inhibition.

Regarding reticular TRPC6, its activity as a passive leaky channel had already been reported but, until now, the only regulator identified for that mechanism was the Stromal Interacting Molecule 1 (STIM1) [42]. Here, we observed that the IGF-1-induced  $Ca^{2+}$  response requires TRPC6 and that MEK inhibition promotes the sequestration of active TRPC6 channels at the ER. So, the effects of Klotho on IGF-1-induced  $Ca^{2+}$  signaling and reticular  $Ca^{2+}$ -leak through TRPC6 could be related to the regulation of STIM-1 by ERK1/2 [63]. Nevertheless, additional experiments are needed to test this hypothesis and physiological consequences remain to be studied.

For the first time, we bring evidence of a role for Klotho in LPS. If our results were confirmed in vivo, combining Klotho's mechanism of action and ER stressors might be an alternative for DDLPS patient care. Indeed, LPS frequently overexpress SERCA2 and calreticulin [39,64] and, consequently, are sensitive to ER stressors [39]. By enhancing  $Ca^{2+}$ -leakage-mediated ER stress, Klotho could increase the calreticulin exposure at the surface of tumor cells and so, facilitate immunogenic cell death. Considering the emerging improvements in immunotherapy, this question will certainly be addressed in the future.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Chemicals

Doxorubicin (Adriamycin; Pfizer, New York, NY, USA) and gemcitabine (Gemzar; Eli Lilly and Company, Neuilly-sur-Seine, France) were obtained from the pharmacy of the Bergonié Institute (Bordeaux, France). Docetaxel (Taxotere; Sanofi-Aventis, Gentilly, France) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). ABT-737 was purchased from Selleckchem (Munich, Germany).

About the other chemicals—thapsigargin, puromycin, anisomycin, ionomycin, Hyp9, OAG, U73343, and Wortmannin—were from Sigma-Aldrich. BMS-754807 and PD98059 were purchased from



Selleckchem. Larixyl acetate was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Pyr3 was from Calbiochem (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Human IGF1 was from Miltenyi Biotec (Paris, France). QVD-Oph was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

#### 4.2. Cell Lines

The dedifferentiated liposarcoma cell lines IB111, IB115, and IB143 were a generous gift from F. Chibon (INSERM U1218, Bergonié Cancer Institute, Bordeaux) and were established and authenticated as previously described [65]. DDLPS and HEK-293T cell lines were respectively cultured in RPMI-1640/GlutaMAX-I and DMEM/GlutaMAX-I media (Life Technologies Inc., brand of ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (FBS). Cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cultures were periodically tested for mycoplasma contamination.

IB111, IB115, and IB143 cells were infected with a lentiviral vector encoding human transmembrane KL (EX-Z9677-Lv105, GeneCopoeia, Rockville, MD, USA). Control cell lines were established with lentiviral transduction of an empty vector (pReceiver-Lv105, GeneCopoeia, Rockville, MD, USA). VSV-G-pseudotyped lentiviral particles were produced by co-transfection of HEK293T cells with previous vectors and the compatible packaging plasmids psPAX2 and pVSVg. Cell lines were incubated overnight with lentiviral supernatants and 8 µg/mL of polybrene (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Stably transduced cells were selected with puromycin (1 µg/mL, Sigma). Then, puromycin was removed from the culture medium. KL overexpression was regularly verified over passages by Western blotting.

#### 4.3. Western Blot

For IGF-1 stimulation, the cells were harvested overnight before IGF-1 addition into an FBS-free culture medium. For protein extraction, cells were rinsed with ice-cold PBS and lysed for 30 min at 4 °C in RIPA lysis and extraction buffer (Sigma) supplemented with a protease/phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), 5 mM sodium orthovanadate (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 1 mM EGTA, and 10 mM sodium fluoride (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Lysates were pelleted 10 min at 17,000× *g*, 4 °C and supernatants were collected for protein quantitation (DC protein assay kit, Biorad, Hercules, CA, USA). After denaturation, 25 µg total proteins of each sample were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (iBlot2, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) for immunoblotting with the appropriate primary antibody at 4 °C overnight. Anti-KL antibodies were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France) (#SAB2104815 and #SAB2105026) and ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) (PA5-21078). Antibodies for detection of P-IGF1Rβ (Tyr1131) (#3021), p-AKT (Ser473) (#4060), AKT (#4685), p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (#9101), ERK1/2 (#9101), BiP (#3177), p-eIF2α (Ser51) (#3597), XBP-1s (#12782), c-PARP (Asp214) (#5625), SERCA2 (#4388) and calreticulin (#12238) were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Antibodies for IGF-1Rβ (#sc-713), eIF2α (#sc-11386), and CHOP (#sc-793) were from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Anti-TRPC6 (#ACC-120) was provided by Alomone Labs (Jerusalem, Israel). Anti-actin (#A2066) was from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). After washing, blots were incubated for 1 h with a horseradish peroxidase-linked anti-rabbit antibody (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) and processed for a chemiluminescent substrate (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The signal was detected using Fusion Fx7 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) imaging system. Actin was used as a loading control and the quantification of protein abundance was performed by blot densitometry using the ImageJ 1.48v software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

#### 4.4. Cell Proliferation

A total of 2500 cells were plated into 24-well plates in four replicates. Culture medium was changed at days 0-3-5 (0.5 mL per well). After trypsinization, the cell number was evaluated by flow cytometry (FACS Calibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) based on their morphological features (FSC/SSC). Data acquisition and analysis were performed with the BD PlateManager and BD CellQuestPro software.

#### 4.5. Clonogenic Assay

Totals of 100, 500, and 1000 cells were plated onto 6-well plates. Fresh culture medium was added every 2 to 3 days. After 10 days, cells were washed with PBS, fixed with 70% ethanol, washed again and then stained with a 1% Crystal Violet solution (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). After several rinses with water and drying, the plates were scanned.

#### 4.6. MTT Assay

A total of 5000 cells were seeded into 96-well plates in six replicates. The day after, the culture medium was replaced by a doxorubicin-containing medium (0.2 mL per well). After 72 h, 20  $\mu$ L of 5 mg/mL MTT substrate (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) solution were added to each well. Plates were incubated 2 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Then, the medium was discarded and formazan was dissolved in DMSO. Absorbance of each well was measured with the microplate reader FlexStation 3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) and calculated ( $A_{570\text{nm}} - A_{630\text{nm}}$ ). For each condition, the viability was calculated as a percent of control. Dose-response curves were interpolated with Prism6 v6.01 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA) software as standard slopes.

#### 4.7. Mitochondrial Potential Loss Assay (Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, TMRM)

A total of 5000 cells were seeded into 96-well plates in at least three replicates. The day after, the culture medium was replaced by drug-containing medium (0.2 mL per well). After 72 h of incubation, 200 nM TMRM dye (Fluka, brand of ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 20  $\mu$ M verapamil (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) were added into medium. Plates were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 30 min. Then, supernatants were collected, cells were trypsinized and resuspended in their respective supernatants. TMRM-staining was analyzed by flow cytometry (FACS Calibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data acquisition and analysis were performed with the BD PlateManager and BD CellQuestPro software. Cell population was determined on a FSC/SSC dot plot. Then, the region corresponding to cells that lost their mitochondrial electric potential (TMRM-negative cells) was selected on a SSC/FL2 dot plot diagram. The number of TMRM-negative cells is shown as a percentage of the analyzed cell population. Dose-response curves were interpolated with Prism6 v6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) software as standard slopes.

#### 4.8. Cytosolic Calcium Imaging

For calcium imaging, 100,000 cells were seeded onto glass coverslips (25 mm dia.) and incubated in a complete culture medium for 48 h. Single-cell cytosolic calcium imaging was performed, using Fluo2 LR-AM calcium dye as previously described [66]. Fluorescence intensity changes were normalized to the initial fluorescence value  $F_0$  and expressed as  $F/F_0$  (relative  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ ). One field was acquired from each coverslip and the data were pooled from six independent coverslips on three different days. Data were processed using OriginPro 7.5 software (Origin Lab, Northampton, MA, USA). On graphs, data were summarized as the mean  $\pm$  standard deviation (SD).

#### 4.9. Statistical Analysis

The cohort of 140 primary liposarcomas is from Gobble et al. [67] (GSE30929). Data about patient survival, histotypes and *KL* expression values (estimated with robust multi-array average (RMA)) were obtained with the web tool GEO2R. Patients were divided into groups according to the *KL* expression value (“high” or “low”, cut-off = mean). Survival rates were estimated using the Kaplan–Meier method and compared using the log-rank test using XL-STAT v2018.1 (Addinsoft, Paris, France) software.

Each experiment was repeated at least three times. To examine the statistical significance of the results, analyses were performed with the Prism6 v6.01 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA) software. The normal distribution of datasets was examined with a Shapiro–Wilk normality test. If the data passed the normality test, the statistical significance between the two conditions was assessed with an unpaired *t*-test and the results were represented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Otherwise, a Mann–Whitney test was used and the median with interquartile range (IQR) was plotted. For western blot experiments, paired tests were used. Significant differences are represented as \* if *p*-value  $p < 0.05$ , \*\* if  $p < 0.01$  and \*\*\* if  $p < 0.001$ .

#### 5. Conclusions

In this study, we evidence that *Klotho* is downregulated in DDLPS tumors and that its re-expression in DDLPS cell lines enhances the apoptotic response to ER stressors. Its mechanism of action mainly relies on the opening of the TLC, which mediates reticular  $Ca^{2+}$  leak and is induced by at least the attenuation of the IGF-1/ERK signaling pathway. Further experiments should be performed in order to identify the molecular players modulating TLC opening and regulated by ERK and *Klotho*. This would provide new therapeutic targets for overcoming drug resistance of DDLPS.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/10/11/439/s1>, Figure S1: Pharmacological inhibition of IGF-1 signaling in IB115 cells, Figure S2: *Klotho* has no effect on cell cycle alterations induced by gemcitabine treatment, Figure S3: Impact of *KL* expression on caspase-dependent cell death induced by gemcitabine at 100 nM during 72 h, Figure S4: Distribution of ATP2A1-3 genes expressions represented by probe intensities, Figure S5: Reticular  $Ca^{2+}$  concentration [ $Ca^{2+}$ ]ER was assessed with the genetic biosensor ErGAP1, Figure S6: *Klotho* increases mitochondrial  $Ca^{2+}$  content and TG-induced mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake, Figure S7: Capacitive  $Ca^{2+}$  entry has no significant impact on gemcitabine-induced cell death, Figure S8: Impact of TRPC3,6 channels inhibition on the response to OAG in IB115-KL cells, Figure S9: Anisomycin reduces ER stress whereas gemcitabine depletes the reticular  $Ca^{2+}$  stores of IB115-KL cells, Figure S10: Sensitization to ER stressors by TLC opening was confirmed in two other DDLPS cell lines overexpressing *KL*, Figure S11. Western blot analysis of AKT and ERK1/2 phosphorylation status in IB115-empty vector cells after 24 h incubation with no drug, BMS-754807 (50 nM), Wortmannin (1  $\mu$ M) or PD98059 (20  $\mu$ M), Figure S12. Pretreatments with BMS-754807 or PD98059 does not affect reticular  $Ca^{2+}$  content.

**Author Contributions:** P.V. and V.D. conceived the project, designed and conducted the experiments, analyzed data and wrote the paper. P.V. supervised the project. O.M., N.T., A.M. and T.D. conducted and analyzed the experiments, F.C. provided cell lines, S.D. and F.V.C. designed experiments and analyzed data. T.L. performed bioinformatic analyses. O.M., T.D., N.T., F.C., S.D. and F.V.C. revised the manuscript.

**Funding:** This work was supported by INCa PLBIO, and Ligue Contre le Cancer (Comité des Pyrénées Atlantiques).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

#### References

1. Jo, V.Y.; Fletcher, C.D.M. WHO classification of soft tissue tumours: An update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology (Phila)* **2014**, *46*, 95–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Abbas Manji, G.; Singer, S.; Koff, A.; Schwartz, G.K. Application of Molecular Biology to Individualize Therapy for Patients with Liposarcoma. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2015**, *35*, 213–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Dalal, K.M.; Kattan, M.W.; Antonescu, C.R.; Brennan, M.F.; Singer, S. Subtype specific prognostic nomogram for patients with primary liposarcoma of the retroperitoneum, extremity, or trunk. *Ann. Surg.* **2006**, *244*, 381–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Henricks, W.H.; Chu, Y.C.; Goldblum, J.R.; Weiss, S.W. Dedifferentiated liposarcoma: A clinicopathological analysis of 155 cases with a proposal for an expanded definition of dedifferentiation. *Am. J. Surg. Pathol.* **1997**, *21*, 271–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Tirumani, S.H.; Tirumani, H.; Jagannathan, J.P.; Shinagare, A.B.; Hornick, J.L.; Ramaiya, N.H.; Wagner, A.J. Metastasis in dedifferentiated liposarcoma: Predictors and outcome in 148 patients. *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO* **2015**, *41*, 899–904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Jones, R.L.; Fisher, C.; Al-Muderis, O.; Judson, I.R. Differential sensitivity of liposarcoma subtypes to chemotherapy. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 2853–2860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Lin, F.; Shen, Z.; Xu, X.; Hu, B.-B.; Meerani, S.; Tang, L.-N.; Zheng, S.-E.; Sun, Y.-J.; Min, D.-L.; Yao, Y. Evaluation of the Expression and Role of IGF Pathway Biomarkers in Human Sarcomas. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2013**, *26*, 169–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Liang, J.; Li, B.; Yuan, L.; Ye, Z. Prognostic value of IGF-1R expression in bone and soft tissue sarcomas: A meta-analysis. *OncoTargets Ther.* **2015**, *8*, 1949–1955.
9. Conti, A.; Espina, V.; Chiechi, A.; Magagnoli, G.; Novello, C.; Pazzaglia, L.; Quattrini, I.; Picci, P.; Liotta, L.A.; Benassi, M.S. Mapping protein signal pathway interaction in sarcoma bone metastasis: Linkage between rank, metalloproteinases turnover and growth factor signaling pathways. *Clin. Exp. Metastasis* **2014**, *31*, 15–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Tomita, Y.; Morooka, T.; Hoshida, Y.; Zhang, B.; Qiu, Y.; Nakamichi, I.; Hamada, K.; Ueda, T.; Naka, N.; Kudawara, I.; et al. Prognostic Significance of Activated AKT Expression in Soft-Tissue Sarcoma. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 3070–3077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Tricoli, J.V.; Rall, L.B.; Karakousis, C.P.; Herrera, L.; Petrelli, N.J.; Bell, G.I.; Shows, T.B. Enhanced Levels of Insulin-like Growth Factor Messenger RNA in Human Colon Carcinomas and Liposarcomas. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6169–6173. [[PubMed](#)]
12. Peng, T.; Zhang, P.; Liu, J.; Nguyen, T.; Bolshakov, S.; Belousov, R.; Young, E.D.; Wang, X.; Brewer, K.; Terrada, L.L.; et al. An experimental model for the study of well differentiated and dedifferentiated liposarcoma; deregulation of targetable tyrosine kinase receptors. *Lab. Investig.* **2011**, *91*, 392–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Boucher, J.; Softic, S.; Ouaamari, A.E.; Krumpoch, M.T.; Kleinriders, A.; Kulkarni, R.N.; O'Neill, B.T.; Kahn, C.R. Differential Roles of Insulin and IGF-1 Receptors in Adipose Tissue Development and Function. *Diabetes* **2016**, *65*, 2201–2213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kasprzak, A.; Kwasniewski, W.; Adamek, A.; Gozdzicka-Jozefiak, A. Insulin-like growth factor (IGF) axis in cancerogenesis. *Mutat. Res.* **2017**, *772*, 78–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Miller, M.L.; Molinelli, E.J.; Nair, J.S.; Sheikh, T.; Samy, R.; Jing, X.; He, Q.; Korkut, A.; Crago, A.M.; Singer, S.; et al. Drug synergy screen and network modeling in dedifferentiated liposarcoma identifies CDK4 and IGF1R as synergistic drug targets. *Sci. Signal.* **2013**, *6*, ra85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Janssen, J.A.; Varewijck, A.J. IGF-1R Targeted Therapy: Past, Present and Future. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2014**, *5*, 224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Pappo, A.S.; Vassal, G.; Crowley, J.J.; Bolejack, V.; Hogendoorn, P.C.W.; Chugh, R.; Ladanyi, M.; Grippo, J.F.; Dall, G.; Staddon, A.P.; et al. A phase 2 trial of R1507, a monoclonal antibody to the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R), in patients with recurrent or refractory rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, synovial sarcoma, and other soft tissue sarcomas: Results of a Sarcoma Alliance for Research Through Collaboration study. *Cancer* **2014**, *120*, 2448–2456. [[PubMed](#)]
18. Kuro-o, M.; Matsumura, Y.; Aizawa, H.; Kawaguchi, H.; Suga, T.; Utsugi, T.; Ohyama, Y.; Kurabayashi, M.; Kaname, T.; Kume, E.; et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* **1997**, *390*, 45–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Kurosu, H.; Yamamoto, M.; Clark, J.D.; Pastor, J.V.; Nandi, A.; Gurnani, P.; McGuinness, O.P.; Chikuda, H.; Yamaguchi, M.; Kawaguchi, H.; et al. Suppression of aging in mice by the hormone *Klotho*. *Science* **2005**, *309*, 1829–1833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Chen, C.-D.; Tung, T.Y.; Liang, J.; Zeldich, E.; Tucker Zhou, T.B.; Turk, B.E.; Abraham, C.R. Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein *klotho*. *Biochemistry (Mosc)* **2014**, *53*, 5579–5587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



21. Matsumura, Y.; Aizawa, H.; Shiraki-Iida, T.; Nagai, R.; Kuro-o, M.; Nabeshima, Y. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *242*, 626–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Hu, M.C.; Kuro-o, M.; Moe, O.W. Renal and extrarenal actions of Klotho. *Semin. Nephrol.* **2013**, *33*, 118–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Fan, J.; Sun, Z. The Antiaging Gene Klotho Regulates Proliferation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells* **2016**, *34*, 1615–1625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Xie, B.; Chen, J.; Liu, B.; Zhan, J. Klotho Acts as a Tumor Suppressor in Cancers. *Pathol. Oncol. Res.* **2013**, *19*, 611–617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Rubinek, T.; Wolf, I. The Role of Alpha-Klotho as a Universal Tumor Suppressor. *Vitam. Horm.* **2016**, *101*, 197–214. [[PubMed](#)]
26. Olauson, H.; Mencke, R.; Hillebrands, J.-L.; Larsson, T.E. Tissue expression and source of circulating  $\alpha$ Klotho. *Bone* **2017**, *100*, 19–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Wolf, I.; Levanon-Cohen, S.; Bose, S.; Ligumsky, H.; Sredni, B.; Kanety, H.; Kuro-o, M.; Karlan, B.; Kaufman, B.; Koeffler, H.P.; et al. Klotho: A tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene* **2008**, *27*, 7094–7105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Takasu, N.; Takasu, M.; Komiya, I.; Nagasawa, Y.; Asawa, T.; Shimizu, Y.; Yamada, T. Insulin-like growth factor I stimulates inositol phosphate accumulation, a rise in cytoplasmic free calcium, and proliferation in cultured porcine thyroid cells. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 18485–18488. [[PubMed](#)]
29. Valdés, J.A.; Flores, S.; Fuentes, E.N.; Osorio-Fuentealba, C.; Jaimovich, E.; Molina, A. IGF-1 induces IP3-dependent calcium signal involved in the regulation of myostatin gene expression mediated by NFAT during myoblast differentiation. *J. Cell. Physiol.* **2013**, *228*, 1452–1463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Dalton, G.; An, S.-W.; Al-Juboori, S.I.; Nischan, N.; Yoon, J.; Dobrinskikh, E.; Hilgemann, D.W.; Xie, J.; Luby-Phelps, K.; Kohler, J.J.; et al. Soluble klotho binds monosialoganglioside to regulate membrane microdomains and growth factor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 752–757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Kim, J.-H.; Xie, J.; Hwang, K.-H.; Wu, Y.-L.; Oliver, N.; Eom, M.; Park, K.-S.; Barrezueta, N.; Kong, I.-D.; Fracasso, R.P.; et al. Klotho May Ameliorate Proteinuria by Targeting TRPC6 Channels in Podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **2017**, *28*, 140–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Xie, J.; Cha, S.-K.; An, S.-W.; Kuro-o, M.; Birnbaumer, L.; Huang, C.-L. Cardioprotection by Klotho through downregulation of TRPC6 channels in the mouse heart. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Cappella, P.; Tomasoni, D.; Faretta, M.; Lupi, M.; Montalenti, F.; Viale, F.; Banzato, F.; D’Incalci, M.; Ubezio, P. Cell cycle effects of gemcitabine. *Int. J. Cancer* **2001**, *93*, 401–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ireland, L.; Santos, A.; Ahmed, M.S.; Rainer, C.; Nielsen, S.R.; Quaranta, V.; Weyer-Czernilofsky, U.; Engle, D.D.; Perez-Mancera, P.A.; Coupland, S.E.; et al. Chemoresistance in Pancreatic Cancer Is Driven by Stroma-Derived Insulin-Like Growth Factors. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 6851–6863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Novosyadlyy, R.; Kurshan, N.; Lann, D.; Vijayakumar, A.; Yakar, S.; LeRoith, D. Insulin-like growth factor-I protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of the adaptive capacity of endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 1304–1317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Chien, W.; Ding, L.-W.; Sun, Q.-Y.; Torres-Fernandez, L.A.; Tan, S.Z.; Xiao, J.; Lim, S.L.; Garg, M.; Lee, K.L.; Kitajima, S.; et al. Selective inhibition of unfolded protein response induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncotarget* **2014**, *5*, 4881–4894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Wang, L.; Zhang, Y.; Wang, W.; Zhu, Y.; Chen, Y.; Tian, B. Gemcitabine treatment induces endoplasmic reticular (ER) stress and subsequently upregulates urokinase plasminogen activator (uPA) to block mitochondrial-dependent apoptosis in Panc-1 cancer stem-like cells (CSCs). *PLoS ONE.* **2017**, *12*, e0184110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Harper, M.T.; Poole, A.W. Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetic ABT-737 depletes platelet calcium stores. *Blood* **2012**, *119*, 4337–4338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Wang, L.; Wang, L.; Song, R.; Shen, Y.; Sun, Y.; Gu, Y.; Shu, Y.; Xu, Q. Targeting Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase 2 by Curcumin Induces ER Stress-Associated Apoptosis for Treating Human Liposarcoma. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 461–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

40. Wang, L.; Li, W.; Yang, Y.; Hu, Y.; Gu, Y.; Shu, Y.; Sun, Y.; Wu, X.; Shen, Y.; Xu, Q. High expression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 2b blocks cell differentiation in human liposarcoma cells. *Life Sci.* **2014**, *99*, 37–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Sadighi Akha, A.A.; Harper, J.M.; Salmon, A.B.; Schroeder, B.A.; Tyra, H.M.; Rutkowski, D.T.; Miller, R.A. Heightened Induction of Proapoptotic Signals in Response to Endoplasmic Reticulum Stress in Primary Fibroblasts from a Mouse Model of Longevity. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 30344–30351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Albarrán, L.; Dionisio, N.; Lopez, E.; Salido, G.M.; Redondo, P.C.; Rosado, J.A. STIM1 regulates TRPC6 heteromultimerization and subcellular location. *Biochem. J.* **2014**, *463*, 373–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hofmann, T.; Obukhov, A.G.; Schaefer, M.; Harteneck, C.; Gudermann, T.; Schultz, G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* **1999**, *397*, 259–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Bréchar, S.; Melchior, C.; Plançon, S.; Schenten, V.; Tschirhart, E.J. Store-operated Ca<sup>2+</sup> channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes. *Cell Calcium* **2008**, *44*, 492–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Jardín, I.; Redondo, P.C.; Salido, G.M.; Rosado, J.A. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances store-operated calcium entry through hTRPC6 channel in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1783*, 84–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Salido, G.M.; Jardín, I.; Rosado, J.A. The TRPC ion channels: Association with Orai1 and STIM1 proteins and participation in capacitative and non-capacitative calcium entry. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2011**, *704*, 413–433. [[PubMed](#)]
47. Van Coppenolle, F.; Vanden Abeele, F.; Slomianny, C.; Flourakis, M.; Hesketh, J.; Dewailly, E.; Prevarskaya, N. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 4135–4142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Fryer, R.A.; Barlett, B.; Galustian, C.; Dagleish, A.G. Mechanisms underlying gemcitabine resistance in pancreatic cancer and sensitisation by the iMiD™ lenalidomide. *Anticancer Res.* **2011**, *31*, 3747–3756. [[PubMed](#)]
49. Yang, X.L.; Lin, F.J.; Guo, Y.J.; Shao, Z.M.; Ou, Z.L. Gemcitabine resistance in breast cancer cells regulated by PI3K/AKT-mediated cellular proliferation exerts negative feedback via the MEK/MAPK and mTOR pathways. *OncoTargets Ther.* **2014**, *7*, 1033–1042.
50. Zhang, L.J.; Chen, S.; Wu, P.; Hu, C.S.; Thorne, R.F.; Luo, C.M.; Hersey, P.; Zhang, X.D. Inhibition of MEK blocks GRP78 up-regulation and enhances apoptosis induced by ER stress in gastric cancer cells. *Cancer Lett.* **2009**, *274*, 40–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Srinivasan, S.; Ohsugi, M.; Liu, Z.; Fatrai, S.; Bernal-Mizrachi, E.; Permutt, M.A. Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis Is Partly Mediated by Reduced Insulin Signaling Through Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and Increased Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  in Mouse Insulinoma Cells. *Diabetes* **2005**, *54*, 968–975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Dai, R.; Chen, R.; Li, H. Cross-talk between PI3K/Akt and MEK/ERK pathways mediates endoplasmic reticulum stress-induced cell cycle progression and cell death in human hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **2009**, *34*, 1749–1757. [[PubMed](#)]
53. Lee, J.; Jeong, D.-J.; Kim, J.; Lee, S.; Park, J.-H.; Chang, B.; Jung, S.-I.; Yi, L.; Han, Y.; Yang, Y.; et al. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Rubinek, T.; Shulman, M.; Israeli, S.; Bose, S.; Avraham, A.; Zundelevich, A.; Evron, E.; Gal-Yam, E.N.; Kaufman, B.; Wolf, I. Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2012**, *133*, 649–657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Dubois, C.; Vanden Abeele, F.; Prevarskaya, N. Targeting apoptosis by the remodelling of calcium-transporting proteins in cancerogenesis. *FEBS J.* **2013**, *280*, 5500–5510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Schäuble, N.; Lang, S.; Jung, M.; Cappel, S.; Schorr, S.; Ulucan, Ö.; Linxweiler, J.; Dudek, J.; Blum, R.; Helms, V.; et al. BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca<sup>2+</sup> leakage from the ER. *EMBO J.* **2012**, *31*, 3282–3296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Li, G.; Mongillo, M.; Chin, K.-T.; Harding, H.; Ron, D.; Marks, A.R.; Tabas, I. Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* **2009**, *186*, 783–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

58. Banerjee, S.; Zhao, Y.; Sarkar, P.S.; Rosenblatt, K.P.; Tilton, R.G.; Choudhary, S. Klotho ameliorates chemically induced endoplasmic reticulum (ER) stress signaling. *Cell. Physiol. Biochem.* **2013**, *31*, 659–672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Murakami, S. Stress resistance in long-lived mouse models. *Exp. Gerontol.* **2006**, *41*, 1014–1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Pfaffenbach, K.T.; Pong, M.; Morgan, T.E.; Wang, H.; Ott, K.; Zhou, B.; Longo, V.D.; Lee, A.S. GRP78/BiP is a novel downstream target of IGF-1 receptor mediated signaling. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 3803–3811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Bieghs, L.; Lub, S.; Fostier, K.; Maes, K.; Van Valckenborgh, E.; Menu, E.; Johnsen, H.E.; Overgaard, M.T.; Larsson, O.; Axelsson, M.; et al. The IGF-1 receptor inhibitor picropodophyllin potentiates the anti-myeloma activity of a BH3-mimetic. *Oncotarget* **2014**, *5*, 11193–11208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Darling, N.J.; Cook, S.J. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 2150–2163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Pozo-Guisado, E.; Casas-Rua, V.; Tomas-Martin, P.; Lopez-Guerrero, A.M.; Alvarez-Barrientos, A.; Martin-Romero, F.J. Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites regulates interaction with the microtubule plus-end binding protein EB1. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 3170–3180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Hisaoka, M.; Matsuyama, A.; Nakamoto, M. Aberrant calreticulin expression is involved in the dedifferentiation of dedifferentiated liposarcoma. *Am. J. Pathol.* **2012**, *180*, 2076–2083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Lagarde, P.; Brulard, C.; Pérot, G.; Mauduit, O.; Delespaul, L.; Neuville, A.; Stoeckle, E.; Le Guellec, S.; Rochaix, P.; Coindre, J.M.; et al. Stable Instability of Sarcoma Cell Lines Genome Despite Intra-Tumoral Heterogeneity: A Genomic and Transcriptomic Study of Sarcoma Cell Lines. *Austin J. Genet. Genomic Res.* **2015**, *2*, 1014.
66. Hammadi, M.; Delcroix, V.; Vacher, A.-M.; Ducret, T.; Vacher, P. CD95-Mediated Calcium Signaling. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1557*, 79–93. [[PubMed](#)]
67. Gobble, R.M.; Qin, L.-X.; Brill, E.R.; Angeles, C.V.; Ugras, S.; O'Connor, R.B.; Moraco, N.H.; Decarolis, P.L.; Antonescu, C.; Singer, S. Expression profiling of liposarcoma yields a multigene predictor of patient outcome and identifies genes that contribute to liposarcomagenesis. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 2697–2705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## Annexe 6

Tableau listant les étudiants encadrés au cours de ma thèse

<b><u>Nom de l'étudiant</u></b>	<b><u>Formation</u></b>	<b><u>Durée du stage</u></b>	<b><u>Evaluation</u></b>
Mallory Ducrozet	M1 biologie intégrative : physiologie	5 semaines	Rapport de stage Présentation orale
Clémentine Collet	M1 RB21	2 semaines	Rapport de stage
Margaux Villevieille	L3 physiologie	2 semaines	Rapport de stage Présentation orale

**Tableau 34.** Liste des étudiants encadrés au cours de ma thèse

*Annexe 7*

Résumé non technique de la demande d'autorisation de projet : DR2018-51v2

## 1. Informations Générales

---

Numéro de version 2

1.1. Référence Dossier 2018112219462174

1.2. Titre du projet Rôle du canal TRPV1 dans la protection des cardiomyocytes vis-à-vis de l'ischémie-reperfusion chez un modèle murin

### 1.3. Durée du projet

---

Nombre d'années 5

Nombre de mois 0

Nombre de jours 0

### 1.4. Date prévue de début de projet

---

Dès que le projet est autorisé Oui

## 2. Résumé non technique

---

L'infarctus du myocarde reste l'une des causes principales de décès chaque année. Notre laboratoire travaille depuis de nombreuses années sur la compréhension des mécanismes visant à limiter la taille de l'infarctus et à explorer de nouvelles pistes thérapeutiques. Pendant l'infarctus, une artère coronaire est obstruée, le cœur est donc privé d'oxygène et de nutriments (phase d'ischémie) ce qui lui est délétère et crée des lésions cellulaires ; mais également lors de la prise en charge clinique du patient quand l'artère du patient est désobstruée (phase de reperfusion), le cœur souffre ce qui entraîne de nouveau des lésions cellulaires. La cardioprotection regroupe l'ensemble des méthodes visant à limiter l'ensemble de ces lésions et donc de protéger le cœur, ces méthodes portent le nom de conditionnement. On parlera de pré-conditionnement s'il s'effectue avant l'ischémie et de post-conditionnement au moment de la reperfusion.

Notre laboratoire a développé un modèle d'ischémie-reperfusion myocardique chez la souris, largement approuvé dans la littérature, permettant d'une part de reproduire au mieux cette pathologie et d'autre part de l'étudier pour développer de nouvelles stratégies de protection. Parmi ces nouvelles stratégies, le maintien de la concentration calcique dans la cellule s'avère être primordial pour diminuer les lésions cellulaires engendrées à la fois au moment de l'ischémie et à la reperfusion de l'organe. Ce projet porte plus précisément sur un canal calcique jouant un rôle dans certaines modulations de concentration calcique des cellules.

Le but de ce projet est de préciser le rôle de ce canal dans l'ischémie-reperfusion myocardique et de tester si la modulation pharmacologique de ce canal est cardioprotectrice. L'étude visera à tester un inhibiteur et/ou un activateur en pré et en post-conditionnement.

La séquence d'ischémie-reperfusion in vivo réalisée implique une chirurgie sous anesthésie générale. Il s'agit du modèle de référence pour l'étude in vivo et préclinique de l'infarctus du myocarde et cet acte chirurgical précis est parfaitement maîtrisé par les chirurgiens du laboratoire et fait l'objet d'une analgésie (générale et locale) et d'un suivi post-opératoire parfaitement adaptés.

L'étude se déroulera ainsi en 2 procédures et portera sur un maximum de 320 animaux sur 5 ans.

Prise en compte des 3R :

Remplacement : Afin de mener à bien ces investigations, nous avons mené en amont des études in vitro sur des modèles cellulaires pour confirmer l'intérêt thérapeutique potentiel du canal TRPV1. Il s'agit à présent de prendre en considération l'organe entier dans son environnement (technique de cardioprotection) pour cette phase pré-clinique. Raffinement : Le modèle étant parfaitement maîtrisé, un ensemble de précautions per et post-opératoire (anesthésiques, analgésiques, soins, environnement, conservation des groupes sociaux) sont mises en place pour prévenir et supprimer toute douleur, souffrance et angoisse pouvant résulter de l'intervention.

Réduction : Outre l'évaluation statistique préalable, le projet comporte deux procédures conditionnelles (la seconde n'a lieu que si la première est concluante) et la première procédure est réalisée en deux étapes : après une première cohorte à effectif réduit, seuls les groupes prometteurs sont complétés.

---

### 3. Informations Administratives et Réglementaires

# **Références bibliographiques**



1. Weinhaus, A. J. & Roberts, K. P. Anatomy of the Human Heart. in *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices* (ed. Iaizzo, P. A.) 51–79 (Humana Press, 2005). doi:10.1007/978-1-59259-835-9\_4.
2. V. Angiology. 4b. The Heart. Gray, Henry. 1918. *Anatomy of the Human Body*.  
<https://www.bartleby.com/107/138.html>.
3. Pinto, A. R. *et al.* Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ. Res.* **118**, 400–409 (2016).
4. Zhou, P. & Pu, W. T. Recounting cardiac cellular composition. *Circ. Res.* **118**, 368–370 (2016).
5. Banerjee, I., Fuseler, J. W., Price, R. L., Borg, T. K. & Baudino, T. A. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H1883-1891 (2007).
6. Bergmann, O. *et al.* Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* **161**, 1566–1575 (2015).
7. Severs, N. J. The cardiac muscle cell. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **22**, 188–199 (2000).
8. Tirziu, D., Giordano, F. J. & Simons, M. Cell Communications in the Heart. *Circulation* **122**, 928–937 (2010).
9. Stenger, R. J. & Spiro, D. Structure of the cardiac muscle cell. *Am. J. Med.* **30**, 653–665 (1961).
10. Ayetey, A. S. & Navaratnam, V. The T-tubule system in the specialized and general myocardium of the rat. *J. Anat.* **127**, 125–140 (1978).
11. Fagone, P. & Jackowski, S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S311-316 (2009).
12. Franzini-Armstrong, C., Protasi, F. & Ramesh, V. Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys. J.* **77**, 1528–1539 (1999).
13. Michalak, M. & Opas, M. Endoplasmic and sarcoplasmic reticulum in the heart. *Trends Cell Biol.* **19**, 253–259 (2009).
14. Bensley, J. G., Matteo, R. D., Harding, R. & Black, M. J. Three-dimensional direct measurement of cardiomyocyte volume, nuclearity, and ploidy in thick histological sections. *Sci. Rep.* **6**, 1–10 (2016).



15. Ordway, G. A. & Garry, D. J. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J. Exp. Biol.* **207**, 3441–3446 (2004).
16. Knowlton, A. A. & Liu, T. T. Mitochondrial Dynamics and Heart Failure. *Compr. Physiol.* **6**, 507–526 (2015).
17. Newby, L. K. *et al.* ACCF 2012 Expert Consensus Document on Practical Clinical Considerations in the Interpretation of Troponin Elevations: A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 2427–2463 (2012).
18. Peacock, W. F. *et al.* Cardiac Troponin and Outcome in Acute Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2117–2126 (2008).
19. Solaro, R. J. & Rarick, H. M. Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ. Res.* **83**, 471–480 (1998).
20. Morré, D. J., Merritt, W. D. & Lembi, C. A. Connections between mitochondria and endoplasmic reticulum in rat liver and onion stem. *Protoplasma* **73**, 43–49 (1971).
21. Vance, J. E. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 595–609 (2014).
22. Franke, W. W. & Kartenbeck, J. Outlet mitochondrial membrane continuous with endoplasmic reticulum. *Protoplasma* **73**, 35–41 (1971).
23. Hong, T. & Shaw, R. M. Cardiac T-Tubule Microanatomy and Function. *Physiol. Rev.* **97**, 227–252 (2016).
24. Bers, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**, 198–205 (2002).
25. Eisner, D. A., Caldwell, J. L., Kistamás, K. & Trafford, A. W. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ. Res.* **121**, 181–195 (2017).
26. Woodcock, E. A. & Matkovich, S. J. Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1746–1751 (2005).
27. Clapham, D. E. Calcium signaling. *Cell* **131**, 1047–1058 (2007).
28. Bagur, R. & Hajnóczky, G. Intracellular Ca<sup>2+</sup> Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol. Cell* **66**, 780–788 (2017).

29. Grabarek, Z. Insights into modulation of calcium signaling by magnesium in calmodulin, troponin C and related EF-hand proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1813**, 913–921 (2011).
30. Malmendal, A., Linse, S., Evenäs, J., Forsén, S. & Drakenberg, T. Battle for the EF-hands: magnesium-calcium interference in calmodulin. *Biochemistry* **38**, 11844–11850 (1999).
31. Wu, H.-Y., Tomizawa, K. & Matsui, H. Calpain-calcineurin signaling in the pathogenesis of calcium-dependent disorder. *Acta Med. Okayama* **61**, 123–137 (2007).
32. Li, M. X. & Hwang, P. M. Structure and function of cardiac troponin C (TNNC1): Implications for heart failure, cardiomyopathies, and troponin modulating drugs. *Gene* **571**, 153–166 (2015).
33. Niki, I., Yokokura, H., Sudo, T., Kato, M. & Hidaka, H. Ca<sup>2+</sup> signaling and intracellular Ca<sup>2+</sup> binding proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* **120**, 685–698 (1996).
34. Szatkowski, M. L. *et al.* In vivo acceleration of heart relaxation performance by parvalbumin gene delivery. *J. Clin. Invest.* **107**, 191–198 (2001).
35. Wang, W., Martindale, J. & Metzger, J. M. Parvalbumin: Targeting calcium handling in cardiac diastolic dysfunction. *Gen. Physiol. Biophys.* **28 Spec No Focus**, F3-6 (2009).
36. Coe, H. & Michalak, M. Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Gen. Physiol. Biophys.* **28 Spec No Focus**, F96–F103 (2009).
37. Slupsky, J. R., Ohnishi, M., Carpenter, M. R. & Reithmeier, R. A. Characterization of cardiac calsequestrin. *Biochemistry* **26**, 6539–6544 (1987).
38. Beard, N. A., Laver, D. R. & Dulhunty, A. F. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **85**, 33–69 (2004).
39. Danilczyk, U. G., Cohen-Doyle, M. F. & Williams, D. B. Functional Relationship between Calreticulin, Calnexin, and the Endoplasmic Reticulum Luminal Domain of Calnexin. *J. Biol. Chem.* **275**, 13089–13097 (2000).
40. Hammadi, M. *et al.* Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **27**, 1600–1609 (2013).

41. Wang, M., Wey, S., Zhang, Y., Ye, R. & Lee, A. S. Role of the Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP in Development, Cancer, and Neurological Disorders. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 2307–2316 (2009).
42. Carafoli, E. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.* **71**, 129–153 (1991).
43. Carafoli, E. The calcium pumping ATPase of the plasma membrane. *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 531–547 (1991).
44. Zylińska, L. & Soszyński, M. Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase in excitable and nonexcitable cells. *Acta Biochim. Pol.* **47**, 529–539 (2000).
45. Brini, M. & Carafoli, E. The Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
46. Oceandy, D., Stanley, P. J., Cartwright, E. J. & Neyses, L. The regulatory function of plasma-membrane Ca(2+)-ATPase (PMCA) in the heart. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 927–930 (2007).
47. Khananshvil, D. The SLC8 gene family of sodium-calcium exchangers (NCX) - structure, function, and regulation in health and disease. *Mol. Aspects Med.* **34**, 220–235 (2013).
48. Ottolia, M., Torres, N., Bridge, J. H. B., Philipson, K. D. & Goldhaber, J. I. Na/Ca exchange and contraction of the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **61**, 28–33 (2013).
49. Feng, T., Kalyanamoorthy, S. & Barakat, K. L-Type Calcium Channels: Structure and Functions. *Ion Channels Health Sick.* (2018) doi:10.5772/intechopen.77305.
50. Bidaud, I., Mezghrani, A., Swayne, L. A., Monteil, A. & Lory, P. Voltage-gated calcium channels in genetic diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1763**, 1169–1174 (2006).
51. Mesirca, P., Torrente, A. G. & Mangoni, M. E. Functional role of voltage gated Ca(2+) channels in heart automaticity. *Front. Physiol.* **6**, 19 (2015).
52. Benitah, J.-P., Alvarez, J. L. & Gómez, A. M. L-type Ca(2+) current in ventricular cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48**, 26–36 (2010).
53. Yano, M., Yamamoto, T., Kobayashi, S. & Matsuzaki, M. Role of ryanodine receptor as a Ca<sup>2+</sup> regulatory center in normal and failing hearts. *J. Cardiol.* **53**, 1–7 (2009).

54. Sitsapesan, R., McGarry, S. J. & Williams, A. J. Cyclic ADP-ribose, the ryanodine receptor and Ca<sup>2+</sup> release. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**, 386–391 (1995).
55. Bers, D. M. & Guo, T. Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1047**, 86–98 (2005).
56. Fearnley, C. J., Roderick, H. L. & Bootman, M. D. Calcium Signaling in Cardiac Myocytes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
57. Radwański, P. B., Belevych, A. E., Brunello, L., Carnes, C. A. & Györke, S. Store-dependent deactivation: cooling the chain-reaction of myocardial calcium signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **58**, 77–83 (2013).
58. López-López, J. R., Shacklock, P. S., Balke, C. W. & Wier, W. G. Local calcium transients triggered by single L-type calcium channel currents in cardiac cells. *Science* **268**, 1042–1045 (1995).
59. Moschella, M. C. & Marks, A. R. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression in cardiac myocytes. *J. Cell Biol.* **120**, 1137–1146 (1993).
60. Garcia, M. I. & Boehning, D. Cardiac inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1864**, 907–914 (2017).
61. Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 517–529 (2003).
62. Bare, D. J., Kettlun, C. S., Liang, M., Bers, D. M. & Mignery, G. A. Cardiac Type 2 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor INTERACTION AND MODULATION BY CALCIUM/CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN KINASE II. *J. Biol. Chem.* **280**, 15912–15920 (2005).
63. Harzheim, D. *et al.* Elevated InsP3R expression underlies enhanced calcium fluxes and spontaneous extra-systolic calcium release events in hypertrophic cardiac myocytes. *Channels Austin Tex* **4**, 67–71 (2010).
64. Yamamoto, S., Takehara, M. & Ushimaru, M. Inhibitory action of linoleamide and oleamide toward sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1861**, 3399–3405 (2017).

65. Frank, K. F., Bölck, B., Erdmann, E. & Schwinger, R. H. G. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovasc. Res.* **57**, 20–27 (2003).
66. Vandecaetsbeek, I., Vangheluwe, P., Raeymaekers, L., Wuytack, F. & Vanoevelen, J. The Ca<sup>2+</sup> Pumps of the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
67. Sammels, E., Parys, J. B., Missiaen, L., De Smedt, H. & Bultynck, G. Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in health and disease: A dynamic equilibrium. *Cell Calcium* **47**, 297–314 (2010).
68. Van Coppenolle, F. *et al.* Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J. Cell Sci.* **117**, 4135–4142 (2004).
69. Flourakis, M. *et al.* Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA<sub>2</sub>-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **20**, 1215–1217 (2006).
70. Brunello, L. *et al.* Presenilin-2 dampens intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by increasing Ca<sup>2+</sup> leakage and reducing Ca<sup>2+</sup> uptake. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 3358–3369 (2009).
71. Pinton, P. *et al.* Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J. Cell Biol.* **148**, 857–862 (2000).
72. Vanden Abeele, F. *et al.* Bcl-2-dependent modulation of Ca(2+) homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* **1**, 169–179 (2002).
73. Westphalen, B. C., Wessig, J., Leyboldt, F., Arnold, S. & Methner, A. BI-1 protects cells from oxygen glucose deprivation by reducing the calcium content of the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ.* **12**, 304–306 (2005).
74. Vanden Abeele, F. *et al.* Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *J. Cell Biol.* **174**, 535–546 (2006).
75. Pacher, P., Csordás, P., Schneider, T. & Hajnóczky, G. Quantification of calcium signal transmission from sarco-endoplasmic reticulum to the mitochondria. *J. Physiol.* **529 Pt 3**, 553–564 (2000).
76. Tarasov, A. I., Griffiths, E. J. & Rutter, G. A. Regulation of ATP production by mitochondrial Ca<sup>2+</sup>. *Cell Calcium* **52**, 28–35 (2012).

77. De Stefani, D., Patron, M. & Rizzuto, R. Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1853**, 2006–2011 (2015).
78. Marchi, S. & Pinton, P. The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. *J. Physiol.* **592**, 829–839 (2014).
79. Mammucari, C., Raffaello, A., Vecellio Reane, D. & Rizzuto, R. Molecular structure and pathophysiological roles of the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 2457–2464 (2016).
80. Palty, R. *et al.* NCLX is an essential component of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 436–441 (2010).
81. Palty, R. & Sekler, I. The mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Cell Calcium* **52**, 9–15 (2012).
82. Csordás, G. *et al.* Imaging Interorganelle Contacts and Local Calcium Dynamics at the ER-Mitochondrial Interface. *Mol. Cell* **39**, 121–132 (2010).
83. Hogan, P. G. & Rao, A. Store-operated calcium entry: mechanisms and modulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **460**, 40–49 (2015).
84. Csordás, G., Weaver, D. & Hajnóczky, G. Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions. *Trends Cell Biol.* **28**, 523–540 (2018).
85. Marchi, S., Patergnani, S. & Pinton, P. The endoplasmic reticulum–mitochondria connection: One touch, multiple functions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1837**, 461–469 (2014).
86. Lopez-Crisosto, C. *et al.* Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology. *Nat. Rev. Cardiol.* **14**, 342–360 (2017).
87. López-Crisosto, C. *et al.* ER-to-mitochondria miscommunication and metabolic diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1852**, 2096–2105 (2015).
88. van Vliet, A. R., Verfaillie, T. & Agostinis, P. New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1843**, 2253–2262 (2014).
89. de Brito, O. M. & Scorrano, L. Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: the role of Ras. *Mitochondrion* **9**, 222–226 (2009).

90. Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S. & Mihara, K. Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J. Biochem. (Tokyo)* **134**, 333–344 (2003).
91. Scott, I. & Youle, R. J. Mitochondrial fission and fusion. *Essays Biochem.* **47**, 85–98 (2010).
92. CVD Statistics 2017. <http://www.ehnheart.org/cvd-statistics/cvd-statistics-2017.html>.
93. Cannon, B. Cardiovascular disease: Biochemistry to behaviour. *Nature* **493**, S2-3 (2013).
94. Scott, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**, 271–279 (2004).
95. Puel, J. *et al.* [Coronary revascularization at the acute phase of myocardial infarction. Short and median-term survival of 359 patients. Multicenter study]. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* **79**, 409–417 (1986).
96. ESC Scientific Document Group *et al.* European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *Eur. Heart J.* **39**, 508–579 (2017).
97. Maladies cardiovasculaires. *Ministère des Solidarités et de la Santé* <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/maladies/maladies-cardiovasculaires/article/les-maladies-cardiovasculaires> (2016).
98. La campagne OUP’S. *Ajila.org* <http://ajila.org/2016/04/14/la-campagne-oups/> (2016).
99. Fédération Française de Cardiologie |. <https://www.fedecardio.org/>.
100. Mehta Laxmi S. *et al.* Acute Myocardial Infarction in Women. *Circulation* **133**, 916–947 (2016).
101. Boateng, S. & Sanborn, T. Acute myocardial infarction. *Dis. Mon.* **59**, 83–96 (2013).
102. Reed, G. W., Rossi, J. E. & Cannon, C. P. Acute myocardial infarction. *Lancet Lond. Engl.* **389**, 197–210 (2017).
103. Yellon, D. M. & Hausenloy, D. J. Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.* **357**, 1121–1135 (2007).
104. Garcia-Dorado, D. & Piper, H. M. Postconditioning: Reperfusion of “reperfusion injury” after hibernation. *Cardiovasc. Res.* **69**, 1–3 (2006).



105. Hearse, D. J., Humphrey, S. M. & Bullock, G. R. The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? *J. Mol. Cell. Cardiol.* **10**, 641–668 (1978).
106. Dimroth, P., Kaim, G. & Matthey, U. Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases. *J. Exp. Biol.* **203**, 51–59 (2000).
107. Neely, J. R. & Morgan, H. E. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **36**, 413–459 (1974).
108. Inserte, J. *et al.* Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage. *Cardiovasc. Res.* **77**, 782–790 (2008).
109. Ostadal, B., Ostadalova, I. & Dhalla, N. S. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiol. Rev.* **79**, 635–659 (1999).
110. Snyder, C. M. & Chandel, N. S. Mitochondrial regulation of cell survival and death during low-oxygen conditions. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 2673–2683 (2009).
111. Jennings, R. B., Sommers, H. M., Smyth, G. A., Flack, H. A. & Linn, H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch. Pathol.* **70**, 68–78 (1960).
112. Zweier, J. L. & Talukder, M. A. H. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **70**, 181–190 (2006).
113. Marban, E., Koretsune, Y. & Kusuoka, H. Disruption of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis in hearts reperfused after prolonged episodes of ischemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **723**, 38–50 (1994).
114. Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Inserte, J., Rodriguez-Sinovas, A. & Piper, H. M. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **94**, 168–180 (2012).
115. Susan D. Kent, F. G. Cellular Pathways of Death and Survival in Acute Myocardial Infarction. *J. Clin. Exp. Cardiol.* (2013) doi:10.4172/2155-9880.S6-003.
116. Pfeffer, M. A. & Braunwald, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* **81**, 1161–1172 (1990).
117. Buja, L. M., Hagler, H. K. & Willerson, J. T. Altered calcium homeostasis in the pathogenesis of myocardial ischemic and hypoxic injury. *Cell Calcium* **9**, 205–217 (1988).
118. Basso, E. *et al.* Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J. Biol. Chem.* **280**, 18558–18561 (2005).

119. Piper, H. M. The calcium paradox revisited: an artefact of great heuristic value. *Cardiovasc. Res.* **45**, 123–127 (2000).
120. Zamzami, N. & Kroemer, G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 67–71 (2001).
121. Giorgio, V. *et al.* Cyclophilin D modulates mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J. Biol. Chem.* **284**, 33982–33988 (2009).
122. Bernardi, P. & Di Lisa, F. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **78**, 100–106 (2015).
123. Ong, S.-B., Samangouei, P., Kalkhoran, S. B. & Hausenloy, D. J. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **78**, 23–34 (2015).
124. Halestrap, A. P. & Richardson, A. P. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **78**, 129–141 (2015).
125. Baines, C. P. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res. Cardiol.* **104**, 181–188 (2009).
126. Nikolettou, V., Markaki, M., Palikaras, K. & Tavernarakis, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1833**, 3448–3459 (2013).
127. Zatz, M. & Starling, A. Calpains and disease. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2413–2423 (2005).
128. Scorrano, L. *et al.* BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science* **300**, 135–139 (2003).
129. Yang, J. *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129–1132 (1997).
130. Li, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479–489 (1997).
131. Krijnen, P. A. J. *et al.* Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *J. Clin. Pathol.* **55**, 801–811 (2002).

132. Teringova, E. & Tousek, P. Apoptosis in ischemic heart disease. *J. Transl. Med.* **15**, (2017).
133. Hosoi, T. & Ozawa, K. Endoplasmic reticulum stress in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Clin. Sci.* **118**, 19–29 (2010).
134. Wang, S. *et al.* Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets: ER stress in the heart. *Br. J. Pharmacol.* **175**, 1293–1304 (2018).
135. Lin, J. H., Walter, P. & Yen, T. S. B. Endoplasmic Reticulum Stress in Disease Pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 399–425 (2008).
136. Xu, C., Bailly-Maitre, B. & Reed, J. C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* **115**, 2656–2664 (2005).
137. Hotamisligil, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* **140**, 900–917 (2010).
138. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat. Rev. Cardiol.* **advance online publication**, (2016).
139. Murry, C. E., Jennings, R. B. & Reimer, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124–1136 (1986).
140. Kushner, F. G. *et al.* 2009 focused updates: ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction (updating the 2004 guideline and 2007 focused update) and ACC/AHA/SCAI guidelines on percutaneous coronary intervention (updating the 2005 guideline and 2007 focused update) a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 2205–2241 (2009).
141. Steg, P. G. *et al.* One-year cardiovascular event rates in outpatients with atherothrombosis. *JAMA* **297**, 1197–1206 (2007).
142. Hausenloy, D. J. *et al.* Translating cardioprotection for patient benefit: position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc. Res.* **98**, 7–27 (2013).
143. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc. Res.* **79**, 377–386 (2008).

144. Loukogeorgakis, S. P. *et al.* Remote Ischemic Preconditioning Provides Early and Late Protection Against Endothelial Ischemia-Reperfusion Injury in Humans: Role of the Autonomic Nervous System. *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 450–456 (2005).
145. Oxman, T., Arad, M., Klein, R., Avazov, N. & Rabinowitz, B. Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am. J. Physiol.* **273**, H1707-1712 (1997).
146. Schmidt, M. R. *et al.* Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **292**, H1883–H1890 (2007).
147. Zhao, Z.-Q. *et al.* Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H579-588 (2003).
148. Na, H. S. *et al.* Ventricular premature beat-driven intermittent restoration of coronary blood flow reduces the incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation in a cat model of regional ischemia. *Am. Heart J.* **132**, 78–83 (1996).
149. Kaljusto, M.-L. *et al.* Postconditioning in rats and mice. *Scand. Cardiovasc. J. SCJ* **40**, 334–341 (2006).
150. Philipp, S. *et al.* Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc. Res.* **70**, 308–314 (2006).
151. Skyschally Andreas *et al.* Ischemic Postconditioning in Pigs. *Circ. Res.* **104**, 15–18 (2009).
152. Staat, P. *et al.* Postconditioning the human heart. *Circulation* **112**, 2143–2148 (2005).
153. Griffiths, E. J. & Halestrap, A. P. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **25**, 1461–1469 (1993).
154. Javadov, S., Jang, S., Parodi-Rullán, R., Khuchua, Z. & Kuznetsov, A. V. Mitochondrial permeability transition in cardiac ischemia-reperfusion: whether cyclophilin D is a viable target for cardioprotection? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **74**, 2795–2813 (2017).
155. Gomez, L. *et al.* Fas-independent mitochondrial damage triggers cardiomyocyte death after ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **289**, H2153–H2158 (2005).

156. Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Heusch, G. & Schulz, R. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res. Cardiol.* **105**, 771–785 (2010).
157. Teixeira, G. *et al.* Involvement of Cyclophilin D and Calcium in Isoflurane-induced Preconditioning. *Anesthesiology* **123**, 1374–1384 (2015).
158. Lim, W. Y., Messow, C. M. & Berry, C. Cyclosporin variably and inconsistently reduces infarct size in experimental models of reperfused myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 2034–2043 (2012).
159. Hausenloy, D. *et al.* The effect of cyclosporin-A on peri-operative myocardial injury in adult patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled clinical trial. *Heart Br. Card. Soc.* **100**, 544–549 (2014).
160. Mewton, N. *et al.* Rationale and design of the Cyclosporine to ImpRove Clinical oUtcome in ST-elevation myocardial infarction patients (the CIRCUS trial). *Am. Heart J.* **169**, 758-766.e6 (2015).
161. Cung, T.-T. *et al.* Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1021–1031 (2015).
162. Gomez, L., Paillard, M., Thibault, H., Derumeaux, G. & Ovize, M. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation* **117**, 2761–2768 (2008).
163. Gomez, L. *et al.* The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk is regulated by GSK3β during reperfusion injury. *Cell Death Differ.* **23**, 313–322 (2016).
164. Antony, A. N. *et al.* MICU1 regulation of mitochondrial Ca(2+) uptake dictates survival and tissue regeneration. *Nat. Commun.* **7**, 10955 (2016).
165. Hausenloy, D. J. *et al.* Novel targets and future strategies for acute cardioprotection: Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart. *Cardiovasc. Res.* **113**, 564–585 (2017).
166. Altamirano, F., Wang, Z. V. & Hill, J. A. Cardioprotection in ischaemia–reperfusion injury: novel mechanisms and clinical translation. *J. Physiol.* **593**, 3773–3788 (2015).

167. Altamirano, F., Wang, Z. V. & Hill, J. A. Cardioprotection in ischaemia–reperfusion injury: novel mechanisms and clinical translation. *J. Physiol.* **593**, 3773–3788 (2015).
168. Abdallah, Y. *et al.* Interplay between Ca<sup>2+</sup> cycling and mitochondrial permeability transition pores promotes reperfusion-induced injury of cardiac myocytes. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 2478–2485 (2011).
169. Talukder, M. A. H. *et al.* Expression of SERCA isoform with faster Ca<sup>2+</sup> transport properties improves postischemic cardiac function and Ca<sup>2+</sup> handling and decreases myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H2418–2428 (2007).
170. Kohno, M. *et al.* A new cardioprotective agent, JTV519, improves defective channel gating of ryanodine receptor in heart failure. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **284**, H1035–H1042 (2003).
171. Zhang, X. *et al.* Endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin and thapsigargin protects against transient ischemic brain injury. *Autophagy* **10**, 1801–1813 (2014).
172. Petrovski, G. *et al.* Cardioprotection by Endoplasmic Reticulum Stress–Induced Autophagy. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 2191–2200 (2010).
173. Lotteau, S., Ducreux, S., Romestaing, C., Legrand, C. & Van Coppenolle, F. Characterization of Functional TRPV1 Channels in the Sarcoplasmic Reticulum of Mouse Skeletal Muscle. *PLoS ONE* **8**, e58673 (2013).
174. Montell, C. & Rubin, G. M. Molecular characterization of the drosophila *trp* locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**, 1313–1323 (1989).
175. Cosens, D. J. & Manning, A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* **224**, 285–287 (1969).
176. Nilius, B. & Owsianik, G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* **12**, 218 (2011).
177. Wes, P. D. *et al.* TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9652–9656 (1995).
178. Vazquez, G., Wedel, B. J., Aziz, O., Trebak, M. & Putney, J. W. The mammalian TRPC cation channels. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1742**, 21–36 (2004).

179. Samanta, A., Hughes, T. E. T. & Moiseenkova-Bell, V. Y. Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell. Biochem.* **87**, 141–165 (2018).
180. Inoue, R. *et al.* Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. *Circ. Res.* **99**, 119–131 (2006).
181. Ong, H. L., de Souza, L. B. & Ambudkar, I. S. Role of TRPC Channels in Store-Operated Calcium Entry. *Adv. Exp. Med. Biol.* **898**, 87–109 (2016).
182. Liu, X., Singh, B. B. & Ambudkar, I. S. TRPC1 is required for functional store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. Role of acidic amino acid residues in the S5-S6 region. *J. Biol. Chem.* **278**, 11337–11343 (2003).
183. Sidi, S., Friedrich, R. W. & Nicolson, T. NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science* **301**, 96–99 (2003).
184. Ghata, J. & Cowley, B. D. Polycystic Kidney Disease. *Compr. Physiol.* **7**, 945–975 (2017).
185. Sharif-Naeini, R. *et al.* Polycystin-1 and -2 dosage regulates pressure sensing. *Cell* **139**, 587–596 (2009).
186. Clapham, D. E., Julius, D., Montell, C. & Schultz, G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 427–450 (2005).
187. Hofherr, A. & Köttgen, M. TRPP channels and polycystins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **704**, 287–313 (2011).
188. Delmas, P. Polycystins: From Mechanosensation to Gene Regulation. *Cell* **118**, 145–148 (2004).
189. Bichet, D., Peters, D., Patel, A. J., Delmas, P. & Honoré, E. Cardiovascular polycystins: insights from autosomal dominant polycystic kidney disease and transgenic animal models. *Trends Cardiovasc. Med.* **16**, 292–298 (2006).
190. Xiao, Y. *et al.* Overexpression of Trpp5 contributes to cell proliferation and apoptosis probably through involving calcium homeostasis. *Mol. Cell. Biochem.* **339**, 155–161 (2010).
191. Duncan, L. M. *et al.* Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res.* **58**, 1515–1520 (1998).



192. Kraft, R. & Harteneck, C. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch.* **451**, 204–211 (2005).
193. Held, K., Voets, T. & Vriens, J. TRPM3 in temperature sensing and beyond. *Temp. Austin Tex* **2**, 201–213 (2015).
194. Ullrich, N. D. *et al.* Comparison of functional properties of the Ca<sup>2+</sup>-activated cation channels TRPM4 and TRPM5 from mice. *Cell Calcium* **37**, 267–278 (2005).
195. Liman, E. R. TRPM5 and taste transduction. *Handb. Exp. Pharmacol.* 287–298 (2007)  
doi:10.1007/978-3-540-34891-7\_17.
196. Andersson, D. A., Chase, H. W. N. & Bevan, S. TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **24**, 5364–5369 (2004).
197. Liu, Z. *et al.* TRPM8: a potential target for cancer treatment. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **142**, 1871–1881 (2016).
198. Venkatachalam, K., Wong, C.-O. & Zhu, M. X. The role of TRPMLs in endolysosomal trafficking and function. *Cell Calcium* **58**, 48–56 (2015).
199. Wang, W., Zhang, X., Gao, Q. & Xu, H. TRPML1: an ion channel in the lysosome. *Handb. Exp. Pharmacol.* **222**, 631–645 (2014).
200. Cuajungco, M. P., Silva, J., Habibi, A. & Valadez, J. A. The mucolipin-2 (TRPML2) ion channel: a tissue-specific protein crucial to normal cell function. *Pflugers Arch.* **468**, 177–192 (2016).
201. Grimm, C., Barthmes, M. & Wahl-Schott, C. TRPML3. *Handb. Exp. Pharmacol.* **222**, 659–674 (2014).
202. Story, G. M. *et al.* ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819–829 (2003).
203. Zygmunt, P. M. & Högestätt, E. D. TRPA1. *Handb. Exp. Pharmacol.* **222**, 583–630 (2014).
204. Caterina, M. J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816–824 (1997).

205. Cohen, M. R. *et al.* Nerve Growth Factor Regulates Transient Receptor Potential Vanilloid 2 via Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling To Enhance Neurite Outgrowth in Developing Neurons. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 4238–4252 (2015).
206. Moqrich, A. *et al.* Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* **307**, 1468–1472 (2005).
207. Hoenderop, J. G. J. *et al.* Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J.* **22**, 776–785 (2003).
208. Clapham, D. E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517–524 (2003).
209. Yue, Z. *et al.* Role of TRP channels in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **308**, H157-182 (2015).
210. Hof, T. *et al.* Transient receptor potential channels in cardiac health and disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **16**, 344 (2019).
211. Earley, S. & Brayden, J. E. Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiol. Rev.* **95**, 645–690 (2015).
212. Hu, Y. *et al.* Uncovering the arrhythmogenic potential of TRPM4 activation in atrial-derived HL-1 cells using novel recording and numerical approaches. *Cardiovasc. Res.* **113**, 1243–1255 (2017).
213. Guinamard, R. *et al.* TRPM4 in cardiac electrical activity. *Cardiovasc. Res.* **108**, 21–30 (2015).
214. Sah, R. *et al.* Ion channel-kinase TRPM7 is required for maintaining cardiac automaticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E3037-3046 (2013).
215. Ju, Y.-K. *et al.* The involvement of TRPC3 channels in sinoatrial arrhythmias. *Front. Physiol.* **6**, 86 (2015).
216. Sabourin, J., Robin, E. & Raddatz, E. A key role of TRPC channels in the regulation of electromechanical activity of the developing heart. *Cardiovasc. Res.* **92**, 226–236 (2011).
217. Guinamard, R. *et al.* Functional characterization of a Ca<sup>(2+)</sup>-activated non-selective cation channel in human atrial cardiomyocytes. *J. Physiol.* **558**, 75–83 (2004).

218. Demion, M. *et al.* Trpm4 gene invalidation leads to cardiac hypertrophy and electrophysiological alterations. *PloS One* **9**, e115256 (2014).
219. Zhang, Y.-H. *et al.* Evidence for functional expression of TRPM7 channels in human atrial myocytes. *Basic Res. Cardiol.* **107**, 282 (2012).
220. Odnoshivkina, U. G. *et al.*  $\beta$ 2-adrenoceptor agonist-evoked reactive oxygen species generation in mouse atria: implication in delayed inotropic effect. *Eur. J. Pharmacol.* **765**, 140–153 (2015).
221. Andrei, S. R., Sinharoy, P., Bratz, I. N. & Damron, D. S. TRPA1 is functionally co-expressed with TRPV1 in cardiac muscle: Co-localization at z-discs, costameres and intercalated discs. *Channels Austin Tex* **10**, 395–409 (2016).
222. Andrei, S. R. *et al.* TRPA1 ion channel stimulation enhances cardiomyocyte contractile function via a CaMKII-dependent pathway. *Channels Austin Tex* **11**, 587–603 (2017).
223. Eder, P. & Molkenstin, J. D. TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **108**, 265–272 (2011).
224. Miller, B. A. *et al.* The second member of transient receptor potential-melastatin channel family protects hearts from ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **304**, H1010-1022 (2013).
225. Sah, R. *et al.* Timing of myocardial trpm7 deletion during cardiogenesis variably disrupts adult ventricular function, conduction, and repolarization. *Circulation* **128**, 101–114 (2013).
226. Aguetaz, E., Bois, P., Cognard, C. & Sebille, S. Stretch-activated TRPV2 channels: Role in mediating cardiopathies. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **130**, 273–280 (2017).
227. Aguetaz, E. *et al.* Axial stretch-dependent cation entry in dystrophic cardiomyopathy: Involvement of several TRPs channels. *Cell Calcium* **59**, 145–155 (2016).
228. Iwata, Y. *et al.* Blockade of sarcolemmal TRPV2 accumulation inhibits progression of dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* **99**, 760–768 (2013).
229. Zhao, Y. *et al.* Unusual localization and translocation of TRPV4 protein in cultured ventricular myocytes of the neonatal rat. *Eur. J. Histochem. EJH* **56**, e32 (2012).
230. Heckel, E. *et al.* Oscillatory Flow Modulates Mechanosensitive klf2a Expression through trpv4 and trpp2 during Heart Valve Development. *Curr. Biol. CB* **25**, 1354–1361 (2015).

231. Volk, T., Schworer, A. P., Thiessen, S., Schultz, J.-H. & Ehmke, H. A polycystin-2-like large conductance cation channel in rat left ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* **58**, 76–88 (2003).
232. Huang, H. *et al.* TRPC1 expression and distribution in rat hearts. *Eur. J. Histochem. EJH* **53**, e26 (2009).
233. Liu, H. *et al.* Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **3**, 374–385 (2010).
234. Zhong, B. & Wang, D. H. TRPV1 gene knockout impairs preconditioning protection against myocardial injury in isolated perfused hearts in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H1791-1798 (2007).
235. Wang, L. & Wang, D. H. TRPV1 gene knockout impairs postischemic recovery in isolated perfused heart in mice. *Circulation* **112**, 3617–3623 (2005).
236. Walker, R. L., Hume, J. R. & Horowitz, B. Differential expression and alternative splicing of TRP channel genes in smooth muscles. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, C1184-1192 (2001).
237. Zhang, S. *et al.* Pulmonary artery smooth muscle cells from normal subjects and IPAH patients show divergent cAMP-mediated effects on TRPC expression and capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **292**, L1202-1210 (2007).
238. Du, J. *et al.* TRPM7-mediated Ca<sup>2+</sup> signals confer fibrogenesis in human atrial fibrillation. *Circ. Res.* **106**, 992–1003 (2010).
239. Harada, M. *et al.* Transient receptor potential canonical-3 channel-dependent fibroblast regulation in atrial fibrillation. *Circulation* **126**, 2051–2064 (2012).
240. Davis, J., Burr, A. R., Davis, G. F., Birnbaumer, L. & Molkentin, J. D. A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing in vivo. *Dev. Cell* **23**, 705–715 (2012).
241. Caterina, M. J. & Julius, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 487–517 (2001).
242. Liao, M., Cao, E., Julius, D. & Cheng, Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* **504**, 107–112 (2013).

243. Tominaga, M. & Tominaga, T. Structure and function of TRPV1. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* **451**, 143–150 (2005).
244. Kedei, N. *et al.* Analysis of the Native Quaternary Structure of Vanilloid Receptor 1. *J. Biol. Chem.* **276**, 28613–28619 (2001).
245. Jahnel, R. *et al.* Biochemical characterization of the vanilloid receptor 1 expressed in a dorsal root ganglia derived cell line. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5489–5496 (2001).
246. Vos, M. H. *et al.* TRPV1b overexpression negatively regulates TRPV1 responsiveness to capsaicin, heat and low pH in HEK293 cells. *J. Neurochem.* **99**, 1088–1102 (2006).
247. Garami, A. *et al.* Thermoregulatory phenotype of the Trpv1 knockout mouse: thermoeffector dysbalance with hyperkinesia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 1721–1733 (2011).
248. Szelényi, Z., Hummel, Z., Szolcsányi, J. & Davis, J. B. Daily body temperature rhythm and heat tolerance in TRPV1 knockout and capsaicin pretreated mice. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 1421–1424 (2004).
249. Iida, T., Shimizu, I., Nealen, M. L., Campbell, A. & Caterina, M. Attenuated fever response in mice lacking TRPV1. *Neurosci. Lett.* **378**, 28–33 (2005).
250. Caterina, M. J. *et al.* Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**, 306–313 (2000).
251. Davis, J. B. *et al.* Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* **405**, 183–187 (2000).
252. Lee, E. *et al.* Transient receptor potential vanilloid type-1 channel regulates diet-induced obesity, insulin resistance, and leptin resistance. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **29**, 3182–3192 (2015).
253. Nagy, I. & Rang, H. Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **88**, 995–997 (1999).
254. Tóth, A. *et al.* Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **135**, 162–168 (2005).

255. Cavanaugh, D. J. *et al.* Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 5067–5077 (2011).
256. Mezey, E. *et al.* Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3655–3660 (2000).
257. Szolcsanyi, J., Anton, F., Reeh, P. W. & Handwerker, H. O. Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin. *Brain Res.* **446**, 262–268 (1988).
258. Romanovsky, A. A. *et al.* The Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channel in Thermoregulation: A Thermosensor It Is Not. *Pharmacol. Rev.* **61**, 228–261 (2009).
259. Kark, T. *et al.* Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol. Pharmacol.* **73**, 1405–1412 (2008).
260. Dvorakova, M. & Kummer, W. Transient expression of vanilloid receptor subtype 1 in rat cardiomyocytes during development. *Histochem. Cell Biol.* **116**, 223–225 (2001).
261. Randhawa, P. K. & Jaggi, A. S. TRPV1 channels in cardiovascular system: A double edged sword? *Int. J. Cardiol.* **228**, 103–113 (2017).
262. Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G. & Schaefer, M. Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J. Cell Sci.* **118**, 917–928 (2005).
263. Xin, H. *et al.* Vanilloid receptor expressed in the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 756–762 (2005).
264. Olah, Z. *et al.* Ligand-induced dynamic membrane changes and cell deletion conferred by vanilloid receptor 1. *J. Biol. Chem.* **276**, 11021–11030 (2001).
265. Sun, Z. *et al.* TRPV1 Activation Exacerbates Hypoxia/Reoxygenation-Induced Apoptosis in H9C2 Cells via Calcium Overload and Mitochondrial Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 18362–18380 (2014).

266. Guo, A., Vulchanova, L., Wang, J., Li, X. & Elde, R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 946–958 (1999).
267. Hurt, C. M. *et al.* Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Regulates Mitochondrial Membrane Potential and Myocardial Reperfusion Injury. *J. Am. Heart Assoc.* **5**, (2016).
268. Ferrandiz-Huertas, C., Mathivanan, S., Wolf, C. J., Devesa, I. & Ferrer-Montiel, A. Trafficking of ThermoTRP Channels. *Membranes* **4**, 525–564 (2014).
269. Kimball, C., Luo, J., Yin, S., Hu, H. & Dhaka, A. The Pore Loop Domain of TRPV1 Is Required for Its Activation by the Volatile Anesthetics Chloroform and Isoflurane. *Mol. Pharmacol.* **88**, 131–138 (2015).
270. Earley, S. Vanilloid and Melastatin Transient Receptor Potential Channels in Vascular Smooth Muscle. *Microcirc. N. Y. N 1994* **17**, 237–249 (2010).
271. Patapoutian, A., Peier, A. M., Story, G. M. & Viswanath, V. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 529–539 (2003).
272. Vlachová, V. *et al.* Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 1340–1350 (2003).
273. Jancsó-Gábor, A., Szolcsányi, J. & Jancsó, N. Irreversible impairment of thermoregulation induced by capsaicin and similar pungent substances in rats and guinea-pigs. *J. Physiol.* **206**, 495–507 (1970).
274. Szallasi, A. & Blumberg, P. M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* **51**, 159–212 (1999).
275. Gavva, N. R. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 550–557 (2008).
276. Tominaga, M. *et al.* The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**, 531–543 (1998).
277. Jordt, S. E., Tominaga, M. & Julius, D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8134–8139 (2000).



278. Ahern, G. P. & Premkumar, L. S. Voltage-dependent priming of rat vanilloid receptor: effects of agonist and protein kinase C activation. *J. Physiol.* **545**, 441–451 (2002).
279. Zygmunt, P. M. *et al.* Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**, 452–457 (1999).
280. Morales-Lázaro, S. L., Simon, S. A. & Rosenbaum, T. The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *J. Physiol.* **591**, 3109–3121 (2013).
281. Nagy, I., Sántha, P., Jancsó, G. & Urbán, L. The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 351–369 (2004).
282. Vriens, J., Nilius, B. & Vennekens, R. Herbal compounds and toxins modulating TRP channels. *Curr. Neuropharmacol.* **6**, 79–96 (2008).
283. Thomas, K. C. *et al.* Structure-activity relationship of capsaicin analogs and transient receptor potential vanilloid 1-mediated human lung epithelial cell toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **337**, 400–410 (2011).
284. Gavva, N. R. *et al.* Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J. Biol. Chem.* **279**, 20283–20295 (2004).
285. Savitha, G., Panchanathan, S. & Salimath, B. P. Capsaicin inhibits calmodulin-mediated oxidative burst in rat macrophages. *Cell. Signal.* **2**, 577–585 (1990).
286. Dray, A., Forbes, C. A. & Burgess, G. M. Ruthenium red blocks the capsaicin-induced increase in intracellular calcium and activation of membrane currents in sensory neurones as well as the activation of peripheral nociceptors in vitro. *Neurosci. Lett.* **110**, 52–59 (1990).
287. Smith, G. D. *et al.* TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* **418**, 186–190 (2002).
288. Winter, Z. *et al.* Functionally important amino acid residues in the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel--an overview of the current mutational data. *Mol. Pain* **9**, 30 (2013).
289. Szallasi, A. Vanilloid receptor ligands: hopes and realities for the future. *Drugs Aging* **18**, 561–573 (2001).

290. Iadarola, M. J. & Mannes, A. J. The vanilloid agonist resiniferatoxin for interventional-based pain control. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 2171–2179 (2011).
291. Messegueur, A., Planells-Cases, R. & Ferrer-Montiel, A. Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor. *Curr. Neuropharmacol.* **4**, 1–15 (2006).
292. Appendino, G. *et al.* Development of the first ultra-potent ‘capsaicinoid’ agonist at transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels and its therapeutic potential. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 561–570 (2005).
293. Campbell, J. N., Raja, S. N. & Meyer, R. A. Halothane sensitizes cutaneous nociceptors in monkeys. *J. Neurophysiol.* **52**, 762–770 (1984).
294. MacIver, M. B. & Tanelian, D. L. Volatile anesthetics excite mammalian nociceptor afferents recorded in vitro. *Anesthesiology* **72**, 1022–1030 (1990).
295. Mutoh, T., Tsubone, H., Nishimura, R. & Sasaki, N. Responses of laryngeal capsaicin-sensitive receptors to volatile anesthetics in anesthetized dogs. *Respir. Physiol.* **111**, 113–125 (1998).
296. Bevan, S. *et al.* Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* **107**, 544–552 (1992).
297. Seabrook, G. R. *et al.* Functional properties of the high-affinity TRPV1 (VR1) vanilloid receptor antagonist (4-hydroxy-5-iodo-3-methoxyphenylacetate ester) iodo-resiniferatoxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 1052–1060 (2002).
298. Ahluwalia, J., Rang, H. & Nagy, I. The putative role of vanilloid receptor-like protein-1 in mediating high threshold noxious heat-sensitivity in rat cultured primary sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 1483–1489 (2002).
299. Woolf, C. J. & Salter, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* **288**, 1765–1769 (2000).
300. Willis, W. D. The role of TRPV1 receptors in pain evoked by noxious thermal and chemical stimuli. *Exp. Brain Res.* **196**, 5–11 (2009).

301. Wick, E. C. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 1, calcitonin gene-related peptide, and substance P mediate nociception in acute pancreatitis. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G959–G969 (2006).
302. Gallego-Sandín, S., Rodríguez-García, A., Alonso, M. T. & García-Sancho, J. The Endoplasmic Reticulum of Dorsal Root Ganglion Neurons Contains Functional TRPV1 Channels. *J. Biol. Chem.* **284**, 32591–32601 (2009).
303. Zhao, R. & Tsang, S. Y. Versatile Roles of Intracellularly Located TRPV1 Channel. *J. Cell. Physiol.* **232**, 1957–1965 (2017).
304. Christie, S., Wittert, G. A., Li, H. & Page, A. J. Involvement of TRPV1 Channels in Energy Homeostasis. *Front. Endocrinol.* **9**, (2018).
305. Zhang, L. L. *et al.* Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circ. Res.* **100**, 1063–1070 (2007).
306. Gram, D. X., Holst, J. J. & Szallasi, A. TRPV1: A Potential Therapeutic Target in Type 2 Diabetes and Comorbidities? *Trends Mol. Med.* **23**, 1002–1013 (2017).
307. Gram, D. X. *et al.* Plasma calcitonin gene-related peptide is increased prior to obesity, and sensory nerve desensitization by capsaicin improves oral glucose tolerance in obese Zucker rats. *Eur. J. Endocrinol.* **153**, 963–969 (2005).
308. Rosenberg, H., Pollock, N., Schiemann, A., Bulger, T. & Stowell, K. Malignant hyperthermia: a review. *Orphanet J. Rare Dis.* **10**, 93 (2015).
309. Betzenhauser, M. J. & Marks, A. R. Ryanodine receptor channelopathies. *Pflugers Arch.* **460**, 467–480 (2010).
310. Treves, S. *et al.* Ryanodine receptor 1 mutations, dysregulation of calcium homeostasis and neuromuscular disorders. *Neuromuscul. Disord.* **15**, 577–587 (2005).
311. Tessier, N., Ducrozet, M., Ducreux, S., Faure, J. & Coppenolle, F. V. Pathophysiological Role of Trpv1 In Malignant Hyperthermia: Identification of New Variants. **12**, 3 (2018).
312. Abeele, F. V. *et al.* TRPV1 variants impair intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling and may confer susceptibility to malignant hyperthermia. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* (2018) doi:10.1038/s41436-018-0066-9.

313. Zhang, E. & Liao, P. Brain transient receptor potential channels and stroke. *J. Neurosci. Res.* **93**, 1165–1183 (2015).
314. Cao, Z., Balasubramanian, A. & Marrelli, S. P. Pharmacologically induced hypothermia via TRPV1 channel agonism provides neuroprotection following ischemic stroke when initiated 90 min after reperfusion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **306**, R149-156 (2014).
315. Khatibi, N. H. *et al.* Capsaicin pre-treatment provides neurovascular protection against neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Acta Neurochir. Suppl.* **111**, 225–230 (2011).
316. Ma, L. *et al.* Activation of TRPV1 reduces vascular lipid accumulation and attenuates atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **92**, 504–513 (2011).
317. Li, B.-H. *et al.* TRPV1 activation impedes foam cell formation by inducing autophagy in oxLDL-treated vascular smooth muscle cells. *Cell Death Dis.* **5**, e1182 (2014).
318. Sun, H., Li, D.-P., Chen, S.-R., Hittelman, W. N. & Pan, H.-L. Sensing of blood pressure increase by transient receptor potential vanilloid 1 receptors on baroreceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **331**, 851–859 (2009).
319. Randhawa, P. K. & Jaggi, A. S. TRPV1 and TRPV4 channels: potential therapeutic targets for ischemic conditioning-induced cardioprotection. *Eur. J. Pharmacol.* **746**, 180–185 (2015).
320. Wei, Z. *et al.* Decreased expression of transient receptor potential vanilloid 1 impairs the postischemic recovery of diabetic mouse hearts. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* **73**, 1127–1132 (2009).
321. Gao, Y., Song, J., Chen, H., Cao, C. & Lee, C. TRPV1 activation is involved in the cardioprotection of remote limb ischemic postconditioning in ischemia-reperfusion injury rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **463**, 1034–1039 (2015).
322. Ren, J.-Y., Song, J.-X., Lu, M.-Y. & Chen, H. Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in isolated perfused heart from diabetic rats: Involvement of transient receptor potential vanilloid 1, calcitonin gene-related peptide and substance P. *Regul. Pept.* **169**, 49–57 (2011).
323. Randhawa, P. K. & Jaggi, A. S. Investigating the involvement of TRPV1 ion channels in remote hind limb preconditioning-induced cardioprotection in rats. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **390**, 117–126 (2017).

324. Qin, S., Liu, S. & Wang, R. [Protective effect of capsaicin on against myocardial ischemia-reperfusion injury of rat in vivo]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **39**, 550–554 (2008).
325. Qin, S., Wang, R., Xu, H. & Luo, N. [Apoptosis inhibition of capsaicin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **42**, 218–221 (2011).
326. Sun, Z. *et al.* *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 18362–18380 (2014).
327. An, J. *et al.* Anesthetic preconditioning enhances Ca<sup>2+</sup> handling and mechanical and metabolic function elicited by Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange inhibition in isolated hearts. *Anesthesiology* **105**, 541–549 (2006).
328. Tominaga, M. & Caterina, M. J. Thermosensation and pain. *J. Neurobiol.* **61**, 3–12 (2004).
329. Hescheler, J. *et al.* Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ. Res.* **69**, 1476–1486 (1991).
330. O’Connell, T. D., Rodrigo, M. C. & Simpson, P. C. Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **357**, 271–296 (2007).
331. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408 (2001).
332. Chaussade, C. *et al.* Expression of myotubularin by an adenoviral vector demonstrates its function as a phosphatidylinositol 3-phosphate [PtdIns(3)P] phosphatase in muscle cell lines: involvement of PtdIns(3)P in insulin-stimulated glucose transport. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **17**, 2448–2460 (2003).
333. He, T. C. *et al.* A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2509–2514 (1998).
334. Rink, T. J., Tsien, R. Y. & Pozzan, T. Cytoplasmic pH and free Mg<sup>2+</sup> in lymphocytes. *J. Cell Biol.* **95**, 189–196 (1982).
335. Qian, T., Nieminen, A.-L., Herman, B. & Lemasters, J. J. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **273**, C1783–C1792 (1997).

336. Rodriguez-Garcia, A. *et al.* GAP, an aequorin-based fluorescent indicator for imaging Ca<sup>2+</sup> in organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 2584–2589 (2014).
337. Palmer, A. E. *et al.* Ca<sup>2+</sup> indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem. Biol.* **13**, 521–530 (2006).
338. Palmer, A. E. & Tsien, R. Y. Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nat. Protoc.* **1**, 1057–1065 (2006).
339. Giacomello, M. *et al.* Ca<sup>2+</sup> hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca<sup>2+</sup> mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Mol. Cell* **38**, 280–290 (2010).
340. Suzuki, J. *et al.* Imaging intraorganellar Ca<sup>2+</sup> at subcellular resolution using CEPIA. *Nat. Commun.* **5**, 4153 (2014).
341. Imamura, H. *et al.* Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15651–15656 (2009).
342. Wieckowski, M. R., Giorgi, C., Lebiedzinska, M., Duszynski, J. & Pinton, P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat. Protoc.* **4**, 1582–1590 (2009).
343. Csordás, G., Thomas, A. P. & Hajnóczky, G. Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria in cardiac muscle. *Trends Cardiovasc. Med.* **11**, 269–275 (2001).
344. Cung, T.-T. *et al.* Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1021–1031 (2015).
345. Luo, Z. *et al.* TRPV1 activation improves exercise endurance and energy metabolism through PGC-1 $\alpha$  upregulation in mice. *Cell Res.* **22**, 551–564 (2012).
346. Lee, J. H. *et al.* Structural insights into transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) from homology modeling, flexible docking, and mutational studies. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **25**, 317–327 (2011).
347. Elokely, K. *et al.* Understanding TRPV1 activation by ligands: Insights from the binding modes of capsaicin and resiniferatoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E137–E145 (2016).

348. Chou, M. Z., Mtui, T., Gao, Y.-D., Kohler, M. & Middleton, R. E. Resiniferatoxin Binds to the Capsaicin Receptor (TRPV1) near the Extracellular Side of the S4 Transmembrane Domain. *Biochemistry* **43**, 2501–2511 (2004).
349. Szallasi, A. & Blumberg, P. M. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* **30**, 515–520 (1989).
350. Ambudkar, I. S. Ca<sup>2+</sup> signaling microdomains:platforms for the assembly and regulation of TRPC channels. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 25–32 (2006).
351. Haque, N., Rahman, M. T., Abu Kasim, N. H. & Alabsi, A. M. Hypoxic Culture Conditions as a Solution for Mesenchymal Stem Cell Based Regenerative Therapy. *The Scientific World Journal* <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/632972/> (2013) doi:10.1155/2013/632972.
352. Csete, M. Oxygen in the cultivation of stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1049**, 1–8 (2005).



## Résumé

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, en 2012, les maladies cardiovasculaires ont causé 17.5 millions de mort dans le monde, soit 30% des décès. L'infarctus du myocarde (IDM), principale maladie cardiovasculaire, est causé par l'obstruction d'une artère coronaire entraînant un arrêt de l'approvisionnement sanguin du tissu en aval de cette obstruction. Ce phénomène est appelé l'ischémie. Cette zone non irriguée est dépourvue en oxygène et en nutriments, entraînant alors la mort cellulaire. Actuellement, le seul traitement possible est la désocclusion de l'artère coronaire permettant au sang d'irriguer *de novo* le tissu, ceci est appelé la reperfusion. Malheureusement, aussi bien l'ischémie que la reperfusion causent des dégâts irréversibles sur le muscle cardiaque.

Afin de diminuer les lésions cellulaires à la suite d'un épisode d'ischémie-reperfusion (I/R), des stratégies de cardioprotection ont vu le jour dans les années 1980. Elles comprennent le « remote », pré-, le per- et post-conditionnement. Parmi ces différentes stratégies, un certain nombre vise à contrebalancer les dérégulations de l'homéostasie calcique, symptômes délétères survenant à l'échelle cellulaire lors l'I/R et contribuant à la mort cellulaire. Parmi les membres de l'homéostasome calcique, nous nous intéressons au canal TRPV1 (pour Transient Receptor Vanilloid 1). TRPV1 est un canal cationique non-sélectif qui possède six domaines transmembranaires et un pore formé entre les domaines 5 et 6. Ce canal est principalement impliqué dans la nociception. Il est activé par la chaleur ( $> 42^{\circ}\text{C}$ ), l'acidose ( $\text{pH} < 6$ ) et des agonistes tels que la capsaïcine, la résinifératoxine et les anesthésiques volatils. En revanche, il est inhibé par des antagonistes tels que la capsazépine et la 5'-Iodorésinifératoxine. De nombreuses équipes se sont intéressées à l'implication de TRPV1 dans la cardioprotection. La modulation pharmacologique de TRPV1 s'est déjà avérée bénéfique vis-à-vis de l'IDM, mais l'effet cardioprotecteur a été attribué aux canaux TRPV1 présents dans le système nerveux périphérique. Aucune étude à ce jour n'a révélé le rôle de TRPV1 au sein du myocarde.

Ainsi, le but de cette étude est de mieux comprendre le rôle de TRPV1 dans la cardioprotection. Pour cela, afin d'utiliser des sondes génétiques ciblant les différents réservoirs calciques de la cellule, nous avons travaillé avec la lignée cellulaire de cardiomyoblastes de rats, les cellules H9C2.

Les principaux résultats de ma thèse sont les suivants :

- 1) TRPV1 est exprimé dans ce modèle cellulaire et semble être localisé à la membrane du réticulum endoplasmique.
- 2) TRPV1 est un canal de fuite calcique fonctionnel du réticulum endoplasmique.
- 3) La modulation pharmacologique de TRPV1 a un impact sur la concentration calcique dans le cytoplasme, dans la mitochondrie et dans les hot spots mitochondriaux.
- 4) L'activation de TRPV1 a des effets hétérogènes sur la mortalité cellulaire après une hypoxie-réoxygénation alors que l'inhibition de TRPV1 augmente systématiquement la survie cellulaire.

De façon annexe, mes travaux de thèse ont également contribué à :

- Compléter l'étude de TRPV1 sur les cardiomyocytes murins adultes de souris sauvages et de souris TRPV1 KO
- Développer un nouveau protocole d'analyse en cytométrie de flux permettant de mesurer plusieurs paramètres en même temps (mort cellulaire, potentiel de membrane mitochondrial, ROS, et masse mitochondriale) après une séquence d'hypoxie-réoxygénation sur des cardiomyocytes adultes de souris.

Dans l'ensemble, ce projet de thèse vise à déterminer comment la modulation positive ou négative d'un canal de fuite calcique du réticulum endoplasmique dans les cardiomyocytes peut limiter les lésions cellulaires engendrées par l'ischémie-reperfusion.