



HAL
open science

Effets de l'exercice et d'une modulation du métabolisme du NAD sur la fonction cardiaque et musculaire dans la cardiomyopathie dilatée

Robin Deloux

► **To cite this version:**

Robin Deloux. Effets de l'exercice et d'une modulation du métabolisme du NAD sur la fonction cardiaque et musculaire dans la cardiomyopathie dilatée. Cardiologie et système cardiovasculaire. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS545 . tel-03125325

HAL Id: tel-03125325

<https://theses.hal.science/tel-03125325>

Submitted on 29 Jan 2021

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.

Sorbonne Université

ED394 - Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

U1180 - Signalisation et physiopathologie cardiovasculaire

Effets de l'exercice et d'une modulation du métabolisme du NAD sur la fonction cardiaque et musculaire dans la cardiomyopathie dilatée

Par Robin DELOUX

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par Mathias MERICKSKAY

Présentée et soutenue publiquement le 28 novembre 2018

Devant un jury composé de :

Dr Athanassia Sotiropoulos	Rapporteur
Dr Timothy Wai	Rapporteur
Pr Jean-Sébastien Hulot	Examineur
Pr Charles Brenner	Examineur
Pr Onnik Agbulut	Président du jury
Dr Mathias Mericksay	Directeur de thèse

Table des abréviations

ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNmt	: ADN mitochondrial
Acétyl-CoA	: Acétyl-coenzyme A
ACC	: acétyl-CoA carboxylase
ACMS	: α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde
Ang-II	: angiotensine de type II
ANT	: adénine nucléotide translocase
ADPr	: adénosine diphosphate ribose
AG	: acide gras
AGNE	: acide gras non estérifié
AK	: adénylate kinase
ARTC	: Cholera toxin-like ADP-ribosyltransferase
ARTD	: Diphtheria toxin-like ADP-ribosyltransferase
ATP	: adénosine triphosphate
BSA	: bovine serum albumine
CK	: créatine kinase
CMD	: cardiomyopathie dilatée
COX	: cytochrome-c oxydase
CPS1	: carbamoyl phosphate synthétase I
CPT	: carnitine palmitoyl transferase
ERR	: récepteur lié aux oestrogènes
FABPpm	: plasma membrane fatty acid binding protein
FAT	: fatty acid translocase
FATP	: fatty acid transport protein
FoxO	: forkhead box protein O
G3P	: glycerol-3-phosphate
G6P	: Glucose-6-phosphate
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase
GDH	: glucose deshydrogénase
GLUT	: glucose transporter
GTP	: guanosine triphosphate
h/r	: ratio épaisseur/rayon du ventricule gauche en diastole
HIF1α	: hypoxia-inductible factor 1-alpha
HK	: hexokinase
IDH2	: isocitrate déshydrogénase 2
IDO	: indoleamine 2,3-Dioxygénase
IVS	: septum interventriculaire
LCAD	: long chain acyl-CoA deshydrogenase
LDH	: lactate déshydrogénase
LVPW	: paroi postérieure du ventricule gauche
MAL	: Megakaryocytic acute leukemia
MAPK	: mitogen-associated protein kinase

MRTFs : myocardin-related transcription factor
NA : acide nicotinique
NAM : nicotinamide
NAMN : nicotinic acid mononucleotide
NAPT : nicotinic acid phosphoribosyl transferase
NMN : nicotinamide mononucléotide
NNT : NAD(P) transhydrogénase
NR : nicotinamide riboside
NRF : nuclear respiratory factor
OPA1 : mitochondrial dynamin like GTPase
PARP : poly-ADP-ribosyl polymerase
PCr : phosphocréatine
PDH : pyruvate déshydrogénase
PDK : PDH kinase
PDP : PDH phosphatase
PE : phényléphrine
PFK : phosphofructokinase
PGC-1 α : peroxysome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PK : pyruvate kinase
PRPP : phosphoribosyl pyrophosphate
PPAR- γ : peroxysome proliferator-activated receptor gamma
QPRT : quinolinate phosphorybosyl transférase
SGLT : sodium-glucose transporter
SIRT : silent mating type information regulator two homolog
SMC : cellules musculaires lisses
SOD2 : superoxide dismutase 2
SREBP1 : sterol regulatory element-binding protein 2
TDO : tryptophane 2,3-dioxygénase
TRP : tryptophane
TRPM2 : transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2
VG : ventricule gauche

Table des matières

Table des abréviations	1
Table des matières	3
I. Introduction.....	6
1. Métabolisme énergétique et insuffisance cardiaque.....	7
1.1 <i>Métabolisme énergétique cardiaque normal</i>	7
1.1.1 Substrats et systèmes de production d'énergie.....	8
1.1.2 Systèmes de transfert d'énergie	15
1.1.3 La mitochondrie.....	18
1.2 <i>Insuffisance cardiaque et métabolisme énergétique</i>	24
1.2.1 Utilisation des substrats dans l'insuffisance cardiaque.....	26
1.2.2 Altération des systèmes de transfert d'énergie.....	28
1.2.3 Altération de la fonction mitochondriale	29
1.2.4 La cardiomyopathie dilatée : une forme sévère d'insuffisance cardiaque affectant le métabolisme énergétique.....	30
1.2.5. Le Serum Response Factor, un facteur de transcription impliqué dans la cardiomyopathie dilatée	32
1.2.6 Besoin de nouvelles thérapies contre les cardiomyopathies dilatées et l'insuffisance cardiaque : comment agir sur le métabolisme cardiaque ?....	37
2. Exercice musculaire.....	39
2.1 <i>Entraînement en endurance et métabolisme musculaire</i>	39
2.1.1 Entraînement et métabolisme cardiaque.....	39
2.1.2 Entraînement et métabolisme du muscle squelettique.....	40
2.2 <i>Modèles animaux d'entraînement en endurance</i>	42
3. Le NAD ⁺ , à l'interface entre métabolisme et signalisation.....	45
3.1 <i>Rôle de coenzyme dans le métabolisme énergétique</i>	45
3.2 <i>Rôle de signalisation</i>	47
3.3 <i>Voies de biosynthèse du NAD⁺</i>	54
4. Métabolisme du NAD ⁺ dans l'insuffisance cardiaque	65
4.1 <i>Chute du NAD⁺ dans le cœur insuffisant</i>	65
4.2 <i>Stratégies de stimulation du métabolisme du NAD⁺ par les vitamines B3</i> . 65	
II. Objectifs de thèse.....	68
III. Matériel et méthodes	71
3.1 Modèles animaux	72
3.1.1 <i>Modèle SRF^{HKO}</i>	72
3.1.2 <i>Modèle Nmrk2^{KO}</i>	73

3.1.3	Modèle <i>SRF^{HKO}-Nmrk2^{KO}</i>	74
3.1.4	Modèle <i>Nmrk2^{TG}</i>	74
3.2	Supplémentation en NR	75
3.3	Exercice musculaire.....	75
3.3.1	<i>Exercice volontaire</i>	75
3.3.2	<i>Entraînement en endurance</i>	76
3.4	Analyses fonctionnelles	76
3.4.1	<i>Échocardiographie</i>	76
3.4.2	<i>Test d'effort</i>	77
3.5	Analyses histologiques	77
3.5.1	<i>Fibrose cardiaque par coloration Rouge Sirius</i>	77
3.5.2	<i>Taille et type de fibre musculaire par marquage en immunohistochimie</i>	78
3.6	Modèles cellulaires.....	80
3.6.1	<i>Culture primaire de cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés</i>	80
3.6.2	<i>Culture primaire de cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes</i>	81
3.7	Analyses en biologie moléculaire	81
3.7.1	<i>Extraction et quantification du NAD</i>	81
3.7.2	<i>Mesure du niveau d'expression des gènes par RT-qPCR</i>	82
3.7.3	<i>Mesure de l'expression de protéines par Western-blot</i>	84
3.8	Étude du métabolisme énergétique.....	85
3.8.1	<i>Analyse de l'activité enzymatique</i>	85
3.8.2	<i>Analyses des capacités oxydatives et glycolytiques des cardiomyocytes en culture avec l'appareil Seahorse</i>	87
3.9	Analyses statistiques	89
IV.	Résultats	90
4.1	Impact de l'exercice volontaire sur l'insuffisance cardiaque induite par une cardiomyopathie dilatée	91
4.1.1	<i>Introduction</i>	91
4.1.2	<i>Résultats</i>	92
4.1.3	<i>Discussion</i>	102
4.2	Effets de la supplémentation en NR dans l'insuffisance cardiaque induite par la cardiomyopathie dilatée	105
4.2.1	<i>Introduction</i>	105
4.2.2	<i>Résultats</i>	106
4.2.3	<i>Discussion</i>	151
4.3	Rôle de la kinase NMRK2 dans le cœur à l'état basal	154
4.3.1	<i>Introduction</i>	154
4.3.2	<i>Résultats</i>	154
4.3.3	<i>Discussion</i>	200
4.4	Implication de la kinase NMRK2 dans la réponse à l'exercice dans le muscle strié squelettique et cardiaque	202

4.4.1 Introduction	202
4.4.2 Résultats.....	203
4.4.3 Discussion.....	213
4.5 Implication de la kinase NMRK2 dans les effets liés à la supplémentation au NR dans la cardiomyopathie dilatée	216
4.5.1 Introduction	216
4.5.2 Results	217
4.5.3 Discussion.....	227
V. Conclusion générale.....	230
Bibliographie.....	239
Table des illustrations	267

I. Introduction

1. Métabolisme énergétique et insuffisance cardiaque

1.1 Métabolisme énergétique cardiaque normal

Le cœur est l'organe de notre corps qui consomme la plus grande quantité d'énergie après le cerveau. C'est un organe très flexible en termes d'utilisation des substrats énergétiques, et il est souvent présenté comme un omnivore métabolique. Il est capable d'utiliser les acides gras, qui représentent sa source d'énergie majeure, mais utilise également les glucides, le lactate, les corps cétoniques et même les acides aminés et fonctions des conditions et de la demande énergétique.

La production d'énergie dans le cœur dépend jusqu'à 90% de la phosphorylation oxydative catalysée par la chaîne respiratoire mitochondriale (Ventura-clapier et al., 2011). Il est responsable de 11% de la consommation totale d'oxygène, ce qui fait de lui le tissu le plus oxydatif de l'organisme, sachant qu'il ne représente que 0.4% de la masse corporelle (Wilding et al., 2006). Pour fonctionner, le cœur utilise l'énergie stockée sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), qu'il synthétise à partir de trois voies métaboliques principales : la lipolyse des acides gras par la bêta-oxydation, la décarboxylation oxydative du pyruvate dans la mitochondrie, et la glycolyse.

L'énergie contenue dans la liaison phosphate du phosphate γ de l'ATP peut être transférée à la créatine par l'enzyme créatine kinase (CK) pour générer une molécule de phosphocréatine (PCr), qui permet à la fois de stocker l'énergie et d'améliorer les transferts énergétiques au sein de la cellule (mécanisme détaillé dans la section 1.1.2). Néanmoins, les réserves du cœur en ATP, 8 mM, et PCr, 15 mM, sont restreintes et ne lui permettent de fonctionner que quelques secondes sans oxygène, comme dans le cas d'un infarctus par exemple. Le cœur humain consomme ainsi plus de 30 kg d'ATP par jour avec une réserve inférieure au gramme, ce qui fait prendre conscience à quel point le cœur est un organe qui fonctionne en quasi flux tendu et doit jongler en permanence entre les différents substrats pour assurer ses besoins énergétiques. De manière générale et dans un cœur correctement perfusé, 60 à 90% de l'acétyl-CoA utilisé provient de la bêta-oxydation des

acides gras, et 10 à 40% proviennent de l'oxydation du pyruvate, issu en proportions approximativement égales de la glycolyse et de l'oxydation du lactate (Stanley et al., 2005). Ces proportions peuvent varier en fonction de la prise alimentaire, avec une glycolyse plus importante en période postprandiale ou une augmentation de l'oxydation des corps cétoniques en cas de jeûne prolongé. De manière générale, le cœur est un organe extrêmement flexible sur le plan énergétique.

1.1.1 Substrats et systèmes de production d'énergie

° **Beta-oxydation des acides gras**

Les acides gras utilisés par le cœur circulent dans le sang sous forme d'acides gras (AG) libres non estérifiés transportés par l'albumine, ou en tant que triglycérides contenus dans les lipoprotéines. Les plus petits AG peuvent passer les membranes plasmiques cellulaires, mais les molécules d'AG à de longueur supérieure à 12 carbones doivent entrer par l'intermédiaire de transporteurs transmembranaires, comme la *fatty acid translocase* (FAT), la *plasma membrane fatty acid binding protein* (FABPpm) et les *fatty acid transport protein* (FATP) (Glatz et al., 2006).

Une fois dans le cytoplasme, les AG sont soit stockés sous forme de triglycérides, soit activés par l'acétyl-CoA synthase. Cette réaction, nécessaire à l'entrée des AG dans la mitochondrie, y associe une molécule de coenzyme A afin de former un acyl-CoA, nécessitant l'utilisation d'une molécule d'ATP :



Les acyl-CoA à chaîne longue ainsi formés ne pouvant pas passer directement la membrane interne mitochondriale, ils doivent être pris en charge par un système de transport reposant sur les carnitines acyltransférases. Composé de deux enzymes majoritaires, les carnitines plamitoyl transférases I et II (CPT-I et II), ce système permet la mitochondriale *via* une transférase (Figure 1). L'utilisation des acides gras est d'ailleurs

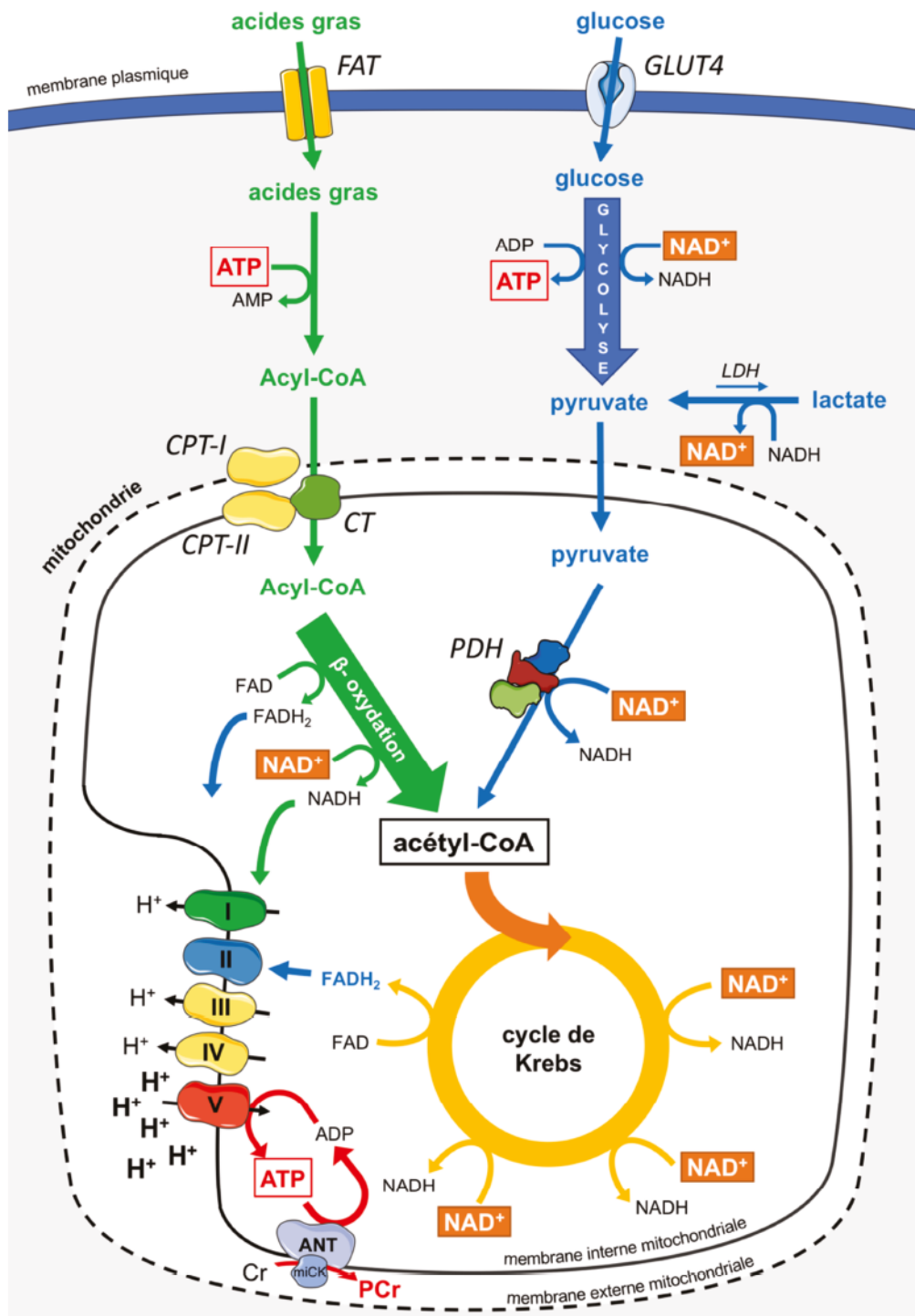


Figure 1 : Voies métaboliques de dégradation du glucose et des acides gras. Les acides gras entrent dans la cellule par les *fatty acid* translocases (FAT), puis sont activés en Acyl-CoA pour entrer dans la mitochondrie par le biais des *Carnitine palmitoyl transferase I* et *II*. Les acides gras subissent ensuite la β -oxydation, qui libère un FADH₂, un NADH et un Acétyl-CoA à chaque cycle. Le glucose passe la membrane plasmique via les transporteurs GLUT, et est utilisé dans la glycolyse pour produire de l'ATP dans le cytosol. Le pyruvate issu de la glycolyse peut entrer dans la mitochondrie et former de l'Acétyl-CoA ou former du lactate dans le cytosol. L'Acétyl-CoA est utilisé dans le cycle de Krebs pour former de 3 molécules de NAD⁺ et un FADH₂, qui sont ensuite oxydés par la chaîne respiratoire mitochondriale pour former de l'ATP.

principalement régulée au niveau de la transférase CPT-I, qui peut être régulée de façon transcriptionnelle mais aussi de façon plus dynamique par son inhibition par le malonyl-CoA synthétisé à partir de l'acétyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). Dans le contexte de forte demande énergétique induit par l'exercice par exemple, l'accélération de la consommation des intermédiaires du cycle de Krebs par la chaîne respiratoire induit une réduction de la concentration en l'acétyl-CoA, ce qui réduit en conséquence sa biodisponibilité pour l'ACC et donc la production de malonyl-CoA, favorisant ainsi l'import de davantage d'acides gras par CPT1. Ce n'est que dans des conditions particulières de stress cardiaque aigu comme l'ischémie que la réduction en malonyl-CoA peut être une cause plus directe de l'augmentation de l'utilisation des acides gras, lorsqu'elle est liée à une inhibition de l'ACC par l'AMPK, la kinase senseur du stress énergétique activée par l'augmentation des taux d'AMP et d'ADP dans cette condition (Saks et al., 2006).

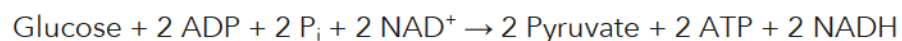
Une fois dans la mitochondrie, les acyl-CoA subissent les réactions de β -oxydation qui vont permettre la synthèse de molécules d'acétyl-CoA à partir de leurs longues chaînes carbonées. Chaque « tour » de β -oxydation libère deux carbones des acides gras activés pour produire une molécule d'acétyl-CoA et deux équivalents réduits (un NADH et un FADH₂). Pour les acides gras ayant un nombre pair de carbones, l'oxydation d'une molécule entière produira un nombre de molécules d'acétyl-CoA équivalent à la moitié du nombre de carbones. Pour les acides gras à nombre impair de carbones, la dernière réaction génère un acétyl-CoA et un propionyl-CoA qui sera converti en succinyl-CoA également utilisable par le cycle de Krebs. Parmi les différents substrats, l'utilisation des acides gras présente ainsi le meilleur rendement en ATP par carbone utilisé, mais nécessite cependant plus d'oxygène pour produire cette énergie, le quotient respiratoire (CO_2 éliminé / O_2 consommé) des acides gras est en effet de 0,7 en moyenne contre 1 pour le glucose. Par exemple, pour la dégradation complète d'une molécule de palmitate (16 carbones), le bilan est de 129 molécules d'ATP produites.

° Glycolyse

Le glucose est importé dans les cardiomyocytes par deux types de transporteurs transmembranaires, les *sodium glucose-linked transporters* (SGLT) et les *glucose transporters* 1 (GLUT1) et 4 (GLUT4). GLUT1 est un transporteur exprimé principalement dans le cerveau et les érythrocytes, mais également de façon plus minoritaire à la membrane des cellules des muscles cardiaque et squelettique, du foie et du tissu adipeux. GLUT4 est le transporteur du glucose majoritaire dans les cellules musculaires, et présente à la différence de GLUT1 la particularité de répondre à la stimulation de l'insuline. En effet lorsque la glycémie est élevée, l'insuline stimule la translocation à la membrane plasmique de vésicules intracellulaires contenant GLUT4, permettant ainsi une augmentation très rapide des capacités de transport du glucose (Wood & Trayhurn, 2003).

Une fois le glucose importé dans la cellule, il est phosphorylé par l'hexokinase pour former du glucose-6-phosphate (G6P). Le G6P peut alors être utilisé dans différentes voies métaboliques en fonction de la demande et des différents besoins énergétiques, comme la glycolyse pour générer du pyruvate, le stockage sous forme de glycogène, ou être dirigé vers la voie de biosynthèse des hexosamines ou des pentoses phosphates.

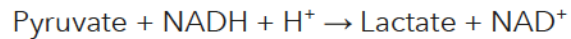
À la différence de la β -oxydation des acides gras qui se déroule dans la mitochondrie, la dégradation du glucose en pyruvate par la glycolyse est un mécanisme purement cytosolique. La glycolyse divise une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate, pour une production nette de 2 ATP et une consommation de deux molécules de NAD^+ :



Ce bilan est relativement faible comparé à l'oxydation des acides gras, et c'est pourquoi l'ATP produit par le myocarde provenant directement de la glycolyse ne représente que 4% de l'ATP total (Kobayashi & Neely, 1979). Cependant sa contribution ne doit pas être négligée car elle semble particulièrement utile pour l'homéostasie du calcium dans les cardiomyocytes. En effet, les différentes enzymes de la glycolyse s'associent entre elles pour former des complexes glycolytiques à proximité du réticulum sarcoplasmique de

manière à y fournir préférentiellement l'ATP qu'elles produisent, et semblent ainsi favoriser la recapture du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique et la relaxation diastolique (Entman et al., 1977; Kusuoka & Marban, 1994).

Le pyruvate produit peut être réduit en lactate en condition d'anaérobie par la lactate déshydrogénase (LDH), réoxydant ainsi le NADH utilisé par la glycolyse :



En présence d'oxygène, le pyruvate formé par la glycolyse n'est pas réduit en lactate mais est dirigé vers la mitochondrie pour donner de l'acétyl-CoA par une réaction de décarboxylation oxydative catalysée par la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'activité de la PDH est régulée par une PDH kinase (PDK) et une PDH phosphatase (PDP), qui inhibent et activent respectivement la PDH. Quatre isoformes de PDK sont connues, la PDK4 étant la forme prédominante dans le cœur.

Lorsque le glucose est utilisé pour entrer sous forme d'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs en condition d'aérobie, son rendement énergétique est élevé à 38 molécules d'ATP produites par molécule de glucose. La glycolyse aérobie est régulée dans les cellules musculaires par les enzymes hexokinase (HK), phosphofructokinase (PFK), glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et pyruvate kinase (PK).

° Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, ou cycle des acides tricarboxyliques, est un cycle commun pour l'oxydation des glucides, des lipides et acides aminés. Une fois transformés en acétyl-CoA, ces substrats subissent une série de réactions de décarboxylation oxydative dans la matrice mitochondriale. Pour chaque molécule d'acétyl-CoA oxydée, quatre équivalents réduits (3 NADH et 1 FADH_2) sont produits et vont pouvoir être oxydés à leur tour par la chaîne respiratoire pour produire de l'ATP.

Les équivalents réduits produits en dehors de la mitochondrie, comme le NADH produit par la glycolyse dans le cytosol, ne peuvent pas passer la membrane interne de la mitochondrie pour atteindre la chaîne respiratoire et nécessitent d'être transportés par un système de « navettes ». Il existe ainsi deux mécanismes pour transporter le NADH cytosolique dans la mitochondrie pour qu'il soit oxydé : la navette malate/aspartate, dont le bilan est la consommation d'une molécule de NADH dans le cytosol au profit de la production d'une autre molécule de NADH dans la matrice, et la navette à glycérol-3-phosphate (G3P), qui consomme également une molécule de NADH cytosolique mais produit en contrepartie une molécule de FADH_2 dans la matrice mitochondriale. Le muscle cardiaque oxydatif utilise en majorité la navette malate/aspartate mais les muscles squelettiques glycolytiques, avec un profil métabolique anaérobie dominant, utilisent davantage la navette à G3P (Picard et al., 2012).

° La chaîne respiratoire mitochondriale

La chaîne respiratoire est composée de cinq complexes enzymatiques, localisés à la membrane interne mitochondriale (Figure 2) : le complexe I ou NADH déshydrogénase, le complexe II ou succinate déshydrogénase, le complexe III ou coenzyme Q déshydrogénase, le complexe IV ou cytochrome c oxydase et le complexe V ou ATP synthase.

L'oxydation du NADH a lieu au niveau du complexe I et celle du FADH_2 se déroule au niveau du complexe II. L'oxydation des deux équivalents réduits libère des électrons qui sont transportés le long de la chaîne respiratoire mitochondriale, que l'on appelle aussi pour cette raison chaîne de transport d'électrons, jusqu'aux complexes III et IV par le biais de l'ubiquinone puis du cytochrome c. Les électrons produits suivent ainsi un gradient décroissant du potentiel d'oxydoréduction, pour être acceptés au niveau du complexe IV par l'oxygène, qui est alors réduit en deux molécules d'eau. On a longtemps pensé que les différents complexes de la chaîne respiratoire n'étaient pas physiquement positionnés dans l'ordre précis du gradient décroissant de leur potentiel redox et qu'ils diffusaient librement dans la membrane, l'ubiquinone et le cytochrome c circulant librement entre les différents

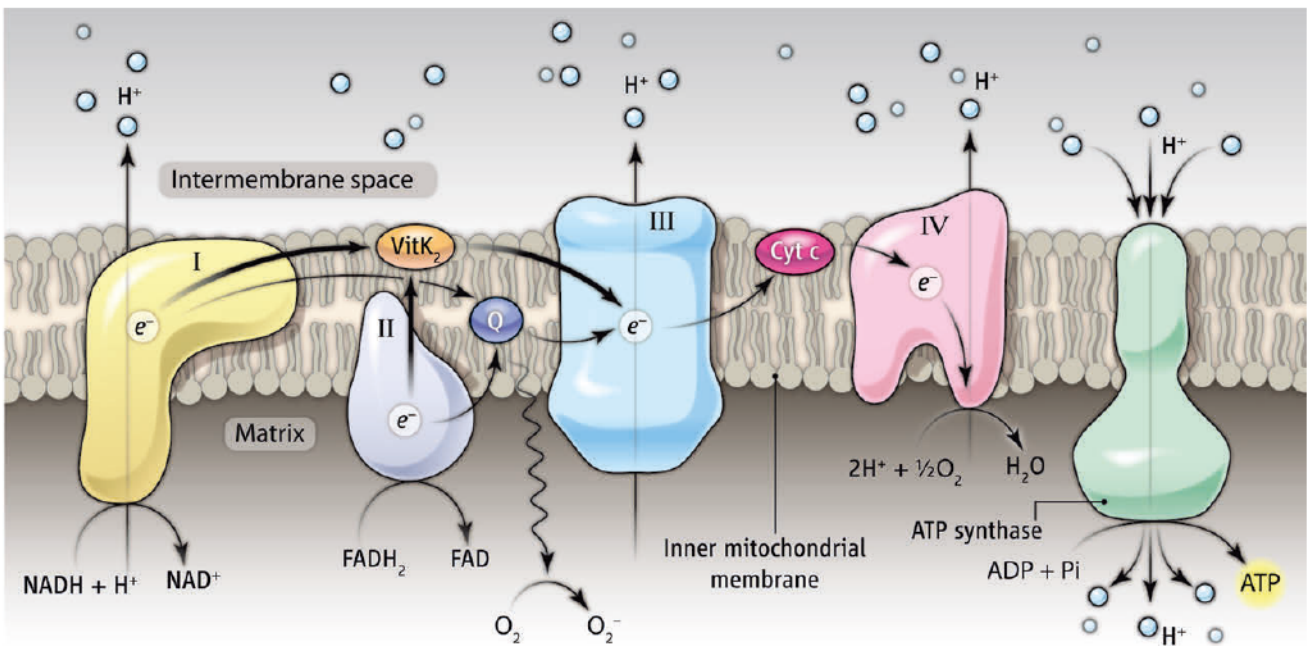


Figure 2 : La chaîne respiratoire mitochondriale. L'énergie créée par le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire est utilisée par les complexes I (NADH coenzyme Q réductase), le complexe III (cytochrome bc_1) et le complexe IV (cytochrome c oxydase) pour pomper des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. L'ATP synthase utilise le flux de protons réentrant dans la matrice pour générer de l'ATP à partir d'ADP et d'un phosphate inorganique (P_i). Figure modifiée d'après Bhalerao & Clandinin, 2012.

complexes. Cependant, depuis une dizaine d'années et le développement des techniques d'électrophorèse non dénaturante, émerge l'évidence que les complexes peuvent s'organiser en supercomplexes composés du complexe I et de un ou plusieurs exemplaires des complexes III et IV, mais leurs avantages structurels et fonctionnels restent cependant sujets à débat (Milenkovic et al., 2017).

L'énergie libérée par les réactions d'oxydoréduction le long de la chaîne respiratoire est utilisée au niveau des complexes I, III et IV pour faire sortir des protons de la matrice mitochondriale dans l'espace intermembranaire. Le gradient de protons qui en résulte permet de générer la force protomotrice qui fait fonctionner l'ATP synthase (complexe V). Il existe donc un couplage entre l'oxydation des équivalents réduits et la phosphorylation de l'ADP, et c'est pour cette raison que la réoxydation du NADH en NAD⁺ (qui utilise trois complexes : I, III et IV) permet de former d'avantage d'ATP que celle du FADH₂ et FAD (qui n'utilise que les complexes III et IV).

1.1.2 Systèmes de transfert d'énergie

L'ATP produit par la chaîne respiratoire doit ressortir de la mitochondrie pour être utilisé notamment au niveau des myofibrilles et permettre la contraction musculaire. Pour cela, une ADP/ATP translocase ou adénine nucléotide transférase (ANT) située à la membrane interne permet la sortie de l'ATP en échange de l'entrée d'une molécule d'ADP. Mais le cytoplasme est constitué de multiples compartiments, plus ou moins séparés par des barrières physiques ou fonctionnelles. La production d'énergie est souvent associée localement aux domaines consommateurs, comme par exemple à la membrane plasmique où il existe des complexes glycolytiques regroupant les enzymes de la glycolyse sous forme de multicomplexes enzymatiques, permettant d'approvisionner localement les canaux ioniques nécessitant de l'ATP à la membrane plasmique. Il en est de même au niveau du réticulum sarcoplasmique où des complexes fournissent localement l'ATP nécessaire au transport du Ca²⁺ (Xu et al., 1995). En parallèle de cette compartimentalisation, des systèmes de transfert d'énergie existent entre les lieux de production et de consommation

d'énergie de manière à limiter au maximum les contraintes de diffusion, comme par exemple entre les mitochondries et les myofilaments.

° Le système créatine kinase

Le système créatine kinase (CK) joue un rôle majeur dans la distribution de l'énergie dans la cellule musculaire. Il permet de faire le lien entre sites de production et de consommation de l'ATP, comme observé entre mitochondries et appareil contractile, mitochondrie et réticulum sarcoplasmique ou encore noyau et mitochondrie (Kaasik et al., 2001).

La CK a été identifiée dès les années 1970 comme système de transport principal dans les cellules à haute consommation énergétique comme les cardiomyocytes et les cellules du muscle strié. Elle permet le transfert réversible d'un groupement phosphate d'un ATP vers une molécule de créatine. Quatre isoformes différentes ont été décrites et s'expriment de façon tissu spécifique. Les cellules musculaires expriment trois isoformes de cette enzyme : M pour *muscle* et B pour *brain* qui sont cytosoliques, et une isoforme mitochondriale, la mi-CK. Les isoformes M et B forment des isoenzymes dimériques MM, BB et MB ; l'isoforme mi-CK peut former des structures dimériques ou octamériques (Wyss et al., 1992) et représente à elle seule 20 à 40% de l'activité CK dans les cellules cardiaques.

Alors que la mi-CK est responsable de la formation de phosphocréatine à partir d'ATP et de créatine à proximité du complexe V de chaîne respiratoire, les isoformes cytosoliques permettent à l'inverse de régénérer de l'ATP à partir de PCr et d'ADP et agissent comme des régulatrices locales des pools d'ATP (Figure 3). Ces couplages fonctionnels et localisés entre la génération d'ATP ou les sites de consommation et les CK contrôlent ainsi localement les ratios ATP/ADP, qui favorisent la production d'énergie à la mitochondrie (ratio ATP/ADP faible) et la consommation dans les différents compartiments cytosoliques (ratio ATP/ADP élevé). En fonctionnant globalement près de son équilibre, les CK cytosoliques agissent comme un système tampon temporel et spatial de l'ATP cellulaire

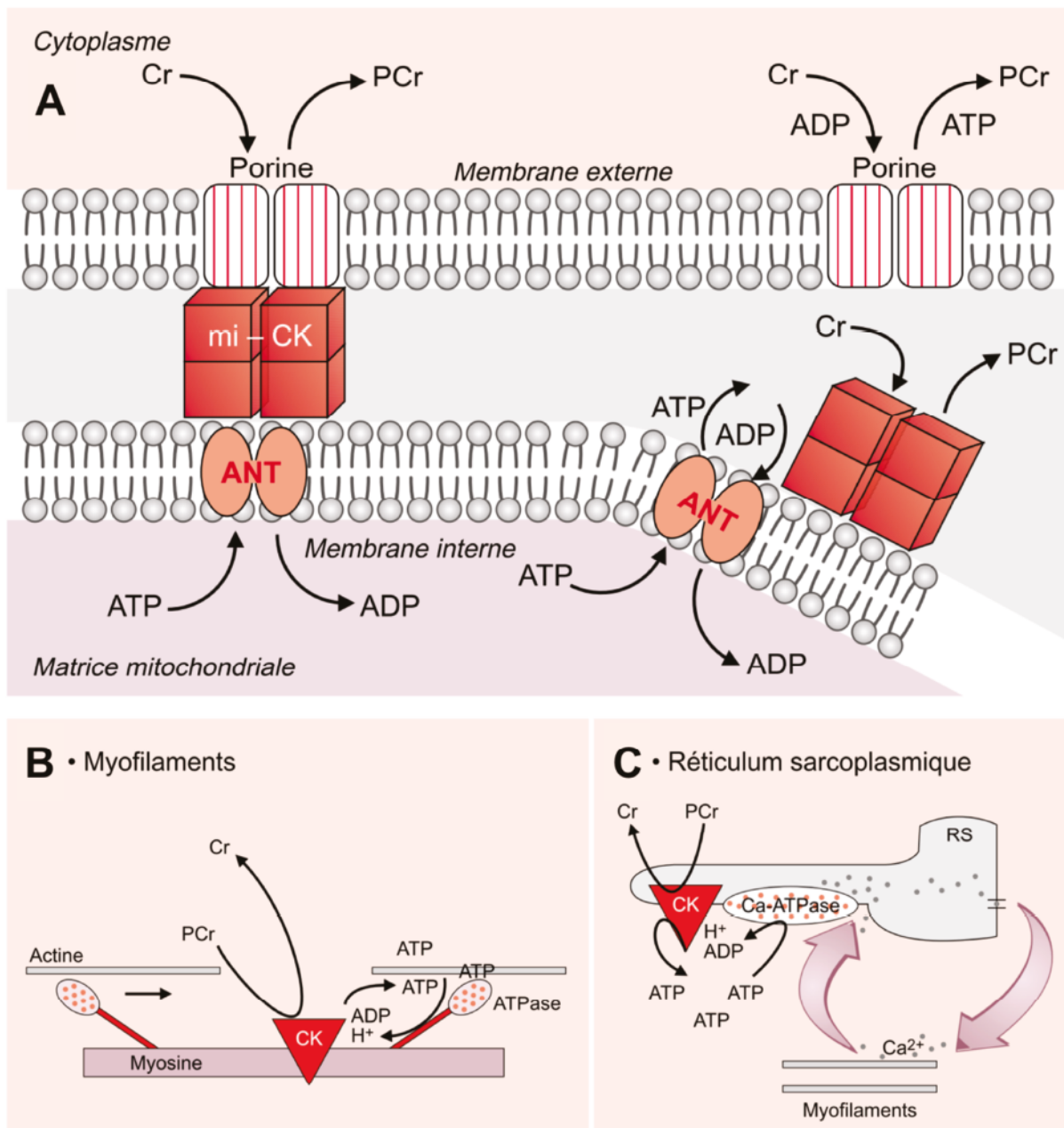


Figure 3 : Compartimentalisation mitochondriale et cytosolique de la CK. A. La créatine kinase mitochondriale (mi-CK) est localisée à la face externe de la membrane mitochondriale interne à proximité de l'adénine nucléotide translocase (ANT). L'ATP produit par la chaîne respiratoire est exporté de la matrice par la translocase et déphosphorylé par la mi-CK qui transfère la liaison phosphate sur la créatine. **B.** La CK MM est localisée au niveau des filaments de myosine et permet localement le maintien d'un rapport ATP/ADP favorable à l'activité des ATPases. **C.** Au niveau du réticulum sarcoplasmique, la CK fonctionne en synergie avec les ATPases qui assurent la recapture du calcium dans le réticulum sarcoplasmique. Figure modifiée d'après Ventura-Clapier R, médecine/science, 1998.

et la PCr comme une forme de réservoir énergétique rapidement mobilisable (Saks et al., 1996; Ventura-Clapier, 1998).

° **Le système adénylate kinase**

L'adénylate kinase (AK) est une enzyme qui catalyse de façon réversible le transfert d'un phosphate et de sa liaison riche en énergie entre deux nucléosides diphosphates, produisant ainsi une molécule d'ATP à partir de deux molécules d'ADP. Elle est également impliquée dans l'homéostasie énergétique du myocarde et du muscle squelettique (Savabi, 1994) via son couplage avec les sites producteurs et consommateurs d'ATP. Elle assure également un rôle déterminant dans la transduction du signal énergétique mitochondriale vers le sarcolemme via le canal K_{ATP} et potentiellement d'autres transporteurs sensibles à l'ATP pour moduler le potentiel membranaire.

1.1.3 La mitochondrie

° **Structure et fonctions**

La mitochondrie est un organite cellulaire hautement spécialisé, et agissant comme centre énergétique cellulaire, puisque comme nous venons de le voir, elle est responsable de la production aérobie d'ATP. Elle a cependant d'autres fonctions essentielles comme la régulation du pH cellulaire, la synthèse des hormones stéroïdes à partir du cholestérol, la synthèse des hèmes, la thermogénèse ou encore le déclenchement des voies de mort cellulaires programmées *via* le cytochrome c.

Elle serait la lointaine descendante d'une bactérie phagocytée par les premiers eucaryotes et aurait perduré et se serait spécialisée au cours de l'évolution pour devenir l'organite que l'on connaît aujourd'hui. Cette hypothèse, qu'on appelle de l'endosymbiose, fut développée par Lynn Margulis dès 1966, puis fut appuyée par la découverte de l'ADN mitochondrial (ADNmt) en 1980. À l'exception des érythrocytes, toutes les cellules de

mammifères possèdent des mitochondries. Devenues essentielles pour pratiquement toutes les cellules eucaryotes, leur distribution et leur nombre diffère selon le tissu considéré. Dans le muscle strié oxydatif, on trouve ainsi deux populations distinctes de mitochondries, insérées entre les myofibrilles qu'on appelle mitochondries interfibrillaires, et situées sous la membrane plasmique qu'on appelle mitochondries subsarcolemmales. La proportion relative de ces deux populations n'est pas aléatoire et reflète l'état physiologique ou pathologique du tissu musculaire, comme dans certaines cardiomyopathies ou la dystrophie musculaire (Novotová et al., 2006).

D'une dimension de 1 à 2 μM de long et 0,5 à 1 μM de large, elles se présentent comme des structures très dynamiques, en forme de bâtonnets et organisées en réseau, animées de mouvements de fission et de fusion rapides. Elles se composent de deux bicouches phospholipidiques, une interne et une externe, qui délimitent ainsi trois milieux : le cytosol, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale.

La membrane externe contient de nombreuses porines, protéines formant des canaux aqueux au travers de la membrane, la rendant perméable aux molécules inférieures à 10 kDa comme l'ATP, l'ADP et la plupart des ions et des substrats. La membrane interne en revanche est beaucoup moins perméable que la membrane externe, du fait de la plus forte densité en protéines membranaires, et la plupart des molécules doivent passer par des transporteurs transmembranaires pour pouvoir entrer dans la matrice et inversement.

Un dogme existe sur le fait que les structures formant des crêtes à l'intérieur de la matrice mitochondriale et où se déroule entre autres la phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire, sont de simples replis et invaginations de la membrane interne. Mais il est aujourd'hui démontré que ces crêtes sont en réalité structurellement indépendantes et de forme majoritairement tubulaire, et rattachées à la membrane interne par d'étroites structures jonctionnelles (Freya & Mannellab, 2000). Ces crêtes permettent d'augmenter de façon considérable la surface membranaire et ainsi les capacités de respiration mitochondriale, et leur densité reflète les besoins énergétiques cellulaires.

La matrice contient les enzymes responsables du cycle de Krebs, les enzymes de la biosynthèse, les enzymes anti-oxydantes, la machinerie de synthèse protéique (ADN, ARNt, ribosomes). Plusieurs protéines de la régulation de la mort cellulaires sont aussi présentes dans la matrice, comme la cyclophiline D qui interagit avec le pore de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP) et des protéines de la voie de l'apoptose comme la famille des Bax/Bcl-2.

° Biogenèse et dynamique mitochondriale

La biogenèse mitochondriale est l'ensemble des mécanismes impliqués dans les processus de développement de la masse mitochondriale et du nombre de mitochondries en réponse à différents signaux de stress énergétique. Elle inclut l'expression de protéines mitochondriales et sa modulation, la synthèse des phospholipides membranaires, l'import de protéines mitochondriales. Elle permet de répondre et de s'adapter à différents stimuli environnementaux comme l'exercice physique, la restriction calorique ou le stress oxydant pour n'en citer que quelques-uns. Les mitochondries sont ainsi capables d'une grande plasticité qui se caractérise par des changements de taille, de nombre et d'aspect, et forment ce que certains appellent un « réticulum » mitochondrial, en particulier dans le cas de tissus hautement oxydatifs comme le muscle strié (Nisoli et al., 2003). Ainsi dans le muscle squelettique par exemple, la biogénèse mitochondriale est fortement stimulée par l'exercice musculaire de manière à augmenter les capacités oxydatives (Hood et al., 2011). La modulation des concentrations calciques par l'exercice pourrait être impliquée dans cette adaptation, une augmentation de la concentration calcique intracellulaire ayant été démontrée comme liée à une augmentation de l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines mitochondriales (Hood, 2006).

La dynamique du réseau mitochondrial est également modulée par des mécanismes de fusion et de fission finement contrôlés. Chez les mammifères, la fission des mitochondries est régulée par la *dynamin-related protein 1* (DRP1) et son récepteur *fission-mediator protein 1* (FIS1) (Liesa et al., 2009). Les mécanismes de fusion sont eux

médiés par deux mitofusines (MFN1 et MFN2) impliquées dans la fusion de la membrane interne (Legros et al., 2002), et l'*optic atrophic type 1 protein* (OPA1) à la membrane externe (Olichon et al., 2002).

Du fait de son origine bactérienne, la mitochondrie possède son propre génome qui encode 37 protéines représentant 2% des protéines mitochondriales, les 98% restant étant encodés par l'ADN nucléaire. Ainsi, une coordination spatiale et temporelle de la synthèse des protéines, de l'import des protéines d'origine nucléaire et de l'assemblage avec les protéines d'origine mitochondriales est essentielle pour assurer une biogénèse mitochondriale correcte. La réplication de l'ADN mitochondrial, et les mécanismes de fusion et de fission doivent aussi être coordonnés.

La réplication du génome mitochondrial est effectuée sous le contrôle d'un facteur de transcription mitochondrial A (TFAM), encodé par le génome nucléaire. Il s'associe au sein des complexes nucléoïdes qui contiennent l'ADN mitochondrial et s'associent à l'ARN polymérase mitochondriale pour réguler la transcription du génome mitochondrial. Des études de gain et perte de fonction du gène ont montré que TFAM est un déterminant du nombre de copies de l'ADNmt, et que ce contrôle est indépendant de ses fonctions de facteur de transcription, soulignant son rôle dans la réplication (Scarpulla, 2008). De plus, il a été démontré que la phosphorylation oxydative mitochondriale est finement contrôlée par la quantité d'ADNmt cellulaire (Rocher et al., 2008). Cependant TFAM n'est pas le seul facteur impliqué dans la régulation du génome mitochondriale, et il existe d'autres acteurs comme les *mitochondrial transcription factors B1* et *B2* (TFB1M et TFB2M) et le *mitochondrial transcription termination factor* (mTERF). À l'heure actuelle les fonctions spécifiques de TFB1M et TFB2M ne sont pas très bien connues, bien que TFB2M semble essentiel pour réguler le nombre de copies d'ADNmt (Correia et al., 2011).

Les *nuclear respiratory factors* (NRF1 et NRF2) sont d'autres facteurs de transcription nucléaires impliqués dans la biogénèse mitochondriale. NRF1 est connu pour réguler à la fois l'expression de gènes nucléaires impliqués dans la phosphorylation oxydative (sous-unité VIc de la cytochrome oxydase, protéine liée à l'ubiquinone et sous-unité γ de l'ATP synthase) mais aussi dans la réplication et la transcription de l'ADNmt (endonucléase

ribonulcléoprotéique) *via* notamment l'activation de TFAM dont nous venons de parler. Ce facteur participe ainsi à la coordination nécessaire entre les génomes nucléaires et mitochondriaux. L'activité de NRF2 est moins connue, mais il semble que son activité dépende de l'état redox cellulaire, et qu'il soit plus important chez les rongeurs que chez l'homme (Garnier et al., 2003).

Le *peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α* (PGC-1α) est le régulateur central de la biogénèse mitochondriale (Puigserver et al., 1998). À travers son interaction avec de multiples facteurs de transcriptions de la famille des récepteurs nucléaires comme les *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs), les récepteurs apparentés aux oestrogènes (ERRs) et les *nuclear respiratory factors* (NRFs), PGC-1α augmente les capacités d'oxydation des acides gras et de phosphorylation oxydative par les mitochondries et induit l'expression coordonnée de gènes nucléaires et mitochondriaux impliqués dans la stimulation de la biogénèse mitochondriale (Lin et al., 2005; Puigserver & Spiegelman, 2003; Ventura-Clapier et al., 2008). PGC-1α active en effet la transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial en activant la transcription puis coactivant les NRFs, qui activent ensuite TFAM, encodé par le génome nucléaire. PGC-1α active d'autres récepteurs et facteurs de transcription nucléaires impliqués dans la biogénèse mitochondriale (Figure 4). Les principaux régulateurs de la β-oxydation des acides gras sont PPARα et PPARδ, et l'activation de PPARα induit une réponse transcriptionnelle augmentant l'expression des enzymes de la β-oxydation (Barger & Kelly, 2000). PPARδ est un facteur de transcription essentiel pour la protection mitochondriale et la biogénèse (P. Wang et al., 2010). ERRα active une partie des cibles de PPARα impliquées dans de multiples voies de production de l'énergie, comme le transport des acides gras, l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie et le péroxisome ou la respiration mitochondriale (Huss et al., 2004).

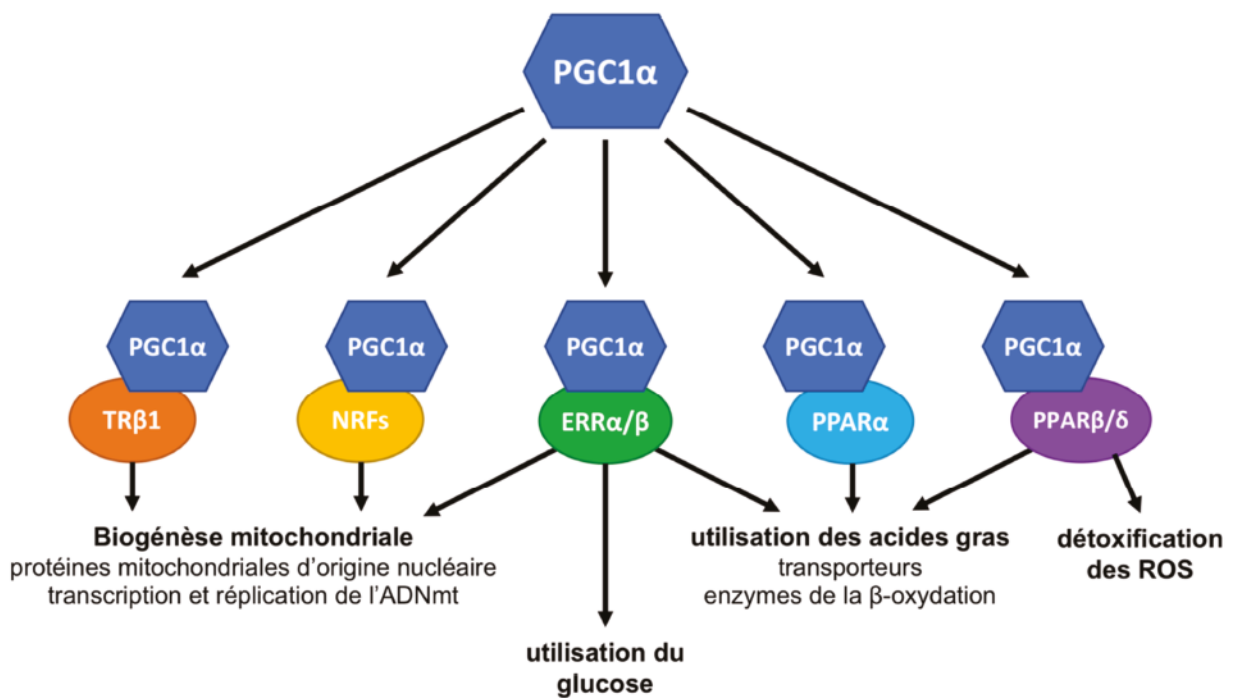


Figure 4 : Cascade de régulation coordonnée par PGC-1α. PGC-1α co-active différents facteurs de transcription comme les récepteurs aux hormones thyroïdiennes beta (TRβ1), les *nuclear respiratory factors* (NRFs), les récepteurs aux oestrogènes (ERRs) et les *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs), pour réguler différents aspects du métabolisme énergétique comme la biogénèse mitochondriale, l'utilisation des différents substrats ou la détoxication des espèces réactives de l'oxygène. (Figure adaptée d'après R. Ventura-Clapier et al. 2011).

1.2 Insuffisance cardiaque et métabolisme énergétique

Afin d'assurer les besoins énergétiques de sa contractilité permanente, le cœur dépend de l'apport en oxygène et en substrats oxydables qui lui permettent de générer en quantité suffisante l'ATP dont il a besoin pour subvenir à ce travail continu. L'insuffisance cardiaque est un syndrome complexe et multifactoriel, définie par l'OMS comme l'incapacité du cœur à assurer un débit cardiaque suffisant pour répondre aux besoins énergétiques de l'organisme. Elle est l'étape terminale de la majorité des pathologies cardiovasculaires, et reste la principale cause de mortalité dans le monde en dépit d'avancées majeures dans le développement de nouveaux traitements, en particulier au sein de la population âgée.

Elle peut résulter d'un trouble du remplissage ventriculaire dans lequel le cœur n'arrive plus à capter suffisamment de sang pour le renvoyer dans l'organisme (on parle alors de dysfonction diastolique) ou d'un trouble de l'éjection dans lequel le cœur n'est plus capable de fournir l'énergie nécessaire à l'expulsion du sang vers la circulation pulmonaire et/ou systémique (on parle de dysfonction systolique). Ces dysfonctions peuvent coexister.

Une des conséquences de ces dysfonctions cardiaques précoces est très souvent un déséquilibre entre la demande et la production d'énergie, entre le travail développé et les capacités de production (Figure 5). Ce déséquilibre peut être initié par la diminution du transport de l'oxygène induite par l'hypoxie chronique, l'athérosclérose, l'inflammation du myocarde, des atteintes coronariennes ou encore des atteintes mitochondriales induites par des facteurs génétiques ou environnementaux. Il peut également résulter d'une surcharge de travail induite par une hypertension systémique, une insuffisance valvulaire ou par une atteinte précoce de la structure cardiaque suite à un infarctus par exemple. Certaines dysfonctions n'ont d'ailleurs pas de cause identifiée, on parle alors de cardiomyopathie idiopathique. Une conséquence majeure de l'insuffisance cardiaque est que l'oxygène et les substrats ne sont plus délivrés correctement aux organes périphériques et les déchets métaboliques ne sont plus éliminés efficacement, induisant un état de déséquilibre énergétique à l'échelle de l'organisme tout entier. Les organes périphériques développent alors des atteintes irréversibles qui dans un second temps deviennent

↗ coût énergétique de la contraction ventriculaire

↗ demande contractile
↗ demande en Ca^{2+}
↘ efficacité contractile



↘ capacité de production

↘ beta oxydation des acides gras
↘ capacité de la CRM
↘ systèmes de transfert d'énergie
↘ efficacité énergétique

Figure 5 : Déséquilibre énergétique dans l'insuffisance cardiaque. L'insuffisance cardiaque est caractérisée par une augmentation de la demande énergétique liée à une réduction de l'efficacité contractile et une augmentation des besoins en Ca^{2+} , alors que les capacités de productions sont diminuées en raison d'une baisse de l'utilisation des acides gras, des capacités de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) et une altération des mécanismes de transfert d'énergie.

intrinsèques et indépendantes de la réduction de la perfusion sanguine *per se*. Ces atteintes généralisées, incluant des phénomènes d'atrophie du muscle squelettique, contribuent à la diminution de la capacité à l'effort et la réduction de la qualité de vie des patients (Mettauer et al., 2006). A l'heure actuelle, très peu de molécules pharmacologiques ont atteint le stade de l'utilisation en clinique pour traiter la dysfonction énergétique dans l'insuffisance cardiaque.

Au stade précoce, la dysfonction cardiaque lorsqu'elle est due à une augmentation de la post-charge comme dans les cas d'hypertension ou de sténose aortique initie une réponse adaptative qui consiste classiquement en l'hypertrophie concentrique du ventricule gauche, c'est-à-dire un épaississement de la paroi pour compenser le stress pariétal. Cette hypertrophie est associée à un remodelage métabolique qui sera détaillé dans les paragraphes suivants. Cependant, lorsque ce stress cardiaque dépasse les capacités d'adaptation ou perdure trop longtemps, il peut être suivi d'une hypertrophie excessive et maladaptative, induisant une dysfonction contractile non compensée, une dilatation progressive des ventricules et *in fine* sur l'insuffisance cardiaque. Le déséquilibre énergétique décrit précédemment, renforcé par ces mécanismes maladaptatifs, induit alors un état de forte privation énergétique du myocarde, qui est de plus en plus considéré comme un facteur central de la progression vers l'insuffisance cardiaque (Bottomley et al., 2013; Dzeja et al., 2000; Ingwall & Weiss, 2004; Neubauer, 2007; Ventura-Clapier et al., 2004).

1.2.1 Utilisation des substrats dans l'insuffisance cardiaque

Il est communément admis que de façon précoce lors de la phase adaptative de l'hypertrophie cardiaque, on observe une transition de la source d'énergie majoritaire du myocarde qui passe des acides gras vers une oxydation préférentielle du glucose (Ventura-Clapier et al., 2004). Cette adaptation métabolique n'est pas retrouvée dans l'hypertrophie adaptative du sportif ou de la femme enceinte par exemple, chez qui on observe plutôt une augmentation des capacités mitochondriales d'oxydation des acides gras. Il n'y a donc ainsi

pas de signature métabolique unique de l'hypertrophie, et les adaptations métaboliques qui en découlent sont davantage liées à la nature du stimulus hypertrophique qu'à l'hypertrophie en elle-même (Rimbaud et al., 2009).

Dans le cas de l'hypertrophie induite par les dysfonctions cardiaques précédemment décrites, la transition métabolique de l'utilisation des acides gras vers celle du glucose constitue un retour au métabolisme cardiaque de type fœtal. Elle est également associée à un déficit des systèmes de stockage et de transfert d'énergie, ainsi que des fonctions mitochondriales.

° Utilisation des acides gras dans l'insuffisance cardiaque

Chez l'homme, plusieurs études ont clairement démontré cette transition métabolique et une diminution de l'expression des enzymes impliquées dans l'utilisation des acides gras (Razeghi et al., 2001; Sack et al., 1996). On observe notamment une réduction significative de l'expression des Acyl-CoA déshydrogénases (LCAD et MCAD) ainsi que de la CPT1. Il en est de même chez le rat, où l'expression de MCAD notamment est significativement réduite dans un modèle d'infarctus (Rosenblatt-Velin et al., 2001). Ceci est corrélé à une réduction de l'ordre de 40% de l'oxydation des acides gras (Lei et al., 2004). L'expression de CPT1 et MCAD en particulier est régulée en temps normal par PPAR α , or son niveau d'expression protéique est réduit de l'ordre 54% dans le cœur humain dès la phase d'insuffisance cardiaque compensée (Karbowska et al., 2003). Ainsi, il a été proposé que la diminution de l'oxydation des acides gras passerait pas une réduction de la voie PPAR α /RXR α (Osorio et al., 2002; Van Bilsen, 2004).

° Utilisation du glucose dans l'insuffisance cardiaque

Dans une tentative de compensation de la chute des capacités oxydatives et de la production d'ATP dans le cœur insuffisant, la glycolyse est transitoirement augmentée. Ainsi, l'entrée du glucose, l'expression du transporteur GLUT1 et l'activité de la PFK1 sont

partiellement augmentés dans les phases précoces de l'insuffisance cardiaque compensée (Diakos et al., 2016). Cependant, cette augmentation de la glycolyse ne permet de compenser la réduction de l'utilisation des acides gras que transitoirement, en particulier car le glucose ne permet pas de synthétiser autant d'ATP que le permet l'oxydation des acides gras. Ainsi on observe dans les phases plus tardives de l'insuffisance cardiaque une réduction de l'expression des transporteurs GLUT1 et GLUT4 ainsi que des enzymes régulatrices de la glycolyse PDK2 et PDK4 (Lei et al., 2004). La chute de la glycolyse est ainsi souvent associée à la transition de la phase compensée de l'insuffisance cardiaque vers la phase terminale.

1.2.2 Altération des systèmes de transfert d'énergie

In fine, ces altérations métaboliques induisent une forte carence énergétique du myocarde, qui se reflète par une altération de l'homéostasie des métabolites de haute énergie (Ventura-clapier et al., 2011). Le système créatine kinase, composé majeur de la réserve énergétique est ainsi diminué dans le remodelage hypertrophique et l'insuffisance cardiaque. En effet, le contenu en CK a été décrit comme réduit de 50% dans l'insuffisance cardiaque chez un modèle d'hypertension chez le rat, et de façon corrélée au déclin de la fraction d'éjection cardiaque (Ingwall et al., 1990). De manière générale, une réduction des CK cytosoliques et mitochondriales (MM-CK et mi-CK) est observée dans l'insuffisance cardiaque chez l'homme et dans des modèles animaux (Ingwall, 2009). L'activité de la CK totale et mitochondriale est également réduite chez le rat dans un modèle d'hypertension (Vatner & Ingwall, 1984). En parallèle, le système des myokinases mitochondriales qui contribue en temps normal assez peu à la distribution de l'ATP est significativement augmenté dans une tentative de compensation (Dzeja et al., 1999). L'activité des CK est également fortement réduite lors de l'évolution de la maladie, suggérant que cette chute est un bon marqueur de la transition de l'hypertrophie sévère vers l'insuffisance cardiaque.

Le découplage fonctionnel de la mi-CK avec la phosphorylation oxydative mitochondriale serait aussi responsable de l'altération des flux d'énergie et de la baisse du

rapport PCr/ATP, qui constitue un bon indicateur de l'état énergétique cardiaque. Selon les espèces, le rapport PCr/ATP oscille entre 1,7 et 2,1 et reflète à la fois la production d'ATP mitochondriale et l'efficacité du transfert d'énergie par les CK (Ventura-clapier et al., 2011). Cette diminution du ratio PCr/ATP est prédictive d'une mortalité augmentée chez les patients insuffisants cardiaques. Il est en effet systématiquement réduit dans l'insuffisance cardiaque humaine (Conway et al., 1991; Hardy et al., 1991) et dans les modèles animaux (Neubauer et al., 1995; Ye et al., 2001). Cette diminution est due vraisemblablement à une chute de la PCr, les taux d'ATP restant relativement constants dans la phase compensée de l'insuffisance cardiaque (Smith et al., 2006; Weiss et al., 2005). Une étude plus récente chez l'homme met l'accent plus sur la réduction du flux CK calculé par RMN au ³¹Phosphore que sur la valeur absolue du ratio PCr/ATP comme marqueur prédictif d'une surmortalité chez les patients en insuffisance cardiaque (Bottomley et al., 2013).

1.2.3 Altération de la fonction mitochondriale

La fonction mitochondriale, et en particulier les mécanismes de biogénèse mitochondriale sont fortement altérés avec l'insuffisance cardiaque. En effet, une étude de laboratoire sur un modèle de surcharge de pression chez le rat a montré que le déclin de la fonction mitochondriale dans le muscle cardiaque et le muscle squelettique est liée à l'altération de l'expression de protéines mitochondriales associées au déclin de PGC-1 α et ses cofacteurs NRFs et TFAM (Garnier et al., 2003). Un déclin de PGC-1 α est également décrit dans de nombreux autres modèles d'insuffisance cardiaque (Faerber et al., 2011; O. Kemi et al., 2007; C.-K. Sun et al., 2007), ce qui suggère que cette chute de la cascade de régulation de PGC-1 α est une bonne signature métabolique de l'insuffisance cardiaque, induisant une réduction des protéines mitochondriales encodées par le génome nucléaire et mitochondriale et ainsi des altérations de la capacité oxydative (Ventura-Clapier et al., 2008). Chez l'homme, les études qui se sont intéressées à la cascade de régulation de PGC-1 α dans l'insuffisance cardiaque montrent des résultats parfois assez contradictoires (Garnier et al., 2009; Karamanlidis et al., 2010; Sebastiani et al., 2007). Ces différences entre les modèles animaux et les pathologies humaines peuvent être liées à la nature et/ou la

sévérité de la pathologie, le manque de groupes contrôles chez l'homme, les différences de sexes ou encore les traitements pris par les patients. Cependant, il semble que l'expression d'ERR α , le partenaire clé de PGC-1 α (Figure 4) et certaines de leurs cibles soient clairement réduits chez l'homme et participent au déclin de la capacité mitochondriale (Sihag et al., 2009).

L'insuffisance cardiaque est également associée à des anomalies morphologiques des mitochondries, avec notamment une augmentation de leur nombre, une réduction de leur taille et une désorganisation de leur intégrité structurale, ce qui suggère une altération du réseau général des mitochondries (Ide et al., 2001; Sabbah et al., 1992; Schaper et al., 1991). Des altérations de la structure des mitochondries, comme une absence de matrice ou des ruptures membranaires peuvent être positivement corrélées à la sévérité de l'insuffisance cardiaque reflétée par la pression diastolique du ventricule gauche ou la fraction d'éjection (Ide et al., 2001). Ainsi, une hypothèse émergente serait que les mécanismes de contrôle de la dynamique et de la forme des mitochondries puisse jouer un rôle dans les pathologies cardiaques. Par exemple, une diminution de la *mitochondrial dynamin like GTPase* (OPA1), une protéine impliquée dans la fusion de la membrane interne mitochondriale, a été décrite comme impliquée dans la régulation des flux d'énergie, de la taille et de la forme des mitochondrie, facteurs qui sont tous essentiels pour un transfert d'énergie optimal (Chen et al., 2009). Un étude récente a démontré que le blocage du mécanisme de fusion des mitochondries par inhibition d'OPA1 dans le cœur chez la souris induisait une fragmentation du réseau mitochondrial et était associé au développement d'une cardiomyopathie et de troubles métaboliques (Wai et al., 2015).

1.2.4 La cardiomyopathie dilatée : une forme sévère d'insuffisance cardiaque affectant le métabolisme énergétique

La cardiomyopathie dilatée (CMD) est une des causes majeures d'insuffisance cardiaque, caractérisée par une dilatation progressive du ventricule gauche et un amincissement des parois, menant à une dysfonction systolique sévère. En dépit des

stratégies thérapeutiques actuelles, la CMD reste associée à une morbidité élevée, et à une mortalité d'environ 20% (Felker et al., 2000). En France, elle concerne environ une personne sur 3000, et touche en majorité les hommes. Ses causes sont multiples et peuvent être d'origine environnementale (consommation excessive d'alcool, diabète, myocardite liée à une infections virale ou bactérienne) ou génétique. Environ 20% des cas sont ainsi associés à une mutation monogénique dont une trentaine est aujourd'hui identifiée, la plupart dans des gènes codant pour des protéines du cytosquelette ou du sarcomère, mais aussi pour certaines protéines chaperonnes (Villard et al., 2011). Plus de la moitié des cas restent cependant sans origine déterminée, on parle alors de CMD idiopathique (Hazebroek et al., 2012). Cette pathologie est très hétérogène et implique la perturbation de l'homéostasie d'un grand nombre de protéines, comme des protéines de la membrane nucléaire, du sarcomère, du cytosquelette ou encore impliquées dans la modulation des flux calciques. Au niveau du cytosquelette, l'actine et la myosine sont particulièrement affectées (Fatkin & Graham, 2002). Même si cette pathologie concerne des sujets de tout âge, les facteurs de risque que sont l'hypertension, l'athérosclérose ou les atteintes des valves cardiaques en font une pathologie particulièrement susceptible de toucher le sujet âgé (Backes & Gersh, 1992).

Les patients atteints de CMD présentent également une altération du métabolisme énergétique, avec une réduction de l'utilisation des acides gras qui n'est que partiellement compensée par une augmentation de l'utilisation du glucose (Dávila-Román et al., 2002; Neglia et al., 2007). Cette pathologie est également marquée par une altération des mécanismes de transfert de l'énergie, qui s'illustre notamment par une réduction du flux CK et du ratio PCr/ATP (Bottomley et al., 2013; Neubauer, 2007). Des mutations sur l'ADN mitochondrial ainsi que des anomalies morphologiques des mitochondries sont également bien décrites et participent au phénotype sévère de la CMD (Arbustini et al., 1998).

1.2.5. Le Serum Response Factor, un facteur de transcription impliqué dans la cardiomyopathie dilatée

Toutes les cellules vivantes sont dotées d'un cytosquelette dynamique, qui en plus de leur conférer une forme et un support structural, sert à réguler un certain nombre de processus comme l'adhésion cellulaire, la migration, la division, la polarité cellulaire, la ségrégation des chromosomes, le trafic intracellulaire, la contraction musculaire, l'apoptose ou la signalisation. Chez les vertébrés, le cytosquelette est d'autant plus complexe que s'y sont développés une grande variété de tissus aux propriétés et fonctions très différentes, jusqu'aux tissus contractiles spécialisés en muscle strié squelettique, cardiaque et muscle lisse. De manière générale, plus d'un millier de gènes participent à la constitution du cytosquelette et de l'appareil contractile des mammifères, qui impliquent une coordination maîtrisée sur le plan fonctionnel mais aussi transcriptionnel.

Le *Serum Response Factor* (SRF) est un facteur de transcription de la famille des facteurs à domaine MADS, qui régule l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la prolifération et la migration cellulaire, la dynamique du cytosquelette et la myogenèse. Cette famille de facteurs de transcription présente la particularité de se lier à l'ADN sur des séquences cibles spécifiques [CC(A/T)₆GG] appelées boîtes CArG (Shore & Sharrocks, 1995). SRF a été identifié pour la première fois pour son implication dans l'activation du proto-oncogène *c-fos* en réponse au sérum dans la lignée de cellules cancéreuses HeLa (Treisman, 1987). Très conservé à l'échelle du vivant, SRF est encodé par un seul gène conservé de la drosophile à l'homme, et est exprimé de façon ubiquitaire (Affolter et al., 1994). Son profil d'expression au cours du développement a été particulièrement bien décrit chez la souris. Aux stades précoces du développement, l'expression de SRF se localise dès 6,5 jours dans les feuillets mésodermiques et ectodermiques, puis dans le mésoderme à 7,5 jours. Son expression devient ensuite plus spécifique du tissu musculaire puisqu'on le retrouve à 8,5 jours majoritairement dans le cœur et les myotomes (Arsenian et al., 1998). On retrouve ensuite à 11,5 jours une expression modérée dans le tube neural et le muscle lisse vasculaire (Belaguli et al., 1997). À l'âge adulte, SRF présente un profil d'expression prédominant dans tous les types

musculaires, c'est-à-dire aussi bien dans le muscle lisse que dans le muscle strié squelettique et cardiaque (S. Li et al., 2005; Mericskay et al., 2007; Parlakian et al., 2004).

Plus d'une centaine de gènes incluant une boîte CARG dans leur promoteur ont pu être identifiées comme cibles potentielles de SRF chez les mammifères, dont la majorité est constituée par des gènes impliqués dans le cytosquelette et l'appareil contractile (Figure 6). SRF contrôle ainsi l'expression dans les tissus musculaires de gènes impliqués dans la différenciation musculaire (actine, alpha et bêta-MHC, troponine, tropomyosine, MyoD...) et dans la dynamique du cytosquelette (alpha-actinine, la vinculine, profiline...) pour n'en citer que quelques-uns (J. Chai & Tarnawski, 2002; Q. Sun et al., 2006). SRF régule également l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire, comme certaines sous-unités des intégrines ou les syndecans (Miano et al., 2007). La capacité à activer la transcription de ces différents gènes cibles est modulée par un certain nombre de cofacteurs transcriptionnels avec lesquels il forme des complexes ternaires pour activer la transcription. La famille de coactivateurs de SRF la plus connue et la plus étudiée est celle des *Myocardin related transcriptional co-factors* (MRTFs), constituée de la myocardine, de MRTF-A et MRTF-B (Olson & Nordheim, 2010). D'autres cofacteurs s'associent à SRF pour activer la différenciation musculaire, comme MyoD dans le muscle squelettique et GATA4 dans le muscle cardiaque (Figure 6).

L'actine est un des gènes cibles majeurs de SRF dans le tissu musculaire. Elle est régulée par la voie de signalisation RhoA qui induit sa polymérisation mais est également impliquée dans l'activité transcriptionnelle de SRF (Hill et al., 1995; Sotiropoulos et al., 1999). La voie MRTF-A semble également particulièrement importante dans la régulation de l'activité de SRF (Posern & Treisman, 2006). MRTF-A, constamment exporté à l'extérieur du noyau, se lie à l'actine globulaire dans le cytoplasme. Lors de l'activation de RhoA, l'actine se polymérise et MRTF-A ne pouvant plus s'y lier s'accumule dans le noyau où il s'associe à SRF pour activer la transcription de gènes comme l'actine elle-même ou la vinculine (Miralles et al., 2003; Vartiainen et al., 2007).

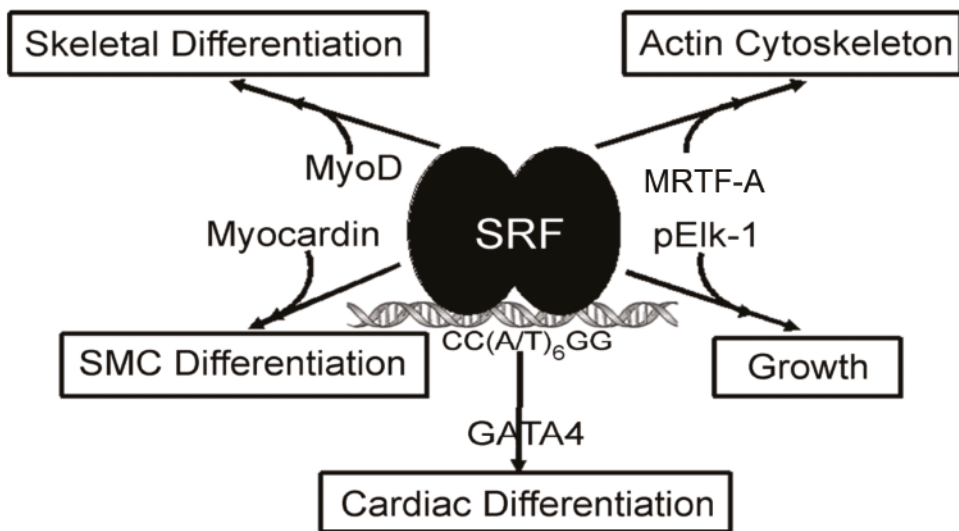


Figure 6 : SRF contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes par interaction avec ses différents cofacteurs. SRF régule différents programmes d'expression génique impliqués notamment dans la croissance et la prolifération cellulaire, la dynamique du cytosquelette d'actine ou encore la différenciation des cellules musculaires lisses (SMC), et du muscle squelettique strié et cardiaque. Modifié d'après *Miano et al. 2007*.

SRF dans le muscle squelettique

SRF est impliqué au cours du développement musculaire et est notamment requis *in vivo* pour l'expression de MyoD, facteur déterminant pour la différenciation et la détermination myogénique (Gauthier-Rouviere et al., 1996; S. Li et al., 2005) Plusieurs études suggèrent que SRF est impliqué dans la modulation de la plasticité du muscle squelettique. À la différence du muscle cardiaque, l'expression de SRF est réduite avec le vieillissement chez l'homme et la souris dans le muscle squelettique, ce qui suggère que cette réduction naturelle pourrait contribuer au phénotype musculaire associé au vieillissement et à la sarcopénie. L'inactivation spécifique de SRF dans le muscle squelettique par le système Cre/LoxP chez la souris n'induit pas de phénotype musculaire particulièrement sévère durant les premiers mois après inactivation, suggérant que dans les conditions normales SRF n'est pas requis pour l'homéostasie musculaire (Lahoute et al., 2008). Cependant, après plusieurs mois les animaux invalidés développent des atteintes musculaires caractérisées notamment par une atrophie des fibres et une accumulation de fibrose, qui dans l'ensemble sont caractéristiques du phénotype musculaire associé au vieillissement. De plus, une autre étude démontre que l'absence de SRF dans les fibres musculaires se traduit par un défaut de recrutement des cellules satellites en réponse à l'hypertrophie induite par surcharge, et identifie SRF comme un acteur central de la signalisation *IL6* et *Cox2/IL4* (Guerci et al., 2012).

SRF dans le muscle cardiaque

Le développement cardiaque est un processus complexe composé de plusieurs étapes nécessitant une coordination finement régulée de l'expression de différents facteurs de transcription tels que GATA4, Nkx2.5, SRF et MEF2 (Sepulveda et al., 2002). L'équipe du Dr Zhenlin Li a été la première à démontrer l'importance de SRF durant le développement cardiaque en générant un *knockout* spécifique par expression d'une Cre recombinase sous le promoteur de la beta-MHC chez la souris. L'étude de ces animaux montre que la perte de SRF chez l'embryon induit un développement cardiaque anormal caractérisé par une

mauvaise trabéculatation et une dilatation induisant une létalité embryonnaire précoce (Parlakian et al., 2004).

Dans le cœur adulte chez la souris, l'activité de SRF peut être augmentée par des agonistes adrénérgiques comme la phényléphrine (PE) ou par des cytokines comme l'angiotensine II, qui sont impliquées dans plusieurs pathologies cardiovasculaires (Jianyuan Chai et al., 2004). La voie calcium/CamKII et la voie RhoA sont également connues pour activer SRF, suggérant que SRF pourrait être activé dans les pathologies cardiaques impliquant une réponse hypertrophique. Il existe très peu d'études décrivant le rôle de SRF chez l'homme dans un contexte pathologique dans le cœur. On sait cependant que l'insuffisance cardiaque est associée à l'expression d'une isoforme tronquée de SRF résultant d'un épissage alternatif excluant les exons 4 et 5 et induisant ainsi une perte de fonction de SRF (Davis et al., 2002). Une autre étude décrit des phénomènes similaires de perte de fonction de SRF induite par l'activation de la caspase-3 générant une forme tronquée de SRF (Chang et al., 2003). Chez la souris, on observe également dans un modèle de laminopathie induisant une CMD une réduction de l'activité de SRF liée à une perturbation de la dynamique de l'actine (Ho et al., 2013).

Le modèle d'inactivation conditionnelle et cardio-spécifique de SRF développée par l'équipe de Zhenlin Li a permis de s'affranchir de la létalité embryonnaire pour étudier les effets de l'inactivation de SRF à l'âge adulte. Cette inactivation, déclenchée par l'injection de tamoxifène, induit le développement d'une cardiomyopathie dilatée et d'une insuffisance cardiaque sévère (Parlakian et al., 2005). Comme chez l'homme, cette CMD est caractérisée par une altération des mécanismes de transfert d'énergie notamment la créatine kinase musculaire, une perte de contractilité progressive et une dilatation du ventricule gauche. L'architecture du cytosquelette est également altérée, comme en témoigne l'épaississement des disques intercalaires, l'altération de la structure polymérisée de l'actine et la désorganisation de la desmine qui sont également intimement liées à la perte d'activité de la créatine kinase musculaire codée par un gène cible de SRF (Diguët et al., 2011).

1.2.6 Besoin de nouvelles thérapies contre les cardiomyopathies dilatées et l'insuffisance cardiaque : comment agir sur le métabolisme cardiaque ?

Les traitements classiques actuels pour lutter contre la cardiomyopathie dilatée sont aujourd'hui les mêmes que ceux utilisés contre l'insuffisance cardiaque, à savoir la prescription de bêtabloquants, d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène ou des récepteurs de l'angiotensine II, ou encore de vasodilatateurs (McNally & Mestroni, 2017). Ces traitements permettent de ralentir le rythme cardiaque et de réduire la surcharge hémodynamique qui est induite par l'activation neuro-hormonale accompagnant l'insuffisance cardiaque et qui se caractérise par une augmentation des catécholamines circulantes et une activation du système rénine-angiotensine-aldostérone suite à l'hypoperfusion des reins. Ces traitements ont permis ces dernières décennies d'améliorer la prise en charge des patients et de réduire la mortalité, mais cette dernière reste malgré tout très élevée à plus de 40% cinq ans après le début de l'insuffisance cardiaque congestive. Le fait est que ces traitements contribuent indirectement à réduire la consommation énergétique du cœur, mais ils ne ciblent pas les défauts de production et de transfert de l'énergie du cœur insuffisant. La seule intervention efficace à long terme pour lutter contre l'insuffisance cardiaque reste à l'heure actuelle la transplantation cardiaque. Devant la pénurie de greffons et les problèmes d'immuno-compatibilité inhérents à la greffe, la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les capacités énergétiques du cœur est une priorité.

L'exercice physique est une stratégie bien connue de prévention des maladies cardiovasculaires, et de nombreuses études ont démontré ses effets bénéfiques pour la prévention secondaire de l'insuffisance cardiaque (Downing & Balady, 2011; Gasiorowski & Dutkiewicz, 2013; Gayda et al., 2016). L'entraînement en endurance est décrit pour avoir des effets bénéfiques sur les capacités oxydatives du muscle squelettique chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique (Adamopoulos et al., 1993), mais ses effets sur le muscle cardiaque sont moins bien décrits chez l'homme, même s'il semble également améliorer les capacités oxydatives et de transfert d'énergie dans les modèles animaux (Kemi et al., 2007).

D'autres stratégies récentes ciblent plus spécifiquement les troubles métaboliques associés à l'insuffisance cardiaque. On peut citer par exemple le traitement à la Trimetazidine, une drogue dont le mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la beta-oxydation des acides gras pour favoriser l'oxydation du glucose, moins consommatrice d'oxygène, ce qui pourrait être favorable compte tenu de la réduction des capacités oxydatives du myocarde malade (Chrusciel et al., 2014). Une autre approche en développement repose sur l'Elamipretide, un peptide de type Szeto-Schiller également connu sous le nom de SS-31 qui pénètre dans les mitochondries et pourrait protéger du stress oxydant les cardiolipides, des lipides spécifiques de la membrane interne mitochondriale, et ainsi diminuer l'atteinte les altérations de la chaîne respiratoire (Szeto, 2014). On notera que ces dernières approches sont surtout de types palliatives, visant à préserver ou économiser le pool restant de mitochondries plus ou moins fonctionnelles dans le cœur malade.

2. Exercice musculaire

2.1 Entraînement en endurance et métabolisme musculaire

Un mode de vie sédentaire est un facteur de risque connu pour contribuer chez l'homme à l'installation de troubles métaboliques chroniques, comme l'hypertension, les maladies coronariennes, l'obésité, le diabète de type II ou encore le processus de sarcopénie lié au vieillissement musculaire. Les autorités de santé publique recommandent ainsi la pratique d'une activité physique régulière, qui permet d'améliorer la qualité de vie et de réduire la mortalité et les risques d'hospitalisation liés à ces maladies chroniques. L'exercice est notamment reconnu comme une pratique bénéfique pour la prévention de l'insuffisance cardiaque. Si les mécanismes sous-jacents à ces bénéfices ne sont pas encore parfaitement connus, l'entraînement en endurance est connu pour induire un remodelage tissulaire et vasculaire et pour améliorer le métabolisme énergétique ainsi que la fonction du muscle cardiaque et du muscle squelettique.

2.1.1 Entraînement et métabolisme cardiaque

Le cœur développe des réponses adaptatives à l'entraînement en endurance, comme une réduction du rythme cardiaque au repos et une augmentation des dimensions cardiaques en diastole. Ces adaptations induisent une hypertrophie cardiaque non pathologique, associée à une augmentation de la fonction ventriculaire et une résistance à l'ischémie (Moore, 1998). Le muscle cardiaque s'adapte également en modifiant ses capacités de production et de transfert d'énergie, même si on ne sait pas encore si ces changements adviennent pour préserver ou pour améliorer la fonction cardiaque à l'effort.

Dans les modèles animaux, certaines études montrent que l'entraînement en endurance augmente la glycolyse et le métabolisme oxydatif (Coleman et al., 1988; S. R. Stuewe et al., 2000), quand d'autres suggèrent que l'adaptation à l'exercice se fait davantage par le biais d'une augmentation de la masse musculaire que par une stimulation de l'expression des gènes mitochondriaux (Kayar et al., 1986; Murakami et al., 1995). Chez

le rat, l'exercice protège également contre les dommages causés par le stress oxydant lié à l'âge (Rosa et al., 2005). Les effets de l'exercice sur l'expression et la fonction du système CK est moins bien décrite dans le cœur. Il a cependant été décrit chez le chien que l'exercice en endurance augmentait l'activité de la CK cytosolique totale et le contenu en MB-CK, même si la pertinence physiologique de ces modifications n'est pas encore démontrée (S. Stuewe et al., 2001). En effet, il n'est pas encore clair si le cœur s'adapte à l'exercice en endurance par le biais d'une simple augmentation des capacités d'utilisation des substrats ou si les flux de transfert d'énergie sont également modifiés chez les modèles animaux. Il reste également à déterminer si ces mécanismes seraient également en place chez l'homme.

2.1.2 Entraînement et métabolisme du muscle squelettique

Le muscle squelettique répond également à l'exercice en endurance en mettant en place des adaptations du métabolisme mitochondrial et un processus de vascularisation. L'entraînement induit en effet une augmentation du volume des mitochondries et des protéines mitochondriales par une augmentation du processus de biogenèse mitochondriale (Howald et al., 1985). Après 6 semaines d'entraînement, la masse mitochondriale du muscle est ainsi élevée de 50 à 100% (Hood, 2001). Une diminution de la perméabilité des mitochondries à l'ADP et une augmentation de la mi-CK sont également observés dans les fibres oxydatives et glycolytiques, favorisant le couplage entre la production et l'utilisation de l'énergie (Zoll, Koulmann, et al., 2003; Zoll et al., 2002). L'amélioration de la performance à l'exercice dépasse l'augmentation modeste de 5 à 20% de la consommation maximale d'oxygène (VO_{2max}), reflétant ainsi l'augmentation intrinsèque des capacités oxydatives du muscle, et de l'efficacité du transport de l'énergie (Phillips et al., 1996; Volvaard et al., 2009). Plus spécifiquement, ces adaptations métaboliques reflètent une augmentation des protéines impliquées dans le système de production de l'ATP (Holloszy, 1967), du cycle de Krebs (Egan et al., 2011), et de la mobilisation, du transport et de l'utilisation des acides gras (Talanian et al., 2010). Le

transport du glucose (Tremblay et al., 1994), le métabolisme glycolytique (Tremblay et al., 1994) et la synthèse du glycogène (Perseghin et al., 1996) sont également augmentés.

Si les phénomènes d'adaptation physiologiques à l'entraînement en endurance du muscle squelettique sont plutôt bien décrits, on en sait moins sur les voies de signalisation faisant le lien entre l'augmentation de la demande et la modulation de l'expression de certains gènes pour y répondre. Encore une fois, PGC-1 α semble jouer un rôle majeur dans la régulation de la biogenèse mitochondriale en réponse à l'exercice, et peut être corrélé au niveau d'entraînement chez les individus sains (Garnier et al., 2005). De plus, les protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale sont corrélées avec l'expression de PGC-1 α , étendant son rôle de simple co-activateur à celui de chef d'orchestre de l'assemblage des protéines mitochondriales d'origine nucléaires et mitochondriales. Une forte corrélation est également observée entre l'activation de la calcineurine, une phosphatase régulée par le calcium, et l'expression de PGC-1 α , suggérant qu'il pourrait être modulé par les taux de calcium intracellulaires. Cependant, l'inhibition de la calcineurine ne bloque pas l'induction de PGC-1 α par l'exercice et l'activation de la biogenèse mitochondriale chez le rat (Garcia-Roves et al., 2006), ou des patients transplantés traités à la ciclosporine, inhibiteur pharmacologique de la calcineurine (Zoll, N'Guessan, et al., 2003). Ainsi, d'autres voies métaboliques induites avec l'exercice comme la voie des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) et des *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases* (CaMK), sont probablement également impliquées dans le contrôle des capacités oxydatives du muscle (Akimoto et al., 2005; Wu et al., 2002). L'augmentation de la demande énergétique liée à l'augmentation des contractions musculaires et l'activation en conséquence des voies sensibles à l'état énergétique semble aussi être importantes pour l'activation de la transcription de PGC-1 α . En effet, l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK), un senseur de l'état énergétique cellulaire, est activé de façon chronique pendant des périodes d'exercice répété (Frøsig et al., 2003), et est impliqué dans la transcription de PGC-1 α et la biogenèse mitochondriale dans des modèles animaux (Terada et al., 2002; Winder et al., 2000).

2.2 Modèles animaux d'entraînement en endurance

Afin de modéliser l'impact de l'exercice sur le développement de l'insuffisance cardiaque, il est nécessaire d'utiliser des protocoles d'entraînement dans les modèles animaux. Plusieurs types de protocoles sont décrits dans la littérature avec des avantages et des inconvénients distincts.

Entraînement sur tapis roulant

Il existe une très grande variété de protocoles d'entraînement en endurance sur tapis roulant. On trouve dans la littérature des protocoles allant de quelques semaines à plusieurs mois, avec des sessions de course de quelques minutes à plusieurs heures, combinant des vitesses de courses et des degrés d'inclinaisons variables. La plupart des études sur les rongeurs impliquent ainsi un entraînement continu, caractérisé par une vitesse de course, une inclinaison ou une durée d'exercice par session fixée ou progressivement augmentés, rendant parfois difficile la comparaison entre elles. Chez le rat, cela semble induire une augmentation du rapport poids du cœur sur poids du corps jusqu'à 30% (Diffie & Nagle, 2003; Fenning et al., 2003), mais d'autres études ne montrent pas d'hypertrophie majeure liée à l'entraînement (Morán et al., 2003). Chez la souris, l'entraînement sur tapis induit une hypertrophie cardiaque relative, reflétée par une augmentation modeste de la masse ventriculaire et de la taille des cardiomyocytes (Bellafiore et al., 2007; Rosa et al., 2005), mais d'autres études ne montrent pas d'hypertrophie (Fewell et al., 1997). Les causes de ces différences ne sont pas connues. Cependant, il serait logique de penser que les effets de l'exercice se réduisent progressivement au cours de l'entraînement si la charge absolue est gardée constante car la capacité à l'exercice et notamment la VO_{2max} augmente, ce qui réduirait les effets de l'exercice en fin de protocole. Ainsi l'intensité de l'effort à fournir devrait être régulièrement augmentée pour suivre l'augmentation de l'aptitude à l'effort des animaux.

Il existe également des protocoles d'entraînement par intervalles, qui consistent en de course période de course à haute intensité entrecoupées de périodes de repos à faible

intensité. L'intérêt de ce mode d'entraînement serait que ces périodes d'exercice à forte intensité seraient plus efficaces pour induire des adaptations structurales et physiologiques du muscle cardiaque et squelettique (Haram et al., 2009; O. J. Kemi et al., 2005).

L'avantage de ce modèle d'entraînement sur tapis roulant est qu'il permet de réguler et de contrôler finement la quantité et l'intensité de l'exercice, à la différence de l'entraînement à la nage ou de l'exercice volontaire sur roue. Tous les animaux subissent ainsi strictement le même stimulus mécanique, et le contrôle des différents paramètres facilite la comparaison entre les études si les conditions environnementales sont identiques, ce qui limite les biais. En revanche, à la différence de la course volontaire sur roue, ce mode d'entraînement nécessite une période d'acclimatation allant de 3 à 10 jours, pour familiariser les animaux au dispositif. La course forcée peut également induire un certain niveau de stress chez l'animal, et la supervision constante de l'exercice par un ou plusieurs expérimentateurs est très chronophage.

Entraînement à la nage en piscine

L'entraînement à la nage consiste à placer les animaux dans des piscines remplies d'eau et à les laisser nager pendant une période de temps donné. Le travail musculaire peut être régulé en attachant des poids ou des flotteurs aux animaux. Comme pour l'entraînement sur tapis roulant, la durée des protocoles de nage varie considérablement entre les études, qui vont de 1 à 6 heures par jour et pendant des périodes de 1 à 24 mois. Ce modèle semble induire une hypertrophie cardiaque de l'ordre de 15%, observable dès une heure d'entraînement par jour et pendant une semaine (Kaplan et al., 1994; Medeiros et al., 2004). Cependant, ce mode d'entraînement ne semble pas induire un remodelage suffisamment important dans le muscle squelettique pour prévenir des dommages oxydatifs induits par un test d'effort aigu chez le rongeur (Barreto et al., 2012). La température de l'eau semble également faire fortement varier les effets de la nage en particulier chez le rat (Prathima & Devi, 1999). L'entraînement à la nage reste une méthode d'exercice moins répandue, en partie du fait des fortes contraintes liées à sa mise en place et du temps qu'il nécessite.

Entraînement volontaire sur roue

L'exercice volontaire sur roue est comme son nom l'indique un mode d'entraînement volontaire, qui contraste avec les autres modèles d'entraînement en endurance chez le rongeur, qui reposent sur un exercice forcé et imposé par un stimulus aversif (stimulation par un choc électrique dans l'entraînement à la course sur tapis, par le risque de noyade dans l'entraînement à la nage en piscine). Plusieurs études montrent qu'il permet d'obtenir des effets robustes aussi bien dans le muscle cardiaque que dans le muscle squelettique (Allen et al., 2001; Hydock et al., 2007; Kariya et al., 2004), démontrant que les animaux sont capables de courir volontairement de manière suffisante à induire une adaptation physiologique.

Ce modèle présente le grand avantage de ne pas reposer sur une stimulation forcée, ce qui permet de l'appliquer à des modèles pathologiques pour lesquels l'entraînement sur tapis pourrait entraîner davantage d'effets délétères que bénéfiques. Il permet également de faire courir les animaux selon leurs capacités individuelles à l'effort, à la différence de l'entraînement sur tapis qui impose un rythme de course à tous les animaux indépendamment de leurs capacités propres. C'est un modèle qui ne nécessite pas d'acclimatation particulière, ni d'intervention majeure de l'expérimentateur, les animaux étant hébergés dans des cages individuelles contenant les roues de course associées à un compteur relevant automatiquement la distance parcourue. Ce modèle présente aussi l'avantage de permettre un entraînement pendant la nuit, qui est la période d'activité des modèles murins utilisés, alors que l'entraînement sur tapis est habituellement réalisé de jour, lorsque pendant la période de repos des animaux. En revanche, ce mode d'entraînement induit une plus grande variabilité de la distance de course nécessitant parfois un plus grand nombre d'animaux. Il existe également des différences liées au sexe, les femelles courant davantage que les mâles. Enfin, les animaux sont dans ce modèles hébergés de façon individuelle, ce qui peut modifier leur comportement.

3. Le NAD⁺, à l'interface entre métabolisme et signalisation

Au cours de cette dernière décennie, le Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) a émergé comme une nouvelle cible dans les troubles du métabolisme qui apparaissent au cours du vieillissement et les pathologies qui y sont associées (Braidy et al., 2011; Frederick et al., 2016; Mericskay, 2016).

3.1 Rôle de coenzyme dans le métabolisme énergétique

Le NAD est un coenzyme d'oxydo-réduction majeur dans le métabolisme énergétique cellulaire (voir Figure 1). Il joue le rôle d'accepteur d'électrons dans plusieurs étapes clés du métabolisme des glucides et des acides gras ainsi que dans le cycle de Krebs. Dans ces réactions, il est réduit en NADH pour permettre l'oxydation des métabolites (Figure 7). Dans le cytosol, le NADH cytosolique produit par la glycolyse est ensuite reconverti en NAD⁺ par la lactate déshydrogénase ou par la malate déshydrogénase, qui initie le transfert des équivalent réduits dans la mitochondrie par le biais de la navette malate/aspartate. Dans la mitochondrie, la β -oxydation des acides gras produit une molécule de FADH₂, une molécule de NADH et une molécule d'acétyl-CoA par cycle. Le cycle de Krebs produit 3 molécules de NADH et une molécule de FADH₂ par cycle, ce qui fait du NADH le donneur majoritaire d'électrons pour la chaîne respiratoire mitochondriale. Pour une description plus détaillée, voir la partie I où sont décrites les implications du NAD dans le métabolisme énergétique et l'utilisation des différents substrats.

En plus de sa fonction majeure dans le métabolisme énergétique, le NAD est également un précurseur du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP). Sous sa forme réduite, le NADPH est un coenzyme essentiel des voies de signalisation impliquées dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène, comme la glutathione et le système des thioredoxine réductases. Il est également utilisé dans les voies de biosynthèse et notamment dans la voie des pentose phosphates. Le NADP est synthétisé par le biais d'une phosphorylation du NAD⁺ par la NAD kinase dans le cytosol (Kawai & Murata, 2008)

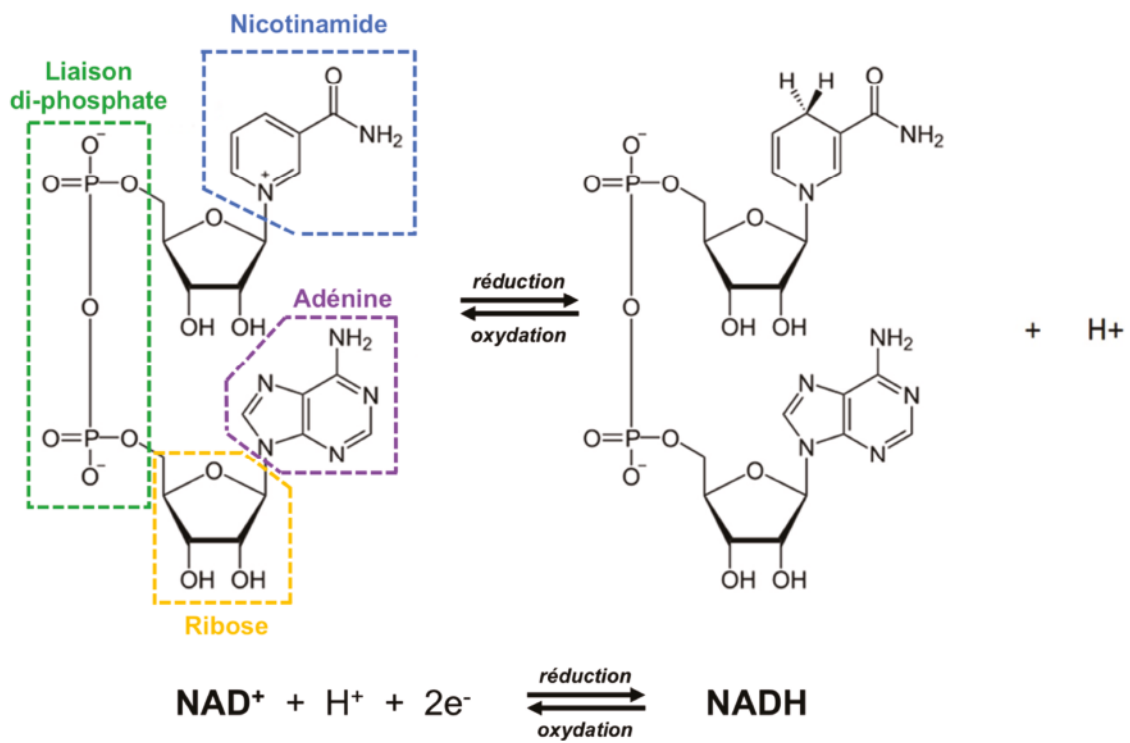


Figure 7 : Couple redox de la molécule de NAD sous sa forme oxydée (NAD⁺) et réduite (NADH). Le potentiel d'oxydo-réduction du couple NAD⁺/NADH est de E0' = -0,320 V

ou par la NAD(P) transhydrogénase (NNT) localisée à la membrane interne mitochondriale. La NNT interconverti le NADP⁺ et le NADH en NADPH et NAD⁺ ou réciproquement. Elle peut ainsi contribuer à la lutte contre les dommages oxydatifs en générant du NADPH à partir du NADH produit par la bêta-oxydation des acides gras et le cycle de Krebs. À l'inverse, lorsque le ratio NAD⁺/NADH est augmenté en cas de diminution des capacités oxydatives comme dans l'insuffisance cardiaque, la NNT transforme du NADPH en NADP⁺ pour augmenter le NADH au détriment des capacités de défenses contre le stress oxydant (Nickel et al., 2015).

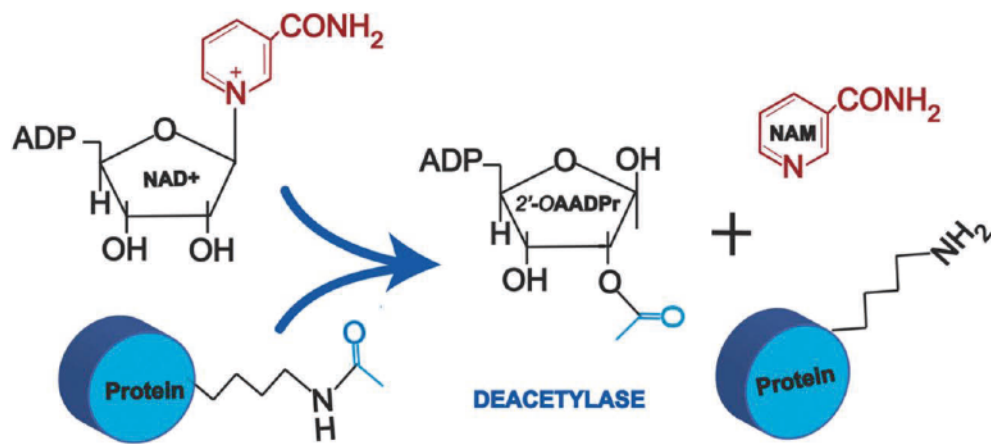
Dans toutes ces fonctions de coenzymes, le NAD alterne entre sa forme oxydée (NAD⁺) et sa forme réduite (NADH), sans consommation nette du pool de NAD (Figure 7). Il existe cependant des voies de signalisation cellulaires qui consomment en grande quantité le NAD⁺.

3.2 Rôle de signalisation

En plus de son rôle direct de coenzyme dans le métabolisme énergétique, le NAD a également une place très importante dans la signalisation énergétique et la lutte contre le stress oxydant, en particulier via son utilisation comme substrat consommé par les sirtuines (SIRT), les poly-ADPribose polymérasés (PARP) et l'ectoenzyme CD38.

Les sirtuines

Les sirtuines sont une classe de protéines dépendantes du NAD⁺ à activité majoritairement déacétylase et mono-ADP-ribosyl transférase (Figure 8). Elles ont été découvertes il y a une vingtaine d'années par le groupe de Leonard Guarente (Imai et al., 2000; Kennedy et al., 1995) et sont connues pour réguler une grande variété de mécanismes cellulaires tels que le vieillissement, la résistance au stress ou le métabolisme



SIRTUIN ACTIVITIES

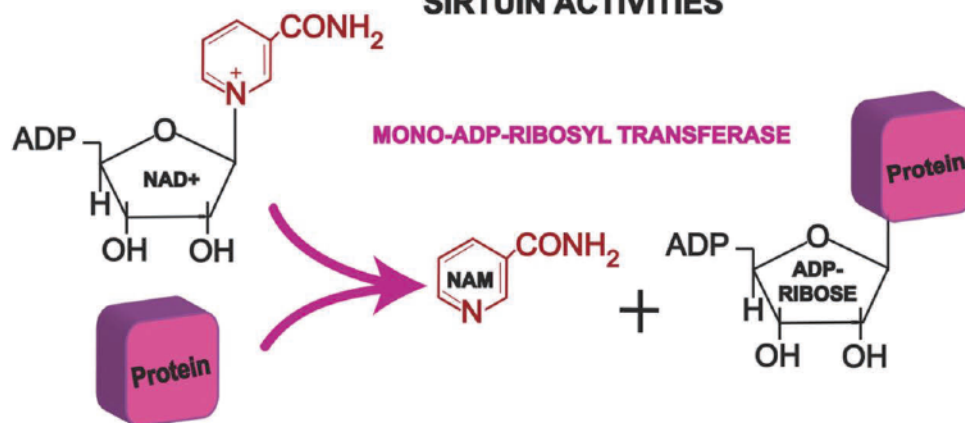


Figure 8 : Représentation schématique des réactions de déacétylation et mono-ADP-ribosylation catalysées par les sirtuines. Pour les réactions de déacétylation qu'elles catalysent, les sirtuines utilisent une molécule de NAD⁺ sur laquelle elles transfèrent le groupement acétyl pour former une molécule de NAM. Pour les réactions de mono-ADP-ribosylation, le NAD⁺ est utilisé pour son ADP-ribose qui est transféré sur les protéines ciblées, ce qui libère également une molécule de NAM. Figure modifiée d'après Sinclair et al, 2007.

énergétique via la régulation de gènes de la biogenèse mitochondriale ou de la phosphorylation oxydative pour n'en citer que quelques-uns (Giblin et al., 2014).

Chez les mammifères, on compte sept membres de la famille des sirtuines, catégorisées comme histones déacétylases de classe III. Elles tirent leur nom de la forte homologie de séquence qu'elles partagent avec le gène « Silent mating-type Information Regulator Two », premier gène de cette famille à avoir été identifié chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme facteur de *silencing* transcriptionnel et régulateur épigénétique de la transcription (Imai et al., 2000).

Lors des réactions qu'elles catalysent, les sirtuines clivent le NAD⁺ en deux fragments : une molécule de nicotinamide (NAM) et une molécule d'ADP-ribose. La majorité des sirtuines ont une activité déacétylase (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT6, SIRT7) et transfèrent alors les groupements acétyl de leur protéines cibles sur l'ADP-ribose libéré. Contrairement à ce que laisse penser leur classement dans la catégorie des histones déacétylases de classe III, d'autres modifications post-traductionnelles sont également réalisés par les sirtuines, comme le transfert de groupements succinyle (SIRT5) ou lipidique (SIRT6, SIRT7) qui utilisent également l'ADP-ribose comme accepteur. Les sirtuines sont également capables de catalyser des réactions de mono-ADP-ribosylation (SIRT4, SIRT6, SIRT7), et dans ce cas c'est l'ADP-ribose libéré à partir du NAD qui est transféré sur les résidus arginine des protéines cibles.

SIRT1, SIRT6 et SIRT7 sont essentiellement nucléaires, et exercent un rôle direct sur des facteurs de transcription impliqués dans la régulation du métabolisme, de la survie cellulaire ou de l'autophagie. SIRT3 et SIRT5 sont en revanche localisées à la matrice mitochondriale, et régulent le métabolisme énergétique en stimulant l'activité d'enzymes impliquées dans le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative mitochondriale (Cencioni et al., 2015).

La sirtuine la plus connue et la plus étudiée dans le cœur est SIRT1. Elle joue un rôle important dans le remodelage de la chromatine et la modulation de l'expression de gènes en déacétylant les histones et certains facteurs de transcriptions que sont PGC-1 α , impliqué

dans la stimulation de la biogenèse mitochondriale et de la bêta-oxydation des acides gras, ou encore les facteurs forkhead box O (FoxO) 1 et 3 impliqués dans la résistance au stress oxydant et la stimulation de l'autophagie (Hariharan et al., 2010). La désacétylation de PGC-1 α par exemple stimule son activité et induit la biogenèse mitochondriale (Lagouge et al., 2006). On sait également que le resvératrol, un activateur de SIRT1 présent dans le raisin et les fruits rouges, améliore la fonction mitochondriale dans le cœur et le muscle squelettique comme l'ont montré notamment certains travaux du laboratoire (Gu et al., 2014; Lagouge et al., 2006; Rimbaud et al., 2011). La surexpression de SIRT1 à un niveau modéré protège le cœur contre le stress oxydant, cependant une trop forte surexpression peut induire au contraire une cardiomyopathie et un excès de stress oxydant (Alcendor et al., 2007).

La sirtuine mitochondriale SIRT3 utilise également le NAD⁺ pour activer l'isocitrate déshydrogénase 2 (IDH2) et d'autres enzymes mitochondriales stimulant ainsi la chaîne respiratoire mitochondriale (Yu et al., 2012). Elle permet de contrer l'acétylation inhibitrice de protéines mitochondriales due à un excès d'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA), observée dans le contexte d'un régime riche en graisse (Hirschey et al., 2010). Sa surexpression dans le cœur chez la souris protège contre l'hypertrophie (Sundaresan et al., 2009), et l'administration de NAD⁺ semble réprimer les effets hypertrophiques de l'angiotensine II (Ang-II) et la phényléphrine (PE) de façon dépendante de la SIRT3 (V. B. Pillai et al., 2010).

Le rôle des autres sirtuines est moins connu dans le cœur à l'heure actuelle, mais on peut cependant citer SIRT6 qui a récemment été décrite comme impliquée dans la régulation du métabolisme du glucose (D. Khan et al., 2018), et SIRT7 impliquée dans la biogenèse ribosomale dont l'inactivation induit une hypertrophie cardiaque et de l'inflammation chez la souris (Vakhrusheva et al., 2008). Un aperçu non exhaustif de la localisation, du rôle et des cibles connus à l'heure actuelle des différentes sirtuines est résumé dans le Tableau 1.

Sirtuine	Localisation	Activité	Fonctions connues	Cibles connues
SIRT1	noyau	déacétylase	métabolisme biogenèse mitochondriale autophagie résistance au stress oxydant	PGC1 α , FoxO1 et 3, histone H1, p53, HIF1 α , SREBP1, autres
SIRT2	cytosol	déacétylase	cycle cellulaire, tumorigenèse	Tubuline, FoxO1, PAR3
SIRT3	mitochondrie	déacétylase	métabolisme	LCAD, GDH, complexes de la chaîne respiratoire, SOD2, IDH2, autres
SIRT4	mitochondrie	ADP-ribosyl transférase	métabolisme de la glutamine beta-oxydation	GLUTD1, GDH
SIRT5	mitochondrie	déacétylase démalonylase désuccinylase	cycle de l'urée métabolisme	CPS1 cytochrome c
SIRT6	noyau	déacétylase ADP-ribosyl transférase déméristoylase dépalmitylase	métabolisme du glucose réparation de l'ADN	H3K9, H3K56
SIRT7	noyau	déacétylase	biogenèse ribosomale inflammation	inconnues

Tableau 1 : Résumé des différentes activités enzymatiques, localisations et principales cibles des sirtuines chez les mammifères. Les sirtuines présentes des différences en termes d'activité enzymatique, de localisation et de fonction(s) chez les mammifères.

Les PARPs

Le NAD⁺ est également utilisé comme donneur d'ADP-ribose par des enzymes appelées poly-ADP-ribose polymérase (PARPs), ou ADP-ribose transférase (ARTDs et ARTCs) dans la nouvelle nomenclature (Hottiger et al., 2010). Ces enzymes sont activées lorsqu'elles reconnaissent des lésions à l'ADN induites par un excès de stress oxydant, et comme leur nom l'indique, forment de longs polymères d'ADP-ribose sur elles-mêmes et leurs protéines partenaires pour permettre le recrutement de la machinerie nucléaire de réparation des lésions à l'ADN.

Une activation modérée de PARP1 (ARTD1 dans la nouvelle nomenclature) dans le cœur est protectrice, mais une suractivation peut réduire drastiquement les taux de NAD cellulaire et ainsi altérer la signalisation d'autres enzymes utilisant le NAD comme SIRT1, conduisant au déclenchement des processus de mort cellulaire dans un modèle d'hypertrophie cardiaque par surcharge de pression (J. B. Pillai et al., 2005; Xiao et al., 2005). De manière intéressante, il a été montré que SIRT1 peut déacétyler et ainsi réprimer PARP1 (J. B. Pillai et al., 2005). Les deux enzymes utilisant le NAD⁺ pour leur activité catalytique, elles semblent ainsi comme impliquées dans des voies de signalisation en compétition pour orienter le sort de la cellule cardiaque en conditions de stress.

Il a été démontré plus récemment que PARP1 était également impliquée dans la régulation des voies métaboliques. Elle favorise en effet l'expression de certains gènes activés par le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes gamma (PPAR- γ) en améliorant la liaison des ligands et en facilitant l'échange des cofacteurs nécessaires à la transcription dans les adipocytes (Lehmann et al., 2015).

La fonction des autres ARTs est moins bien caractérisée, mais on peut citer l'ectoenzyme ART1 (ARTC1 dans la nouvelle nomenclature), qui est connue pour ADP-ribosyler un grand nombre de protéines membranaires et notamment l'intégrine- α 7 dans le muscle squelettique (Zolkiewska & Moss, 1997). Cette modification post-traductionnelle améliore l'adhésion de l'intégrine- α 7 à la laminine de la matrice extracellulaire, ce qui

pourrait avoir une importance dans la physiologie du muscle cardiaque compte tenu de son activité contractile intense.

L'ectoenzyme CD38

Une autre enzyme majeure consommant du NAD est l'ectoenzyme CD38, générant du NAM et de l'ADP-ribose cyclique (cADPr). Le cADPr est un second messager de la signalisation calcique influant notamment sur l'ouverture des récepteurs à la ryanodine du réticulum sarcoplasmique (Lukyanenko et al., 2001; Ogunbayo et al., 2011). L'ADP-ribose cyclique est également requis pour le maintien de l'élévation calcique induite par l'angiotensine-II après l'élévation rapide du Ca^{2+} liée aux récepteurs à l'inositol triphosphate (Gul et al., 2008). L'hydrolyse du NAD^+ par CD38 génère également de l'ADP-ribose, qui avec le cADPr est connu pour activer le canal TRPM2, un membre de la famille M des récepteurs cationiques à ouverture potentiel dépendante perméable au Ca^{2+} (Lange et al., 2008; Perraud et al., 2001).

Des souris déficientes en CD38 présentent une augmentation des taux de NAD^+ tissulaires même si de fortes différences peuvent être observées entre les études (Aksoy et al., 2006; Young et al., 2006). La contractilité du myocarde est significativement augmentée chez des souris mâles déficientes en CD38 (Gan et al., 2011). Ensemble, ces études suggèrent que CD38 est un régulateur important de la balance entre le NAD^+ intra- et extracellulaire, même si de nouvelles investigations seront nécessaires pour complètement comprendre ses mécanismes. Une étude récente a démontré que les niveaux de CD38 étaient particulièrement corrélés au taux de NAD^+ au cours du vieillissement dans un grand nombre de tissus dont le muscle squelettique, même si malheureusement le muscle cardiaque n'a pas été étudié (Camacho-Pereira et al., 2016).

3.3 Voies de biosynthèse du NAD⁺

La consommation du NAD⁺ par toutes ces voies métaboliques et de signalisation implique l'existence de mécanismes de biosynthèse afin de conserver les niveaux tissulaires de NAD⁺. L'intérêt de maintenir constant les taux de NAD⁺ fut mis en évidence dès le XVIII^{ème} siècle par l'observation d'une maladie appelée pellagre, signifiant « peau aigre », apparue en Italie et en Espagne et induite par la malnutrition. Cette maladie se manifestait par une triade de symptômes particulièrement sévères : une dermatite, des diarrhées aiguës, et dans les cas les plus grave, une démence. Un traitement précoce de la maladie fut la consommation en grande quantité de lait de vache (Goldberger, 1914), avant que soit finalement découvert que la maladie était liée à une carence en vitamines B3, précurseurs du NAD⁺. Une supplémentation en vitamines B3 est nécessaire et efficace pour traiter la pellagre (Naveen et al., 2013; P.T., 2005), et c'est pourquoi on retrouve parfois également ces vitamines sous le nom de vitamines PP, pour "Pellagra Preventive". Depuis, plusieurs voies de biosynthèse du NAD⁺ ont pu être mises en évidence chez les mammifères : une voie dite des précurseurs non amidés, par la synthèse *de novo* à partir de l'acide aminé Tryptophane (TRP) ou de la vitamine B3 acide nicotinique (NA), et des voies dites « de sauvetage » à partir de précurseurs amidés que sont le nicotinamide (NAM) et le nicotinamide riboside (NR).

Voie de synthèse *de novo*

Il existe une synthèse du NAD⁺ dite *de novo*, réalisée à partir de l'acide aminé tryptophane par une voie qu'on appelle voie des précurseurs non amidés. Comme résumé dans la Figure 9, cette synthèse nécessite de nombreuses étapes. En résumé, elle démarre avec la conversion du tryptophane en N-formylkynurénine par les enzymes indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) ou tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO), qui sont les enzymes limitantes de cette voie. Ensuite, quatre réactions enzymatiques transforment le N-formylkynurénine en α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdéhyde (ACMS) (Nikiforov et al., 2011). L'ACMS peut ensuite être totalement oxydé ou se cycliser spontanément pour

DE NOVO BIOSYNTHESIS

SALVAGE PATHWAYS

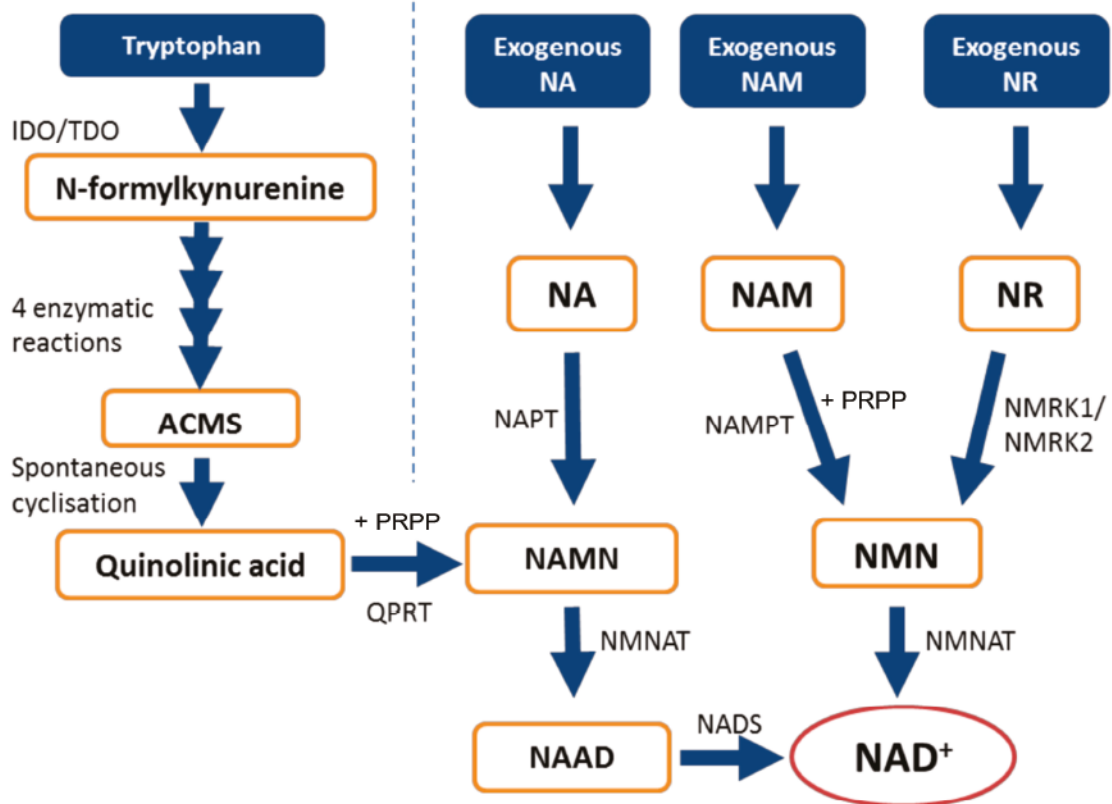


Figure 9 : Les voies de biosynthèse du NAD⁺. Le NAD⁺ peut être régénéré par le biais des multiples étapes de la synthèse *de novo* à partir de tryptophane, ou par les voies de sauvetage à partir de ses précurseurs de la famille des vitamines B3, l'acide nicotinique (NA), le nicotinamide (NAM) et le nicotinamide riboside (NR). Figure modifiée d'après Fletcher et al. 2017.

former de l'acide quinolinique. La Quinolinate phosphorybosyl transférase (QPRT) catalyse ensuite la conversion de l'acide quinolinique en acide nicotinique mononucléotide (NAMN). Ce dernier est fusionné à un groupe adénine monophosphate issu du clivage d'un ATP par les enzymes ubiquitaires nicotinamide mononucléotide adenylyl transférases (NMNATs) pour former l'acide nicotinique adénine dinucléotide (NAAD) (Nikiforov et al., 2011). Enfin, le NAAD subit une étape finale d'amidation *via* la NAD⁺ synthase (NADS) qui utilise la glutamine comme donneur d'amine pour aboutir à la molécule de NAD⁺ (Hara et al., 2003).

Chez la souris, la voie des précurseurs non amidés à partir du tryptophane semble toutefois avoir une contribution très restreinte dans la majorité des organes. À l'exception du foie et des reins, l'activité de la NADS y est en effet très réduite et la voie des précurseurs non amidés contribue pour seulement 0.7% du NAD⁺ produit dans le cœur (Mori et al., 2014).

Voies de « sauvetage » à partir des vitamines B3

La grande majorité de la biosynthèse du NAD⁺ dans le cœur et le muscle squelettique repose sur les vitamines B3. Comme illustré dans la Figure 9, ces voies de « sauvetage » resynthétisent le NAD⁺ à partir de 2 précurseurs amidés majeurs que sont le nicotinamide (NAM) et le nicotinamide riboside (NR) ou d'un précurseur non amidé l'acide nicotinique (NA). Ces métabolites ont une structure plus proche du NAD⁺ (voir Figure 10) et peuvent être puisés dans l'alimentation ou recyclés à partir des produits de l'activité des enzymes utilisant le NAD⁺ comme les sirtuines et les PARPs qui produisent du NAM.

Voie de l'acide nicotinique

Cette voie, que l'on appelle aussi voie de Preiss-Handler, est la première voie de sauvetage à avoir été caractérisée (Preiss & Handler, 1958). Elle permet d'aboutir à une molécule de NAMN par le transfert d'un ribose-phosphate sur le NA par la NA

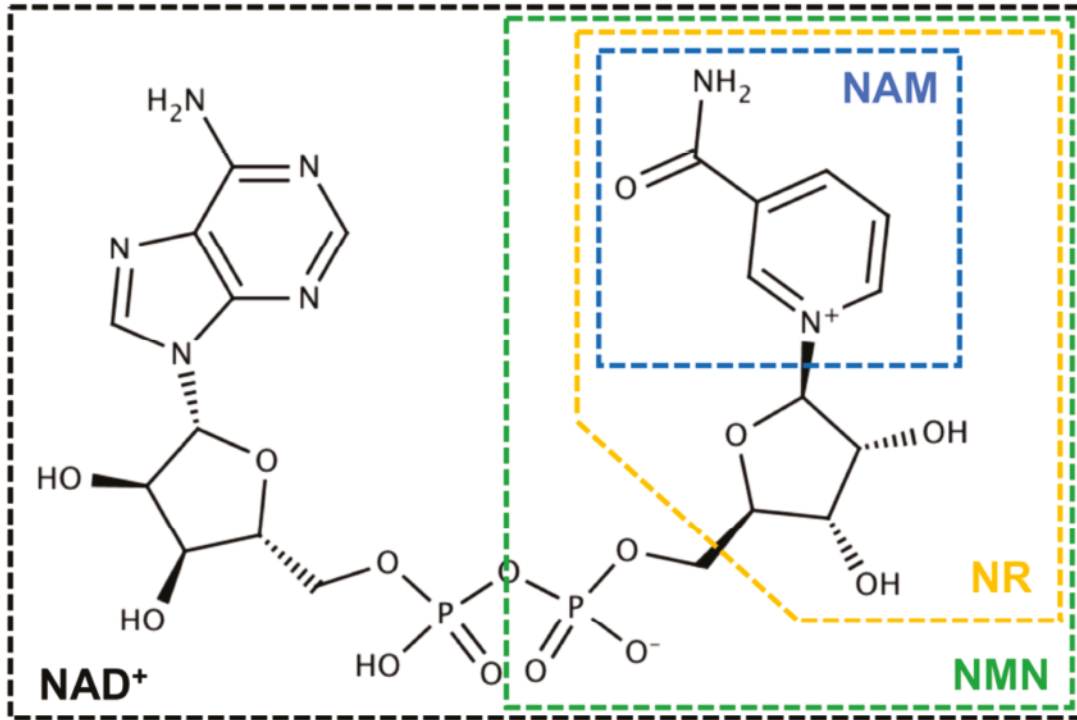


Figure 10 : La molécule de NAD⁺ et ses précurseurs. Le NAD⁺ et ses précurseurs, le nicotinamide mononucléotide (NMN), le nicotinamide riboside (NR) et le nicotinamide (NAM) partagent tous au moins une base pyridique.

phosphoribosyl transférase (NAPT). Les étapes suivantes pour aboutir à la molécule de NAD⁺ sont communes avec la voie *de novo*.

Voie de sauvetage par la NAMPT

La voie de sauvetage la plus connue pour resynthétiser le pool de NAD⁺ cellulaire est celle de la Nicotinamide phosphoribosyl transférase (NAMPT), qui est l'enzyme limitante de cette voie (Tan et al., 2013). Elle catalyse la conversion du NAM et du 5'-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) en nicotinamide mononucléotide (NMN) en utilisant une molécule d'ATP. Le NMN est ensuite converti en NAD⁺ par les NMNAT comme précédemment décrit pour le NAMN et le NAAD. Le NAM étant un produit de l'activité des sirtuines et des PARPs utilisant du NAD⁺, la NAMPT recycle ainsi le NAD⁺ utilisé par les voies de signalisation. Cette voie constitue donc une voie absolument essentielle pour maintenir les taux de NAD⁺. L'expression de la NAMPT est elle-même régulée par les taux de NAD⁺ et l'activité des sirtuines régulé de façon négative par les taux de NAM (T. Wang et al., 2006).

La NAMPT est une protéine dimérique à activité phosphoribosyl-transférase de type II. Elle a été décrite initialement comme une cytokine appelée *pre-B cell colony enhancing factor* (PBEF), avant d'être caractérisée comme une adipokine retrouvée dans la circulation et connue sous le nom de visfatine, puis de NAMPT. C'est une protéine très conservée et on la retrouve aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes, dans la majorité des tissus et types cellulaires, soulignant sa fonction primordiale pour la fonction cellulaire (Garten et al., 2015). Elle existe sous une forme cytosolique, majoritairement dans le cytosol et le noyau, ainsi qu'une forme extracellulaire sécrétée appelée eNAMPT, ou visfatine. L'inhibition pharmacologique de l'activité de la NAMPT par la FK866 entraine une chute drastique du taux de NAD cellulaire, qui conduit à la mort cellulaire (Hasmann & Schemainda, 2003; Tan et al., 2013). Le rôle de la eNAMPT n'a pas encore été clairement identifié, mais son activité est associée à l'induction de la NO synthase dans des contextes pro-inflammatoires comme le diabète par exemple (Romacho et al., 2009). L'eNAMPT a également été identifiée comme un régulateur positif de l'hypertrophie cardiaque (V. B.

Pillai et al., 2013), et on sait que la sécrétion de NAMPT dans le sérum est activée dans les neutrophiles en contexte d'insuffisance cardiaque induite par infarctus du myocarde (Montecucco et al., 2013).

Nouvelle voie de sauvetage par les kinases NMRK

En parallèle de cette voie bien décrite de la NAMPT, il existe une autre voie qui permet de synthétiser du NAD⁺ à partir d'un précurseur plus récemment découvert, le nicotinamide riboside (NR). Cette voie implique deux nouvelles kinases que sont les nicotinamide riboside kinases 1 et 2 (NMRK1 et NMRK2). Leur fonction est en effet de phosphoryler le NR en NMN, qui est par la suite converti en NAD⁺ par les NMNAT.

Les kinases NMRK ont tout d'abord été identifiées chez la levure par l'équipe de Charles Brenner qui a été la première à identifier le NR comme nouveau précurseur du NAD⁺ (Bieganowski & Brenner, 2004), capable de stimuler l'espérance de vie chez la levure per l'intermédiaire de *Sir2*, homologue de *Sirt1* chez les mammifères (Belenky et al., 2007). Si ces deux kinases NMRK1 et NMRK2 sont relativement proches, elles présentent des particularités distinctes comme une affinité différente au NR, NMRK1 ayant un Km de 0.088 mM pour le NR, quand NMRK2 présente un Km de 0.19 mM (Tempel et al., 2007). De plus, la kinase NMRK1 peut utiliser l'ATP et le guanosine triphosphate (GTP) comme substrat pour phosphoryler le NR en NMN, alors que la NMRK2 est spécifique de l'ATP pour cette réaction (Dölle & Ziegler, 2009; Tempel et al., 2007).

Encore trop peu de données sont disponible quant au rôle et la part que prennent les kinases NMRK1 et 2 dans la synthèse du NAD⁺, même si une étude récente montre qu'une perte de fonction de NMRK1 n'est pas critique pour le maintien des taux de NAD⁺ (Ratajczak et al., 2016). Cependant, cette même étude montre que NMRK1 prends tout de même une part essentielle dans la biosynthèse du NAD⁺ dans les hépatocytes en réponse à une supplémentation en NR et en NMN. Le rôle de la kinase NMRK2 est encore moins décrit à l'heure actuelle, même si elle fait preuve d'un intérêt croissant. Si la voie de sauvetage *via* la NAMPT a été précédemment décrite comme primordiale pour le maintien

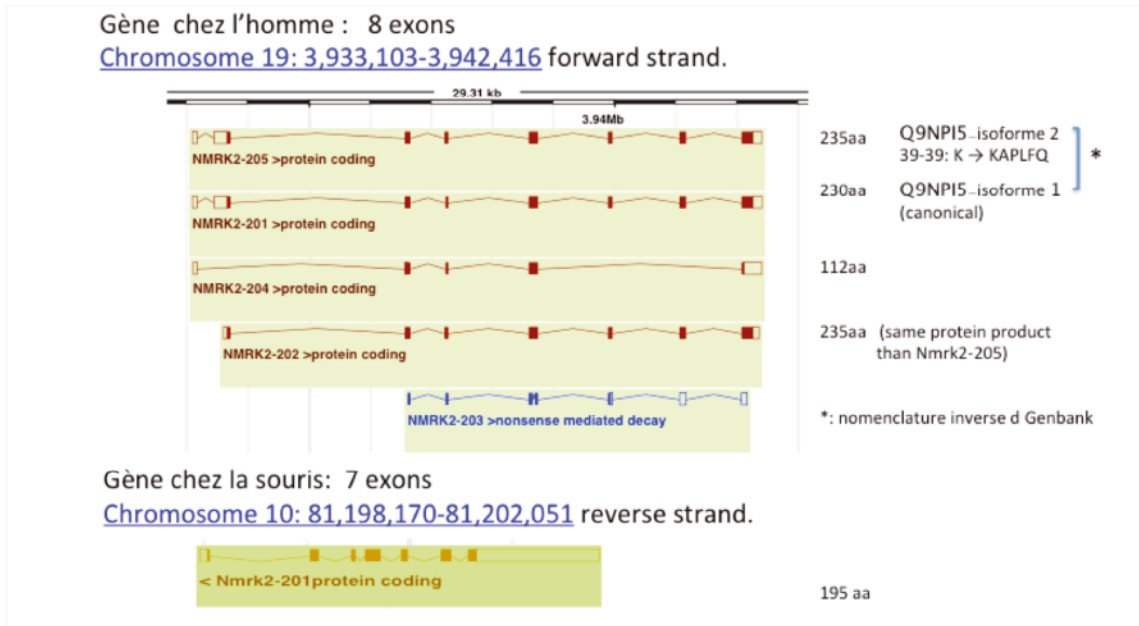
du taux de NAD⁺ dans de nombreux tissus comme le système nerveux, le foie, le tissu adipeux ou le muscle squelettique (Frederick et al., 2016; Liana R. Stein & Imai, 2014; Yoshino et al., 2011; Zhou et al., 2016), tout ou presque reste à étudier au sujet des kinases NMRK. Hautement conservées chez les eucaryotes, il semblerait cependant que NMRK1 soit exprimée de façon ubiquitaire (Liana R. Stein & Imai, 2014), quand NMRK2 serait exprimée spécifiquement dans le muscle strié, mais cela reste à caractériser.

Chez l'homme, 5 transcrits sont annotés sur le gène *NMRK2* présent sur le chromosome 19 dans la banque de donnée ENSEMBL contre 7 dans la banque de donnée Genbank (Figure 11). Ces transcrits sont prédits à partir des banques de données EST (Expressed Sequence Tag) comme issus d'épissages alternatifs du gène. Ils codent pour des protéines de différentes tailles. L'isoforme la plus longue comprend 235 résidus acides aminés (aa), le plus court faisant 145 aa. Il existe également une isoforme courte de 112 aa, prédit comme instable dans Genbank mais pas dans ENSEMBL. Le gène chez souris est décrit comme produisant un unique transcrit dans ENSEMBL et deux dans Genbank.

L'alignement des séquences protéiques des différentes isoformes montre que chez l'homme seules les isoformes 1 et 2 les plus longues contiennent l'ensemble des résidus décrits comme impliqués dans l'activité enzymatique des NR kinases sur la base d'une étude cristallographique de la kinase NMRK1 (Figure 12, (Tempel et al., 2007)).

Une protéine connue sous le nom de *muscle integrin binding protein* (MIBP), a été identifiée par l'équipe de Chuanyue Wu (J. Li et al., 1999) avant le clonage du gène complet chez l'homme par l'équipe de Charles Brenner (Bieganowski & Brenner, 2004). MIBP comprend une séquence à 100% identique à la partie N-terminale et C-terminale de l'isoforme 2 de la protéine NMRK2, suggérant qu'il s'agit du produit d'un épissage alternatif du gène. A l'heure actuelle, cette protéine MIBP n'est plus répertoriée dans les banques ou seulement comme un produit d'épissage aberrant. Néanmoins, elle pourrait ressembler en partie à l'isoforme X2 par exemple avec une délétion des résidus 40 à 44 en N-terminal (par rapport à la version longue, isoforme 1) et une délétion centrale des résidus 115 à 158 pour MIBP contre 113 à 136 pour X2.

A : structure du gène *NMRK2* dans la banque de données ENSEMBL



B : structure du gène *NMRK2* dans la banque de données Genebank

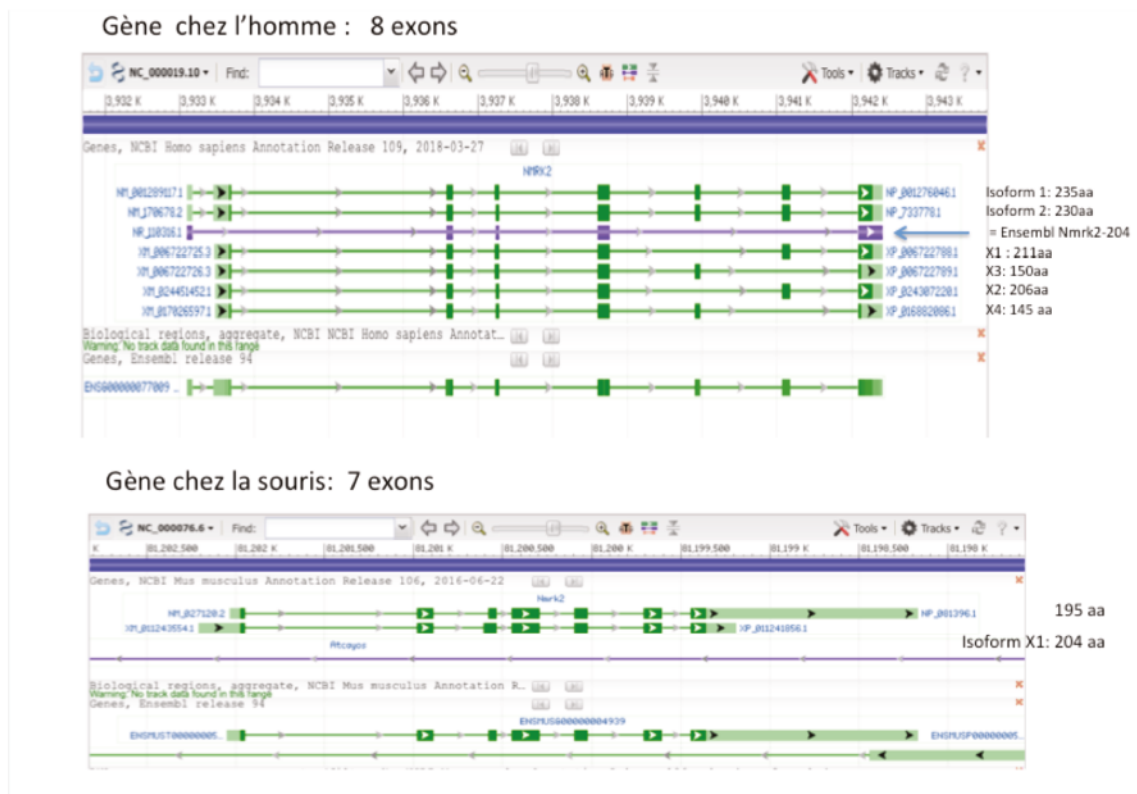


Figure 11 : Structure du gène *NMRK2* figurant dans les banques de données ENSEMBL et Genebank

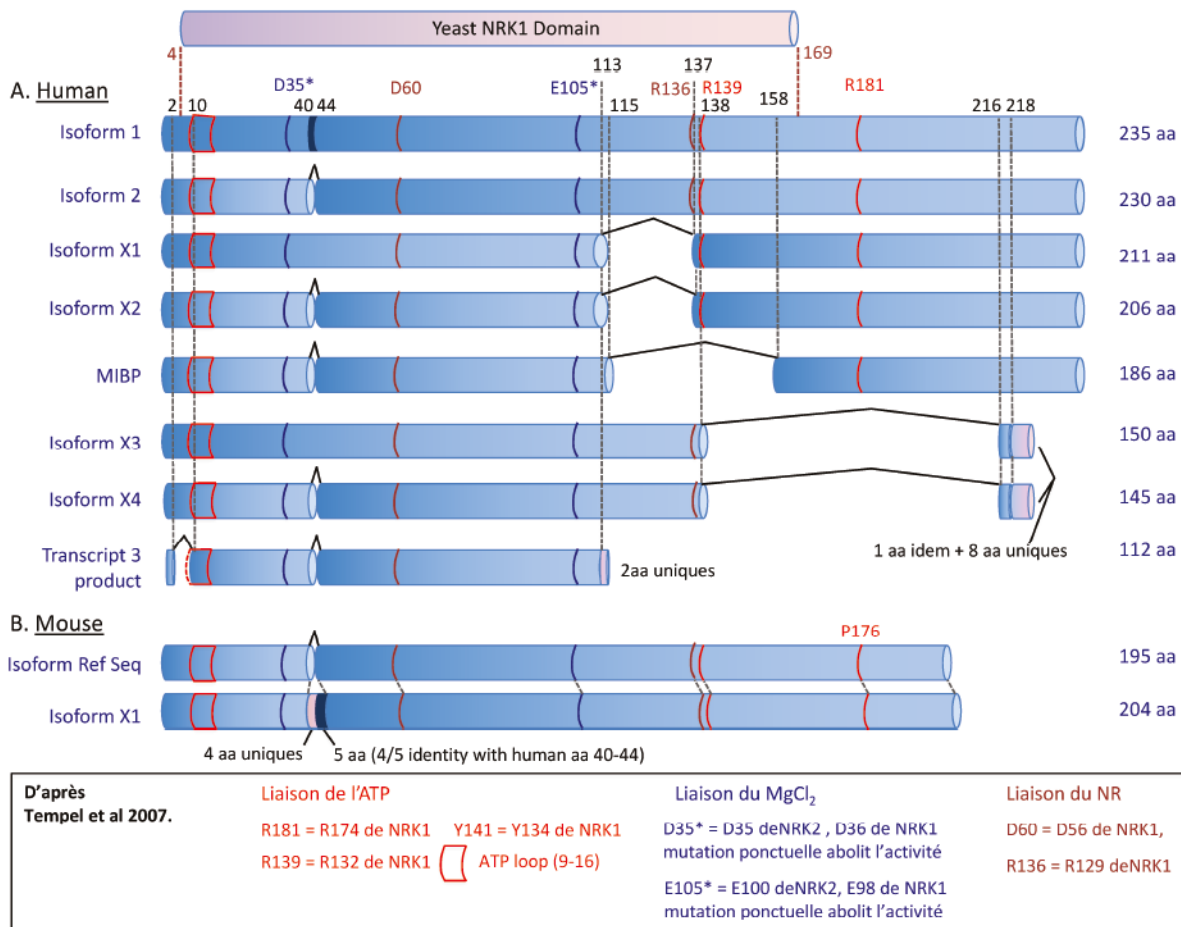


Figure 12 : Alignement des différentes isoformes protéiques de NMRK2. D'après Tempel et al, 2007.

MIBP a été décrit comme une protéine ayant la particularité de se lier à la partie cytosolique des intégrines $\beta 1$ et $\alpha 7$ et dont la surexpression dans des myoblastes murins C2C12 perturbe la différenciation myogénique (J. Li et al., 1999). La même équipe a ensuite démontré que la surexpression de MIBP inhibait l'adhésion cellulaire en perturbant le dépôt de la laminine dans la matrice extracellulaire *via* la phosphorylation de la paxilline par un mécanisme encore inconnu, et modulait ainsi la différenciation myogénique (J. Li et al., 2003). Les travaux de Charles Brenner ont toutefois montré que la forme MIBP est dépourvue d'activité enzymatique (donnée non montrée mais citée dans Bieganowski & Charles Brenner, 2004).

Une étude chez le poisson zèbre a également démontré que *Nrk2b*, orthologue de *Nmrk2*, était requis pour la formation normale des dépôts de laminine aux jonctions myotendineuses des muscles en développement et que ce phénotype observé chez les mutants déficients pour le gène *Nrk2b* pouvait être corrigé par l'ajout de NAD^+ dans le bassin des poissons (Goody et al., 2010). Cette étude montre donc que NMRK2 pourrait être important pour une morphogenèse musculaire et matricielle normale, et semble lier la fonction dans la voie de synthèse du NAD^+ avec une fonction liée au dépôt de la laminine. Il semble donc que NMRK2 a potentiellement un lien avec la signalisation des intégrines mais aucun mécanisme n'a été décrit à ce jour.

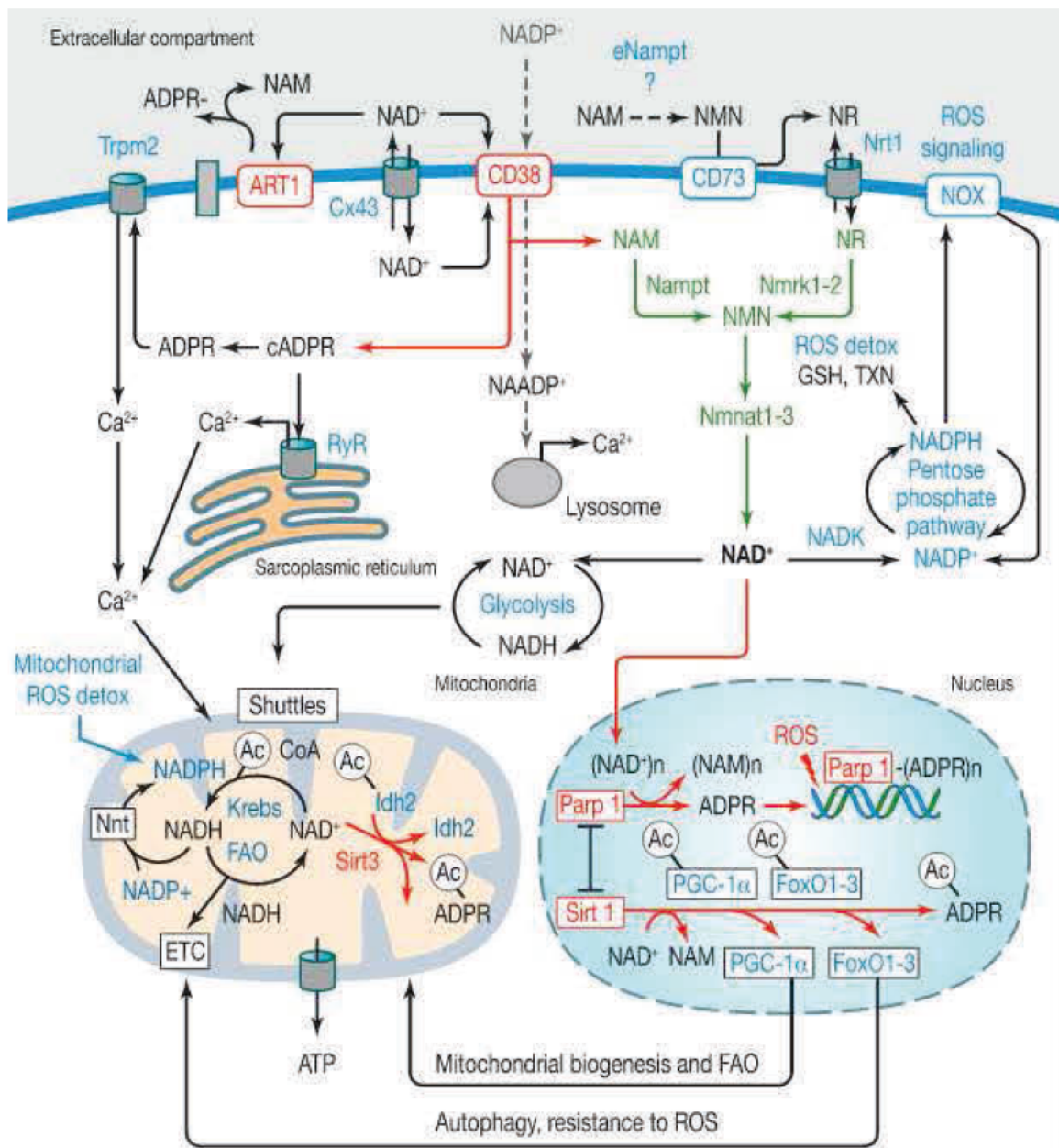


Figure 13 : Schéma récapitulatif des voies d'utilisation et de production du NAD⁺. Les voies de synthèses du NAD⁺ sont présentées en vert, les voies de consommation en rouge. De Merickay, 2016.

4. Métabolisme du NAD⁺ dans l'insuffisance cardiaque

4.1 Chute du NAD⁺ dans le cœur insuffisant

Les taux tissulaires de NAD⁺ peuvent être perturbés dans un certain nombre de pathologies, et une réduction de la concentration en NAD⁺ a pu être associée à de nombreux états physiopathologiques comme le diabète de type I (Charron & Bonner-Weir, 1999), la dégénérescence neuronale (Zhou et al., 2016), les maladies hépatiques (Trammell, Weidemann, et al., 2016) et la surdité caus e par le bruit associée à une perte de neurones auditifs (Brown et al., 2014). Dans ces exemples, l'hypothèse principale est que la chute du taux de NAD⁺ serait une conséquence de la suractivation des PARPs en réponse au stress oxydant, induisant ainsi une consommation excessive de NAD⁺.

Il a été démontré que le taux de NAD⁺ décline également au cours du vieillissement dans différents tissus chez le rat, notamment dans le cœur, le rein, le foie et les poumons (Braidy et al., 2011). Dans le cœur en particulier, le ratio NAD⁺/NADH chute de 0,7 à 0,1 entre 3 et 24 mois, avec une diminution du taux de NAD⁺ de près de 70% (Camacho-Pereira et al., 2016). Différentes autres études sur des modèles murins d'insuffisance cardiaque, incluant des modèles d'hypertrophie par surcharge de pression induite par constriction aortique ou d'ischémie-reperfusion, montrent également un taux réduit de NAD⁺ dans le cœur (Mericskay, 2016).

4.2 Stratégies de stimulation du métabolisme du NAD⁺ par les vitamines B3

La perturbation de la signalisation du NAD⁺ dans les différentes pathologies décrites précédemment démontre l'importance du NAD⁺ dans la régulation du métabolisme énergétique. Ce constat a commencé à orienter les recherches vers le développement de stratégies de stimulation de la signalisation métabolique en restaurant les taux de NAD⁺. L'utilisation d'inhibiteurs des PARPs par exemple, pour prévenir l'utilisation massive et excessive de NAD⁺, permet non seulement d'augmenter la biodisponibilité du NAD⁺ et le métabolisme mitochondrial induit par SIRT1, mais agit également comme agent anti-

cancéreux (Bai et al., 2011; To et al., 2014). D'autre part, des activateurs des sirtuines, comme le resvératrol, peuvent protéger de l'obésité induite par la résistance à l'insuline via une augmentation de l'oxydation des acides gras, une amélioration de la fonction endothéliale et une augmentation de la masse et de la fonction mitochondriale (Feige et al., 2008; Fujitaka et al., 2011; Milne et al., 2007). Ces stratégies semblent avoir des effets prometteurs pour un potentiel traitement thérapeutique des pathologies métaboliques. Plus récemment, de nouvelles stratégies par supplémentation en vitamines B3 ont vu le jour. Elles présentent l'avantage de reposer sur des précurseurs déjà habituellement présents dans l'alimentation et utilisés par l'organisme, ce qui en fait une approche non toxique avec des effets secondaires très limités.

Chronologiquement parlant, le premier précurseur du NAD⁺ à avoir été testé est l'acide nicotinique. Il a été le premier précurseur de la famille des vitamines B3 à être décrit pour le soigner la pellagre, puis caractérisé comme pouvant réduire l'hyperlipidémie, en réduisant les taux de triglycérides plasmatiques et de *low density lipoproteins* (LDL) (Altschul et al., 1955; Taskinen & Nikkilä, 1988). Cependant, l'activation le traitement au NA induit des effets indésirables comme une vasodilatation cutanée sévère via l'activation des cellules de Langerhans de l'épiderme (Benyo et al., 2006), ou plus grave encore une augmentation des acides gras non estérifiés circulants et une réduction de la sensibilité à l'insuline (van de Weijer et al., 2015), réduisant l'intérêt et le potentiel de ce précurseur pour stimuler le métabolisme du NAD⁺.

La supplémentation en NAM est une stratégie intéressante mais potentiellement limitée en raison de l'effet inhibiteur du NAM sur l'activité des sirtuines comme démontré dans le foie (Lee et al., 2013). L'utilisation du NAM a cependant été démontrée comme bénéfique dans un certain nombre de cas. Par exemple, dans un modèle d'ischémie cérébrale, l'administration de NAM à court terme permet de compenser la chute observée du NAD⁺ et d'inhiber l'activité des PARPs et des sirtuines, protégeant ainsi les neurones (D. Liu et al., 2009). Une supplémentation en NAM protège du stress oxydant et améliore la réponse immunitaire chez des rats diabétiques (John et al., 2012), cependant une autre étude rapporte qu'une trop forte dose de NAM peut être délétère pour le métabolisme

énergétique en favorisant notamment la résistance à l'insuline et en augmentant les dommages oxydatifs (D. Li et al., 2013).

Le NMN, à la différence des autres précurseurs de la famille des vitamines B3, n'est pas un précurseur naturellement retrouvé dans l'alimentation (Bieganski & Brenner, 2004). Son administration a été décrite comme pouvant améliorer l'intolérance au glucose et l'utilisation des lipides dans un contexte de régime riche en graisse *via* notamment une activation de SIRT1 (Yoshino et al., 2011). Elle améliore la dysfonction vasculaire et le stress oxydant lié à l'âge (de Picciotto et al., 2016).

Depuis la découverte des kinases NMRKs, un intérêt croissant s'est récemment porté sur l'utilisation du NR comme précurseur du NAD⁺. Il a en effet été récemment identifié comme étant le plus efficace chez l'homme et chez la souris pour augmenter la synthèse du NAD⁺ par administration orale, en comparaison à d'autres précurseurs comme le NMN ou le NAM (Trammell, Schmidt, et al., 2016). Le NR améliore la fonction mitochondriale en stimulant la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique de modèles murins de maladies mitochondriales (Cerutti et al., 2014; N. A. Khan et al., 2014). Dans un modèle d'obésité induite par un régime riche en graisses, le NR permet de protéger de la chute du NAD⁺ dans les tissus musculaires et le foie, et ainsi de préserver l'activité des sirtuines 1 et 3, et permet une meilleure sensibilité à l'insuline et une réduction du cholestérol (Cantó et al., 2012). Une autre étude montre qu'il diminue aussi l'intolérance au glucose tout en réduisant le développement de la stéatose hépatique chez des souris pré-diabétiques (Trammell, Weidemann, et al., 2016). De manière intéressante, une réduction de l'expression de la NAMPT, l'enzyme habituellement centrale pour le recyclage du NAD⁺ à partir du NAM, est retrouvée dans des modèles de pathologie cardiaque comme les modèles d'ischémie-reperfusion ou d'administration d'angiotensine II (Hsu et al., 2014).

Ces résultats suggèrent que le NR pourrait être un bon candidat comme précurseur utilisé par les voies de biosynthèse alternatives à la NAMPT en vue de stimuler le métabolisme du NAD⁺.

II. Objectifs de thèse

L'insuffisance cardiaque est un syndrome complexe et multifactoriel, caractérisé par une atteinte globale et progressive des capacités métaboliques cardiaques, illustrée par une altération de l'utilisation des substrats, des mécanismes de transfert d'énergie et de la fonction mitochondriale. Les traitements actuels de l'insuffisance cardiaque permettent d'épargner au cœur une consommation énergétique trop importante, mais ne ciblent pas les défauts de production et d'utilisation de l'énergie du cœur insuffisant. L'exercice physique est une stratégie bien connue de prévention des maladies cardiovasculaires et les effets bénéfiques de l'entraînement en endurance sur le métabolisme musculaire sont assez bien établis, mais les effets de l'exercice sur la fonction cardiaque en condition pathologique sont encore très peu décrits et soulèvent la question du ratio bénéfice-risque de la pratique de l'exercice chez le patient insuffisant. Ainsi, le premier objectif de cette thèse a été de :

#1 Caractériser les effets de l'exercice physique dans un modèle de cardiomyopathie dilatée

La difficulté de faire faire de l'exercice aux patients insuffisants cardiaques a néanmoins suscité la recherche d'autres stratégies visant à cibler pharmacologiquement les troubles métaboliques associés à l'insuffisance cardiaque. Au regard de la perte en NAD observée dans le myocarde malade, l'utilisation de précurseurs de la famille des vitamines B3 pour compenser la chute du NAD⁺ cardiaque est apparue comme une stratégie innovante. La NAMPT, l'enzyme majoritaire en conditions non pathologiques pour maintenir les taux de NAD⁺, est réprimée dans différents modèles d'insuffisance cardiaque et des résultats préliminaires de l'équipe laissent à penser que la kinase NMRK2 qui est exprimée spécifiquement dans les muscles striés et qui utilise le NR comme précurseur du NAD⁺ serait augmentée dans le contexte de l'insuffisance cardiaque. Partant de ce constat, le second objectif de cette thèse a été de :

#2 Comprendre le rôle de la voie de biosynthèse du NAD⁺ médiée par la kinase NMRK2 dans les tissus musculaire et cardiaque, et notamment :

2.1 Dans un modèle d'inactivation du gène *Nmrk2* chez la souris, rechercher le phénotype cardiaque et musculaire à l'état basal et dans des situations de stimulation du métabolisme énergétique, soit de type physiologique par l'exercice, soit pathologique par l'application d'un stress cardiaque.

2.2 Dans le contexte spécifique de la cardiomyopathie dilatée, étudier les effets de la supplémentation en NR sur le modèle *SRF^{HKO}* et rechercher le rôle de l'activation de NMRK2 dans ce modèle en générant des souris doublement invalidées pour les gènes *Srf* et *Nmrk2*.

III. Matériel et méthodes

3.1 Modèles animaux

3.1.1 Modèle SRF^{HKO}

Le modèle de cardiomyopathie dilatée utilisé dans ces travaux de thèse repose sur le modèle murin d'inactivation cardio-spécifique et contrôlée du gène du *Serum Response Factor* (SRF) développé par l'équipe du Dr Zhenlin Li (Parlakian et al., 2005). Cette inactivation est basée sur le système Cre-LoxP, qui permet de s'affranchir de la létalité embryonnaire causée par une inactivation totale et constitutive en permettant de déclencher cette invalidation chez la souris adulte. Pour cela, le transgène de la recombinase CRE est exprimé sous le contrôle du promoteur de l' α -MHC, permettant ainsi son expression spécifiquement dans le cœur. Dans ce modèle, la CRE est fusionnée à deux domaines *Mutated Estrogen Receptor* (MER) en N-terminal et C-terminal, qui permettent sa séquestration dans le cytosol une fois traduite. L'injection de tamoxifène, une hormone de synthèse modulant spécifiquement les récepteurs aux œstrogènes, induit la translocation de la recombinase CRE dans le noyau et ainsi l'excision de l'exon 2 du gène SRF situé entre deux séquences LoxP. L'inactivation de SRF induisant une CMD a ainsi été déclenché chez les animaux entre l'âge de 8 et 10 semaines par injection intrapéritonéale de tamoxifène pendant 3 jours consécutifs à une dose de 20 mg/kg/jour.

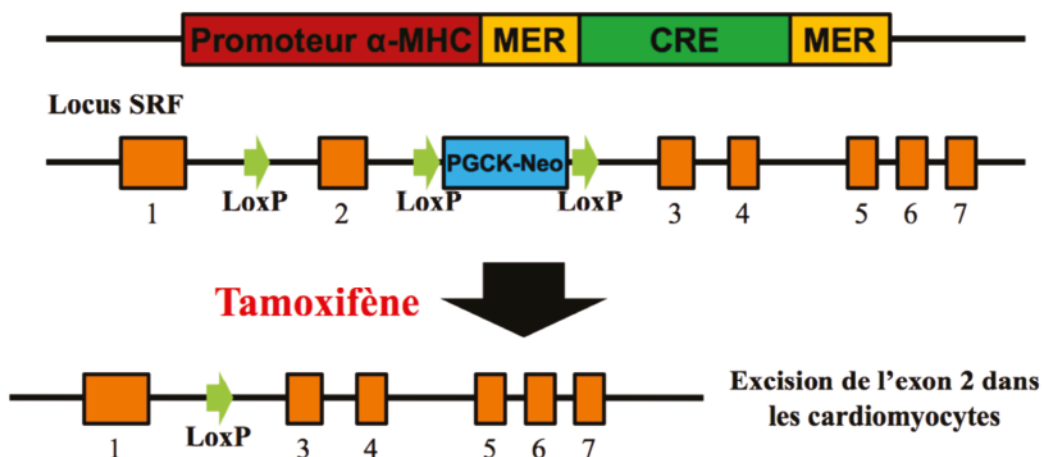


Figure 14 : Représentation schématique de la construction génétique permettant l'inactivation du gène SRF par injection de tamoxifène

Sept jours après injection, SRF est complètement invalidée et n'est plus retrouvé dans le cœur. Une baisse de la contractilité cardiaque progressive apparaît après 3 semaines, reflétée par une altération de la fraction d'éjection du ventricule gauche. La dilatation cardiaque apparaît après 4 semaines, et s'aggrave jusqu'à induire une insuffisance cardiaque terminale entraînant la mort des animaux 8 semaines après injection. Compte tenu de la cinétique de l'établissement de l'insuffisance cardiaque dans ce modèle, nous avons choisi de baser nos études après un temps défini de 40 jours après injection de tamoxifène, pour étudier les effets de l'exercice et de la supplémentation en NR sur la fonction et le métabolisme cardiaque.

3.1.2 Modèle *Nmrk2*^{KO}

Pour comprendre le rôle de la kinase NMRK2 dans le tissu musculaire strié squelettique et cardiaque, l'équipe a généré une lignée d'animaux invalidés de façon constitutive pour le gène codant pour la kinase NMRK2. Pour cela, la séquence complète du gène *Nmrk2* a été remplacée grâce à la technique de recombinaison homologue par une séquence LacZ couplée à une cassette PGK-Neo, de manière à pouvoir sélectionner les embryons correctement invalidés. Ce modèle est un *knock-out* total de NMRK2, et n'est pas létal à l'état embryonnaire.

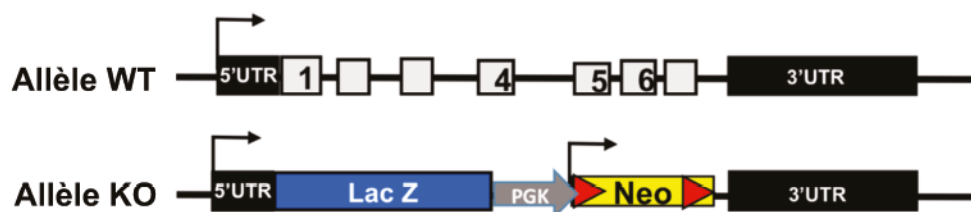


Figure 15 : Représentation schématique de la construction génétique permettant l'invalidation constitutive du gène de la kinase NMRK2

Un suivi de la fonction cardiaque et différentes expériences visant à déterminer le phénotype cardiaque tout au long de la vie de ces animaux ont été réalisés de 4 à 24 mois,

et l'implication de NMRK2 aux effets de l'entraînement en endurance sur les muscles squelettique et cardiaque a été évaluée dans ce modèle sur des animaux âgés de 16 mois.

3.1.3 Modèle SRF^{HKO} - $Nmrk2^{KO}$

Nous avons également croisé des animaux de la lignée SRF^{HKO} avec des animaux de la lignée $Nmrk2^{KO}$ pour obtenir des animaux double-transgéniques invalidés pour SRF et pour NMRK2, afin d'étudier le rôle de cette kinase dans le contexte de l'insuffisance cardiaque et dans les effets liés à une supplémentation en NR. Après injection de tamoxifène, des animaux âgés de 8 à 10 semaines ont été supplémentés ou non en NR et un suivi de la fonction cardiaque au cours du temps a été réalisé ainsi que différentes expériences visant à déterminer le phénotype métabolique cardiaque à 40 jours chez ces animaux.

3.1.4 Modèle $Nmrk2^{TG}$

Pour étudier les effets de la suractivation de la protéine NMRK2 sur la fonction et le métabolisme cardiaque dans un contexte physiologique sain, nous avons généré une lignée d'animaux transgéniques surexprimant NMRK2 de façon inducible dans le coeur. Cette lignée a pu être obtenue en collaboration avec l'équipe de G. Lavery à l'université de Birmingham (Royaume-Uni) qui nous a fourni des animaux possédant une construction permettant la surexpression conditionnelle de NMRK2 aux locus ROSA26, que nous avons croisés avec notre lignée exprimant la recombinaison CRE sous le promoteur de l' α -MHC pour que cette surexpression soit cardiospécifique. La surexpression de NMRK2 a été induite par injection intrapéritonéale de tamoxifène pendant 3 jours consécutifs à une dose de 20 mg/kg/jour comme précédemment et les animaux de 8 à 10 semaines supplémentés en NR pour évaluer le phénotype cardiaque.

3.2 Supplémentation en NR

Les animaux ont été supplémentés au NR *via* l'alimentation. Pour cela, des croquettes ont été préparées manuellement deux fois par semaine en mélangeant 660 mg de NR avec 200 g de nourriture en poudre SAFE A03 et 94 mL d'eau. Cette dose a été mis au point pour assurer un apport minimum de 450 mg de NR/kg/jour, pour une consommation moyenne de 3 grammes de nourriture par animal par jour. Les croquettes préparées ont été stockées à 4°C et une petite quantité distribuée chaque jour aux animaux pour éviter l'altération de la vitamine. La supplémentation a été effectuée 5 jours après injection de tamoxifène chez les différents modèles d'animaux transgéniques, la nourriture était disponible *ad libitum* et aucune différence en terme de consommation n'a été observée entre les animaux contrôles et les animaux transgéniques.

3.3 Exercice musculaire

3.3.1 Exercice volontaire

L'exercice volontaire a été utilisé comme mode d'entraînement chez les souris SRF^{HKO} développant une cardiomyopathie dilatée. Sept jours après injection de tamoxifène, les animaux ont été répartis de façon aléatoire dans les groupes sédentaires et entraînés par randomisation. Les animaux destinés à être entraînés ont été transférés dans des cages individuelles équipées d'une roue métallique pour une durée de 4 semaines. Dans un souci de reproduire au maximum les conditions environnementales et expérimentales entre les groupes, les animaux sédentaires ont également été transférés dans des cages individuelles pour toute la durée du protocole d'entraînement. Pendant ces 4 semaines, la distance parcourue par les animaux a pu être mesurée de façon précise et quotidienne grâce à deux aimants fixés sur la roue et son support, et un compteur de tours électronique.

3.3.2 Entraînement en endurance

Après répartition des animaux dans les groupes sédentaires et entraînés par randomisation, les animaux destinés à être entraînés ont été acclimatés au dispositif de course pendant 3 jours consécutifs afin de réduire le stress induit ce nouvel environnement. Les animaux ont ensuite subi un entraînement en endurance sur tapis roulant pendant une durée de 9 semaines, 5 jours par semaine. Chaque séance d'entraînement était constituée d'une phase d'échauffement de 15 minutes (5 minutes à une vitesse de 5 cm/s, 5 minutes à 10 cm/s et 5 minutes à 15 cm/s), suivie d'une période de 45 minutes d'entraînement à 15 cm/s, dont la vitesse a été progressivement augmentée au fil de l'avancée du protocole pour finir à 30 cm/s. Le même protocole d'entraînement (durée et vitesse de course) a été strictement suivi par tous les animaux.

3.4 Analyses fonctionnelles

3.4.1 Échocardiographie

Les mesures de la morphologie et des paramètres fonctionnels cardiaques ont été réalisées en échocardiographie. Les animaux ont été anesthésiés par induction à 2% d'isoflurane pendant 5 minutes puis maintenus à 0,5% pendant toute la durée des mesures. Les mesures des dimensions du ventricule gauche (VG) ont été réalisées à l'aide d'un appareil à ultrasons (Vivid 7 Dimension, GE Healthcare) et d'une sonde de 12 MHz de fréquence. L'analyse des images obtenues en mode temps-mouvement (TM) en vue parasternale selon le petit axe cardiaque ont permis d'obtenir la mesure des paramètres suivants en diastole et en systole : diamètre du VG (LVd et LVs), épaisseur du septum interventriculaire (IVSd et IVSs) et de la paroi postérieure du ventricule gauche (LVPWd et LVPWs). Les volumes de la cavité du ventricule gauche en fin de diastole et de systole (EDV et ESV) ont été calculés selon la formule de Teichholz :

$$ESV = \frac{7 \times LVs^3}{2,4 + LVs}$$

Le volume d'éjection et la fréquence cardiaque ont également été mesurés. La fraction d'éjection du ventricule gauche a été calculé à partir de la mesure des volumes cardiaques selon la formule de Simpson :

$$FE = \frac{EDV-ESV}{EDV} \times 100$$

Le ratio épaisseur/rayon du ventricule gauche en diastole (h/r) a également été calculé d'après ces mesure selon la formule suivante :

$$h/r = \frac{LVPWd + IVSd}{LVd}$$

3.4.2 Test d'effort

Pour évaluer la capacité musculaire des animaux à l'effort, nous avons réalisé un test d'épuisement sur tapis roulant. Après une période d'acclimatation au dispositif de 3 jours, les animaux ont été soumis à une période d'échauffement de 15 minutes (5 minutes à une vitesse de 5 cm/s, 5 minutes à 10 cm/s et 5 minutes à 15 cm/s) puis la vitesse de course a été progressivement augmentée de 1 cm/s chaque minute, jusqu'à épuisement des animaux. Les signes d'épuisement ont été définis comme 5 stimuli aversifs (chocs électriques) subits en moins de 60 secondes, ou plus de 5 secondes passées par l'animal sur la grille électrique sans intention de reprendre la course. Les résultats de ce test sont exprimés en temps de course et en vitesse maximale atteints avant épuisement.

3.5 Analyses histologiques

3.5.1 Fibrose cardiaque par coloration Rouge Sirius

La fibrose cardiaque a été quantifiée à l'aide d'une coloration histologique au Rouge Sirius. Pour cela, les cœurs ont été prélevés au moment du sacrifice et découpés en deux

parties égales selon une ligne perpendiculaire au grand axe cardiaque dans la partie la plus large. La partie apicale a ensuite été directement incluse dans du Tissue-Tek (Sakura, USA) et congelée à -150°C dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide, puis stocké à -80°C. Les blocs de cœur ainsi congelés ont ensuite été découpés en coupes fines de 8 µm à l'aide d'un microtome (CM1860 Cryostat, Leica) et déposées sur des lames de verre. La coloration des fibres de collagène cardiaque a ensuite été réalisée par marquage histologique au rouge picroSirius. Les coupes de cœur ont été fixées pendant 10 minutes dans du paraformaldéhyde dilué à 3,7%, lavées rapidement à l'eau distillée puis à l'éthanol absolu pendant 5 minutes. Après fixation, les coupes ont été marquées pendant 60 minutes dans une solution de rouge picroSirius dilué à 0,3% dans de l'acide picrique, puis rincées et fixées à l'acide acétique 0,5% pendant 10 minutes. Après ces étapes, les coupes ont été déshydratées dans différents bains d'alcool en pourcentages croissants puis dans du xylène, pour être finalement montées sous lamelles. À l'issue de ce marquage, les fibres de collagènes sont colorées en rouge et le tissu cardiaque en jaune. Le pourcentage de fibrose cardiaque totale a été calculé à partir d'images prises sur ces lames en microscopie photonique et quantifié à l'aide du logiciel ImageJ.

3.5.2 Taille et type de fibre musculaire par marquage en immunohistochimie

La taille et le type de fibres musculaires ont été mesurées sur des coupes de muscle squelettique congelées de 8 µm obtenues de la même façon que les coupes de cœur (voir paragraphe précédent) à partir des muscles *soleus* et *plantaris*. Pour déterminer la taille des fibres musculaire, un marquage de la laminine, une protéine de la matrice extracellulaire, a été réalisé par immunohistochimie sur ces coupes de muscle. Un marquage par immunohistochimie des isoformes MHC-I, MHC-IIA et MHC-IIB des chaînes lourdes de myosine a été réalisé en parallèle pour déterminer la présence le type des fibres musculaires dans le *soleus* et le *plantaris*. Les différentes isoformes ont été marquées par les anticorps monoclonaux de souris BAD5 (spécifique de MHC-I, IgG2b, dilution 1 :100), SC-71 (spécifique de MHC-IIA, IgG1, dilution 1:100) et BF-F3 (spécifique de MHC-IIB, IgM, dilution 1:100) obtenus de la *Developmental Studies Hybridoma Bank* (DSHB, University of

Iowa). La laminine a été marquée par un anticorps polyclonal de lapin (L9393, Sigma). Les coupes transversales de tissu musculaire ont été fixées pendant 5 minutes dans du paraformaldéhyde dilué à 3,7%, lavées deux fois 5 minutes dans du PBS, perméabilisées pendant 10 minutes dans une solution de Triton 0,1%, lavées deux fois, saturées dans de la BSA *IgG-free* 5% pendant 45 minutes, lavées une fois, incubées avec un anticorps anti-F(ab) de souris produit chez la chèvre pendant 20 minutes pour réduire les interactions non spécifiques avec les anticorps primaires, lavées une fois, puis finalement incubées avec les anticorps primaires dirigés contre les isoformes de MHC et la laminine à 4°C pendant une nuit. Le lendemain, après trois lavages de 5 minutes dans du Tween20 dilué à 0,1% dans du PBS, les coupes ont été incubées avec des anticorps secondaires dirigés contre les différentes formes d'anticorps primaires utilisés pendant une heure : anti IgG2b de souris produit chez la chèvre et couplé au fluorophore Alexa Fluor® 350, anti IgG1 de souris produit chez la chèvre et couplé au fluorophore Alexa Fluor® 555, anti IgM de souris produit chez la chèvre et couplé au fluorophore Alexa Fluor® 488, et anti lapin produit chez la chèvre et couplé au fluorophore Alexa Fluor® 633, chacun dilué au 1:400 dans de la BSA *IgG-free* 5%. Après trois lavages de 5 minutes dans du Tween20 dilué à 0,1% dans du PBS, les coupes de muscle ont été montées sous lamelle avec du glycérol 70%. Des images de ces coupes en microscopie à fluorescence (DMi8, Leica) ont été prises à un grossissement de 400x. La taille des fibres musculaires a été déterminée à l'aide d'une macro codée avec le logiciel imageJ permettant de délimiter le contour des fibres grâce au marquage laminine, puis ajusté à la main. Le type de fibres pures ou mixtes pour MHC-I, MHC-IIA et MHC-IIB a été obtenu par comptage manuel des fibres à partir des marquages en immunohistochimie. Les fibres pures pour l'isoforme MHC-IIX ne sont pas marquées par les anticorps utilisés et apparaissaient noires sur les images.

3.6 Modèles cellulaires

3.6.1 Culture primaire de cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés

Des rats nouveau-nés de un à deux jours ont été tués par décapitation puis le cœur prélevé et rincé dans une solution d'ADS (1,7 g NaCl, 1,19 g HEPES, 30 mg NaH₂PO₄, 250 mg Glucose, 100 mg KCl et 25 mg MgSO₄ dans 250 mL d'eau, pH7,35) sur glace. Après élimination des oreillettes, les ventricules cardiaques ainsi isolés ont été découpés en morceaux d'environ 1 mm de diamètre, et mis à digérer dans une solution de 0,5 mg/mL de collagénase A (Roche, #10103586001) et 0,5 mg/mL de pancréatine (Sigma, P1750) pendant 7 fois 20 minutes sous agitation à 37°C. À chaque cycle de digestion, le surnageant contenant les cellules isolées a été récupéré dans 2 mL de sérum de veau foetal (NCS) et stocké à 37°C. À la fin de la digestion, l'ensemble des cellules issues des différents cycles de digestion ont été récupérés et resuspendus dans 8 mL de NCS. Les cellules ont ensuite été déposées sur des gradients de Percoll (GE Healthcare) de densité différente (une phase inférieure à 0,66 g/mL et une phase supérieure de 0,47 g/mL) et centrifugées à 3000 g pendant 30 minutes à température ambiante pour séparer les cardiomyocytes des fibroblastes cardiaques. Après récupération du disque de cardiomyocytes à l'interface entre les deux phases de Percoll, les cellules ont été resuspendues et mises en culture dans un milieu composé de : 67 mL de DMEM (Gibco, #21885025), 17 mL de milieu 199 (Gibco, #22350029), 10 mL de sérum de cheval (Gibco, #16050122), 5 mL de sérum de veau foetal (Gibco, #10270106) et 1 mL d'antibiotiques pénicilline et streptomycine (PS) (Gibco, #15140122) pour 100 mL de milieu final. Les cardiomyocytes ont enfin été déposés dans des boîtes de culture cellulaire préalablement coatées avec de la laminine à 10 µg/mL (Gibco, #2317015). 48h après isolement, le milieu de culture a été renouvelé et les cellules traitées au NR en concentrations de 100 µM à 1 mM et/ou à la FK866 à 10 µM, inhibiteur pharmacologique de la NAMPT. Les cellules ont ensuite été gardées en culture jusqu'au 7^{ème} jour après isolement où elles ont été utilisées pour différentes expériences.

3.6.2 Culture primaire de cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes

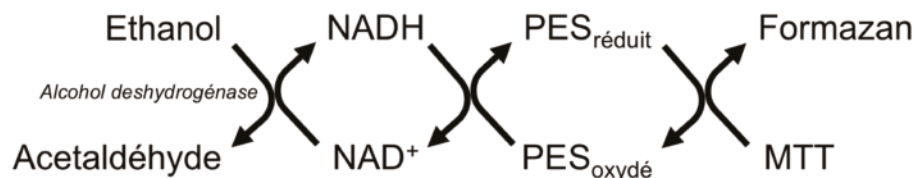
Pour isoler les cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes, des rats de 250 g ont été euthanasiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital à 100 mg/kg et leur cœur prélevé et rincé dans une solution stock refroidie à 4°C et composée de : 117 mM NaCl, 5,7 mM KCl, 4,4 mM NaHCO₃, 1,5 mM KH₂PO₄, 1,7 mM MgCl₂, 21 mM HEPES, 11,7 mM Glucose, 10 mM Créatine, 20 mM Taurine, pH7,1. Le cœur a ensuite été canulé par l'aorte et rincé par perfusion rétrograde avec cette même solution stock pendant 4 minutes à un flux de 6 mL/min à 37°C. Après digestion par perfusion de solution stock supplémentée en collagénase A (Roche, #10103586001) à 1 mg/mL pendant 45 minutes à un flux de 4 mL/min, le cœur a été récupéré dans la solution stock contenant 25 µM de Ca²⁺ et débarrassé des oreillettes et des vaisseaux. Les ventricules digérés ont été passés à travers un filtre pour éliminer les débris tissulaires et les cardiomyocytes ont été récupérés dans un tube à hémolyse. Enfin, les cellules ont subi plusieurs cycles de décantation successive d'environ 10 minutes dans la solution stock contenant 5 mg/mL de BSA et des concentrations croissantes de Ca²⁺ de 25 à 300 µM puis resuspendues dans un milieu de culture contenant du MEM (Sigma, M4780), supplémenté à 2,5% de NCS (Gibco, #10270106), 20 mM HEPES et 1% de PS (Gibco, #15140122) et déposées dans des boîtes de culture cellulaire préalablement coatées avec de la laminine à 10 µg/mL (Gibco, #2317015). Le milieu de culture a été renouvelé et les cellules traitées au NR en concentrations de 100 µM à 1 mM et/ou à la FK866 à 10 µM, inhibiteur pharmacologique de la NAMPT.

3.7 Analyses en biologie moléculaire

3.7.1 Extraction et quantification du NAD

Le NAD a été extrait à partir de biopsies de tissu congelé, broyées dans une solution tampon d'éthanol 75%, HEPES 2,5 mM à pH7,1 à l'aide d'un homogénéisateur à billes de céramique (Precellys, Bertin Instruments). Les échantillons ont ensuite été chauffés à 80°C

pendant 3 minutes pour favoriser l'extraction du NAD et centrifugés à 15000 g pendant 20 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Le NAD est extrêmement stable dans ce tampon et résiste à une dégradation par la chaleur pendant plus de 60 minutes. Après extraction, les échantillons ont été dilués au 1/20^{ème} en milieu acide dans un tampon HCl 10 mM et en parallèle dans ce même tampon neutralisé au Tris 1M pH8, puis chauffés à 60°C pendant 30 minutes. Cette étape de chauffage détruit le NADH sans altérer le NAD⁺ : on dose ainsi pour un même échantillon le NAD⁺ et le NAD total, ce qui permet de déduire par différence le taux de NADH. Le dosage repose sur une technique colorimétrique basée sur le recyclage du NAD, dont la vitesse de réaction est corrélée à l'oxydation du MTT en Formazan selon les réactions suivantes :



Les échantillons ont ainsi été dosés en triplicats dans un tampon composé de 0,5 mM 3-(4.5-dimethylthiazol-2-yl)-2.5-diphenyltetrazolium (MTT), 2 mM phenazine ethosulfate (PES), 600 mM ethanol, 120 mM Bicine (pH7,8) et 0,05 mg/mL alcool deshydrogénase de levure (Sigma, #A3263). La vitesse d'apparition du précipité bleu/violet lié à la précipitation du Formazan a été mesuré par mesure de l'absorption à 550 nM toutes les 30 secondes pendant 40 minutes avec un lecteur de plaque (Infinite 500, TECAN), et comparé à une gamme de NAD⁺ en concentrations connues pour déterminer le taux de NAD⁺ et NADH dans les échantillons.

3.7.2 Mesure du niveau d'expression des gènes par RT-qPCR

Le niveau d'expression de gènes impliqués dans l'hypertrophie cardiaque, la fibrose ou le métabolisme cardiaque a été mesuré par la méthode de RT-PCR quantitative, qui associe une transcription inverse des ARNs à une réaction de PCR pour amplifier

spécifiquement les séquences d'ADNc et ainsi quantifier le niveau d'expression des gènes étudiés.

Extraction des ARN messagers

Les ARNs totaux ont été extraits à partir de biopsies cardiaques par broyage dans 1 mL de tampon de lyse TRIzol® (Invitrogen, #15596018) à l'aide d'un homogénéisateur tissulaire à billes de céramiques (Precellys, Bertin Instruments). Les ARNs ont ensuite été isolés par ajout de 200 µL de chloroforme et centrifugation à 10000 g pendant 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse supérieure a été prélevée et les ARNs précipités par ajout de 500 µL d'isopropanol pendant la nuit à 4°C. Après centrifugation à 10000 g pendant 15 minutes à 4°C, le culot d'ARNs a été lavé 3 fois à l'éthanol 70% pour éliminer les traces éventuelles de TRIzol® et d'isopropanol avant d'être séché et repris dans 20 µL d'eau sans ARNases et ADNases et conservés à -80°C. Les ARNs ainsi purifiés ont été quantifiés en mesurant l'absorbance à 260 nm avec un spectrophotomètre (Nanodrop 2000).

Transcription inverse

Les ARNs purifiés ont ensuite été transformés en ADN double brin complémentaire (ADNc) par transcription inverse grâce au kit iScript Reverse Transcriptase (BioRad, #1708840), utilisant une version modifiée de la transcription inverse de Moloney Murine Leukemia Virus et des amorces oligo-DT complémentaire de la queue poly-A des ARNm pour amorcer la transcription. 1 µg d'ARNm ont ainsi été transcrits en ADNc dans 20 µL de mix, pendant 20 minutes à 42°C.

PCR quantitative en temps réel

Les ADNc ont ensuite été quantifiés par la technique de PCR en temps réel qui consiste à suivre la réplication d'une séquence d'ADN cible au cours du temps sur une série de cycles d'amplifications. Elle repose sur le fonctionnement d'une PCR classique,

constituée d'une phase de dénaturation de l'ADN double brin, d'une phase d'hybridation avec des amorces spécifiques synthétisés pour encadrer spécifiquement la séquence du gène d'intérêt, et une phase d'élongation au cours de laquelle se déroule la synthèse du brin d'ADN complémentaire à partir des amorces. L'amplification de la séquence d'ADN d'intérêt est suivie au fil des cycles de polymérisation grâce au SYBR® Green, un intercalant de l'ADN qui émet une fluorescence verte lorsqu'il s'incorpore entre les bases de l'ADN double-brin. Les réactions de PCR ont été réalisées en triplicats sur plaques 384 puits dans un volume réactionnel de 7,5 µL contenant 0,8 ng/µL d'ADNc, 0,5 µM de chaque amorce et 3,5 µL de SsoAdvanced™ Supermix (Biorad, #1725274) contenant le SYBR® Green, la Taq polymérase et les oligonucléotides nécessaires à la polymérisation. Les réactions de PCR ont été menées grâce à un thermocycleur couplé à un système de détection de la fluorescence (CFX384, Biorad). La quantification du niveau d'expression des gènes d'intérêt est basée sur le principe du *cycle threshold*, c'est-à-dire du cycle de PCR auquel le signal de fluorescence dépasse un certain seuil déterminé. Les valeurs d'expressions des gènes d'intérêts sont toujours exprimées de manière relative à l'expression de gènes de référence connus pour leur stabilité dans les conditions expérimentales données.

3.7.3 Mesure de l'expression de protéines par Western-blot

Les niveaux d'expressions des protéines et l'acétylation globale des protéines ont été mesurés par la technique du Western-blot. Pour cela, les protéines totales ont été extraites à partir de biopsies cardiaques par homogénéisation dans un tampon de lyse RIPA composé de 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 µM PJ-34, 70 µM acide tannique, ainsi que des antiprotéases, antiphosphatases et antidécétylases. Après homogénéisation, les extraits ont été centrifugés à 10000 g pendant 15 minutes à 4°C et le surnageant contenant les protéines prélevé et stocké à -80°C. La concentration protéique a ensuite été déterminée par dosage colorimétrique BCA, basé sur la propriété de l'acide bicinchoninique à former un complexe pourpre avec l'ion cuivre I, réduit à partir du cuivre II par les protéines en milieu alcalin. La mesure de l'absorbance à 560 nm a ainsi été réalisée à l'aide d'un lecteur de plaque (Infinite 500,

TECAN), et comparé à l'absorbance d'une gamme de BSA de concentrations connues pour déterminer la concentration des extraits protéiques. 20 µg de protéines par échantillon ont ensuite été dénaturées et séparées sur gel par électrophorèse SDS-PAGE et transférées sur membrane de nitrocellulose. Les protéines d'intérêt ont ensuite été détectées par incubation avec des anticorps primaires pendant une nuit à 4°C. Les protéines liées aux anticorps primaires ont ensuite été révélées par des anticorps secondaires conjugués à une peroxydase HRP (Jackson ImmunoResearch) et un système de détection de la chimiluminescence (iBright, Thermo Fisher Scientific). Les bandes détectées ont ensuite été quantifiées à l'aide du logiciel imageJ.

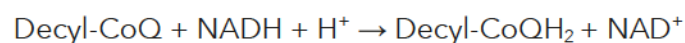
3.8 Étude du métabolisme énergétique

3.8.1 Analyse de l'activité enzymatique

L'activité de différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique ont été mesurée en spectrophotométrie après extraction dans un tampon d'homogénéisation composé de 5 mM HEPES, 1 mM EGTA, 0,1% Triton, 1 mM DTT, 10 µM PJ-34, 70 µM acide tannique, ainsi que des antiprotéases, antiphosphatases et antidéacétylases.

Complexe I

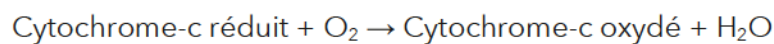
L'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale a été mesurée par sa capacité de réduire le NADH en NAD⁺ en transférant les électrons à la décyl-Ubiquinone selon la réaction suivante, suivie par mesure de l'absorbance à 340 nm résultant de la réduction du NADH :



Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate composé de 41 mM KH_2PO_4 , 9 mM K_2HPO_4 , 3,75 mg/mL BSA, 100 μM décyl-ubiquinone. Une première mesure basale avec ou sans roténone à 20 μM , inhibiteur pharmacologique du complexe I, a été réalisée, puis une deuxième mesure après ajout de NADH à 100 μM a permis de déterminer l'activité spécifique du complexe I.

Complexe IV (cytochrome c oxydase)

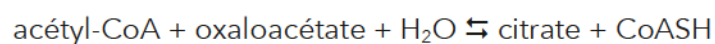
Le complexe IV, ou cytochrome-c oxydase (COX), est un des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et participe à la phosphorylation oxydative de l'ATP en oxydant le cytochrome-c :



Le cytochrome-c réduit et sa forme oxydée n'ont pas le même spectre d'absorption, ce qui permet de suivre la disparition du cytochrome-c réduit par mesure de l'absorbance à 550 nm. Une première mesure basale avec du cytochrome-c réduit à 90% dans un tampon 50 mM K_2HPO_4 à pH7,4 a été réalisée, puis une seconde mesure après ajout de l'échantillon a permis de déterminer l'activité spécifique de la COX.

Citrate synthase

La Citrate synthase est une enzyme du cycle de Krebs utilisée comme marqueur de l'activité mitochondriale. Elle catalyse la réaction :



Cette réaction enzymatique est réversible, et ne permet pas de mesurer tel quel l'appartition des produits. Pour ce dosage, on utilise le 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) qui réagit avec le CoASH pour former l'ion $\text{C}_6\text{O}_4\text{S}_2^-$ dont on peut mesurer l'apparition en mesurant l'absorbance à 412 nm :



L'activité de la citrate synthase a ainsi pu être déterminée après une première mesure basale effectuée dans un tampon Tris 100 mM pH8 contenant 100 μM de DTNB et 300 μM d'acétyl-CoA. La différence induite par l'ajout de 500 μM d'oxaloacétate a permis par déduction de calculer l'activité spécifique de l'enzyme.

3.8.2 Analyses des capacités oxydatives et glycolytiques des cardiomyocytes en culture avec l'appareil Seahorse

Les capacités de la chaîne respiratoire mitochondriale et de l'utilisation du glucose par les cardiomyocytes ont été mesurées sur des cardiomyocytes de rats nouveau-nés avec le système d'analyseur Seahorse (XFe96, Agilent). Les cardiomyocytes ont étéensemencés à une densité de 40000 cellules par puit dans des plaques de culture Seahorse spécifiques (Agilent, #101085-004) préalablement coatées à la laminine et traitées au NR et à la FK866 comme décrit précédemment dans le paragraphe **3.6.1**.

Mitochondrial Stress Test

Le jour de l'expérience, les cellules ont été incubées pendant une heure dans un milieu de culture non tamponné (Seahorse, 102353-100) supplémenté en 10 mM glucose, 1 mM pyruvate et 2 mM glutamine à pH7,4. Les cellules ont ensuite subi un protocole de « stress mitochondrial » par injection successive d'oligomycine à 2 μM pour inhiber l'ATP synthase, de FCCP à 1 μM pour découpler la chaîne respiratoire et induire une respiration maximale, et enfin d'amytal à 1 mM et d'antimycine A à 0,5 μM pour inhiber spécifiquement les complexes I et III de la chaîne respiratoire. L'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale a été suivie par la consommation d'oxygène dans le milieu (OCR), exprimée en pmoles d'oxygène consommé par minute. Ces différentes injections ont permis de déduire différents paramètres comme la respiratoire basale des cellules, la part dédiée à la

production d'ATP et celle liée à la fuite des protons à travers la membrane, ainsi que la capacité de réserve de la chaîne respiratoire pour atteindre une respiratoire maximale.

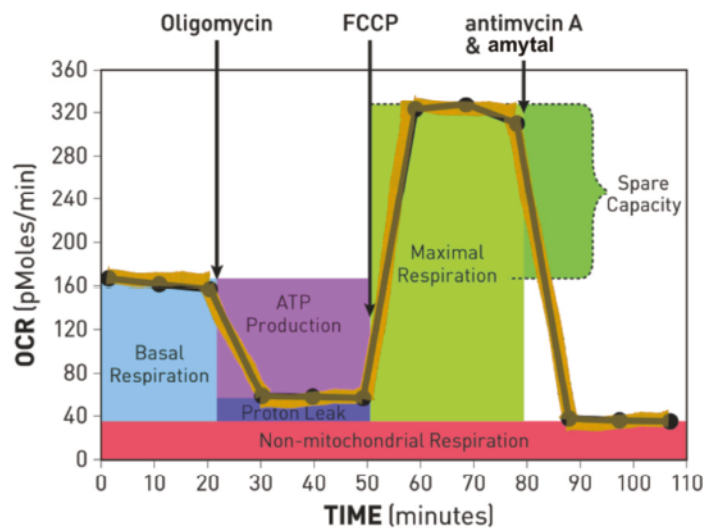


Figure 16 : Profil du « Mitochondrial Stress Test » Seahorse et paramètres calculés.

Glycolysis Stress Test

Sur le même principe que le test précédemment, un test de « stress glycolytique » a permis de déterminer différents paramètres clés de la glycolyse. Après incubation pendant une heure dans un milieu non tamponné (Seahorse, 102353-100) dépourvu de glucose et simplement supplémenté en 1 mM glutamine, les cellules ont subi une série d'injection de glucose à 10 mM, d'oligomycine à 1 μ M et de 2-Deoxy-D-glucose (2-DG) à 50 mM. Ces injections ont permis de caractériser le taux de glycolyse normal et la capacité de réserve des cellules à mobiliser la glycolyse lorsque la chaîne respiratoire est inhibée. Le 2-DG est un analogue non hydrolysable du glucose, qui entre en compétition avec le glucose et inhibe complètement la glycolyse lorsqu'il est en excès. La glycolyse a été mesurée par le taux d'acidification du milieu extracellulaire (ECAR), exprimée en milli-unités de pH par minute.

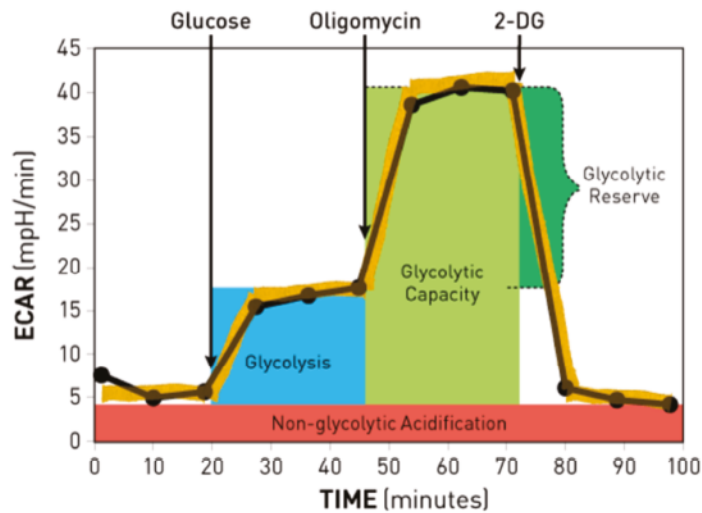


Figure 17 : Profil du test de « Glycolysis Stress Test » Seahorse et paramètres calculés.

3.9 Analyses statistiques

Tous les protocoles ont été réalisés après assignation des animaux dans les différents groupes expérimentaux par randomisation. Le respect de la normalité des groupes a été vérifié par la méthode de Shapiro-Wilk, puis les groupes ont été comparés par test de student, ANOVA un facteur ou ANOVA deux facteurs en fonction de la nature des données, ou par leur équivalent non paramétrique en cas de non-respect de la normalité. Les valeurs sont exprimées en tant que moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne.

IV. Résultats

4.1 Impact de l'exercice volontaire sur l'insuffisance cardiaque induite par une cardiomyopathie dilatée

4.1.1 Introduction

Dans cette étude, finalisée pendant ma première année de thèse après mes travaux de master 2 initiés dans l'équipe du Pr. Onnik Agbulut, je me suis intéressé à la caractérisation des effets de l'exercice volontaire dans le contexte de l'insuffisance cardiaque induite par la cardiomyopathie dilatée dans le modèle d'invalidation du gène SRF. La course volontaire a été choisie comme mode d'entraînement dans cette étude. Ce modèle est en effet moins intensif que l'entraînement sur tapis roulant car il laisse aux animaux la possibilité de courir selon leurs capacités individuelles et permet ainsi d'éviter de potentiels effets délétères induits par une course forcée, dans un contexte d'insuffisance cardiaque où une intolérance à l'exercice est parfois décrite (Upadhyia et al., 2015). L'objectif de ces travaux était d'étudier l'effet de l'exercice volontaire au moment de l'établissement d'une dysfonction cardiaque mais avant le stade de l'insuffisance cardiaque sévère. C'est pourquoi nous avons permis aux animaux de courir dès 7 jours après la perte de SRF induite par l'injection de tamoxifène, à un stade encore complètement asymptomatique sur le plan fonctionnel mais où on sait qu'un remodelage moléculaire a déjà commencé. La fonction cardiaque des animaux a été suivie par échocardiographie avant le début du protocole et après 4 semaines d'exercice volontaire, puis les animaux ont été sacrifiés et le cœur prélevé. L'analyse de la fibrose cardiaque en histologie et du profil d'expression de gènes et de protéines impliquées ont été réalisés pour tenter de comprendre et de caractériser les effets de l'exercice volontaire sur le métabolisme énergétique et mitochondrial cardiaque.

4.1.2 Résultats

Cette étude a fait l'objet d'une publication en premier auteur dans le journal *Frontiers in Physiology* en Novembre 2017. J'ai réalisé l'ensemble des expériences de cette étude, à l'exception des analyses en échocardiographie effectuées par N. Mougenot.



Voluntary Exercise Improves Cardiac Function and Prevents Cardiac Remodeling in a Mouse Model of Dilated Cardiomyopathy

Robin Deloux^{1,2}, Damien Vitiello^{1,3,4}, Nathalie Mougenot⁵, Philippe Noirez^{3,4}, Zhenlin Li¹, Mathias Mericskay^{1,2}, Arnaud Ferry^{3,6} and Onnik Agbulut^{1*}

¹ Sorbonne Universités, UPMC University Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine, UMR Centre National de la Recherche Scientifique 8256, Biological Adaptation and Aging, Paris, France, ² UMR-S 1180, National Institute for Health and Medical Research, University Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France, ³ Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, Paris, France, ⁴ Institute for Research in Medicine and Epidemiology of Sport, EA7329, National Institute of Sport, Expertise and Performance, Université Paris Descartes, Paris, France, ⁵ Sorbonne Universités, UPMC University Paris 06, UMS28, Plateforme d'Expérimentation Coeur, Muscles, Vaisseaux, Paris, France, ⁶ Sorbonne Universités, UPMC University Paris 06, Institut de Myologie, UMR-S 794, National Institute for Health and Medical Research, UMR Centre National De La Recherche Scientifique 7215, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Jianhua Li,
Pennsylvania State University College
of Medicine, United States

Reviewed by:

Erica N. Chirico,
Cooper Medical School of Rowan
University, United States
Y. Gul Ozkaya,
Akdeniz University, Turkey

*Correspondence:

Onnik Agbulut
onnik.agbulut@upmc.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Exercise Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 04 July 2017

Accepted: 24 October 2017

Published: 15 November 2017

Citation:

Deloux R, Vitiello D, Mougenot N,
Noirez P, Li Z, Mericskay M, Ferry A
and Agbulut O (2017) Voluntary
Exercise Improves Cardiac Function
and Prevents Cardiac Remodeling in a
Mouse Model of Dilated
Cardiomyopathy.
Front. Physiol. 8:899.
doi: 10.3389/fphys.2017.00899

Objective: Despite the indubitable beneficial effect of exercise to prevent of cardiovascular diseases, there is still a lack of studies investigating the impact of exercise in non-ischemic dilated cardiomyopathy. Here, we investigated the impact of voluntary exercise on cardiac function in a mouse model of non-ischemic dilated cardiomyopathy (α MHC-MerCreMer:Sf/Sf), induced by cardiac-specific inactivation of the Serum Response Factor.

Materials and Methods: Seven days after tamoxifen injection, 20 α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice were assigned to sedentary ($n = 8$) and exercise ($n = 12$) groups. Seven additional α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice without tamoxifen injection were used as control. The exercise group performed 4 weeks of voluntary running on wheel (1.8 ± 0.12 km/day). Cardiac function, myocardial fibrosis, and mitochondrial energetic pathways were then blindly assessed.

Results: Exercised mice exhibited a smaller decrease of left ventricular (LV) fractional shortening and ejection fraction compared to control mice. This was associated with a lower degree of LV remodeling in exercised mice, as shown by a lower LV end-systolic intraventricular septal and posterior wall thickness decrease from baseline values compared to sedentary mice. Moreover, exercised mice displayed a reduced gene expression of atrial and brain natriuretic factors. These benefits were associated by a reduced level of myocardial fibrosis. In addition, exercised mice exhibited a higher mitochondrial aconitase, voltage-dependent anion-selective channel 1 and PPAR gamma coactivators-1 alpha proteins levels suggesting that the increase of mitochondrial biogenesis and/or metabolism slowed the progression of dilated cardiomyopathy in exercised animals.

Conclusions: In conclusion, our results support the role of voluntary exercise to improve outcomes in non-ischemic dilated heart failure (HF) and also support its potential for a routine clinical use in the future.

Keywords: non-ischemic cardiac disease, dilated cardiomyopathy, non-forced exercise, wheel exercise

INTRODUCTION

Heart failure (HF) is the common final stage of most cardiovascular disorders and despite significant advances in drug management and interventional procedures, it remains one of the highest causes of morbidity and mortality worldwide (Rodriguez et al., 2013). HF is the final consequence of a complex cardiac remodeling initiated by different types of hemodynamic stress, such as myocardial infarction, chronic arterial hypertension, or fibrosis. Cardiomyopathies are the leading causes of HF in the world (Stehlik et al., 2012). Among them, dilated cardiomyopathy (DCM) represents the most frequent disease leading to HF in young adult patients (Stehlik et al., 2012; Savvatis et al., 2015). However, the molecular mechanisms leading to DCM (and lately HF) can be very heterogeneous. The DCM is a very heterogeneous pathology and involves many perturbations of the protein homeostasis in sarcomeres, nuclear membrane and cytoskeleton, or calcium metabolism. In the cytoskeleton, actin, and myosin are particularly affected (Fatkin and Graham, 2002). Despite the improvement of medication management and interventional procedures, the treatment of DCM remains to be addressed. This is due to the fact that in contrast to the ischemic forms of HF which can now be treated with procedures such as revascularization, valve repair, or remodeling operations, the only option for DCM treatment, once the disease has reached a terminal stage of drug refractoriness remains heart transplantation (Hershberger et al., 2010). In this setting, less invasive therapeutic and/or preventive approaches like physical activity, would signify a promising non-pharmaceutical, preventive therapeutic strategy for this category of HF patients.

Exercise training has emerged as an alternative non-pharmaceutical strategy to prevent cardiovascular diseases and current evidence has pointed out the usefulness of exercise training for secondary prevention of HF (Sharma et al., 2001; Guyatt and Devereaux, 2004; Downing and Balady, 2011; Gasiowski and Dutkiewicz, 2013; Gayda et al., 2016; Ribeiro et al., 2017). Despite that exercise training yields an improvement of cardiac function and quality of life in HF patients, its effects on humans are still controversial. In the case of chronic HF, it has been shown that long-term exercise at a moderate intensity decreases mortality and hospital readmission for HF and increases the quality of life after a cardiac infarction (Belardinelli et al., 1999). In addition, a significant, but modest effect of exercise training on reduction of the combined endpoint was reported by the largest trial of exercise training in chronic HF (O'Connor et al., 2009). However, other studies have reported that HF with preserved LV ejection fraction (HFpEF) was associated with a decline of cardiovascular reserve leading to exercise intolerance, particularly when it has been difficult to stabilize the heart rate after a short exercise (Upadhyaya et al., 2015;

Gupte and Hamilton, 2016). These discrepancies regarding the benefits of chronic exercise could be explained by the variability of exercise training intensity levels and duration or by the age of patients and the different physiopathology in HFpEF compared to HF with reduced LV ejection fraction (HFrEF) that were mostly recruited in the other studies (Belardinelli et al., 1999; O'Connor et al., 2009). The molecular and cellular mechanisms involved in the insufficient heart with physical activity are still poorly known. In this study, we aimed to determine the impact of voluntary exercise during the establishment of HF in a mouse model of DCM. For this purpose, we selected a mouse model of non-ischemic DCM triggered by cardiac-specific inducible inactivation of the Serum Response Factor (SRF-HKO mice) (Parlakian et al., 2005; Diguët et al., 2011), a major regulator of cardiac genes and microRNAs that is repressed in human failing hearts (Davis et al., 2002; Chang et al., 2003). Results of the current work strongly supported the role of voluntary exercise to improve outcomes in non-ischemic HF and support its potential for a clinical use in the future.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Voluntary Exercise

All procedures were performed in accordance with national and European legislations, in conformity with the Public Health Service Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals, and were approved by our institutional Ethics Committee "Charles Darwin" (Permit number: #4370). In this study, 27 nine-month old conditionally invalidated serum response factor (SRF) mice (α MHC-MerCreMer:Sf/Sf) were used. The Cre-mediated excision of floxed SRF alleles in the heart was induced by daily intraperitoneal tamoxifen (20 mg/kg/day; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) injections on three consecutive days. Seven days after first tamoxifen injection, α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice were allocated to sedentary (SRF-HKO, $n = 8$) and exercise (SRF-HKO wheel, $n = 12$) groups. Moreover, seven α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice without tamoxifen treatment were used as control (sedentary). Each voluntary active mouse was housed in an individual cage containing a wheel during 4 weeks, after 7 days of acclimation to the running wheel. It should be noted that mice of the exercise group were selected based on their capacity (i.e., running distance achieved) to run into wheel. The wheels were equipped with a magnet mounted on an outside surface and magnetic sensor connected with a digital counter and timer. Thus, an accurate measurement of the daily running distance and running duration was performed for each mouse in each of the 4 weeks of the voluntary training protocol. To reproduce the same experimental condition sedentary animals were also housed in an individual

cage and were fed with standard chow diet containing 16% protein, 3% lipids (A04-10, Safe Scientific Animal Food & Engineering, Augy, France).

Echocardiography

Echocardiography was performed on anesthetized mice under isoflurane (induction with 2% and maintained with 0.5%; Ferry et al., 2015). Non-invasive measurements of left ventricular (LV) dimensions were done using echocardiography-Doppler (Vivid 7 Dimension/Vivid7 PRO; GE Medical System Co, Vélizy, France) with an ultrasound probe at 9–14 MHz frequency range. The bi-dimensionally guided time-motion recording mode (parasternal long-axis view) of the left ventricle (LV) provided the following measurements: diastolic (IVSd) and systolic intraventricular septal (IVSs) and posterior wall thicknesses (LVPWd and LVPWs), LV end-diastolic (LVEDD) and end-systolic diameters (LVESD) and heart rate. Each set of measurements was obtained from the same cardiac cycle. LV shortening fraction (LVSF) was calculated using the formula: $(LVEDD - LVESD) / LVEDD \times 100$. LV myocardial volume (LVV), LV end-diastolic (EDV), and end-systolic (ESV) volumes were calculated using a half-ellipsoid model of the LV (Ferry et al., 2015). From these volumes, LV ejection fraction (LVEF) was calculated using the formula: $(EDV - ESV) / EDV \times 100$. The LV thickness / LV radius ratio (h/r) was also assessed in all animals. Echocardiographic measures were performed before (baseline) and 40 days (sacrifice) after tamoxifen injections (Ferry et al., 2015).

Cardiac Fibrosis

After sacrifice, hearts were cut in two equal halves following a line perpendicular to the short axis. Apical halves were then immediately fixed in Tissue-Tek (Sakura, USA) and frozen at -150°C in liquid nitrogen-cooled isopentane, and stored at -80°C until they were sliced into 8- μm -thick cryosections using an ultramicrotome (CM1860 Cryostat, Leica). Cardiac fibrosis was characterized with the PicroSirius Red staining. Frozen sections were fixed for 10 min in 3.7% formaldehyde, and washed with distilled water and 100% ethanol for 5 min. Sections were then transferred for 60 min in a 0.3% picric acid Sirius red solution, rinsed and fixed with acetic acid 0.5% for 10 min. After these steps, sections were dehydrated in a series of alcohols and then xylene and mounted in Eukitt. The extent of fibrosis was quantified using ImageJ software (12 randomly selected images per sample) and was expressed as the fibrotic content.

Relative Quantification of Gene Expression by qPCR

Total RNA was extracted from the apex of hearts using TRIzol[®] lysis reagent (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France) and a tissue homogenizer (Bio-Gen PRO200) following the manufacturer's instructions. Extracted RNA was quantified by spectrophotometry using NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France). From 500 ng of extracted RNA, first-strand cDNA was then synthesized using the high capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France) with random primers

according to manufacturer's instructions. Using the Light Cycler[®] 480 system (Roche Diagnostics, Meylan, France), the reaction was carried out in duplicate for each sample in a 6- μl reaction volume containing 3 μl of SYBR Green Master Mix, 500 nM of the forward and reverse primers each and 3 μl of diluted (1:25) cDNA. The thermal profile for SYBR Green qPCR was 95°C for 8 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 15 s, and 72°C for 30 s. To exclude PCR products amplified from genomic DNA, primers were designed, when possible, to span one exon-exon junction. Data were collected and analyzed using the LightCycler[®] 480 software, release version 1.5.0 (Roche). Primers sequences used in this study are available on request. The gene expression stability of *Hmbs* (Hydroxymethylbilane synthase) was used as the reference transcript.

Western Blotting

Total proteins were extracted from the heart into an ice-cold lysis buffer containing Tris-HCl 20 mM at pH7.6, NaCl 250 mM, EDTA 3 mM, EGTA 3 mM, NP40 0.5%, DTT 2 mM, Na Orthovanadate 10 mM, Glycerophosphate 10 mM, and 2% of protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and quantified with Bradford colorimetric assay. After a denaturation step for 5 min at 95°C , equal amounts of protein extracts (25 μg) were separated by SDS-PAGE before electrophoretic transfer onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France).

Western blot analysis was carried out using anti-Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α (PGC1 α) (1:200, rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-Voltage-dependent anion-selective channel 1 (VDAC1) (1:1000, mouse monoclonal, Abcam, Paris, France), anti-mitochondrial aconitase (ACO2) (1:2000, rabbit polyclonal, kindly provided by Pr Bertrand Friguet, University Pierre and Marie Curie), and an anti-Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (1:3000, rabbit polyclonal, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Proteins bound to primary antibodies were visualized with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Thermo-Fisher Scientific, Saint-Herblain, France) and a chemiluminescent detection system (ECL-Plus, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). Bands were quantified by densitometric software (Multi Gauge, Fujifilm).

Statistical Analysis

For echocardiography analysis, two-way ANOVA with repeated measures on one factor was performed. When an effect was detected, *post-hoc* Bonferroni comparisons were performed. For qPCR and western blots analysis, group normality and homogeneity of variances between groups were assessed using Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. Differences between SRF-HKO and SRF-HKO wheel groups were then statistically compared using *t*-test, or Kruskal & Wallis tests when normality or homogeneity of variance is not achieved. Values are expressed as mean \pm S.E.M.

RESULTS

Effects of Voluntary Exercise on Cardiac Function

Seven days after tamoxifen injection to induce SRF inactivation, twenty α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice were assigned to the sedentary (SRF-HKO, $n = 8$) and exercise (SRF-HKO wheel, $n = 12$) groups. The exercise group (SRF-HKO wheel) underwent 4 weeks of voluntary running on the wheel and daily running distance was recorded during 4 weeks. The longest daily running distance performed by SRF-HKO wheel mice has been reached during the third week of the voluntary training protocol (2.24 ± 0.25 km). The mean daily running distance was 1.8 ± 0.12 km/day. Moreover, the mean weight of mice before exercise protocol is 29.3 ± 1.4 g (baseline) and it did not differ between two groups after 4 weeks (sacrifice) (30.7 ± 2.7 SRF-HKO vs. 30.3 ± 1.7 SRF-HKO wheel). Voluntary exercise was initiated 7 days following the first tamoxifen injection, coinciding with a strong decrease in SRF mRNA and protein levels (Parlakian et al., 2005).

Before (baseline) and 4 weeks after voluntary activity (sacrifice), the LV function was assessed by echocardiography (Figure 1). We observed a significant decrease of LVEF between the baseline and the time of sacrifice both in SRF-HKO (78.4 ± 1.44 to $56.5 \pm 4.32\%$, $p < 0.01$, Figure 1A) and in SRF-HKO wheel mice (76.8 ± 1.86 to $67.8 \pm 1.77\%$, $p < 0.01$, Figure 1A) but this decrease was significantly lower in SRF-HKO wheel mice compared to SRF-HKO group (-9.0 ± 2.3 vs. -21.8 ± 3.5 , $p < 0.01$). Similar results were observed for LVSF (-7.3 ± 5.7 vs. $-15.6 \pm 5.3\%$, $p < 0.05$, Figure 1B). We also demonstrated that LV h/r ratio was significantly greater in SRF-HKO wheel mice compared to sedentary SRF-HKO mice at the time of sacrifice (0.32 vs. 0.27 , $p < 0.05$, Figure 1C) indicating that exercise limits the process of LV chamber dilatation. The sedentary SRF-HKO animals exhibited a significant decrease of IVSs at the time of sacrifice compared to baseline (-0.02 cm, $p < 0.05$) whereas this parameter did not change in SRF-HKO wheel (Figure 1D).

The IVSs thickness was maintained over the 4-week period in SRF-HKO wheel mice, but was thinner in sedentary SRF-HKO mice at the time of sacrifice (0.11 ± 0.01 vs. 0.09 ± 0.01 , $p < 0.05$, Figure 1D). Both SRF-HKO and SRF-HKO wheel groups exhibited a significant decrease of LVPWs at the time of sacrifice compared to baseline (-0.03 ± 0.005 cm, $p < 0.001$, -0.009 ± 0.003 , $p < 0.01$, respectively, Figure 1E). The thinning was significantly less pronounced in SRF-HKO wheel mice compared to sedentary SRF-HKO mice at the time of sacrifice (-0.02 cm, $p < 0.01$, Figure 1E). No significant differences were found during diastole between SRF-HKO wheel and SRF-HKO sedentary mice neither at baseline nor at the time of sacrifice. The LVEDD was significantly increased in SRF-HKO mice ($+0.06$ cm, $p < 0.05$) and the LVPWd was significantly decreased in SRF-HKO wheel mice (-0.01 cm, $p < 0.05$) between baseline and the time of sacrifice. The functional efficiency of voluntary physical activity on cardiac function during the establishment of HF was further reinforced by a reduction in the expression of the stress-induced atrial natriuretic factor ($p < 0.05$) and brain natriuretic peptide ($p < 0.01$) in exercised SRF-HKO wheel group compared to sedentary SRF-HKO mice (Figure 1F).

Effects of Voluntary Exercise on Cardiac Fibrosis

To evaluate the impact of voluntary exercise on cardiac remodeling, we analyzed myocardial fibrosis. Fibrosis were first measured by Sirius red staining. At the time of sacrifice, all of SRF-HKO mice exhibited interstitial fibrosis compared to control mice (12.0 vs. 4.9% , $p < 0.01$, Figures 2A,B). Nevertheless, the mean percentage area of fibrosis was lower in SRF-HKO wheel mice compared to SRF-HKO one (5.1 vs. 12.1% , $p < 0.01$). In addition, no difference was observed between SRF-HKO wheel and control mice (5.1 vs. 4.9% , $p > 0.05$).

Reduced fibrosis in the SRF-HKO wheel group in comparison to SRF-HKO groups was also supported by real-time PCR which demonstrated significant less induction of the expression of collagen I and III (Figure 2C). As showed in Figure 2C, both transforming growth factor beta 1 and connective tissue growth factor mRNA levels were also decreased in SRF-HKO wheel group but the differences failed to reach a significant level.

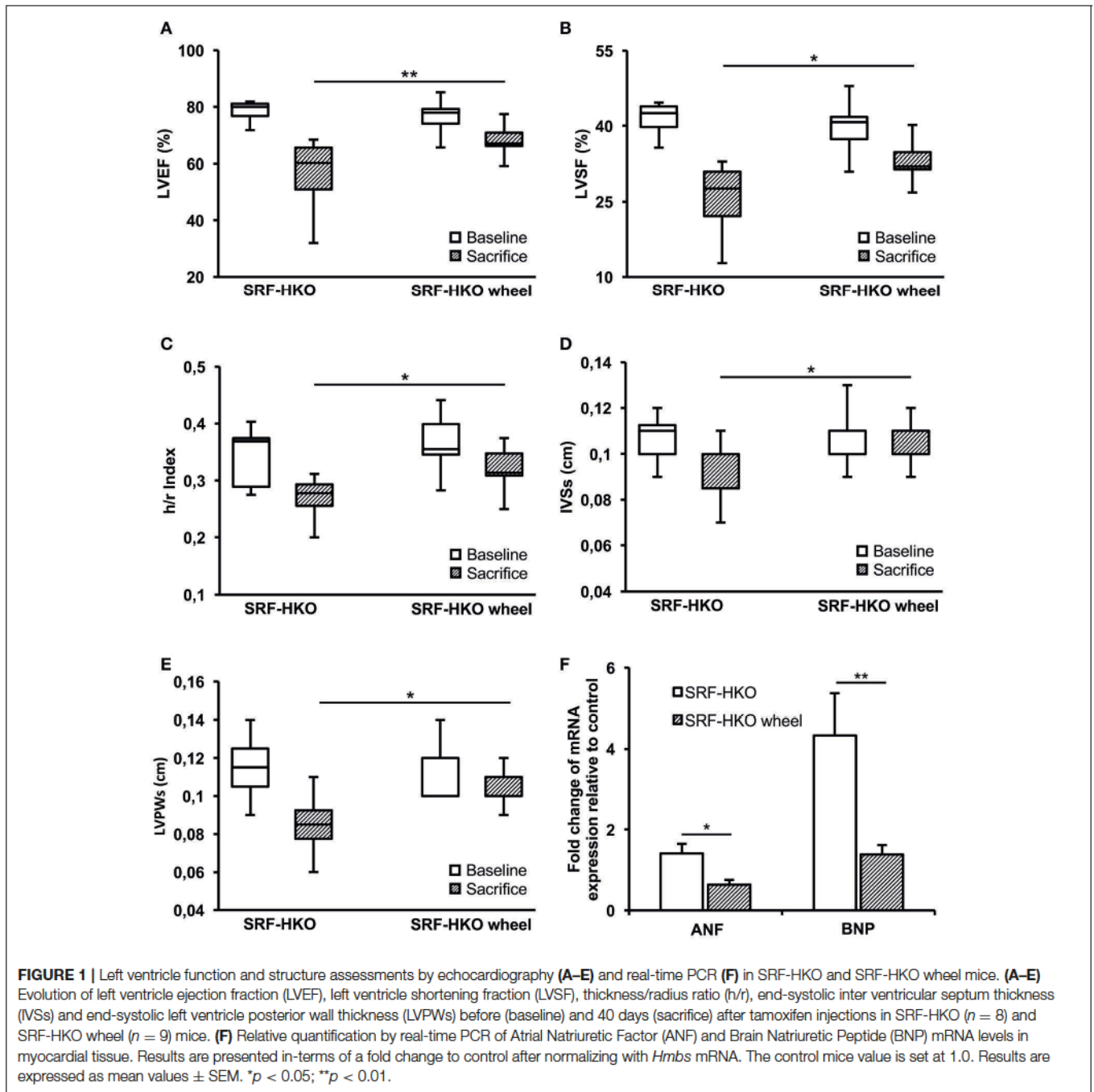
Mitochondrial Biogenesis and Energetic Pathways Modifications of SRF-HKO Mice

To gain a mechanistic insight on the beneficial effects of voluntary exercise, we examined the mitochondrial biogenesis and energetic pathways markers expression profile at mRNA and protein levels (Figure 3). The real-time PCR showed that PPAR α gene expression was significantly higher in sedentary SRF-HKO wheel mice compared to sedentary SRF-HKO mice at the time of sacrifice ($p < 0.001$, Figure 3A). Moreover, the PGC1 α gene expression tended to be greater in SRF-HKO wheel animals compared to their sedentary counterparts without reaching statistical significance ($p = 0.09$, Figure 3A). The PPAR γ and PGC1 β genes expression remained unchanged between the two SRF-HKO groups at the time of sacrifice (Figure 3A). Concerning other mitochondrial markers, the expression of NAMPT gene, which is involved in NAD biosynthesis from nicotinamide, was significantly greater in SRF-HKO wheel mice compared to SRF-HKO mice at the time of sacrifice ($p < 0.05$, Figure 3B). The TFAM ($p = 0.07$) and SDHA ($p = 0.056$) genes expression, implicated in metabolic adaptation expression, tended to be greater in SRF-HKO wheel animals compared to SRF-HKO mice but these differences did not reach statistical significance (Figure 3B). The NRF1 gene expression remained unchanged between the two SRF-HKO groups at the time of sacrifice (Figure 3B).

Modifications in mitochondrial biogenesis and energetic pathways of SRF-HKO mice after voluntary exercise training were also supported by western-blot analysis (Figures 3C,D), which demonstrated that PGC1 α ($p < 0.001$), VDAC1 ($p < 0.01$), and ACO2 ($p < 0.001$) proteins levels were significantly increased in SRF-HKO wheel group compared to the sedentary group (Figures 3C,D).

DISCUSSION

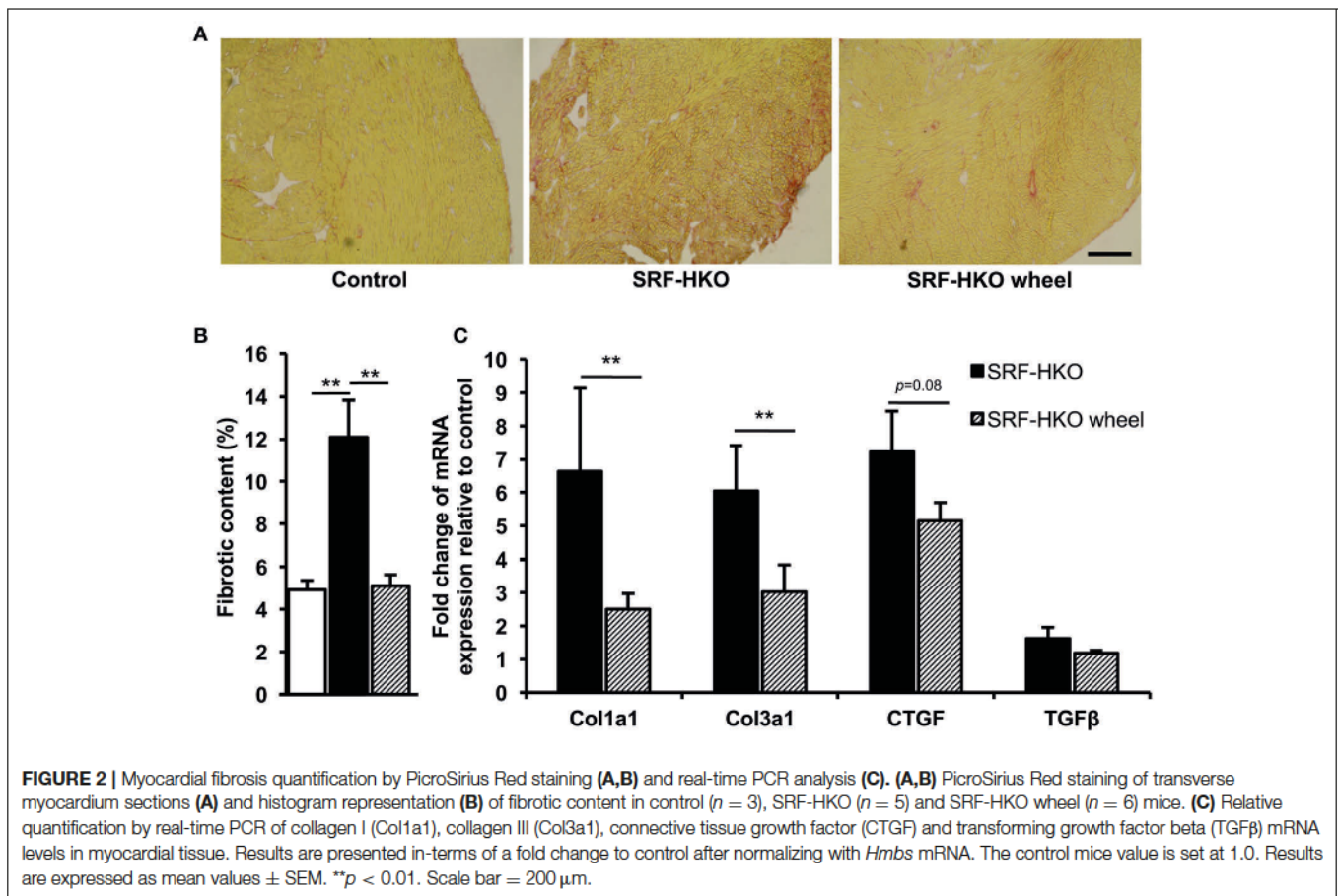
The major finding of this study is that a 4-week voluntary exercise stabilizes the functional outcomes of non-ischemic dilated mouse



hearts and this benefit is accompanied with a reduction of myocardial fibrosis and the enhancement of mitochondrial energy metabolism.

Non-ischemic DCM is one of the most frequent diseases leading to HF in young adult patients (Savvatis et al., 2015). It is characterized by ventricular dilation, altered systolic function and in some cases diastolic dysfunction. In contrast to ischemic cardiomyopathies which are amenable to a variety of pharmacological, electrical, and interventional treatments, the only treatment of advanced stage of non-ischemic form of HF

is heart transplantation or permanent implantation of an assist device (Clegg et al., 2006; Hamdi et al., 2013). Thus, there is a real need to develop novel therapies for these cardiomyopathies. In the present study, we reported a significant beneficial impact of 4-week voluntary running protocol on LV function and remodeling in a mouse model of DCM induced by a cardiac-specific inactivation of SRF. We demonstrated that voluntary exercise can preserve the contractile function and reduce the extent of ventricular dilation of SRF-deficient mice. We also confirmed that voluntary exercise could stabilize the systolic function in



SRF-deficient transgenic mice, although the ventricular dilatation in diastole still takes place. The lack of impact of exercise on the LV chamber diameter in diastole may not be surprising when one considers that endurance training is associated with LV hypertrophy, but also chamber dilatation, as an adaptive remodeling to increased body perfusion demand (King and Wood, 2013).

SRF is a transcription factor of the MADS-box family, and takes part in the regulation of the genes expression involved in many cellular processes such as cellular growth, proliferation, differentiation, the actin remodeling. An abnormal truncated form of SRF has been described in human failing hearts (Davis et al., 2002) and the cleavage of SRF by caspase has been found to potentially promote HF (Chang et al., 2003). Conditional invalidation of SRF in cardiomyocytes demonstrates that SRF is essential for cardiac maturation during embryogenesis and the postnatal period (Parlakian et al., 2005; Gary-Bobo et al., 2008). In this study, we used conditionally invalidated SRF mice (α MHC-MerCreMer:Sf/Sf) which allows to inactivate SRF gene expression specifically in cardiomyocytes since tamoxifen-inducible Cre recombinase expression is under the control of the cardiomyocyte-specific alpha myosin heavy chain promoter (Parlakian et al., 2005). There is an important decrease in SRF both in mRNA and protein levels as early as 5 days after tamoxifen; mice then progressively exhibit a decline of cardiac

function, associated with reduced metabolic flux to the myofibril and decrease contractility, leading to dilated cardiomyopathy, HF, and death within 10 weeks (Parlakian et al., 2005). All these observations underline that α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice a good model to evaluate the impact of voluntary physical activity during the establishment of HF in a non-ischemic cardiomyopathy context.

It is now widely accepted that chronic physical activity is beneficial for cardiac health and particularly on HF (Schocken et al., 2008; Shiroma and Lee, 2010). Few data are available regarding the impact of exercise on cardiac function and structure in the context of DCM. It has been demonstrated that an 8-week cycle exercise program (Holloway et al., 2012) or a 12-week cardiac rehabilitation program (Legallois et al., 2016) improved cardiac function of patients with HF from DCM. Other studies demonstrated that exercise is associated with a decrease in plasma concentration of C-reactive protein (CRP), TNF- α , and Serum amyloid A (SAA) in patients suffering from chronic HF (Larsen et al., 2001; Gill and Malkova, 2006; Batista et al., 2009). The exact mechanisms underlying beneficial and anti-inflammatory effects of physical activity are not clearly understood. More recently, Bei et al. (2017) demonstrated that exercise induced an increase of circulating extracellular vesicles in mice. Exercise-derived extracellular vesicles can confer the systemic benefits of exercise to distal organs, including the

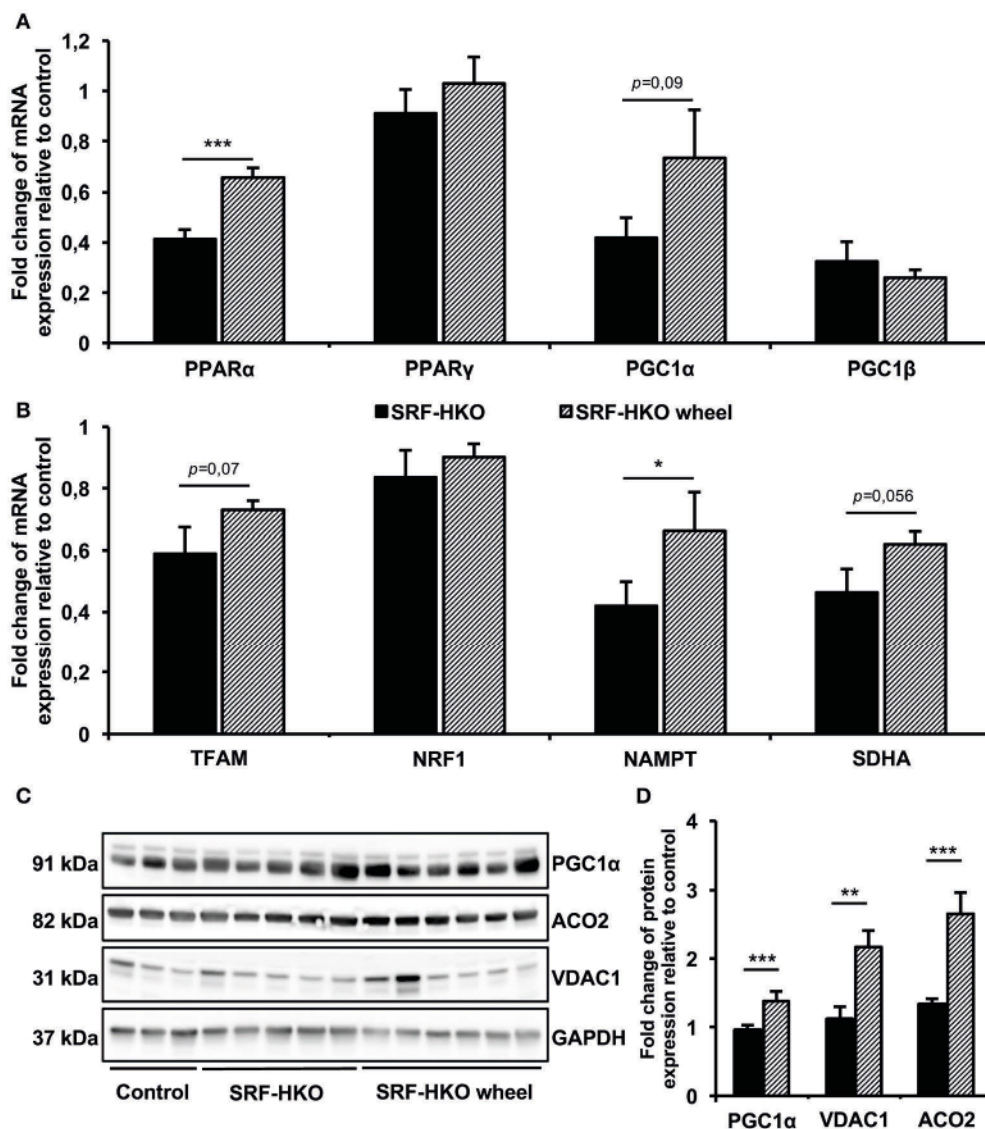


FIGURE 3 | Real-time PCR (A,B) and Western blot analysis (C,D) of mitochondrial biogenesis and selected energetic pathways. (A,B) Relative quantification by real-time PCR of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma (PPAR α/γ), PPAR gamma coactivators-1 alpha and beta (PGC1 α/β), Transcription factor of activated mitochondria (TFAM), nuclear respiratory factor 1 (NRF1), nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) and succinate dehydrogenase complex subunit (SDHA) mRNA levels in myocardial tissue. Results are presented in-terms of a fold change to control after normalizing with *Hmbs* mRNA. The control mice value is set at 1.0. (C,D) Western blot analysis (C) and histogram representation (D) of PGC1 α , mitochondrial Aconitase (ACO2) and Voltage-Dependent Anion-selective Channel 1 (VDAC1) proteins quantification. Results are presented as a fold change to control after normalizing with GAPDH protein. The control mice value is set at 1.0. Results are expressed as mean values \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

heart. Briefly, the authors demonstrated that exercise induced an increase in circulating extracellular vesicles, *via* the activation of the ERK1/2 and HSP27 signaling, thus providing an enhanced protection against cardiac injury compared to endogenous extracellular vesicles at baseline. This study suggested that the extracellular vesicles might serve as a potent therapy for myocardial injury in the future (Bei et al., 2017).

Three types of chronic exercise dominate the literature (i) forced treadmill running, (ii) swimming, and (iii) voluntary wheel running. A majority of studies have used a motorized

treadmill that varied in intensity, slope and duration between the studies. In addition, both treadmill and swimming are known to induce stress. Despite its non-forced nature, voluntary wheel-running is sufficient signals to induce physiologic cardiac growth in rodents (Allen et al., 2001; Natali et al., 2001; Konhilas et al., 2004). Similar to humans and forced treadmill running, a minimum of 3–4 weeks of exercise is required to instigate a 5–20% increase in cardiac mass depending on strain, sex, diet, age, or any combination of these variables (Allen et al., 2001; Lerman et al., 2002; Konhilas et al., 2004, 2015; McMullan et al.,

2016). We therefore employed a 4-week non-forced and non-stressful voluntary wheel-running protocol to provide sufficient stimuli for cardiac adaptation. Our first results demonstrated that the mean daily running distance of our DCM mice is relatively modest compared to mouse capacities in forced treadmill running but enough to improve the cardiac function, reduce the LV cavity dilation, prevent the myocardial fibrotic content accumulation and reduce the cardiac stress in SRF-HKO wheel mice compared to their sedentary counterparts. Moreover, the increased PPAR γ gene expression and the increased PGC1 α , VDAC1, and ACO2 proteins expression found in the SRF-HKO wheel mice show that a 4-week voluntary exercise was already sufficient to induce mitochondrial function improvement and biogenesis. All in one, these latter results suggest that voluntary exercise is beneficial and mitigates or prevents the development of DCM induced by a specific inactivation of SRF into the myocardium.

Molecular processes leading to DCM and lately HF can be very heterogeneous depending on the subject and the stage of the disease. In this regard, and because the heart is one of the highly oxidative organs, many studies explored the impact of mitochondrial dysfunction in the development of cardiomyopathies (El-Hattab and Scaglia, 2016). Interestingly, it has been shown that DCM is one of the most common types of cardiomyopathies induced by mitochondrial disorders (Bates et al., 2012; Finsterer and Kothari, 2014). However, to our knowledge, no data is available regarding the potential implication of SRF inactivation-induced mitochondrial disorders in the development of DCM. In the present study, we showed that the inactivation of SRF in α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice lead to a significant decrease of the myocardial genetic expression of PPAR γ , PGC1 α , TFAM, NAMPT, and SDHA compared to the control mice. These results demonstrated that cardiac specific SRF inactivation affect mitochondrial biogenesis, transcription activity and nicotinamide biosynthetic enzyme activity which

represent potential underlying mechanisms involved in the development of DCM. Moreover, our results suggested for the first time that 4-week voluntary exercise might represent a beneficial way to prevent the mitochondrial disorders potentially involved in cardiac dysfunction in the context of non-ischemic DCM. Thus, our finding can help define new molecular and cellular triggers that may initiate the DCM and represent new therapeutic targets.

In conclusion, our murine model of DCM is a good model to evaluate the impact of voluntary physical activity during the establishment of HF in a non-ischemic cardiomyopathy context. Indeed, 4 weeks of voluntary running induce significant positive impact on cardiac function despite the use of 9 old-months mice which could be potential confounding factor for physiological adaptation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

OA, AF, conceived the study. RD, DV, PN, ZL, MM, AF, and OA, performed the laboratory experiments. NM performed functional assessment. RD and MM contributed to the statistical analysis. RD, DV, and OA wrote the draft of the paper. RD, DV, ZL, MM, AF, and OA, reviewed the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by funds from CNRS, INSERM, University Pierre&Marie Curie, "Association Française contre les Myopathies" (AFM) (contract n° 16605) and the LabEx REVIVE (ANR-10-LABX-73). RD was supported by a Ph.D. fellowship from UPMC University. Authors thank Dr. Solène Emmanuelle Boitard (UMR CNRS 8256, Paris-France) for scientific discussion. We thank the animal facilities of UPMC.

REFERENCES

- Allen, D. L., Harrison, B. C., Maass, A., Bell, M. L., Byrnes, W. C., and Leinwand, L. A. (2001). Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J. Appl. Physiol.* 90, 1900–1908.
- Bates, M. G. D., Nesbitt, V., Kirk, R., He, L., Blakely, E. L., Alston, C. L., et al. (2012). Mitochondrial respiratory chain disease in children undergoing cardiac transplantation: a prospective study. *Int. J. Cardiol.* 155, 305–306. doi: 10.1016/j.ijcard.2011.11.063
- Batista, M. L., Batista Júnior, M. L., Lopes, R. D., Seelaender, M. C. L., and Lopes, A. C. (2009). Anti-inflammatory effect of physical training in heart failure: role of TNF-alpha and IL-10. *Arq. Bras. Cardiol.* 93, 643–651, 692–700. doi: 10.1590/S0066-782X2009001200021
- Bei, Y., Xu, T., Lv, D., Yu, P., Xu, J., Che, L., et al. (2017). Exercise-induced circulating extracellular vesicles protect against cardiac ischemia-reperfusion injury. *Basic Res. Cardiol.* 112:38. doi: 10.1007/s00395-017-0628-z
- Belardinelli, R., Georgiou, D., Cianci, G., and Purcaro, A. (1999). Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure: effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. *Circulation* 99, 1173–1182. doi: 10.1161/01.CIR.99.9.1173
- Chang, J., Wei, L., Otani, T., Youker, K. A., Entman, M. L., and Schwartz, R. J. (2003). Inhibitory cardiac transcription factor, SRF-N, is generated by caspase 3 cleavage in human heart failure and attenuated by ventricular unloading. *Circulation* 108, 407–413. doi: 10.1161/01.CIR.0000084502.02147.83
- Clegg, A. J., Scott, D. A., Loveman, E., Colquitt, J. L., Royle, P., and Bryant, J. (2006). Clinical and cost-effectiveness of left ventricular assist devices as a bridge to heart transplantation for people with end-stage heart failure: a systematic review and economic evaluation. *Eur. Heart J.* 27, 2929–2938. doi: 10.1093/eurheartj/ehi857
- Davis, F. J., Gupta, M., Pogwizd, S. M., Bacha, E., Jeevanandam, V., and Gupta, M. P. (2002). Increased expression of alternatively spliced dominant-negative isoform of SRF in human failing hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282, H1521–H1533. doi: 10.1152/ajpheart.00844.2001
- Diguet, N., Mallat, Y., Ladouce, R., Clodic, G., Prola, A., Tritsch, E., et al. (2011). Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end products in dilated cardiomyopathy. *J. Biol. Chem.* 286, 35007–35019. doi: 10.1074/jbc.M111.252395
- Downing, J., and Balady, G. J. (2011). The role of exercise training in heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 58, 561–569. doi: 10.1016/j.jacc.2011.04.020
- El-Hattab, A. W., and Scaglia, F. (2016). Mitochondrial Cardiomyopathies. *Front. Cardiovasc. Med.* 3:25. doi: 10.3389/fcvm.2016.00025
- Fatkin, D., and Graham, R. M. (2002). Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol. Rev.* 82, 945–980. doi: 10.1152/physrev.00012.2002
- Ferry, A., Benchaoui, R., Joanne, P., Peat, R. A., Mougnot, N., Agbulut, O., et al. (2015). Effect of voluntary physical activity initiated at age 7 months on skeletal hindlimb and cardiac muscle function in mdx mice of both genders. *Muscle Nerve* 52, 788–794. doi: 10.1002/mus.24604

- Finsterer, J., and Kothari, S. (2014). Cardiac manifestations of primary mitochondrial disorders. *Int. J. Cardiol.* 177, 754–763. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.11.014
- Gary-Bobo, G., Parlakian, A., Escoubet, B., Franco, C. A., Clément, S., Bruneval, P., et al. (2008). Mosaic inactivation of the serum response factor gene in the myocardium induces focal lesions and heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 10, 635–645. doi: 10.1016/j.ejheart.2008.04.014
- Gasiorowski, A., and Dutkiewicz, J. (2013). Comprehensive rehabilitation in chronic heart failure. *Ann. Agric. Environ. Med.* 20, 606–612.
- Gayda, M., Ribeiro, P. A. B., Juneau, M., and Nigam, A. (2016). Comparison of different forms of exercise training in patients with cardiac disease: where does high-intensity interval training fit? *Can. J. Cardiol.* 32, 485–494. doi: 10.1016/j.cjca.2016.01.017
- Gill, J. M. R., and Malkova, D. (2006). Physical activity, fitness and cardiovascular disease risk in adults: interactions with insulin resistance and obesity. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 110, 409–425. doi: 10.1042/CS20050207
- Gupte, A. A., and Hamilton, D. J. (2016). Exercise intolerance in heart failure with preserved ejection fraction. *Methodist DeBakey Cardiovasc. J.* 12, 105–109. doi: 10.14797/mdcj-12-2-105
- Guyatt, G. H., and Devereaux, P. J. (2004). A review of heart failure treatment. *Mt. Sinai J. Med.* 71, 47–54.
- Hamdi, H., Boitard, S. E., Planat-Benard, V., Pouly, J., Neamatalla, H., Joanne, P., et al. (2013). Efficacy of epicardially delivered adipose stroma cell sheets in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* 99, 640–647. doi: 10.1093/cvr/cvt149
- Hershberger, R. E., Morales, A., and Siegfried, J. D. (2010). Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: a review for genetics professionals. *Genet. Med.* 12, 655–667. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181f2481f
- Holloway, C. J., Dass, S., Suttie, J. J., Rider, O. J., Cox, P., Cochlin, L. E., et al. (2012). Exercise training in dilated cardiomyopathy improves rest and stress cardiac function without changes in cardiac high energy phosphate metabolism. *Heart Br. Card. Soc.* 98, 1083–1090. doi: 10.1136/heartjnl-2012-302145
- King, G., and Wood, M. J. (2013). The heart of the endurance athlete assessed by echocardiography and its modalities: “embracing the delicate balance.” *Curr. Cardiol. Rep.* 15:383. doi: 10.1007/s11886-013-0383-1
- Konhilas, J. P., Chen, H., Luczak, E., McKee, L. A., Regan, J., Watson, P. A., et al. (2015). Diet and sex modify exercise and cardiac adaptation in the mouse. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 308, H135–H145. doi: 10.1152/ajpheart.00532.2014
- Konhilas, J. P., Maass, A. H., Luckey, S. W., Stauffer, B. L., Olson, E. N., and Leinwand, L. A. (2004). Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H2768–H2776. doi: 10.1152/ajpheart.00292.2004
- Larsen, A. I., Aukrust, P., Aarsland, T., and Dickstein, K. (2001). Effect of aerobic exercise training on plasma levels of tumor necrosis factor alpha in patients with heart failure. *Am. J. Cardiol.* 88, 805–808. doi: 10.1016/S0002-9149(01)01859-8
- Legallois, D., Belin, A., Nesterov, S. V., Milliez, P., Parienti, J.-J., Knuuti, J., et al. (2016). Cardiac rehabilitation improves coronary endothelial function in patients with heart failure due to dilated cardiomyopathy: a positron emission tomography study. *Eur. J. Prev. Cardiol.* 23, 129–136. doi: 10.1177/2047487314565739
- Lerman, I., Harrison, B. C., Freeman, K., Hewett, T. E., Allen, D. L., Robbins, J., et al. (2002). Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains. *J. Appl. Physiol.* 92, 2245–2255. doi: 10.1152/jappphysiol.01045.2001
- McMullan, R. C., Kelly, S. A., Hua, K., Buckley, B. K., Faber, J. E., Pardo-Manuel de Villena, F., et al. (2016). Long-term exercise in mice has sex-dependent benefits on body composition and metabolism during aging. *Physiol. Rep.* 4:e13011. doi: 10.14814/phy2.13011
- Natali, A. J., Turner, D. L., Harrison, S. M., and White, E. (2001). Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. *J. Exp. Biol.* 204, 1191–1199.
- O'Connor, C. M., Whellan, D. J., Lee, K. L., Keteyian, S. J., Cooper, L. S., Ellis, S. J., et al. (2009). Efficacy and safety of exercise training in patients with chronic heart failure: HF-ACTION randomized controlled trial. *JAMA* 301, 1439–1450. doi: 10.1001/jama.2009.454
- Parlakian, A., Charvet, C., Escoubet, B., Mericskay, M., Molkentin, J. D., Gary-Bobo, G., et al. (2005). Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart. *Circulation* 112, 2930–2939. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.533778
- Ribeiro, P. A. B., Boidin, M., Juneau, M., Nigam, A., and Gayda, M. (2017). High-intensity interval training in patients with coronary heart disease: prescription models and perspectives. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* 60, 50–57. doi: 10.1016/j.rehab.2016.04.004
- Rodríguez, F., Wang, Y., Johnson, C. E., and Foody, J. M. (2013). National patterns of heart failure hospitalizations and mortality by sex and age. *J. Card. Fail.* 19, 542–549. doi: 10.1016/j.cardfail.2013.05.016
- Savvatis, K., Schultheiss, H.-P., and Tschöpe, C. (2015). Endomyocardial biopsy and ultrastructural changes in dilated cardiomyopathy: taking a “deeper” look into patients’ prognosis. *Eur. Heart J.* 36, 708–710. doi: 10.1093/eurheartj/ehu461
- Schocken, D. D., Benjamin, E. J., Fonarow, G. C., Krumholz, H. M., Levy, D., Mensah, G. A., et al. (2008). Prevention of heart failure: a scientific statement from the American Heart association councils on epidemiology and prevention, clinical cardiology, cardiovascular nursing, and high blood pressure research; quality of care and outcomes research interdisciplinary working group; and functional genomics and translational biology interdisciplinary working group. *Circulation* 117, 2544–2565. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.188965
- Sharma, S., Firoozi, S., and McKenna, W. J. (2001). Value of exercise testing in assessing clinical state and prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiol. Rev.* 9, 70–76. doi: 10.1097/00045415-200103000-00005
- Shiroma, E. J., and Lee, I.-M. (2010). Physical activity and cardiovascular health: lessons learned from epidemiological studies across age, gender, and race/ethnicity. *Circulation* 122, 743–752. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.914721
- Stehlik, J., Edwards, L. B., Kucheryavaya, A. Y., Benden, C., Christie, J. D., Dipchand, A. I., et al. (2012). The registry of the international society for heart and lung transplantation: 29th official adult heart transplant report—2012. *J. Heart Lung Transplant.* 31, 1052–1064. doi: 10.1016/j.healun.2012.08.002
- Upadhyaya, B., Haykowsky, M. J., Eggebeen, J., and Kitzman, D. W. (2015). Exercise intolerance in heart failure with preserved ejection fraction: more than a heart problem. *J. Geriatr. Cardiol.* 12, 294–304. doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2015.03.013

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Deloux, Vitiello, Mougenot, Noirez, Li, Mericskay, Ferry and Agbulut. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4.1.3 Discussion

La cardiomyopathie dilatée (CMD) est l'une des pathologies cardiaques non ischémiques les plus fréquentes chez les jeunes adultes (Savvatis et al., 2015). Elle est caractérisée par une dilatation des cavités cardiaques et un amincissement des parois induisant une altération de la contractilité cardiaque. Les cardiomyopathies sont aujourd'hui traitées grâce à différentes stratégies pharmacologiques ou interventionnelles, mais le seul traitement actuel contre les formes avancées d'insuffisance cardiaque reste la transplantation cardiaque (Clegg et al., 2006). Il est ainsi urgent de développer et de caractériser de nouvelles stratégies pour lutter contre ces cardiomyopathies.

Chez l'homme, quelques études se sont intéressées aux effets de l'exercice dans le contexte de la CMD, et ont montré une amélioration de la fonction cardiaque chez les patients (Holloway et al., 2012; Legallois et al., 2016). Cependant celles-ci ne se sont pas intéressées aux mécanismes sous-jacents à ces effets bénéfiques. Notre étude a permis de décrire pour la première fois les effets de l'entraînement volontaire dans un modèle murin de cardiomyopathie dilatée. Dans un premier temps, nous avons évalué la fonction cardiaque par échocardiographie. De façon très encourageante nous démontrons ici que l'exercice permet de préserver l'atteinte de la fonction cardiaque induite par l'installation de l'insuffisance cardiaque. En effet, nous avons montré que la contractilité cardiaque, reflétée par la fraction d'éjection du ventricule gauche, est significativement moins réduite chez les animaux ayant pu pratiquer un exercice physique. Les parois du ventricule gauche, c'est-à-dire la paroi libre et le septum interventriculaire, sont également moins amincies au cours de l'établissement de la cardiomyopathie dilatée chez les animaux entraînés. *In fine*, l'exercice permet une préservation et une moindre dilatation cardiaque, reflétée par le ratio h/r. De façon intéressante, la préservation de la fonction cardiaque par l'exercice est associée à une forte réduction de l'expression des gènes des marqueurs de stress cardiaque *Anf* et *Bnp*.

Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer par quels mécanismes la fonction cardiaque pouvait être préservée par l'exercice. Par analyse histologique, nous

avons démontré que la fibrose cardiaque s'était drastiquement moins développée chez les animaux entraînés que chez les animaux sédentaires, jusqu'à être équivalente au taux de fibrose retrouvé chez les animaux contrôles non malades. La fibrose est un tissu conjonctif constitué essentiellement de fibres de collagènes qui ne conduisent pas l'influx électrique et ont des propriétés isolantes, ce qui perturbe la bonne transmission du signal contractile cardiaque. Cette quasi non-induction de la fibrose cardiaque chez les animaux exercés peut expliquer en partie pourquoi mécaniquement la contractilité cardiaque est moins altérée que chez les animaux sédentaires atteints de CMD. Ces observations en histologie sont associées à une tendance à la réduction de la transcription du gène du *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF), acteur majeur du développement fibrotique, et des deux isoformes de collagène majoritaires dans le cœur, les collagènes I et III, ce qui corrobore cette hypothèse. Notre groupe a montré par ailleurs que les niveaux de CTGF sont pourtant sous contrôle étroit du niveau de SRF (Angelini et al., 2015). Dans cette étude, il est montré qu'une surexpression de SRF, qui tend à réprimer les gènes cibles de SRF par effet de « quenching » déjà décrit pour ce facteur de transcription, conduit comme chez notre mutant cardiospécifique de SRF à une surexpression de CTGF. Cette surexpression semble passer via un mécanisme dépendant de la répression du microARN miR-133, dérégulant la synthèse de CTGF. Dans notre étude sur l'exercice, l'effet répresseur de l'entraînement sur le taux d'expression du gène *Ctgf* reste cependant mineur suggérant que l'exercice agit sur d'autres voies que le CTGF pour réduire la fibrose.

L'atteinte de la fonction mitochondriale et du métabolisme énergétique ont été décrites dans le contexte du développement des cardiomyopathies chez l'homme (El-Hattab & Scaglia, 2016). De façon intéressante, la CMD a été décrite comme l'une des pathologies cardiaques les plus communes induites par les pathologies mitochondriales d'origine génétique (Finsterer & Kothari, 2014). Parmi les atteintes décrites dans les modèles d'insuffisance cardiaque d'origine ischémique, on sait que la réduction des capacités oxydatives mitochondriales est associée à une réduction au niveau transcriptionnel de l'expression du facteur de transcription PGC-1 α , ainsi que des facteurs NRF1 et TFAM agissant en aval de PGC-1 α (Garnier et al., 2003). Cependant rien n'était à notre connaissance décrit dans le contexte de la CMD. Dans notre étude, nous avons

également montré que la CMD déclenchée par la délétion de SRF induisait une réduction de l'expression de PGC-1 α et de PPAR α , ainsi que de TFAM. De façon très intéressante, nous avons montré que l'activité physique volontaire induisait une augmentation de l'expression de PPAR α , impliqué dans le métabolisme des acides gras, avec une tendance également pour PGC-1 α et TFAM, ainsi qu'une augmentation de l'expression protéique de PGC-1 α . L'expression des protéines VDAC1, une porine de la membrane interne mitochondriale et de l'aconitase mitochondriale ACO2 était également plus élevée chez les animaux invalidés pour SRF entraînés à la différence des animaux sédentaires. Si cela reste à caractériser plus en détail, ces résultats suggèrent que l'exercice volontaire semble capable de stimuler les voies de biogénèse mitochondriale et d'utilisation des acides gras, ce qui pourrait expliquer ses effets bénéfiques sur la fonction cardiaque dans le contexte de stress énergétique caractérisé dans l'insuffisance cardiaque. Des effets sur la perfusion cardiaque et la réduction de la résistance vasculaire au travail cardiaque ne sont évidemment pas à exclure non plus.

En conclusion, cette étude démontre pour la première fois dans un modèle de CMD que l'exercice physique pourrait être une stratégie efficace et bénéfique pour lutter contre les altérations mitochondriales dans le contexte des cardiomyopathies non ischémiques.

4.2 Effets de la supplémentation en NR dans l'insuffisance cardiaque induite par la cardiomyopathie dilatée

4.2.1 Introduction

Différentes études ont montré que les taux de NAD étaient altérés dans des modèles d'insuffisance cardiaque comme des modèles des modèles d'hypertrophie par surcharge de pression induite par constriction aortique ou ischémie-reperfusion, ou des modèles de d'infarctus du myocarde (Hsu et al., 2009; J. B. Pillai et al., 2005; Zhang et al., 2016). Cependant, ce phénomène n'a pas encore été décrit dans le contexte de la CMD. Une stratégie alternative aux traitements pharmacologiques et interventionnels actuels serait d'utiliser des précurseurs de la famille des vitamines B3 pour stimuler la biosynthèse de NAD⁺ et ainsi cibler plus directement les troubles métaboliques associés à l'insuffisance cardiaque. Parmi ces précurseurs, le Nicotinamide Riboside (NR) été décrit comme le plus efficace pour augmenter la synthèse de NAD⁺ par voie orale et pour améliorer le métabolisme énergétique et la fonction mitochondriale dans différents modèles pathologiques comme les maladies mitochondriales dans le muscle squelettique ou le diabète, mais ses effets n'ont jamais été décrits dans la pathologie cardiaque, et encore moins dans le contexte de la cardiomyopathie dilatée.

Dans une seconde étude publiée par l'équipe et à laquelle j'ai participé, nous avons étudié les effets de la supplémentation en NR sur la fonction cardiaque dans le contexte de la cardiomyopathie dilatée induite par la délétion du gène SRF. Pour cela, la fonction cardiaque des animaux a été suivie par échocardiographie, et différentes analyses du métabolisme du NAD, de ses voies de biosynthèse et des effets du NR sur le métabolisme énergétique ont été réalisées sur des animaux SRF^{HKO} et sur des modèles de culture primaire de cardiomyocytes de rats nouveau-nés et adultes.

4.2.2 Résultats

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal *Circulation* en Mai 2018 dans laquelle je suis co-3^{ème} auteur. J'ai contribué à ces travaux par la réalisation des expériences d'analyse de la fonction mitochondriale et de la glycolyse en réponse au NR sur des cardiomyocytes de rats nouveau-nés, ainsi que par l'analyse de l'expression de gènes et le dosage des taux de NAD en réponse au NR sur des cultures primaires de cardiomyocytes de rats adultes.

Nicotinamide Riboside Preserves Cardiac Function in a Mouse Model of Dilated Cardiomyopathy

Editorial, see p 2274

BACKGROUND: Myocardial metabolic impairment is a major feature in chronic heart failure. As the major coenzyme in fuel oxidation and oxidative phosphorylation and a substrate for enzymes signaling energy stress and oxidative stress response, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) is emerging as a metabolic target in a number of diseases including heart failure. Little is known on the mechanisms regulating homeostasis of NAD⁺ in the failing heart.

METHODS: To explore possible alterations of NAD⁺ homeostasis in the failing heart, we quantified the expression of NAD⁺ biosynthetic enzymes in the human failing heart and in the heart of a mouse model of dilated cardiomyopathy (DCM) triggered by Serum Response Factor transcription factor depletion in the heart (SRF^{HKO}) or of cardiac hypertrophy triggered by transverse aorta constriction. We studied the impact of NAD⁺ precursor supplementation on cardiac function in both mouse models.

RESULTS: We observed a 30% loss in levels of NAD⁺ in the murine failing heart of both DCM and transverse aorta constriction mice that was accompanied by a decrease in expression of the nicotinamide phosphoribosyltransferase enzyme that recycles the nicotinamide precursor, whereas the nicotinamide riboside kinase 2 (NMRK2) that phosphorylates the nicotinamide riboside precursor is increased, to a higher level in the DCM (40-fold) than in transverse aorta constriction (4-fold). This shift was also observed in human failing heart biopsies in comparison with nonfailing controls. We show that the *Nmrk2* gene is an AMP-activated protein kinase and peroxisome proliferator-activated receptor α responsive gene that is activated by energy stress and NAD⁺ depletion in isolated rat cardiomyocytes. Nicotinamide riboside efficiently rescues NAD⁺ synthesis in response to FK866-mediated inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase and stimulates glycolysis in cardiomyocytes. Accordingly, we show that nicotinamide riboside supplementation in food attenuates the development of heart failure in mice, more robustly in DCM, and partially after transverse aorta constriction, by stabilizing myocardial NAD⁺ levels in the failing heart. Nicotinamide riboside treatment also robustly increases the myocardial levels of 3 metabolites, nicotinic acid adenine dinucleotide, methylnicotinamide, and N1-methyl-4-pyridone-5-carboxamide, that can be used as validation biomarkers for the treatment.

CONCLUSIONS: The data show that nicotinamide riboside, the most energy-efficient among NAD precursors, could be useful for treatment of heart failure, notably in the context of DCM, a disease with few therapeutic options.

Nicolas Diguët, PhD
Samuel A.J. Trammell,
PhD

Cynthia Tannous, PhD*
Robin Deloux, MSc*
Jérôme Piquereau, PhD
Nathalie Mougenot, PhD
Anne Gouge, MSc
Mélanie Gressette, MSc
Boris Manoury, PhD
Jocelyne Blanc, MSc
Marie Breton, MD
Jean-François Decaux,
PhD
Gareth G. Lavery, PhD
István Baczkó, MD, PhD
Joffrey Zoll, PhD
Anne Garnier, PhD
Zhenlin Li, PhD
Charles Brenner, PhD
Mathias Mericskay, PhD

*Drs Tannous and Deloux contributed equally.

Key Words: acetyl coenzyme A
■ cardiomyopathy, dilated ■ energy metabolism ■ glycolysis ■ heart failure
■ NAD ■ nicotinamide-beta-ribose
■ serum response factor

Sources of Funding, see page 2271

© 2017 American Heart Association, Inc.

<http://circ.ahajournals.org>

Clinical Perspective

What Is New?

- Myocardial nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) coenzyme levels are depressed in mouse models of heart failure.
- An expression shift occurs in murine and human failing hearts in which the normally predominant nicotinamide phosphoribosyltransferase enzyme using nicotinamide as a precursor for NAD⁺ synthesis is repressed, whereas the nicotinamide riboside kinase 2 enzyme using the nucleoside nicotinamide riboside (NR) is strongly upregulated.
- The nicotinamide riboside kinase 2 pathway is activated by energy stress in an AMP-activated protein kinase α /peroxisome proliferator-activated receptor α -dependent manner in cardiomyocytes.
- NR-supplemented diet administered to murine models of dilated cardiomyopathy or pressure overload-induced heart failure restores myocardial NAD levels and preserves cardiac function.
- NR increases glycolysis, and citrate and acetyl-coenzyme A metabolism, as well, in cardiomyocytes.

What Are the Clinical Implications?

- NR is the most energetically favorable NAD precursor and was recently shown to be uniquely and orally bioavailable in humans in a phase I clinical trial.
- NR-supplemented diet could help patients who have heart failure to cope with limited myocardial ATP supply by restoring NAD coenzyme levels and associated signaling.
- NR-supplemented diet has been shown in several studies to enhance metabolic flexibility in the context of obesity and diabetes mellitus and to improve muscle function, justifying that NR is put in the front line for metabolic therapy of heart failure syndrome in which these functions are altered.

Despite progress in therapeutic advances, mortality remains high in congestive heart failure (HF), creating a need for new evidence-based and cost-effective treatments. Failure of cardiomyocyte bioenergetics is a key issue in HF that is not well addressed in current therapeutics.^{1,2} We focused our attention on pathways that regulate nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) homeostasis in the failing heart, which has emerged as a new avenue for the development of metabolic therapy of HF.^{3,4} NAD⁺ is the major hydride transfer coenzyme in fuel oxidation and mitochondrial ATP generation and is the precursor for NADPH, which is required for anabolic pathways and reactive oxygen species detoxification.^{5,6} In addition, NAD⁺ is an essential substrate of enzymes including sirtuins and poly(ADP-ribose) polymerases, which are important in responding to altered nutritional

status and genotoxic stress.^{6,7} Sirtuins perform NAD⁺-dependent deacylation of protein Lys residues modified by acetyl coenzyme A (Ac-CoA) derived acyl groups.⁸ Sirtuins regulate nuclear gene expression, and mitochondrial enzyme activities, as well, and can play a protective role in the heart,⁹ although chronic overactivation may be deleterious.¹⁰ Poly(ADP-ribose) polymerase 1 is activated by reactive oxygen species-induced DNA lesions, and could deplete myocardial NAD⁺ stores in HF.¹¹ In situations of physiological equilibrium, biosynthetic pathways relying on dietary sources of tryptophan and NAD⁺ precursor vitamins counterbalance the consumption of NAD⁺ by signaling enzymes. However, dietary precursors may become insufficient to maintain the NAD⁺ metabolome in pathological conditions, thereby necessitating supplementation of NAD⁺ precursor.^{5,12,13}

The homeostasis of NAD⁺ and regulation of NAD⁺ biosynthetic enzymes have not been studied in dilated cardiomyopathy (DCM), a leading cause of heart transplant.¹⁴ We previously generated a powerful model of nonischemic DCM in mice triggered by cardiac-specific inducible inactivation of Serum Response Factor (*SRF^{HKO}* model).^{15–18} SRF is a major transcriptional regulator of genes and microRNAs involved in contractility, and in energy flux and calcium handling, as well.^{15,17,18} The SRF pathway is altered in the human failing heart^{19,20} and in animal models of DCM.^{21,22} The heart of *SRF^{HKO}* mutant mice display an early downregulation of myofibrillar creatine kinase (CK) activity encoded by the *Ckm* gene, which is followed by repression of enzymes of fatty acid β -oxidation and loss of ATP, thus recapitulating the transitional steps toward energy failure and cardiac structural remodeling in HF.¹⁸

Here, we show that NAD⁺ homeostasis is altered at an early stage in the heart of *SRF^{HKO}* mice with a striking induction of the nicotinamide riboside kinase 2 (NMRK2) pathway for NAD⁺ synthesis. *Nmrk2* gene is 1 of 2 mammalian paralogs of the yeast *NRK1* gene that was discovered as a eukaryotic route to NAD⁺ from nicotinamide riboside (NR).²³ Given the activity of NR in promoting sirtuin activity and restoring metabolic balance in a variety of model organisms,^{13,24–28} we aimed to test whether NR might treat HF in *SRF^{HKO}* mice and in the pressure overload hypertrophy model induced by transverse aorta constriction (TAC). Here, we show that NR greatly protects cardiac function by virtue of improved citrate and Ac-CoA metabolism and antioxidant gene expression. Because NR is orally available in people,²⁹ our data rationalize clinical testing of NR in human HF.

METHODS

The data, analytic methods, and study materials will be made available from the corresponding author on request to other researchers for purposes of reproducing the results or replicating the procedure. Detailed methods are available in the [online-only Data Supplement](#).

Patients

Left ventricular (LV) myocardium was obtained from terminally failing human hearts of 4 patients (mean age 54 years \pm 7, SD) at the time of transplantation at the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg as previously published with approval of the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg ethics committee.³⁰ All patients gave informed consent. Patients' characteristics are detailed in Table I in the online-only Data Supplement. The investigations conformed to the principles of the Declaration of Helsinki. Control hearts were obtained from the department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Szeged, Szeged, Hungary. Experimental protocols were approved by the Ethical Review Board of the Medical Center of the University of Szeged and by the Scientific and Research Ethical Committee of the Medical Scientific Board at the Hungarian Ministry of Health (ETT-TUKEB; No. 51–57/1997 OEj and 4991-0/2010-1018EKU).

Transgenic Mice

All experiments with animals conformed to the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and were approved by the ethics committee Charles Darwin #5 (agreement 00369.01). See online-only Data Supplement for details on SRF inactivation protocol.

NR Supplementation

SRF^{flKO} and control (*Sf/Sf*) mice were administered A04 rodent maintenance diet (Scientific Animal Food Engineering) supplemented with NR chloride provided by Chromadex. See online-only Data Supplement for details.

Transcriptomic Analysis

Transcriptomic data are available on NCBI Gene Expression Database, Accession number GSE84142.

Statistical Analysis

Animals were randomly assigned into different treatment groups. To assess significance, we performed Student *t* test for independent samples when the experimental design compared only 2 groups, or 1-way ANOVA for multiple group comparisons, or 2-way factorial ANOVA for independent factors when appropriate. Tukey tests were used for comparison of specific experimental groups when 1-way ANOVA gave a *P* value of <0.05 or, in the case of 2-way ANOVA for interaction, a *P* value of <0.05. Values are expressed as mean \pm SEM.

Supplemental Information

Supplemental information includes supplemental methods, 9 supplemental figures, and 6 supplemental tables.

RESULTS

NMRK2 Pathway Is Activated in the Failing Heart of *SRF^{flKO}* Mice

Transcriptome analyses in *SRF^{flKO}* mice at baseline or after phenylephrine α -adrenergic stimulation¹⁶ revealed

that the *Nmrk2* gene was induced at an early stage in the *SRF^{flKO}* heart and rose continuously during establishment of HF (Figure 1A and Table II in the online-only Data Supplement). The transcript for the ectoenzyme NT5E (CD73) that hydrolyzes extracellular NAD⁺ and nicotinamide mononucleotide (NMN) to NR, the substrate of NMRK2 kinase³¹ also increased in *SRF^{flKO}* hearts (Table II in the online-only Data Supplement). In contrast, the transcripts encoding nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), the enzyme converting nicotinamide (NAM) to NMN, and purine nucleoside phosphorylase (PNP), which converts NR to NAM,³² were depressed on phenylephrine treatment in *SRF^{flKO}* hearts (Table II in the online-only Data Supplement). Genes involved in the tryptophan and nicotinic acid pathways for NAD⁺ synthesis were not altered (Figure 1A and Table II in the online-only Data Supplement).

Modulation of *Nmrk2* and *Nampt* gene expression detected by transcriptomics was corroborated at the mRNA and protein level (Figure 1B through 1D). We observed a similar shift in human patients from predominant expression of NAMPT in healthy hearts to increased NMRK2 and depressed NAMPT in failing hearts (Figure 1D, Table II in the online-only Data Supplement). In mouse heart sections, NMRK2 protein localizes at the proximity of sarcolemma in controls (Figure 1E). The signal was strongly enhanced and spread to cytoplasm in *SRF^{flKO}* cardiomyocytes.

At day 15 after SRF inactivation, there was a 30% loss of NAD (representing the sum of NAD⁺ and NADH) (Figure 1F, see Methods in the online-only Data Supplement for details). The gene expression pattern (*Nt5e* and *Nmrk2* up with *Pnp* and *Nampt* down) suggested that cardiac tissue is attempting to mobilize and utilize NR as an NAD⁺ precursor while not increasing NAM usage. We tested this hypothesis by intraperitoneal administration of NR and NAM to *SRF^{flKO}* mice from day 8 to 15. Consistent with this hypothesis, myocardial NAD levels were preserved by NR but not by NAM (Figure 1F). *Srf* and *Nmrk2* expression levels were not changed by these treatments (Figure 1G and 1H). Because NR is orally available,^{26,29} we tested an NR-supplemented diet for 2 weeks. Myocardial NAD levels were reduced in this second series of *SRF^{flKO}* mice in comparison with controls and rescued by NR administration (Figure 1I).

NR Preserves Cardiac Function in the *SRF^{flKO}* Heart

We hypothesized that NR supplementation of food might be beneficial for cardiac function in the context of DCM. We fed control and mutant *SRF^{flKO}* mice a standard chow diet or NR-supplemented diet to reach a dose of 400 mg/kg of body weight per day from day 5 to 50, a period in which untreated *SRF^{flKO}* mice develop DCM and progress toward HF.^{15–18} NR diet induced a

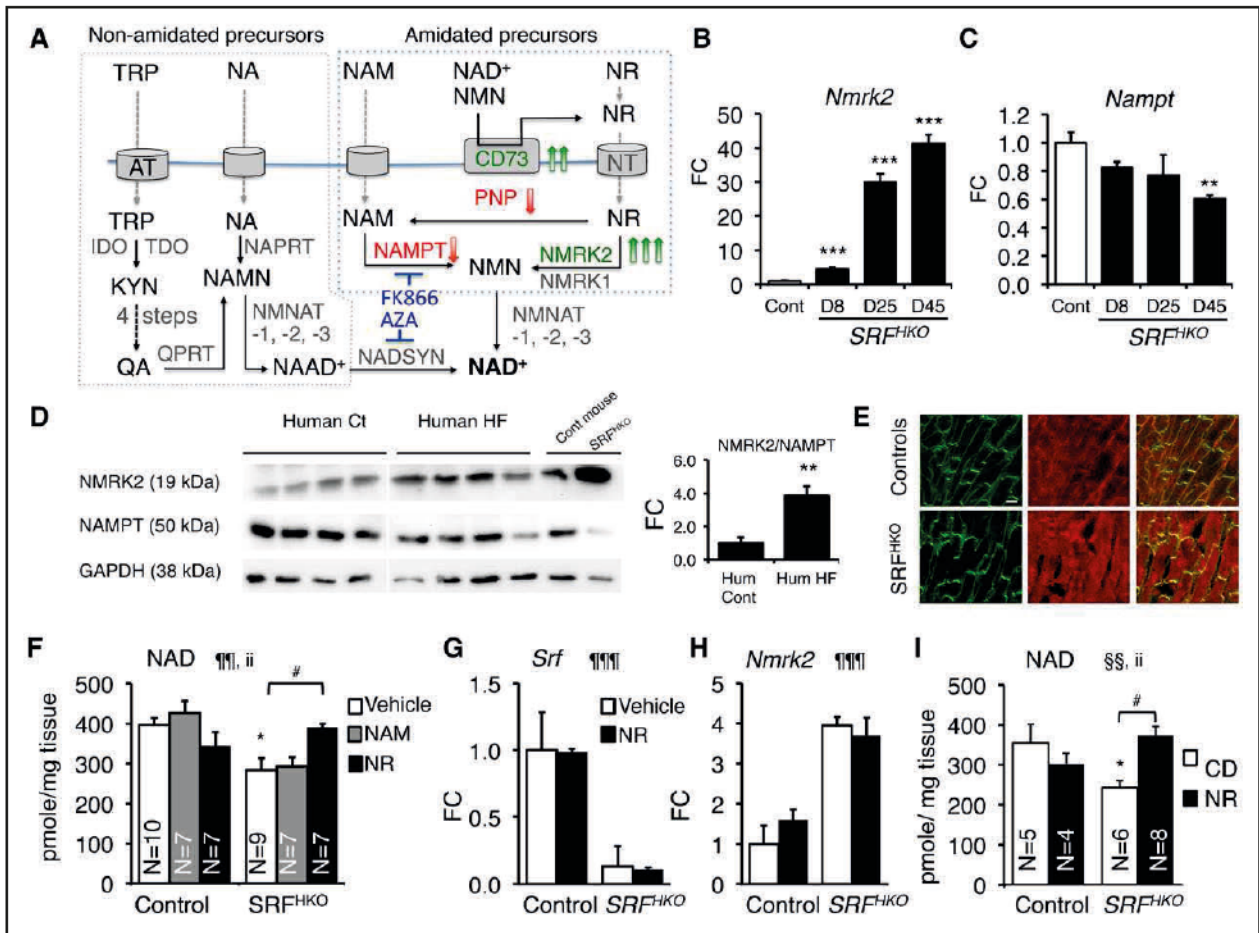


Figure 1. Activation of the *Nmrk2* gene in dilated cardiomyopathy.

A, Biosynthetic NAD⁺ pathways in mammalian cells. NA (nicotinic acid), NAM, NR, and TRP enter cells through specialized transport systems. Extracellular NAD⁺ and NMN are hydrolyzed to NR by the ectonucleotidase CD73. In the de novo pathway, TRP is converted to kynurenin (KYN) by IDO and TDO enzymes, and then into quinolic acid (QA) in 4 steps (not detailed). QA, NA, and NAM are phosphoribosylated by QPRT, NAPRT1, and NAMPT enzymes, respectively, to form mononucleotides NAMN and NMN. NR is phosphorylated by NMRK enzymes to form NMN. NR can be converted to NAM by PNP. NAMN and NMN are adenylated by the NMNAT enzymes to form the dinucleotides NAAD⁺ and NAD⁺. NAAD⁺ is amidated by NADSYN1. Genes increased in *SRF*^{HKO} heart are highlighted in green and those repressed in red (see accompanying Table II in the online-only Data Supplement). Inhibitors are shown in blue. **B** and **C**, RT qPCR analysis of *Nmrk2* and *Nampt* mRNA fold change (FC) in *SRF*^{HKO} hearts at different days (D) after SRF inactivation. **D**, Western blot analysis of NMRK2 and NAMPT protein in control and failing human hearts and control and *SRF*^{HKO} mouse hearts at D45. GAPDH is used as loading control. All human and mouse samples were analyzed on single blot, but 2 lanes separating that showed signs of protein degradation and aberrant migration pattern were cut out of the picture. **Right**, Ratio of NMRK2/NAMPT in human samples. **E**, Control and *SRF*^{HKO} mutant heart sections stained for NMRK2 (red) and vinculin (green) at D45. White bar in upper left panel=20 μm. **F** through **H**, NAM or NR (30 μmol) were injected intraperitoneally from D8 to 15 (400 mg/kg per day) to control and *SRF*^{HKO} mice. Vehicle: saline solution. **F**, Myocardial NAD⁺ levels. **G** and **H**, RT qPCR analysis of *Srf* and *Nmrk2* mRNA levels. **I**, Myocardial NAD levels in control and *SRF*^{HKO} mice fed regular chow diet (CD) or NR-enriched diet (0.22% 400–450 mg/kg per day) from D5 to 20. Throughout the figure, data are expressed as mean±SEM. Statistical analysis: One-way ANOVA (**B**, **C**) or 2-way factorial ANOVA for independent samples (**F** through **I**). ¶¶¶*P*≤0.01, ¶¶¶¶*P*≤0.001 for the genotype effect; §§*P*≤0.01 for the NR treatment effect; ii *P*≤0.01 for the interaction effect. Post hoc Tukey test: asterisks indicate statistical significant difference between any group versus the control CD (or vehicle) group: **P*≤0.05. ***P*≤0.01. ****P*≤0.001. # *P*≤0.05 for the effect of NR within the *SRF*^{HKO} group. A *t* test was used for the graph at the right of **D**: ** *P*≤0.01. FC indicates fold change over control group; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; NAAD, nicotinic acid adenine dinucleotide; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; NAM, nicotinamide; NAMN, nicotinic acid mononucleotide; NAMPT, nicotinamide phosphoribosyltransferase; NMN, nicotinamide mononucleotide; NMNAT, nicotinamide mononucleotide adenyltransferase; NMRK, nicotinamide riboside kinase; NR, nicotinamide riboside; PNP, purine nucleoside phosphorylase; QPRT, quinolinate phosphoribosyltransferase; RT qPCR, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; SRF, Serum Response Factor; TDO, tryptophan 2,3-dioxygenase; and TRP, tryptophan.

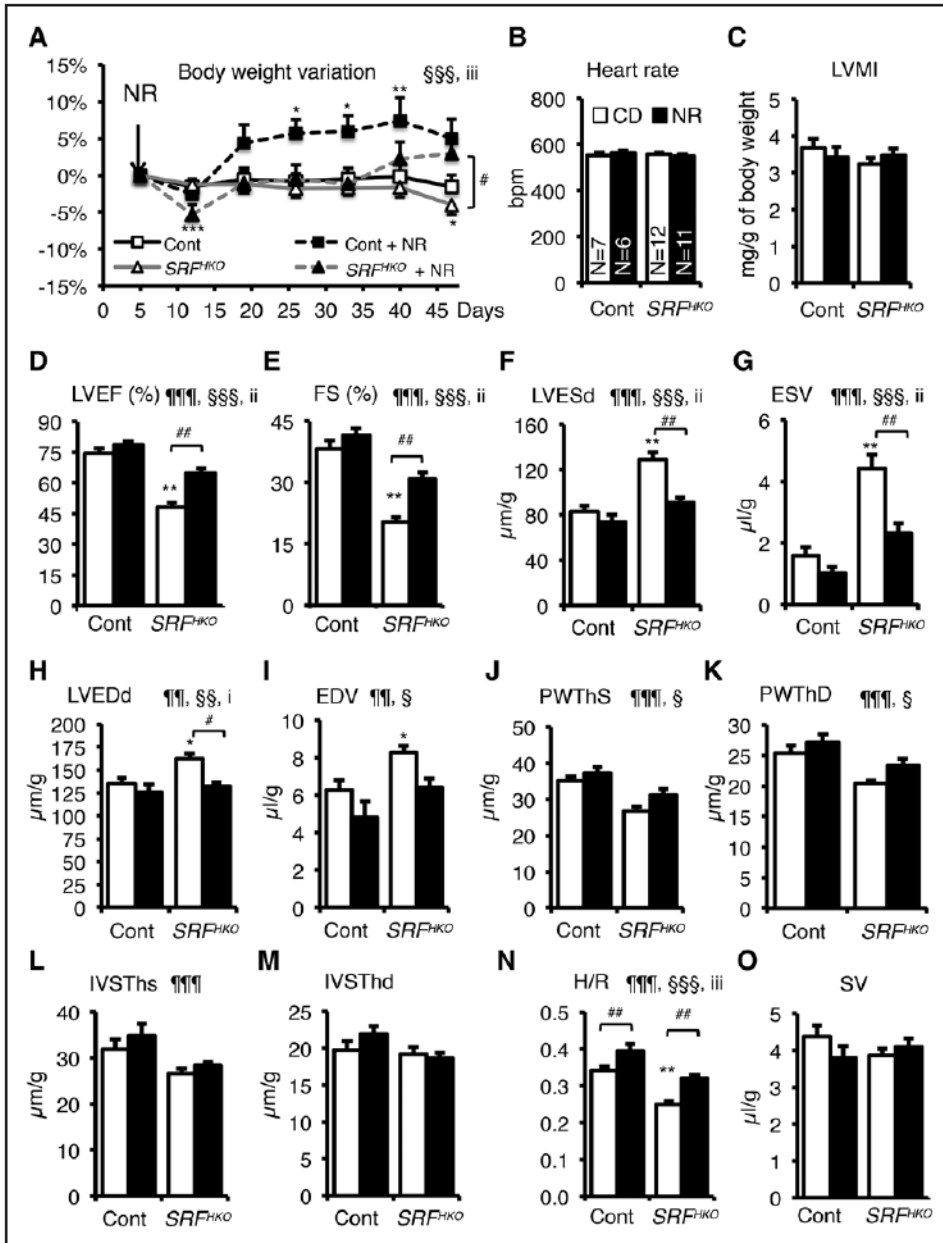


Figure 2. NR supplementation in diet prevents the onset of heart failure and dilatation.

A, CD- or NR-supplemented diet (0.22%) was given ad libitum to control and *SRF^{HKO}* mice from day 5 after SRF inactivation to the end of the experiment. Body weight was monitored throughout the period. Data are expressed as mean % weight variation±SEM, in comparison with weight at day 5. A 2-factor ANOVA with repeated measures on 1 factor was used for statistical analysis. §§§*P*≤0.001 for the time effect; iii, *P*≤0.001 for the interaction effect. Post hoc Tukey test: **P*≤0.05, ***P*≤0.01, ****P*≤0.001 for any time point versus day 5 within a group; #*P*≤0.05 for the NR treatment in *SRF^{HKO}* group. **B** through **O**, Cardiac parameters of control and *SRF^{HKO}* mutant were analyzed in M-Mode echocardiography between day 45 and day 47. **B**, Heart rate; **C**, left ventricle (LV) mass index; **D**, LV ejection fraction; **E**, fractional shortening; **F** and **G**, LV end-systolic diameter (**F**) and volume (**G**); **H** and **I**, LV end-diastolic diameter (**H**) and volume (**I**); **J** and **K**, LV posterior wall thickness in systole (**J**) and diastole (**K**); **L** and **M**, interventricular septum thickness in systole (**L**) and diastole (**M**); **N**, H/R: LV thickness (H) to radius (R) ratio; and **O**, stroke volume. Dimensions were normalized by the body weight. Data are expressed as mean±SEM. Statistical analysis: 2-way factorial ANOVA for independent samples. ¶¶*P*≤0.01, ¶¶¶*P*≤0.001 for the genotype effect; §*P*≤0.05, §§*P*≤0.01, §§§*P*≤0.001 for the NR treatment effect; i *P*≤0.05, ii *P*≤0.01, iii *P*≤0.001 for the interaction effect. Post hoc Tukey test: asterisks indicate statistically significant difference versus the control CD group: **P*≤0.05, ***P*≤0.01, ****P*≤0.001. #*P*≤0.05, ##*P*≤0.01 for the effect of NR within the *SRF^{HKO}* group. CD indicates chow diet; CONT, control; EDV, end-diastolic volume; ESV, end-systolic volume; FS, fractional shortening; IVSThd, interventricular septum thickness in diastole; IVSThs, interventricular septum thickness in systole; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVEDd, left ventricular end-diastolic diameter; LVESd, left ventricular end-systolic diameter; LVMI, left ventricular mass index; NR, nicotinamide riboside; PWThD, posterior wall thickness in diastole; PWThS, posterior wall thickness in systole; and SV, stroke volume.

modest 5% to 7% increase in body weight in control mice and allowed *SRF^{HKO}* mice to regain weight after an initial loss, whereas *SRF^{HKO}* mice on a regular diet had lost weight at the end of the protocol (Figure 2A). Cardiac parameters were analyzed by echocardiography between days 45 and 47 (Figure 2B through 2O). NR did not change heart rate and LV mass index, but slightly it increased the LV thickness-to-radius ratio (H/R) in control mice (Figure 2N). To assess a potential impact of NR treatment on vascular function, we compared vascular reactivity in isolated mesenteric arteries from NR-fed and control mice. We found no difference between the 2 groups neither in responses to K⁺ or agonist-induced contraction nor in the relaxation response to carbachol or a NO donor (Figure I in the online-only Data Supplement and Table III in the online-only Data Supplement).

SRF^{HKO} mutant mice fed the standard diet displayed a severe decrease in LV ejection fraction and fractional shortening (Figure 2D and 2E). The NR diet clearly protected against this decline in cardiac function. It is important to note that NR fully protected *SRF^{HKO}* mice against the dilatation and thinning of the LV wall (Figure 2F through 2M), preserving the H/R ratio that normally declines with DCM (Figure 2N). Changes in stroke volume (Figure 2O) and cardiac output (not shown) were not significant.

At the histological level, NR limited the appearance of very long cardiomyocytes (Feret > 100 μm) in *SRF^{HKO}* mice, although the population of large cardiomyocytes (minFeret > 26 μm) remained larger than in controls (Figure II in the online-only Data Supplement).

NR-Enriched Diet Protects the Cardiac NAD⁺ Metabolome in HF

The impact of an NR-enriched diet on the cardiac NAD⁺ metabolome is not known (Figure 3A). Mice fed with or without NR were euthanized 3 days after the echocardiography at day 50. Myocardial NAD was decreased in the *SRF^{HKO}* mice at day 50 as measured by the NAD cycling assay, and the NR diet protected against this drop (Figure 3B). Myocardial NAD⁺ and NADH varied in the same direction in all conditions, leaving the NAD⁺/NADH ratio unchanged (Figure III in the online-only Data Supplement). Liquid chromatography-mass spectrometry analysis allowed us to provide the levels of NAD⁺ metabolites on a common scale with NAD⁺^{13,33} (Figure 3C through 3L). *SRF^{HKO}* mice hearts did not have higher levels of adenosine diphosphate ribose (ADPR) or NAM (Figure 3D and 3E). Levels of NADP⁺ and NMN showed a pattern similar to NAD⁺ (Figure 3F and 3G).

NR increased the cardiac levels of nicotinic acid adenine dinucleotide, a sensitive biomarker of increased NAD⁺ metabolism,²⁹ and methyl-NAM (MeNAM), as well (Figure 3A, 3H through 3J). MeNAM oxidation by AOX1 generates N1-methyl-4-pyridone-5-carboxamide (Me4PY)

and releases hydrogen peroxide (Figure 3A). Changes in unrelated metabolites were not significant (Figure 3K and 3L). As shown in the nematode,³⁴ NR increased the expression of the *Nfe2l2* gene encoding NRF2, whereas its target genes *Mt2* and *Nox4* were already activated, and *G6pdx*, as well, in the heart of *SRF^{HKO}* mice (Figure 3M through 3P). NR treatment in the *SRF^{HKO}* hearts limited the level of *Myh7* induction, a signature of cardiac stress and metabolic remodeling in the failing heart (Figure 3Q).

The liver is a central organ for the regulation of nutrient metabolism. We assessed the NAD⁺ metabolome response in the liver of control and *SRF^{HKO}* mice (Table IV in the online-only Data Supplement). NR increased the MeNAM and Me4PY levels similarly in both genotypes. It is interesting to note that the liver response to NR diet was more robust in the *SRF^{HKO}* mice with regard to the increase in the steady-state level of NAD, nicotinic acid adenine dinucleotide, ADPR, and NAM. Because the liver is not targeted by the *Srf* deletion, it suggests that the HF condition indirectly modifies the balance of NAD synthesis and signaling in the liver.

NR-Enriched Diet Does Not Result in Global Cardiac Protein Deacetylation

The cardiac levels of NAM and ADPR in this HF model are low and show few changes with NR (Figure 3D and 3E), suggesting that the NR-driven boost in NAD⁺ synthesis is not necessarily translated into a higher level of NAD⁺ consumption by sirtuins and poly(ADP-ribose) polymerases. We performed antiacetyl-K and anti-poly-ADP-ribose Western blot analyses on cardiac proteins from control and *SRF^{HKO}* mice fed with the chow diet or NR-enriched diets. Just as levels of ADPR were not modulated by *SRF^{HKO}* or NR, neither were levels of PAR (Figure IVA in the online-only Data Supplement). There was an increase in the acetylation level of some cardiac proteins in the hearts of NR-fed animals (Figure IVB in the online-only Data Supplement). Antibodies specific to the acetylated form of FOXO1 or p53 showed an increase in the acetylation level of these nuclear proteins in the heart in response to NR in controls as in *SRF^{HKO}* mice (Figure 3R, Figure V in the online-only Data Supplement). By comparison, the acetylation level of the mitochondrial aconitase 2 protein did not change in any of these conditions despite lower protein level in the *SRF^{HKO}* hearts (Figure 3S and Figure VIA in the online-only Data Supplement). These data suggest that the bioenergetic improvement in NR-supplemented hearts may result in greater production of cytosolic Ac-CoA and consequent increased nucleocytosolic protein acetylation.

NR Improves Metabolism of Citrate in HF

Several regulators involved in mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism, and lipid metabolism, as

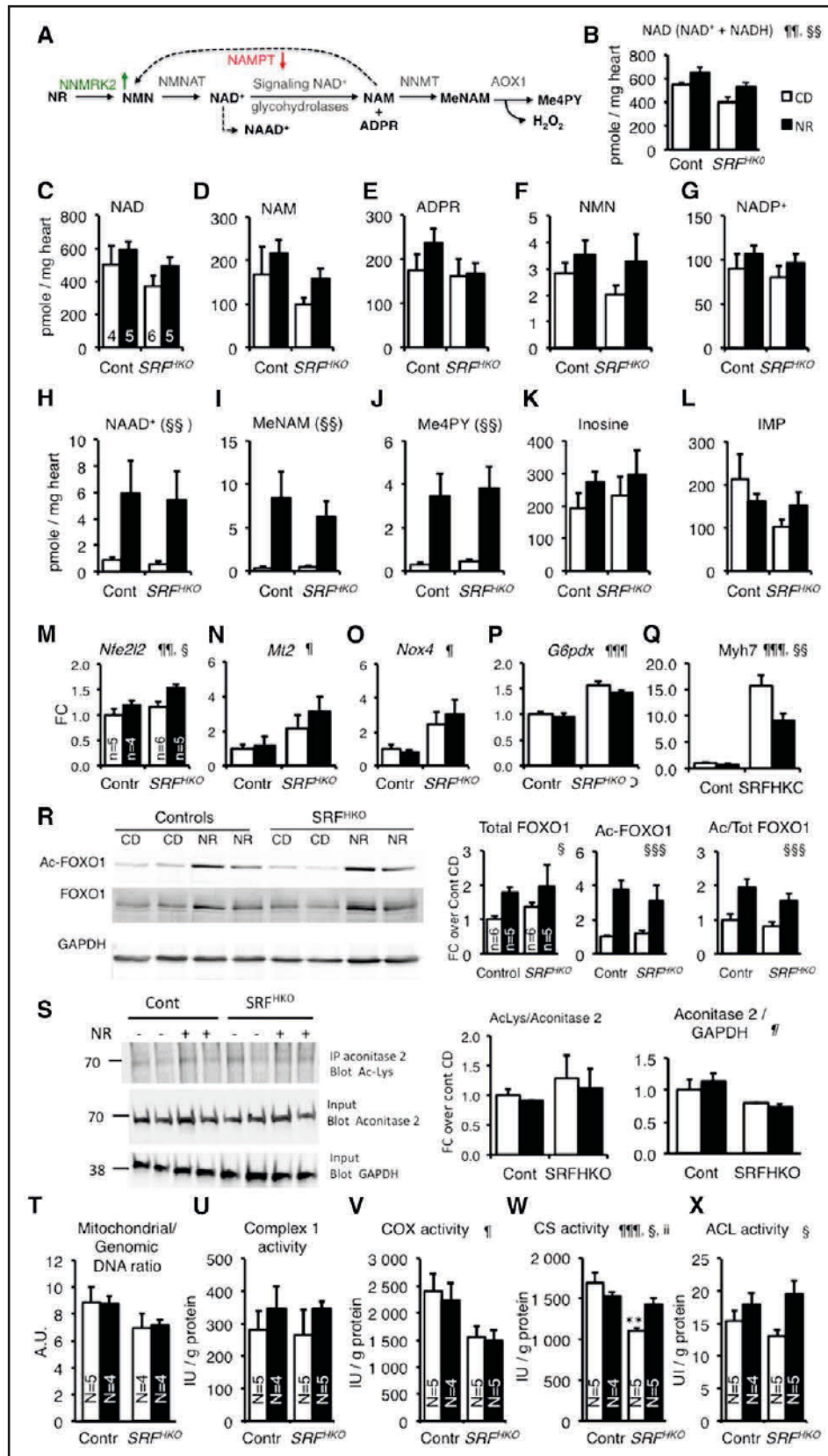


Figure 3. Impact of NR treatment on cardiac NAD⁺ metabolome.

A, NR to NAD⁺ pathway and NAD⁺ catabolism are depicted. NAD⁺ is cleaved into NAM and ADP-ribose by NAD⁺-consuming enzymes. NAM is either recycled by NAMPT or methylated by the nicotinamide *N*-methyltransferase (NNMT) enzyme and oxidized by the aldehyde deoxidase 1 (AOX1) giving rise to degradation products MeNAM and Me4PY, respectively. **B**, Myocardial NAD was quantified by colorimetric NAD⁺ cycling assay at day 50 in controls (n=6), Controls+NR (Continued)

well, were repressed in *SRF^{flKO}* hearts (Figure VIIA and VIIB in the online-only Data Supplement). Simultaneously, the expression of the glucose transporter *Glut1* was increased and expression of *Pdk2* was decreased, which can be seen as a trend of the failing heart to increase glycolysis (Figure VIIC in the online-only Data Supplement). NR did not alter the expression of these genes.

There was a trend toward a reduced mitochondrial to genomic DNA ratio in the *SRF^{flKO}* LV (Figure 3T). The NADH-dependent complex I activity and Cox activity was not changed by the NR diet (Figure 3U and 3V). Neither the complex I and II maximal respiration rates, nor the apparent K_m for ADP, mitochondrial CK coupling, and ADP acceptor control ratio showed any alteration at this stage (day 50) in the *SRF^{flKO}* LV fibers. These parameters were not altered by NR administration (Figure VIID through VIIG in the online-only Data Supplement).

We noted that NR treatment resulted in a net increase in acetylation of FOXO1 and p53 (Figure 3R and Figure V in the online-only Data Supplement). Availability of cytosolic Ac-CoA depends on mitochondrial citrate synthase (CS) production of citrate and conversion to Ac-CoA via the cytosolic enzyme, ATP-citrate lyase (ACL). CS activity was reduced to 65% of control levels in the *SRF^{flKO}* LV myocardium (Figure 3W). It is striking that NR administration protected against the decline of CS activity in the failing heart. This rescue in activity occurred despite a net reduction in protein level in the *SRF^{flKO}* myocardium that was not rescued by the NR treatment (Figure VIB in the online-only Data Supplement). It is interesting to that NR also increased cardiac ACL activity in both control and *SRF^{flKO}* mice (Figure 3X). Taken together, these data suggest that NR improves CS and ACL activity, resulting in increased nucleocytoplasmic protein acetylation.

Nmrk2 Gene Is Induced by Inhibition of Alternative NAD⁺ Biosynthetic Pathways in Cultured Cardiomyocytes

To assess the impact of NMRK2 on NAD⁺ biosynthesis relative to the other pathways in cardiomyocytes, we used chemical inhibitors to target the alternative pathways in neonatal rat cardiomyocytes (NRCs) grown in Dulbecco modified Eagle medium containing NAM as the vitamin B3. The glutamine analog azaserin inhibits the glutamine-dependent NAD synthase NADSYN1,³⁵ which catalyzes the last step of NAD⁺ synthesis from tryptophan and NA (Figure 1A). FK866 is a specific inhibitor of Nampt.³⁶

Azaserin had a slowly repressive effect on NAD pools that resulted in a 50% reduction with respect to nontreated cells at 72 hours (Figure 4A through 4C) while progressively increasing *Nmrk2* expression (Figure 4D). FK866 treatment led to a rapid and severe loss of intracellular NAD⁺ but not NADH (Figure 4A through 4C). Despite this severe loss, NRC could be maintained up to 72 hours in continuous layer with FK866 treatment. FK866 treatment strongly increased *Nmrk2* expression at 72 hours (Figure 4D). Combined azaserin and FK866 treatment had a similar impact than FK866 alone (Figure 4A through 4D). *Nmrk1* expression did not change in these conditions (not shown).

We tested whether NR could preserve NAD⁺ levels in the presence of FK866. NR slightly increased the baseline level of intracellular NAD⁺ in nontreated NRC, whereas exogenous NAD⁺ had no impact (Figure 4E). Both compounds increased the NAD⁺/NADH ratio (Figure 4F and 4G). NR fully protected NAD⁺ levels in NRCs treated with FK866, whereas the protection by exogenous NAD⁺ was partial (Figure 4E), although both treat-

Figure 3 Continued. (n=5), *SRF^{flKO}* (n=6), *SRF^{flKO}+NR* (n=6). Data are expressed as means±SEM. **C through L**, Myocardial metabolites were analyzed by LCMS-based metabolomics. See abbreviations in the text. Controls (n=4), controls+NR (n=5), *SRF^{flKO}* (n=6), +NR (n=5, except for NAM, MeNAM, and Me4PY, n=4, no peak was identified in 1 sample). Data are expressed as means±SEM. **M through Q**, Expression of genes related to oxidative stress signaling (**M through O**) and cardiac structural and metabolic remodeling (**P and Q**). n=5 in each group. **R**, Representative Western blot analysis of FOXO1 and acetyl-FOXO1 of 3 independent experiments realized in different duplicates for each group. GAPDH is used as a loading control. **Right graphs**, Quantification of total and acetyl-FOXO1 ratio on GAPDH and acetyl-FOXO1/total FOXO1 ratio in n=5 to 6 animals per group. **S**, Acetylation level of mitochondrial aconitase 2. Aconitase 2 (75 kDa) was immunoprecipitated using a rabbit polyclonal antibody, and the immunoprecipitate was analyzed by Western blot using a mouse monoclonal anti-Ac(K103) antibody. Inputs were run in a parallel gel and immunoblotted with anti-aconitase 2 and anti-GAPDH for loading control. The ratio of acetyl-aconitase2/total aconitase2 and aconitase2/GAPDH are shown (**right**). See accompanying Figure VIA in the online-only Data Supplement for control immunoprecipitation with preimmune rabbit IgG. **T through X**, LV cardiac tissue was isolated at 50 days after tamoxifen injection in control and *SRF^{flKO}* mice fed control diet (CD) or NR-enriched diet. DNA and proteins were extracted from parallel samples to quantify mitochondrial to genomic DNA ratio (T) and enzymatic activities: complex I (U), cytochrome oxidase (V), citrate synthase (W), and ATP citrate lyase (X). See associated Figure VII in the online-only Data Supplement. In **M through S**, data are expressed as mean fold change (FC)±SEM over control group CD. Statistical analysis: Two-way factorial ANOVA for independent samples was used for all panels. ¶*P*≤0.05, ¶¶*P*≤0.01, ¶¶¶*P*≤0.001 for the genotype effect; §*P*≤0.05, §§*P*≤0.01, §§§*P*≤0.001 for the NR treatment effect; ii *P*≤0.01 for the interaction effect. Post hoc Tukey test: asterisks indicate statistically significant difference versus the control CD group: ***P*≤0.01. ACL indicates ATP-citrate lyase; ADP, adenosine diphosphate ribose; Cont, control; CS, citrate synthase; IMP, inosine monophosphate; LCMS, liquid chromatography-mass spectrometry; NAAD, nicotinic acid adenine dinucleotide; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; NAM, nicotinamide; NAMPT, nicotinamide phosphoribosyltransferase; NMN, nicotinamide mononucleotide; and NR, nicotinamide riboside.

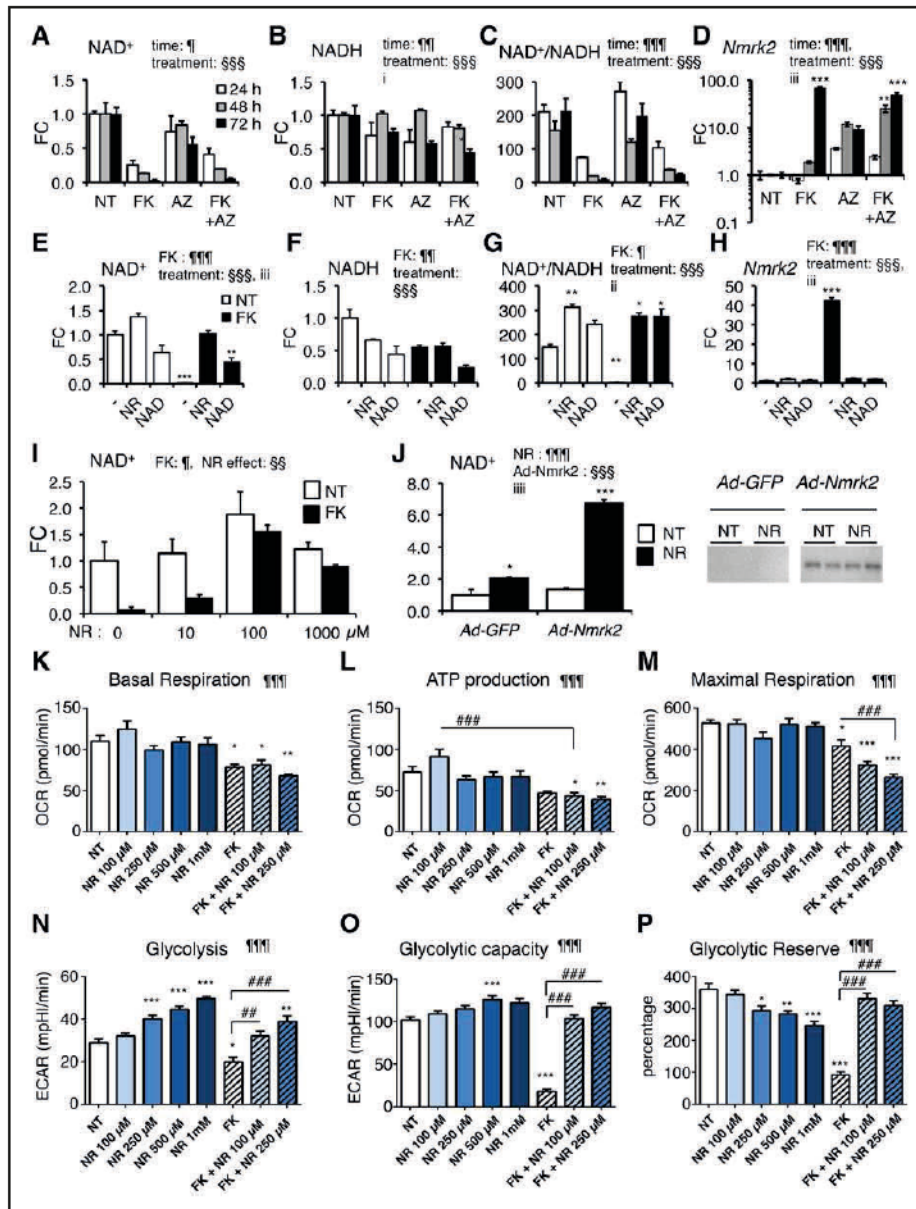


Figure 4. *Nmrk2* expression is activated by repression of alternative NAD⁺ biosynthetic pathways.

A through **C**, Intracellular levels of NAD⁺ (**A**), NADH (**B**), and NAD⁺/NADH ratio (**C**) in NRC after 10 μmol/L FK866 and 20 μmol/L azaserin treatment or no treatment (NT) for 24 to 72 hours as indicated. **D**, *Nmrk2* mRNA level in NRC treated as in **A** through **C**. **E** through **G**, Same as in **A** through **C** in NRC treated for 72 hours with 10 μmol/L FK866 or not treated (NT) in normal culture medium (–) or in presence of 250 μmol/L NAD⁺ or 1 mmol/L NR. **H**, *Nmrk2* mRNA level in NRC treated as in **E** through **G**. **I**, NAD⁺ levels in NRCs treated with 10 μmol/L FK866 for 72 hours, or not treated (NT) in the presence of increasing concentration of NR in culture medium. **J**, NAD⁺ content in nontreated (NT) or following 24-hour NR treatment (1 mmol/L) in NRC infected with Ad-GFP or HA-Nmrk2. **Right**, Western blot detection of HA-NMRK2 with anti-HA antibody. **K** through **M**, Mitochondrial stress test in Seahorse analyzer. NRC grown on Seahorse 96-well plates were analyzed for oxygen consumption rate (OCR) at day 8 after 5 days of treatment. **K**, Basal mitochondrial respiration is calculated from total cellular respiration minus nonmitochondrial respiration. **L**, ATP production is calculated from basal mitochondrial respiration minus respiration after oligomycin injection. **M**, Maximal respiration is measured after FCCP injection. See accompanying **Figure IX** in the online-only Data Supplement for other respiration parameters. **N** through **P**, Glycolysis stress test in Seahorse analyzer. NRC grown on Seahorse 96-well plates were analyzed at day 8 after 5 days of treatment. **N**, Glycolysis was measured as a function of extracellular acidification rate (ECAR) after injection of 10 mmol/L glucose. **O**, Glycolytic capacity as the maximum ECAR following injection of oligomycin. **P**, Glycolytic reserve as the difference between glycolysis and maximal glycolytic capacity. Throughout the figure, data are expressed as mean fold change (FC)±SEM over the control group, except when indicated. Statistical analysis: a 2-way factorial ANOVA for independent samples was used for **A** through **J**. ¶ and § symbols as indicated in the panels; i P≤0.05, ii P≤0.01, iii P≤0.001 for the interaction effect. One-way ANOVA was used for **K** through **P**. ¶¶ P<0.05, ¶¶¶ P<0.01, ¶¶¶¶ P<0.001. §§ P≤0.01, §§§ P≤0.001. Post hoc Tukey test: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 between any (Continued)

ments blocked *Nmrk2* induction (Figure 4E). At least 100 $\mu\text{mol/L}$ NR was required to rescue the NAD^+ loss induced by 10 $\mu\text{mol/L}$ FK866 (Figure 4I). To assess the functionality of NMRK2 in the absence of a stress like the FK866, we infected NRC with a recombinant adenovirus expressing HA-tagged *Nmrk2* cDNA (Figure 4J). Overexpression of NMRK2 did not modulate the NAD^+ levels in NRC. In presence of NR, *Nmrk2* overexpression robustly increased the NAD^+ level by a factor of 6. NR alone slightly increased the NAD^+ level in control NRC infected with *Ad-GFP* (Figure 4J). In isolated primary cultures of adult rat cardiomyocytes, NR increased intracellular NAD nearly 3-fold, showing that the NMRK pathway is more active in adult rat cardiomyocytes than in NRCs (Figure VIII A in the online-only Data Supplement). FK866 reduced NAD levels by a factor of 2 (Figure VIII A in the online-only Data Supplement) in adult rat cardiomyocytes and increased *Nmrk2* expression by a factor of 4.5, whereas azaserin had no impact (Figure VIII B in the online-only Data Supplement). We assessed the impact of NR on oxygen consumption rates in NRC following a mitochondrial stress protocol. NR had no impact on any mitochondrial respiration parameter in NRC at baseline (Figure 4K through 4M, Figure IX in the online-only Data Supplement). NR increased glycolysis at baseline in a dose-dependent manner (Figure 4N), but not the maximal glycolytic capacity (Figure 4O and 4P). We assessed the capacity of NR to rescue any impact of FK866 on metabolism. FK866 reduced basal oxygen consumption rates and maximal respiration and trended to reduce ATP production (adjusted P value=0.0547) (Figure 4K through 4M). Addition of NR at doses that we showed to fully rescue the drop in NAD^+ levels triggered by the FK866 did not correct these alterations and even further reduced maximal respiration at high doses (Figure 4K through 4M, Figure IX in the online-only Data Supplement). FK866 strongly reduced basal glycolysis and glycolytic capacities in NRC. NR strikingly preserved NRC glycolytic capacities to 100% control levels and more in FK866-treated cells and stimulated glycolysis at baseline in nontreated cells in a dose-dependent manner (Figure 4N through 4P).

SRF Deficiency-Induced Depression of the *Nmrk2* Promoter Is Counterbalanced by the Sensitivity of *Nmrk2* Gene to NAD^+ Depletion and Energetic Stress

Because *Nmrk2* expression is activated in vivo on *Srf* gene inactivation, we addressed the role of the SRF transcription factor in *Nmrk2* gene regulation. We identified

an SRF binding site with 9/10 bp match to the consensus CC(AT)₆GG (CArG) sequence in a conserved 600-bp region between the murine and human genes (Figure 5A). We cloned the upstream region and 5'-UTR of the murine *Nmrk2* gene (-581/+61) into a luciferase reporter vector and mutated the CArG-like sequence to a motif matching the consensus sequence (5'-CC) or a motif unable to bind SRF (5'-GG) (Figure 5A). FK866 increased the expression of the WT construct 8-fold, whereas a consensus CArG reduced the extent of activation (Figure 5B). The 5'-GG mutation reduced baseline expression by 75% and abolished the response to FK866. The full intergenic 3009-bp sequence upstream of *Nmrk2* had a much higher activity, especially in response to FK866 (Figure 5C). siRNA-mediated inhibition of *Srf* reduced, but did not abolish, the induction of endogenous *Nmrk2* by FK866 in NRC, suggesting that FK866-triggered activation of the *Nmrk2* promoter is partially independent of SRF (Figure 5D and 5E). FK866 treatment reduces ATP to 50% of the control level in NRC (Figure 5F). SRF is major upstream regulator of *Ckm* gene involved in high-energy phosphate compounds balance. A siRNA-mediated 5-fold knock-down of *Ckm* gene expression lowered the cellular ATP levels to 70% control level and triggered a 6.8-fold increase in *Nmrk2* expression (Figure 5G and 5H). A 2-fold reduction in *Srf* expression resulted in a 2-fold reduction of *Ckm* expression leaving *Nmrk2* expression intact. Enforcing a more profound depression of *Ckm* expression in the context of *Srf* repression in NRC by cotransfection with both *Srf* and *Ckm* siRNAs resulted in a 2.3-fold increase in *Nmrk2* expression (Figure 5H).

Nmrk2 Is Induced by the AMPK-PPAR α Axis

In line with the previous results, we hypothesized that pathways related to energy failure might activate *Nmrk2*. The level of phosphorylated AMP-activated protein kinase α (AMPK α), the energy stress-sensing AMP-activated kinase, and its target Ac-CoA carboxylase (ACC) was increased at an early stage when *Nmrk2* induction began in the *SRF*^{TKO} hearts (Figure 6A and 6B). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) treatment stimulated AMPK phosphorylation in NRCs and increased NMRK2 protein level in NRCs (Figure 6C and 6D). The energetic stress induced by glucose deprivation for 24 hours or FK866 for 48 hours also increased the NMRK2 protein.

AICAR treatment did not modulate NAD^+/NADH but robustly induced *Nmrk2* expression (Figure 6E through 6H). To assess whether the effect of AICAR took place at the level of the *Nmrk2* promoter, we transfected *Nmrk2*-

Figure 4 Continued. group versus NT control cells; ## P <0.01, ### P <0.001 for indicated comparisons. Ad-GFP indicates adenovirus encoding green fluorescent protein; AZ, azaserin; FCCP, Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine; FK, FK866; HA, human influenza hemagglutinin tag sequence; NAD , nicotinamide adenine dinucleotide; NRC, neonatal rat cardiomyocyte; and NR, nicotinamide riboside.

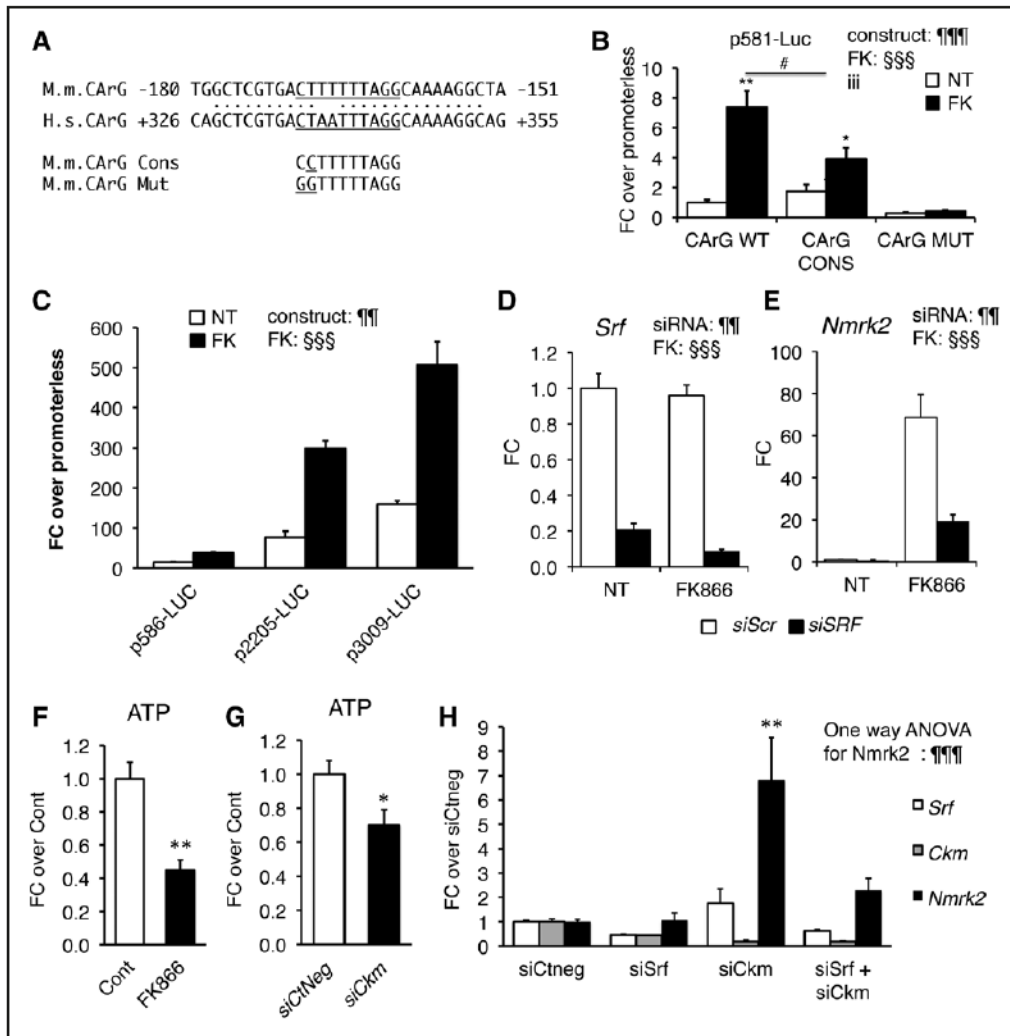


Figure 5. SRF is a component of *Nmrk2* gene transcription.

A, CARG-like binding site for SRF in the conserved region between the murine (M.m) *Nmrk2* promoter and human (H.s) *NMRK2* intron 1. The CARG-like motif was mutated to a CARG consensus sequence (cons) and a CARG mutant (mut) site unable to bind SRF. **B**, Activity of p586-Firefly Luciferase construct bearing wild-type (WT), consensus (CONS), or mutated (Mut) CARG motif without (NT) or with FK866 treatment (10 μ mol/L) in NRC. SV40-renilla luciferase was cotransfected with the *Nmrk2*-Firefly Luc constructs for normalization of transfection efficiency. Two-way factorial ANOVA for independent factors: ¶¶¶ P <0.001 for construct effect, §§§ P <0.001 for FK effect; iii P <0.001 for the interaction effect. Post hoc Tukey-test: * P <0.05, ** P <0.01 FK versus NT; # P <0.05 CARG construct versus CARG wild type. **C**, Various lengths of the murine *Nmrk2* regulatory region were inserted into pGL4 vector and transfected in nontreated or FK866-treated NRC. Two-way factorial ANOVA for independent factors: ¶¶ P <0.01 for construct effect, §§§ P <0.001 for FK effect. **D** and **E**, *Srf* and *Nmrk2* mRNA levels in NRC transfected with control scrambled siRNA (siScr) (white bars), or *Srf* or *Nmrk2* siRNA (black bars), without (NT) or with FK866 treatment. Two-way factorial ANOVA for independent factors: ¶¶ P <0.01 for siRNA effect, §§§ P <0.001 for FK effect. **F** and **G**, ATP levels in NRCs treated for 72 hours with FK866 (**F**) or siCkm (**G**). t test: * P <0.05, ** P <0.01, between FK-treated cells or siCkm-transfected cells versus control cells or siCtneg-transfected cells, respectively. **H**, *Srf*, *Ckm*, and *Nmrk2* mRNA level in NRC transfected for 72 hours with siRNAs as indicated. A 1-way ANOVA was used. ¶¶¶ P <0.001. Post hoc Tukey test: ** P <0.01, between any group versus siCtneg-transfected control cells. Throughout the figure, data are expressed as mean \pm SEM over control group, fold change over control group (FC) except for **B** and **C**, fold change over promoterless pGL4 plasmid and **H** FC over siCtneg. CARG indicates CC(A/T)₆GG; NRC, neonatal rat cardiomyocyte; siRNA, small interfering RNA; and SRF, Serum Response Factor.

luciferase constructs into NRC and treated the cells with AICAR. The p586-Luc, and moreover, the p3009-Luc reporter, was highly responsive to AICAR treatment (Figure 6I and 6J). Cotransfection of a plasmid overexpressing a dominant negative isoform of AMPK efficiently blunted induction by AICAR (Figure 6I and 6J).

Analysis of the 5'-regulatory sequences of *Nmrk2* revealed enrichment in putative peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) binding sites (Figure 6K). The fragments -3009/-2552 and -1028/-228 contain most of the activity. By comparison, the activity of the *Nmrk2* promoter was very low in cardiac fibroblasts (Figure 6L).

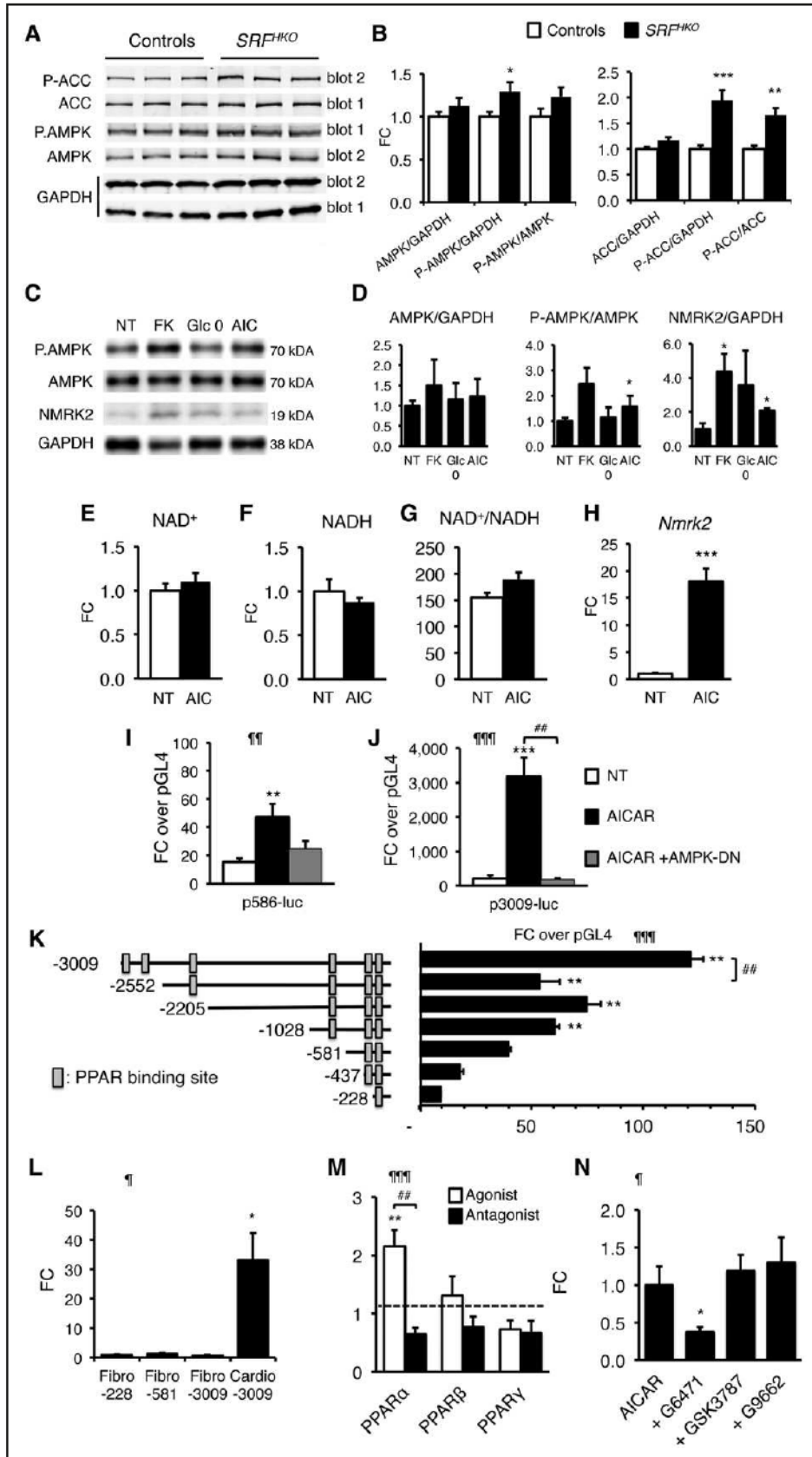


Figure 6. *Nmr2* expression is increased by AMPK and PPAR α pathways.

A, Representative Western blot analysis of cardiac proteins in control and *SRF^{KO}* mice at day 9 using antibodies directed against ACC, phospho-ACC (Ser79), AMPK α , and phospho-AMPK α (Thr172). Phosphorylated and total proteins were analyzed on 2 separate gels (gel 1 and 2) and GAPDH antibody was used for loading control. **B**, Quantification (*Continued*)

To assess the role of PPAR factors in *Nmrk2* gene regulation, we cotransfected NRC with the p3009-Luc reporter and PPAR expression vectors. Only PPAR α increased the activity of the *Nmrk2* promoter in the presence of its agonist GW7647 (Figure 6M). The PPAR α antagonist G6471 repressed the *Nmrk2* promoter (Figure 6M) and blunted the activating effect of AICAR (Figure 6N). Neither the PPAR β nor the PPAR γ antagonists had any effect on *Nmrk2* promoter induction by AICAR. These results establish that *Nmrk2* is an AMPK-PPAR α -responsive gene that is induced by energy stress in cardiac cells.

NR Preserves Cardiac Function in the TAC Model

To determine whether NR treatment could be useful in other forms of HF, we assessed its efficiency in the TAC model of pressure overload cardiac hypertrophy. NR was administrated starting 2 days after the TAC or SHAM surgery. Kaplan-Meier survival curve analysis showed no significant difference, mainly because of a similar early mortality between the 2 groups within 1 week after TAC (Figure 7A). NR treatment reduced the final drop in LV ejection fraction that occurred between the fourth and sixth week after TAC (Figure 7B and

Table V in the online-only Data Supplement). NR did not attenuate the dilatation of the LV chamber and had only a transient effect on the thinning of the interventricular septum (Figure 7C and 7D). At euthanization, the cardiac hypertrophy index was similar between the chow diet and NR groups (Figure 7E).

The TAC-induced HF resulted in a decrease of the myocardial NAD⁺ pool, which was partially preserved by NR, with little impact on the NAD⁺/NADH ratio (Figure 7F through 7H). TAC increased *Nmrk2* expression level in the nontreated group and NR-treated group, whereas *Nmrk1* expression remained unchanged and *Nampt* was repressed (Figure 7I through 7K). TAC repressed *Sirt3* expression, *Sirt1* and *Ckm* expression while increasing the expression of *Myh7*, *Anf*, and *Bnp* (Figure 7L through 7Q) but NR treatment had no impact on gene expression.

DISCUSSION

We report that depressed NAD⁺ homeostasis and activation of NMRK2 kinase are early and persistent events in a mouse model of DCM leading to heart failure and that administration of NR, the substrate of NMRK2 and most energetically favorable NAD⁺ precursor, prevents

Figure 6 Continued. of total and phosphoprotein signal from Western blot analyses. Data are normalized on GAPDH signal. The Phos/Total ratio is calculated from GAPDH normalized levels for each individual. n=6 for each group. Data are expressed as mean fold change (FC) \pm SEM over control group. *t* test: **P* \leq 0.05, ***P* \leq 0.01, ****P* \leq 0.001 over control group. **C**, NRCs were treated with FK866 (10 μ mol/L, 72 hours, FK), AICAR (500 μ mol/L, 48 hours, AIC), or grown in the absence of glucose in the medium (Glc 0) for 48 hours, and proteins were extracted for Western blot analyses. Representative Western blot. **D**, Quantification on n=3 samples for each condition of NRCs treated as in **C**. Data are expressed as mean FC \pm SEM over NT group. **P* \leq 0.05 over control group. **E** through **G**, Intracellular NAD⁺ content (**E**), NADH (**F**), and NAD⁺/NADH ratio (**G**) in NRCs after 24 hours of treatment with AICAR (500 μ mol/L). **H**, RT qPCR analysis of *Nmrk2* mRNA level in NRCs treated with AICAR. *t* test: ****P* \leq 0.001 over nontreated control group. **I** and **J**, NRCs were cotransfected with *Nmrk2*-luciferase constructs containing 586 (**I**) or 3009 base pairs (**J**) of upstream *Nmrk2* regulatory region and a dominant negative (DN) AMPK expression vector. NRCs were transfected at day 3 after plating, followed by AICAR treatment (500 μ mol/L) at day 4. Luciferase levels were analyzed at day 5. Normalized Firefly/Renilla values are expressed as in Figure 5B as FC \pm SEM over the promoterless pGL4 vector. One-way ANOVA: $\eta^2 P \leq 0.01$, $\eta^2 P \leq 0.001$ for treatment effect. Post hoc Tukey test: ***P* \leq 0.01, ****P* \leq 0.001 over nontreated control group. ###*P* \leq 0.01 for AICAR versus AICAR+AMPK-DN. **K**, *Nmrk2* promoter deletion analysis by luciferase assay. Rectangular boxes show the position of the putative PPAR binding sites. Data are expressed as mean FC \pm SEM over the promoterless pGL4 plasmid. One-way ANOVA: $\eta^2 P \leq 0.001$. Post hoc Tukey test: ***P* \leq 0.01, over the promoterless pGL4 vector. ###*P* \leq 0.01 for over the immediately shorter construct. **L**, Neonatal rat cardiac fibroblasts and cardiomyocyte-enriched fractions were separated on a discontinuous Percoll gradient. Cardiac fibroblasts were transfected with the p-228, p-581, and p-3009-FLuc constructs. Cardiomyocytes were transfected with the p-3009-FLuc. SV40-RLuc construct was cotransfected for normalization. Data are expressed as mean FC \pm SEM over the mean p228-FLuc activity in cardiac fibroblasts. One-way ANOVA: $\eta^2 P \leq 0.05$. Post hoc Tukey test: **P* \leq 0.05 Cardio-3009 over Fibro-30089. **M**, NRCs were cotransfected with the p3009-FLuc construct and the RXR expression vector and with either PPAR α , PPAR β/δ , or PPAR γ expression vectors. NRCs were treated 24 hours later with the agonists GW7647 (0.6 μ mol/L), GW501516 (0.6 μ mol/L), and G1929 (0.6 μ mol/L), for PPAR α , PPAR β/δ , and PPAR γ , respectively, or with their respective antagonists, GW6471 (10 μ mol/L), GSK3787 (2 μ mol/L), or GW9662 (2 μ mol/L). Data are expressed as mean FC \pm SEM over nontreated luciferase levels of NRCs transfected with the p3009-FLuc construct alone (dashed line) in the same experiment. A 1-way ANOVA was used because each group is independent of the other (different agonists and antagonists): $\eta^2 P \leq 0.001$. Post hoc Tukey test: ***P* \leq 0.01 versus p3009-FLuc alone. ###*P* \leq 0.01 for comparison between agonist and antagonist. **N**, NRCs were transfected with the p3009-FLuc construct. Transfected NRCs were treated 24 hours later with the antagonists G6471, GSK3787, or G9662, 30 minutes before adding AICAR for a further 24-hour period. All concentrations were as in **M**. Data are expressed as mean FC \pm SEM over the p3009-luc construct treated with AICAR alone. One-way ANOVA: $\eta^2 P \leq 0.05$. Post hoc Tukey: **P* \leq 0.05 versus AICAR treated cells. ACC indicates acetyl-coenzyme A carboxylase; AICAR, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide; AMPK, AMP-activated protein kinase; NRC, neonatal rat cardiomyocyte; NT, nontreated cells; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; and RT qPCR, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.

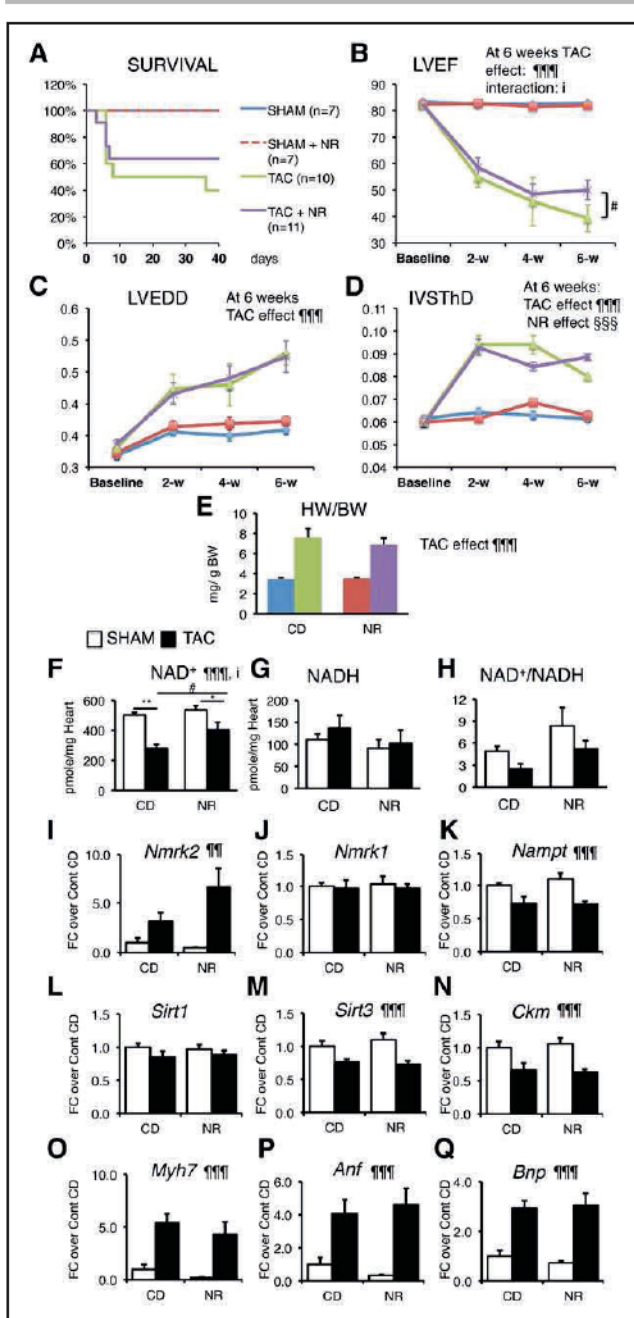


Figure 7. NR treatment preserves myocardial NAD levels and limits the drop in ejection fraction in the pressure overload-induced hypertrophy model.

Two-month-old control and *SRF*^{HKO} male mice were subjected to TAC or SHAM surgery and fed with control chow diet (CD) or NR-enriched diet from day 2 after surgery to day 42. **A**, Kaplan-Meier survival curve analysis. Log-rank statistic: $P > 0.05$. Color code shown on the right for each group is valid for **A** through **E**. **B** through **D**, Echocardiography follow-up analysis from baseline (2 days before surgery) to 6 weeks after. **E**, Heart weight to body weight ratio after euthanization at 6 weeks. **F** through **H**, Cardiac NAD⁺ and NADH levels and redox state assessed by the NAD⁺ cycling assay. **I** through **Q**, Cardiac mRNA levels of the indicated genes assessed by RT-qPCR. Data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis: 2-way ANOVA for independent factors statistical analysis is shown at (Continued)

deterioration of cardiac function and adverse remodeling (Figure 8).

Altered NAD⁺ homeostasis has been reported in several models of HF including pressure overload, myocardial infarction, and angiotensin 2 infusion.^{3,37,38} In this context, much attention has focused on the NAMPT enzyme that is repressed in several models of cardiac injuries.³⁸ On the other hand, we found a robust upregulation of *Nmrk2* expression in the heart of *SRF*^{HKO} developing DCM and a more modest but significant increase following TAC-induced HF. It is interesting that we observed a similar shift from repressed NAMPT to increased NMRK2 in human failing heart. Interrogation of the Gene Expression Omnibus (GEO) database reveals that *Nmrk2* is induced in several models of cardiomyopathy related to mutations in the *lamin-A* (GEO data set GDS2746),³⁹ *Idh2* (GDS4893),⁴⁰ *PGC1α* (GDS4776),⁴¹ or *Tfr1* (GSE68745)⁴² genes. Considering the relative heterogeneity of molecular functions encoded by these genes, we propose that the activation of the NMRK2 pathway represents a common adaptive mechanism in the failing heart. Here, we show that the *Nmrk2* gene can be activated in response to NAMPT inhibition and activation of the energy stress sensor AMPK. In NRCs, we show that this activation depends on PPARα. PPARα is often expressed at lower levels in the adult failing heart,⁴³ whereas AMPK was shown to activate PPARα in various contexts.⁴⁴ Hence, AMPK activation could compensate in part for the lower levels of PPARα to activate *Nmrk2*. The precise contribution of these actors in the adult failing heart remains an open question. In the case of *SRF*^{HKO} hearts, it is interesting to note that, despite the fact that *SRF* is an upstream regulator of *Nmrk2* gene that we would expect to be repressed following *Srf* gene inactivation, *SRF* is also a major upstream regulator of *Ckm* gene, which is important to maintain PCr/ADP/ATP balance,^{15,18} and AMPK is activated early on in the *SRF*^{HKO} heart (this study). We show in vitro that *Ckm* depression alone is sufficient to induce *Nmrk2* expression. In addition *Srf* inactivation alters the expression of numerous sarcomeric genes and triggers a severe eccentric remodeling¹⁵ that is likely to further increase the energetic cost of contraction in vivo. A similar phenomenon could

Figure 7 Continued. 6 weeks and was used for **B** through **Q**, followed by post hoc Tukey test. ¶¶¶ $P \leq 0.01$, ¶¶¶¶ $P \leq 0.001$ for the TAC effect; §§§ $P \leq 0.001$ for the NR treatment effect; $i P \leq 0.05$ for the interaction effect. Asterisks indicate statistically significant difference for the indicated comparisons: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$. # $P \leq 0.05$ for the effect of NR within the TAC group. See accompanying Table V in the online-only Data Supplement for other echocardiography data at 6 weeks and previous stages. IVSThD indicates interventricular septum thickness in diastole; LVEDD, left ventricle end-diastolic diameter; LVEF, left ventricle ejection fraction; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; NR, nicotinamide riboside; RT-qPCR, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; and TAC, transverse aorta constriction.

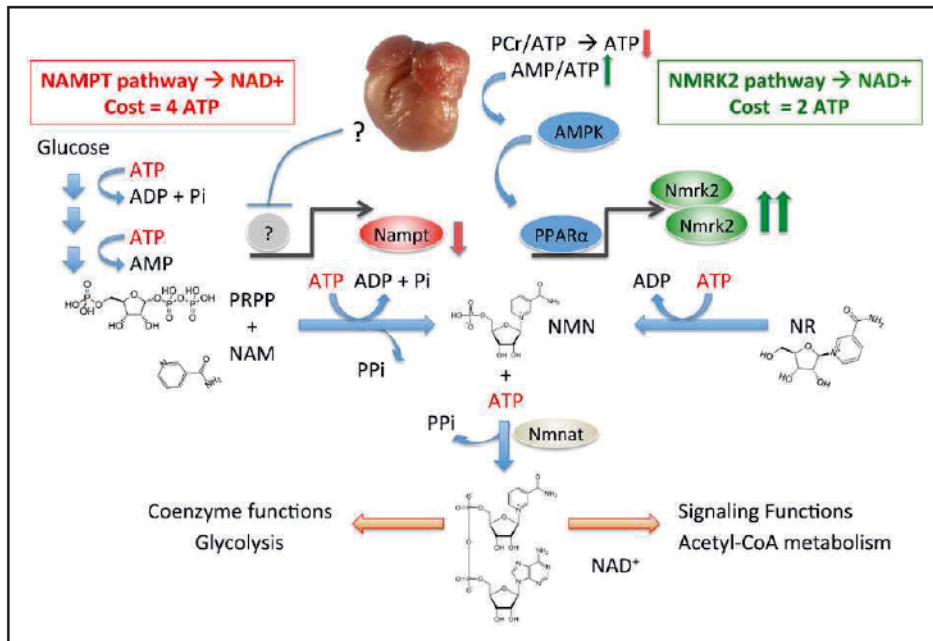


Figure 8. Activation of the NMRK2 pathway to NAD⁺ synthesis as an adaptive energy-sparing mechanism in the failing heart.

DCM is a form of pathological cardiac remodeling that is associated with severe energy depletion leading to HF. The energy stress sensor AMP-kinase is an adaptive signaling pathway aiming to preserve energy in the cells. The NAMPT enzyme is a major, rate-limiting step for NAD⁺ synthesis whose energetic cost equals 4 ATP molecules, including 1 converted to AMP, for the synthesis of 1 NAD⁺. NAMPT is repressed in most forms of HF through an unknown regulatory mechanism. Opposite to this repression, *Nmrk2* gene is an AMPK-responsive gene that is activated in several models of DCM and other forms of pathological remodeling such as the pressure-overload cardiac hypertrophy. NMR-kinase 2 allows the synthesis of NAD⁺ at a lower cost of 2 ATP per molecule. Although NR content may be limited in rodent and human diet, NR can easily be provided as a nutraceutical to help the failing heart to maintain NAD⁺ levels. AMPK indicates AMP-activated protein kinase; DCM, dilated cardiomyopathy; HF, heart failure; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; NAM, nicotinamide; NAMPT, nicotinamide phosphoribosyltransferase; NMN, nicotinamide mononucleotide; NR, nicotinamide riboside; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; and PRPP, phosphoribosyl pyrophosphate.

occur for instance in the lamin-A mutants, which display severe alterations in cardiomyocyte cytoskeletal integrity and in which SRF activity is repressed and *Nmrk2* expression induced.^{22,39} In addition to its well-known roles in stimulating fuel oxidation to restore ATP levels, we show that AMPK stimulation induces *Nmrk2* expression. NMN synthesis from NR by NMRK enzymes requires a single ATP, whereas synthesis from NAM by NAMPT requires >3 ATP equivalents: one for the autophosphorylation of the enzyme, and 2 (plus a carbohydrate) in formation of phosphoribosyl pyrophosphate (Figure 8). Both pathways consume an additional ATP for fusion with NMN to generate the dinucleotide. Hence, the shift from NAMPT to NMRK2 for NAD⁺ synthesis is an energy-sparing mechanism that may be favored in HF. In turn, we show that one of the beneficial actions of NR, at least in vitro, may be to increase glycolysis in cardiomyocytes. These different mechanisms of action may contribute to increase cardiac efficiency, which should be assessed in future studies to establish whether metabolic substrate preference and potentially glucose oxidation, which is associated with a better respiratory quotient and ATP availability, are improved on NR treatment.

Although the NMRK2 pathway is activated in the failing heart of *SRF^{flKO}* mice, the myocardial NAD⁺ level is depressed, which suggests that circulating and tissue levels of NAD⁺ precursors are insufficient to sustain cardiac NAD⁺ synthesis in mice on a regular rodent diet, stimulating an interest in NR supplementation to correct this defect. A few studies have shown that short-term NAD⁺ supplementation following chronic angiotensin-2 administration³⁷ or NMN supplementation following ischemia-reperfusion injury⁴⁵ or TAC surgery⁴⁶ can normalize alterations in NAD⁺/NADH ratio in the mouse failing heart. It is interesting to note that cells do not take up NMN intact, and, instead, NMN is extracellularly dephosphorylated to NR, such that its cellular conversion to NAD⁺ depends on the NR kinase pathway.^{47,48}

We discovered a strongly beneficial effect of NR in the *SRF^{flKO}* model of HF in the preservation of cardiac function and limitation of cardiac remodeling that was associated with the maintenance of NAD⁺ levels in the heart. NAD⁺ metabolomics and expression analysis showed no evidence for increased levels of PAR, ADPR, Nam, or PARylated proteins, which would indicate a storm of NAD⁺-consuming activities in this model of

HF. Instead, a progressive loss of *Nampt* expression, coupled with the known depression of ATP and high-energy phosphates, is postulated to make it challenging for damaged hearts to maintain NAD⁺ homeostasis.

Beyond the repletion in myocardial NAD⁺ levels, the most striking NR-reversible deficit we found in HF was depression of CS and ACL activity. Many regulatory processes from gene expression to enzyme activity are controlled by reversible protein Lys acetylation. Although there is a variety of acetylases and deacetylases that are NAD⁺-dependent and NAD⁺-independent, production of citrate in mitochondria and its conversion to cytosolic Ac-CoA by the ACL is required to drive changes in substrate fuel selection² and protein acetylation level.^{8,49} NR had no impact on the acetylation level of a mitochondrial protein like Aco2 but robustly increased the acetylation level of FOXO1 or p53 transcription factors in *SRF^{HKO}* hearts and control hearts, suggesting a tight link between NR-derived NAD⁺ synthesis and Ac-CoA availability for posttranslational acetylation of nucleocytoplasmic proteins. This apparently overrides the ability of SIRT1 to deacetylate these factors. At the present stage, it is difficult to assess the consequences of these modifications. Moreover, there is presently no reason to think that FOXO1 and p53 are the only targets whose acetylation level is modified by long-term NR treatment. Rather, our data suggest that the acetylation levels of FOXO1 and p53 can be considered as surrogate markers of an increase in nucleocytoplasmic Ac-CoA metabolism.

Last, we observed that NR led to heightened production of Me4PY, a terminal NAM metabolite associated with local production of H₂O₂. This pathway was shown to promote life extension in the *Caenorhabditis elegans* through a hormetic response to a moderate rise in reactive oxygen species, which activates the cytoprotective NRF-2 transcription factor involved in oxidative stress response.³⁴ In the *SRF^{HKO}* heart, NR was shown to result in Me4PY simultaneous with induction of NRF-2.

Here, we also show a modest although significant protective effect of NR treatment on the drop of LV ejection fraction observed in the TAC model. The effect of NR in the TAC model seems to be less important than in the DCM model, which may be linked to the different nature of the cardiac stress in these models, ie, pressure overload in the TAC model that increases afterload versus volume overload in DCM that increases preload, and the fact that the *Nmrk2* gene is less strongly induced in the TAC model than in the *SRF^{HKO}* model. We note also that the early mortality induced by the TAC led to an early dropout in the untreated and NR-treated TAC groups that may have introduced a bias by removing from the analysis the animals with the worst outcome.

In conclusion, our work shows that oral NR supplementation is a powerful approach to preserve cardiac function and limit remodeling in DCM, a devastating disease currently lacking effective therapies. Recently,

mutations in the de novo NAD⁺ biosynthetic pathway were shown to lead to a new category of genetic diseases called congenital NAD deficiency disorders, which are associated with cardiac and skeletal defects but correctible by niacin supplementation in mouse models of the disease.⁵⁰ Our study and previous findings by others^{13,26–28} suggest that NR has the potential not only to improve the cardiac symptoms in congenital syndromes and acquired HF, but also to act at a systemic level notably on liver metabolism, insulin resistance, and skeletal muscle performances that are altered concomitantly with cardiac defects. However, a limitation of our study is the fact that we did not study the impact of NR on the survival rate of *SRF^{HKO}* mice and the occurrence of terminal congestive HF. Further work will be required to determine the pharmacokinetics and pharmacodynamics of therapeutic NR administration in animal models and people with HF to enable safe and effective human translation.

ARTICLE INFORMATION

Received October 23, 2016; accepted November 6, 2017.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circ.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026099/-/DC1>.

Correspondence

Mathias Mericskay, PhD, Signalisation et Physiopathologie Cardiovasculaire, Inserm UMR-S 1180, Faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Sud, 5, rue Jean-Baptiste Clément, F-92296 Chatenay-Malabry, France. E-mail mathias.mericskay@inserm.fr

Affiliations

Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Department of Biology of Adaptation and Ageing, CNRS UMR8256, INSERM U1164, Institute of Biology Paris-Seine, DHU FAST, France (N.D., C.T., R.D., A. Gouge, J.B., J.-F.D., Z.L.). Department of Biochemistry, Carver College of Medicine, University of Iowa, Iowa City (S.A.J.T., C.B.). Signalling and Cardiovascular Pathophysiology, UMR-S 1180, University Paris-Sud, INSERM, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France (C.T., R.D., J.P., M.G., B.M., M.B., A. Garnier, M.M.). Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Plateforme PECMV, UMS28, Paris, France (N.M.). Institute of Metabolism and Systems Research, University of Birmingham, United Kingdom (G.G.L.). Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Szeged, Hungary (I.B.). Physiology Department, Faculty of Medicine and EA3072, Université de Strasbourg, France (J.Z.).

Acknowledgments

The authors thank V. Veksler and R. Ventura-Clapier (Inserm UMR-S 1180) for expert advice on respiration assays, Luc Bertrand (UCL, Belgium) for expert advice on AMPK detection, A. Angelini (UMR 8256) for technical help in these assays, A. Grosfeld (UMR 8256) for preliminary setup experiments for *Nmrk2* cloning, Florence Lefebvre for adult rat cardiomyocyte isolation.

Sources of Funding

This study was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM N 16282), the Agence Nationale de la Recherche (ANR) grant NAD-Heart ANR-17-CE17-0015-01 and ANR-08-GENOPAT-038, Fondation de France grant 00075811 and fundings from Institut National pour la Santé Et la Recherche Médicale (INSERM), Center National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Pierre et Marie Curie Paris 6, and University Paris Sud. Drs Diguët and Tannous, and Mr Deloux were supported by a PhD fellowship of French Ministère de

la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. Dr Diguët was further supported by a 1-year PhD fellowship from AFM. Dr Brenner is supported by the Roy J. Carver Trust. GGL is supported by a Wellcome Trust Senior Fellowship (104612/Z/14/Z).

Disclosures

Dr Brenner has an intellectual property interest in uses of NR. He serves on the Scientific Advisory Board of ChromaDex, which distributes NR and is cofounder and the chief scientific advisor of Prohealthspan, which sells NR supplements. The other authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

- Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:1360–1372. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.09.006.
- Des Rosiers C, Labarthe F, Lloyd SG, Chatham JC. Cardiac anaplerosis in health and disease: food for thought. *Cardiovasc Res*. 2011;90:210–219. doi: 10.1093/cvr/cvr055.
- Mericskay M. Nicotinamide adenine dinucleotide homeostasis and signalling in heart disease: Pathophysiological implications and therapeutic potential. *Arch Cardiovasc Dis*. 2016;109:207–215. doi: 10.1016/j.acvd.2015.10.004.
- Lee CF, Tian R. Mitochondrion as a target for heart failure therapy: role of protein lysine acetylation. *Circ J*. 2015;79:1863–1870. doi: 10.1253/circj.CJ-15-0742.
- Belenky P, Bogan KL, Brenner C. NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci*. 2007;32:12–19. doi: 10.1016/j.tibs.2006.11.006.
- Cantó C, Menzies KJ, Auwerx J. NAD(+) Metabolism and the control of energy homeostasis: a balancing act between mitochondria and the nucleus. *Cell Metab*. 2015;22:31–53. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.023.
- Fouquerel E, Sobol RW. ARTD1 (PARP1) activation and NAD(+) in DNA repair and cell death. *DNA Repair (Amst)*. 2014;23:27–32. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.09.004.
- Ghanta S, Grossmann RE, Brenner C. Mitochondrial protein acetylation as a cell-intrinsic, evolutionary driver of fat storage: chemical and metabolic logic of acetyl-lysine modifications. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013;48:561–574. doi: 10.3109/10409238.2013.838204.
- Bindu S, Pillai VB, Gupta MP. Role of sirtuins in regulating pathophysiology of the heart. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27:563–573. doi: 10.1016/j.tem.2016.04.015.
- Oka S, Alcendor R, Zhai P, Park JY, Shao D, Cho J, Yamamoto T, Tian B, Sadoshima J. PPAR α -Sirt1 complex mediates cardiac hypertrophy and failure through suppression of the ERR transcriptional pathway. *Cell Metab*. 2011;14:598–611. doi: 10.1016/j.cmet.2011.10.001.
- Pillai JB, Isbatan A, Imai S, Gupta MP. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD⁺ depletion and reduced Sir2alpha deacetylase activity. *J Biol Chem*. 2005;280:43121–43130. doi: 10.1074/jbc.M506162200.
- Bogan KL, Brenner C. Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: a molecular evaluation of NAD⁺ precursor vitamins in human nutrition. *Annu Rev Nutr*. 2008;28:115–130. doi: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155443.
- Trammell SA, Weidemann BJ, Chadda A, Yorek MS, Holmes A, Coppey LJ, Obrosov A, Kardon RH, Yorek MA, Brenner C. Nicotinamide riboside opposes type 2 diabetes and neuropathy in mice. *Sci Rep*. 2016;6:26933. doi: 10.1038/srep26933.
- Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Goldfarb S, Levvey BJ, Meiser B, Rossano JW, Yusen RD, Stehlik J. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Heart Transplantation Report—2015; focus theme: early graft failure. *J Heart Lung Transplant*. 2015;34:1244–1254. doi: 10.1016/j.healun.2015.08.003.
- Parlakian A, Charvet C, Escoubet B, Mericskay M, Molkentin JD, Gary-Bobo G, De Windt LJ, Ludosky MA, Paulin D, Daegelen D, Tuil D, Li Z. Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart. *Circulation*. 2005;112:2930–2939. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.533778.
- Tritsch E, Mallat Y, Lefebvre F, Diguët N, Escoubet B, Blanc J, De Windt LJ, Catalucci D, Vandecasteele G, Li Z, Mericskay M. An SRF/miR-1 axis regulates NCX1 and annexin A5 protein levels in the normal and failing heart. *Cardiovasc Res*. 2013;98:372–380. doi: 10.1093/cvr/cvt042.
- Touvron M, Escoubet B, Mericskay M, Angelini A, Lamotte L, Santini MP, Rosenthal N, Daegelen D, Tuil D, Decaux JF. Locally expressed IGF1 peptide improves mouse heart function in induced dilated cardiomyopathy by blocking myocardial fibrosis and SRF-dependent CTGF induction. *Dis Model Mech*. 2012;5:481–491. doi: 10.1242/dmm.009456.
- Diguët N, Mallat Y, Ladouce R, Clodic G, Prola A, Tritsch E, Blanc J, Larcher JC, Delcayre C, Samuel JL, Friguet B, Bolbach G, Li Z, Mericskay M. Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end products in dilated cardiomyopathy. *J Biol Chem*. 2011;286:35007–35019. doi: 10.1074/jbc.M111.252395.
- Chang J, Wei L, Otani T, Youker KA, Entman ML, Schwartz RJ. Inhibitory cardiac transcription factor, SRF-N, is generated by caspase 3 cleavage in human heart failure and attenuated by ventricular unloading. *Circulation*. 2003;108:407–413. doi: 10.1161/01.CIR.0000084502.02147.83.
- Kuwahara K, Teg Pipes GC, McAnally J, Richardson JA, Hill JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Modulation of adverse cardiac remodeling by STARS, a mediator of ME2 signaling and SRF activity. *J Clin Invest*. 2007;117:1324–1334. doi: 10.1172/JCI31240.
- Frank D, Rangrez AY, Poyanmehr R, Seeger TS, Kuhn C, Eden M, Stiebeling K, Bernt A, Grund C, Franke WW, Frey N. Mice with cardiac-restricted overexpression of Myozap are sensitized to biomechanical stress and develop a protein-aggregate-associated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;72:196–207. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.03.016.
- Ho CY, Jaalouk DE, Vartiainen MK, Lammerding J. Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature*. 2013;497:507–511. doi: 10.1038/nature12105.
- Bieganowski P, Brenner C. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell*. 2004;117:495–502.
- Belenky P, Racette FG, Bogan KL, McClure JM, Smith JS, Brenner C. Nicotinamide riboside promotes Sir2 silencing and extends lifespan via Nrk and Urh1/Pnp1/Meu1 pathways to NAD⁺. *Cell*. 2007;129:473–484. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.024.
- Mouchiroud L, Houtkooper RH, Moulain N, Katsyuba E, Ryu D, Cantó C, Mottis A, Jo YS, Viswanathan M, Schoonjans K, Guarente L, Auwerx J. The NAD(+)/sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling. *Cell*. 2013;154:430–441. doi: 10.1016/j.cell.2013.06.016.
- Cantó C, Houtkooper RH, Pirinen E, Youn DY, Oosterveer MH, Cen Y, Fernandez-Marcos PJ, Yamamoto H, Andreux PA, Cettour-Rose P, Gademann K, Rinsch C, Schoonjans K, Sauve AA, Auwerx J. The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab*. 2012;15:838–847. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.022.
- Cerutti R, Pirinen E, Lamperti C, Marchet S, Sauve AA, Li W, Leoni V, Schon EA, Dantzer F, Auwerx J, Viscomi C, Zeviani M. NAD(+)-dependent activation of Sirt1 corrects the phenotype in a mouse model of mitochondrial disease. *Cell Metab*. 2014;19:1042–1049. doi: 10.1016/j.cmet.2014.04.001.
- Khan NA, Auranen M, Paetau I, Pirinen E, Euro L, Forsström S, Pasila L, Velagapudi V, Carroll CJ, Auwerx J, Suomalainen A. Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3. *EMBO Mol Med*. 2014;6:721–731. doi: 10.1002/emmm.201403943.
- Trammell SA, Schmidt MS, Weidemann BJ, Redpath P, Jaksch F, Dellinger RW, Li Z, Abel ED, Migaud ME, Brenner C. Nicotinamide riboside is uniquely and orally bioavailable in mice and humans. *Nature Commun*. 2016;7:12948. doi: 10.1038/ncomms12948.
- Garnier A, Zoll J, Fortin D, N'Guessan B, Lefebvre F, Geny B, Mettauer B, Veksler V, Ventura-Clapier R. Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II. *Circ Heart Fail*. 2009;2:342–350. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.812099.
- Grozio A, Sociali G, Sturla L, Caffa I, Soncini D, Salis A, Raffaelli N, De Flora A, Nencioni A, Bruzzone S. CD73 protein as a source of extracellular precursors for sustained NAD⁺ biosynthesis in FK866-treated tumor cells. *J Biol Chem*. 2013;288:25938–25949. doi: 10.1074/jbc.M113.470435.
- Belenky P, Christensen KC, Gazzaniga F, Pletnev AA, Brenner C. Nicotinamide riboside and nicotinic acid riboside salvage in fungi and mammals. Quantitative basis for Urh1 and purine nucleoside phosphorylase function in NAD⁺ metabolism. *J Biol Chem*. 2009;284:158–164. doi: 10.1074/jbc.M807976200.
- Trammell SA, Brenner C. Targeted, LCMS-based metabolomics for quantitative measurement of NAD(+) metabolites. *Comput Struct Biotechnol J*. 2013;4:e201301012. doi: 10.5936/CSBJ.201301012.
- Schmeisser K, Mansfeld J, Kuhlow D, Weimer S, Priebe S, Heiland I, Birringer M, Groth M, Segref A, Kanfi Y, Price NL, Schmeisser S, Schuster S, Pfeiffer AF, Guthke R, Platzer M, Hoppe T, Cohen HY, Zarse K, Sinclair DA, Ristow M. Role of sirtuins in lifespan regulation is linked

- to methylation of nicotinamide. *Nat Chem Biol*. 2013;9:693–700. doi: 10.1038/nchembio.1352.
35. Preiss J, Handler P. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. II. Enzymatic aspects. *J Biol Chem*. 1958;233:493–500.
 36. Galli U, Travelli C, Massarotti A, Fakhfoury G, Rahimian R, Tron GC, Genazzani AA. Medicinal chemistry of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors. *J Med Chem*. 2013;56:6279–6296. doi: 10.1021/jm4001049.
 37. Pillai VB, Sundaresan NR, Kim G, Gupta M, Rajamohan SB, Pillai JB, Samant S, Ravindra PV, Isbatan A, Gupta MP. Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway. *J Biol Chem*. 2010;285:3133–3144. doi: 10.1074/jbc.M109.077271.
 38. Hsu CP, Yamamoto T, Oka S, Sadoshima J. The function of nicotinamide phosphoribosyltransferase in the heart. *DNA Repair (Amst)*. 2014;23:64–68. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.08.005.
 39. Muchir A, Pavlidis P, Decostre V, Herron AJ, Arimura T, Bonne G, Worman HJ. Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Clin Invest*. 2007;117:1282–1293. doi: 10.1172/JCI29042.
 40. Akbay EA, Moslehi J, Christensen CL, Saha S, Tchaicha JH, Ramkissoon SH, Stewart KM, Carretero J, Kikuchi E, Zhang H, Cohoon TJ, Murray S, Liu W, Uno K, Fisch S, Jones K, Gurumurthy S, Gliser C, Choe S, Keenan M, Son J, Stanley I, Losman JA, Padera R, Bronson RT, Asara JM, Abdel-Wahab O, Amrein PC, Fathi AT, Danial NN, Kimmelman AC, Kung AL, Ligon KL, Yen KE, Kaelin WG Jr, Bardeesy N, Wong KK. D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH2 causes cardiomyopathy and neurodegeneration in mice. *Genes Dev*. 2014;28:479–490. doi: 10.1101/gad.231233.113.
 41. Martin OJ, Lai L, Soundarapandian MM, Leone TC, Zorzano A, Keller MP, Attie AD, Muoio DM, Kelly DP. A role for peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 in the control of mitochondrial dynamics during postnatal cardiac growth. *Circ Res*. 2014;114:626–636. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302562.
 42. Xu W, Barrientos T, Mao L, Rockman HA, Sauve AA, Andrews NC. Lethal Cardiomyopathy in mice lacking transferrin receptor in the heart. *Cell Rep*. 2015;13:533–545. doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.023.
 43. Vega RB, Kelly DP. Cardiac nuclear receptors: architects of mitochondrial structure and function. *J Clin Invest*. 2017;127:1155–1164. doi: 10.1172/JCI88888.
 44. Pol CJ, Lieu M, Drosatos K. PPARs: protectors or opponents of myocardial function? *PPAR Res*. 2015;2015:835985. doi: 10.1155/2015/835985.
 45. Yamamoto T, Byun J, Zhai P, Ikeda Y, Oka S, Sadoshima J. Nicotinamide mononucleotide, an intermediate of NAD⁺ synthesis, protects the heart from ischemia and reperfusion. *PLoS One*. 2014;9:e98972. doi: 10.1371/journal.pone.0098972.
 46. Lee CF, Chavez JD, Garcia-Menendez L, Choi Y, Roe ND, Chiao YA, Edgar JS, Goo YA, Goodlett DR, Bruce JE, Tian R. Normalization of NAD⁺ redox balance as a therapy for heart failure. *Circulation*. 2016;134:883–894. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022495.
 47. Ratajczak J, Joffraud M, Trammell SA, Ras R, Canela N, Boutant M, Kulkarni SS, Rodrigues M, Redpath P, Migaud ME, Auwerx J, Yanes O, Brenner C, Cantó C. NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells. *Nat Commun*. 2016;7:13103. doi: 10.1038/ncomms13103.
 48. Fletcher RS, Ratajczak J, Doig CL, Oakey LA, Callingham R, Da Silva Xavier G, Garten A, Elhassan YS, Redpath P, Migaud ME, Philp A, Brenner C, Canto C, Lavery GG. Nicotinamide riboside kinases display redundancy in mediating nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in skeletal muscle cells. *Mol Metab*. 2017;6:819–832. doi: 10.1016/j.molmet.2017.05.011.
 49. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science*. 2009;324:1076–1080. doi: 10.1126/science.1164097.
 50. Shi H, Enriquez A, Rapadas M, Martin EMMA, Wang R, Moreau J, Lim CK, Sztot JO, Ip E, Hughes JN, Sugimoto K, Humphreys DT, McInerney-Leo AM, Leo PJ, Maghzal GJ, Halliday J, Smith J, Colley A, Mark PR, Collins F, Silence DO, Winlaw DS, Ho JWK, Guillemin GJ, Brown MA, Kikuchi K, Thomas PQ, Stocker R, Giannoulatou E, Chapman G, Duncan EL, Sparrow DB, Dunwoodie SL. NAD deficiency, congenital malformations, and niacin supplementation. *N Engl J Med*. 2017;377:544–552. doi: 10.1056/NEJMoa1616361.

CORRECTION

Correction to: Nicotinamide Riboside Preserves Cardiac Function in a Mouse Model of Dilated Cardiomyopathy

In the article by Diguët et al, "Nicotinamide Riboside Preserves Cardiac Function in a Mouse Model of Dilated Cardiomyopathy," which published ahead of print December 7, 2017, and appears in this issue of the journal (*Circulation*. 2018;137:2256-2273. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026099), the following corrections were made.

Figure 3S of the preprint online version contained a picture of an anti-aconitase 2 immunoblot (blot 2) that was performed after stripping of the acetyl-lysine antibody used to label immunoprecipitated aconitase 2 (blot1). As the efficiency of the stripping procedure could not be guaranteed, the picture of blot 2 has been removed. Instead, a picture of the input proteins used for immunoprecipitation that were run at the same time in a parallel gel is shown, as well as an immunoblot for GAPDH for loading control (previously Supp. Figure S6A). The picture of blot 1 has also been enlarged to show that a single acetylated protein migrating as the same size than aconitase 2 is present in this region of the gel. A picture of control IgG immunoprecipitation of cardiac proteins followed by anti-Acetyl-Lysine immunoblot showing the absence of non specific acetylated band in this region of the gel is now shown in a new Figure VIA in the online-only Data Supplement.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental Methods

Transgenic mice

All experiments with animals conformed to the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and were approved by the ethics committee Charles Darwin #5 (agreement 00369.01). *SRF^{HKO}* mice bear the tamoxifen-inducible α -MHC-MerCreMer transgene and the *Srf* floxed allele (*Sf/Sf*) as described previously.¹ Tamoxifen (Sigma T5648) was administered by i.p. injection at a dose of 0.7 mg diluted in 100 μ l peanut oil at D0, D1 and D2 to *SRF^{HKO}* mice and *Sf/Sf* control littermates at 9 month of age. The sex ratio was balanced in each group.

For phenylephrine administration, the series of mice treated with PE, 80 mg/kg/day for 15 days with Alzet osmotic micropumps and the impact of the treatment on cardiac parameters have been published previously.² TAC surgery was performed under ketamine/xylazine anesthesia. Briefly the upper cartilage of the sternum was open on less than 0.3 cm to get access to the aortic cross without requirement for artificial ventilation of the mice. A 27-Gauge needle was placed along the aortic cross between the branching of the right brachio-cephalic artery and the left carotid artery and 2 tight knots with a 6.0 suture were made around the aortic cross and the needle. The needle was quickly removed to allow the blood to go through and the skin sutured with 4.0 silk. Mice were administered buprenorphine for the first 24h and monitored daily by trained staff to detect signs of pains or issues with the suture. Animal showing signs of prostration, and/or infections and/or inability to feed by themselves were sacrificed for ethical reasons.

NR supplementation

The soft pellets were prepared every 5 days by mixing 1.65 g of NR into 500 g of powdered SAFE A04 diet and 235 ml of water to reach 2.24 mg of NR / g (wet weight). Control diet was prepared in the same way omitting NR. Mice had ad libitum access to food and water. Mice (average body weight 31.3 ± 0.82 g, no difference between groups) consumed an average of 6 g of soft food per day, reaching a minimal daily intake of 450 mg NR/kg. No difference in food intake was observed between *SRF^{HKO}* and control mice. For NAM and NR i.p. administration, mice were injected daily at a dose of 1 μ mole/ g body weight with 300 mM NAM or NR solution in saline.

Microarray and RT-PCR analysis

To evaluate the effects of SRF deletion on gene expression, total RNA was purified from *SRF^{HKO}* and control *Sr^{fl/fl}* hearts with the RNeasy fibrous tissue kit (Qiagen). We examined the effects of SRF inactivation on gene expression at 8 days after TAM injection, an early stage when SRF is already strongly diminished but cardiac functions are not altered and at 25 days after TAM injection, an intermediate stage when the LVEF starts to decrease and LV chamber begin to dilate.¹ In addition, we compared the effect of phenylephrine (PE), an alpha-adrenergic agonist known to trigger cardiac hypertrophy, administered at 80 mg/kg/day with Alzet osmotic minipumps from day 5 to 15 after TAM injection to *SRF^{HKO}* and control *Sr^{fl/fl}* as previously described.

Diguet et al. Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy

Microarray analysis for each genotype was performed with four samples, each being hybridized to one Affymetrix GeneChip MOE 430 2.0 array (Affymetrix, Santa Clara, CA) with a coverage of 45,000 transcripts, corresponding to over 30,000 mouse genes. All technical microarray procedures were carried out by PartnerChip (Evry, France) under Affymetrix guidelines. Briefly, 2 μ g of total RNA sample was used to synthesize double stranded cDNA with the SuperScript II double-stranded cDNA synthesis kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Labeled cRNA was synthesized using the Affymetrix IVT amplification and labeling kit. 20 μ g of purified, fragmented labeled cRNA were hybridized with an array at 45°C for 16 h in an Affymetrix 640 hybridization oven. The posthybridization process was performed in an Affymetrix Fluidics Station 450 according to the manufacturer's instructions. All gene chips were scanned on an Affymetrix GeneChip 3000 scanner, and data were extracted from scanned images using AFX GCOS 1.4 software. Background intensities were adjusted and normalized using GCRMA method implemented in R (version 2.4.1).

RT-qPCR

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

Western Blot Analysis

Proteins were homogenized in a lysis buffer (Tris-HCl pH7.5 50 mM, NP40 Igepal 1%, NaCl, 150 mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, Glycerol 10%) in the presence of proteases, phosphatases and deacetylases inhibitors (PMSF 0.5 mM, NaF 50 mM, PPINa 5 mM, Roche protease cocktail inhibitor 1/100, Santa Cruz deacetylase cocktail inhibitor 1/100). Equal amounts of proteins (10 to 20 μ g) were separated on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Proteins were detected by overnight incubation at 4°C with primary antibodies followed by IRDye 700 or IRDye800 fluorescent antibodies (Li-Cor Biosciences, 1/2500) and scanned on an Odyssey CLx Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences). Acetyl-CoA Carboxylase (ACC): Thermoscientific # MA5-15025; dilution 1/1000. ACC Phospho-Ser79: Thermoscientific # PA5-17725; dilution 1/1000. Acetylated-Lysine Mouse mAb (Ac-K-103) : Cell Signaling #9681 ; dilution 1/1000. AMPK α : Cell Signaling #2532; dilution 1/1000. AMPK α (Phospho-Thr172): Cell Signaling #2535; dilution 1/1000. FKHR (H-128)(FoxO1): Santa Cruz BT # sc-11350; dilution 1/1000. AcFKHR (D-19): Santa Cruz BT # sc-49437; dilution 1/200. Acetyl-Lysine: Cell Signaling #9441; dilution 1/1000. Citrate Synthase: Abcam. GAPDH: Sigma #G9545; dilution 1/3000. Aconitase 2: Kind gift of Anne Laure Bulteau (Bulteau et al. Biochemistry. 2003;42(50):14846-55); dilution 1/500. HA epitope: Sigma #H6908; dilution 1/500. NMRK2: generated by BioGenes (see below); dilution 1/500. PARP: Cell Signaling #9532; dilution 1/1000. PAR (Anti-Poly (ADP-Ribose): Pharmingen #551813 dilution 1/500. p53 (acetyl K386): Abcam #ab52172; 1/500. Anti-Visfatin antibody (NAMPT) : Abcam #ab24149 ; 1/500.

Diguet et al. Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy

Generation of rabbit polyclonal antibody against NMRK2 protein

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

Immunofluorescent staining

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

Echocardiography

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

NAD extraction and quantification

Frozen tissue powder was resuspended in 75% ethanol, 25% HEPES 10 mM pH7.1, buffer (20 μ l/mg of tissue). Extracts were warmed 5 min at 80° C, then directly cold on ice and centrifuge 5 min at 16 000 g. Tissues extracts were normalized on the weight of tissue used for extraction. NAD was extremely stable in this buffer and resistant to heat degradation over 60 minutes. Using spiking concentrations of known amounts of NAD⁺

Diguet et al. Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy

and NADH (Sigma-Aldrich) in pure buffered ethanol solution followed by dilutions in acid (HCl 0.1M) or basic (NaOH 0.1M) buffer, heating at 60°C for 30 minutes and neutralization with TRIS buffer pH7.1, we found that NAD⁺ was extremely stable after heating in acid condition (>99% recovery) while NADH was completely destroyed (<1% recovery). Heating in NaOH buffer led to some destruction of both NAD⁺ and NADH and this protocol was discontinued. Hence, we selected the protocol of selective acid-heating destruction of NADH in the cardiac samples for the determination of free NAD⁺ versus free NADH concentrations in these extracts, the buffered ethanol extracts were diluted 1/10 in HCl 0.1M and heated 30 minutes at 60°C to destroy NADH and then neutralized with Tris buffer at pH 7.1 before measuring NAD⁺. After adjustment of dilution factors, NADH levels were calculated by subtracting the NAD⁺ concentration to the non-heated ethanolic extract values: NADH = NAD_t (non-heated) - NAD⁺(heated). Kinetics of the reaction (OD at 550nm, every 30 seconds for 40 minutes) was followed on a TECAN Infinite F500 microplate reader. NAD was quantified in duplicates for each sample by comparison to a range of standard NAD⁺ concentration using linear regression curve equation method between NAD⁺ standard concentrations and the slope of the reaction in OD units/sec. For cell cultures, the wells were washed twice with PBS and scraped on ice in buffered ethanol (100 μl/well in 12-well plates or 50 μl/well in 24-well plates). Extracts were diluted in water to a final volume of 25 μl to reach a concentration that within the titration curve. We added 100 μL of reaction buffer (600 mM ethanol, 0.5 mM 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2 mM phenazine ethosulfate (PES), 120 mM Bicine (pH7.8), yeast alcohol dehydrogenase (SIGMA A3263 > 300 u/mg) 0.05 mg/ml. Kinetics of the reaction (OD at 550nm, every 30 seconds for 40 minutes) was followed on a TECAN Infinite F500 microplate reader. NAD was quantified in duplicates for each sample by comparison to a range of standard NAD⁺ concentration using linear regression curve equation method between NAD⁺ standard concentrations and the slope of the reaction in OD units/sec. NAD⁺/NADH was obtained by the formula $([NAD_t] - [NADH]) / [NADH]$. Proteins could not be reliably quantified after extraction by boiling buffered ethanol method but cells layers were confluent in all conditions. Hence, in neonatal rat cardiomyocytes where the number of cells have changes over the culture period, data are given as fold change over mean control values (untreated group) at the time of extraction. In adult rat cardiomyocytes that do not proliferate, 20,000 cells were seeded per well in 24-well plates and an average cylinder volume of 20 μm diameter and 100 μm length was used to estimate the cellular volume and calculate the concentration.

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

NRC were isolated as described previously.³ 1-day-old rat pups were killed by decapitation and the cardiac ventricles were harvested and minced into 1 to 2-mm wide cubes with scissors. After washing with Tyrode solution, heart fragments were subjected up to 10 rounds of digestion with 0.05 mg/ml of Liberase Blendzyme 4 (Roche Applied Science) in 10 ml oxygenated Tyrode solution under agitation at 37°C for 10 minutes. The supernatant of the first digestion was discarded and the following digestions were centrifuged and the cell pellet dissociated in 2 ml of DMEM, 10% FCS. The different fractions were pooled and centrifuged on a discontinuous Percoll gradient (bottom 58.5%. top 40.5%. 30 min. 3000 rpm) to enrich in cardiomyocytes at the interface between the 2 Percoll solutions. Non cardiac cells containing mainly fibroblasts were at the top of the tubes. Neonatal cardiomyocytes were seeded at a density 5×10^5

Diguet et al. Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy

cells/well in 6-well plates coated with 10 μ g/ml of laminin (BD Biosciences) in DMEM without pyruvate, with glucose 4.5g/l, 10% horse serum, 5% FCS and cultured at 37 °C in 1% CO₂ atmosphere. To assay the impact on NAD⁺ and Nmrk2 expression, Azaserin and FK866 drugs were added in the culture medium at day 5 and renewed every day when the treatment was prolonged over several days. The same was done for NAD⁺, NR and AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside). AICAR was administrated for 24h only. Doses are indicated in the legends. For treatment of transfected cells (see next section), AICAR, FK866 and PPAR agonists and antagonist were administrated 1 day after transfection. PPAR agonists: GW7647 for PPAR α , GW501516 for PPAR β / δ and GW1929 for PPAR γ ; PPAR antagonists: GW6471 PPAR α , GSK3787 for PPAR β / δ and GW9662 for PPAR γ were ordered from SIGMA ALDRICH CHIMIE, Saint Quentin Fallavier, France. Adult rat cardiomyocytes (ARC) were isolated as previously described.² ARC were seeded at 20,000 cells/well in 24-well plates and treated 2 hours after Ca²⁺ introduction and plating with 10 μ M FK866, 20 μ M Azaserin or 1 mM NR for 65h before NAD extraction. In all conditions, they were still more than 60% of rod-shaped cardiomyocytes after 65 h cultures. The treatment did not induce changes in cell shape or cell numbers.

Seahorse analyses

NRC were seeded at 60 000 cells/well in 96-well Seahorse plates. At day 3 of culture, FK866 (10 μ M) and/or a range NR doses was added to the medium. Analyses were performed at day 8 of culture. After equilibrating the cells for 1h at 37°C in the Seahorse test medium, the mitochondrial stress protocol included sequential injection of oligomycin (2 μ M final) to inhibit ATP synthase, FCCP (1 μ M final) as the uncoupling agent and a final injection of Amytal (1 mM final) and Antimycine A (0.5 μ M final). For the glycolytic reserve assessment protocol, Cells were deprived of glucose in a non-buffered medium for one hour before the analysis. Glucose was injected first at 10 mM final to measure glycolysis. Glycolytic capacity was measures as the maximal ECAR value after oligomycin injection (2 μ M final), effectively shutting down ATP production by oxidative phosphorylation. Glycolytic reserve is defined as the difference between basal glycolysis and glycolytic capacity. The final injection is 2-deoxy-glucose (2-DG) at 50 mM to inhibit glycolysis. All ECAR values are given after deduction of non-glycolytic ECAR measurement.

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

The transcription initiation site of mouse Nmrk2 promoter was determined by 5'RACE and was conform to the reported site in the Genbank (NM_027120.2). The promoter of the mouse Nmrk2 gene was cloned from C57Bl6/N genomic DNA by PCR with forward primer CCTATGAGGTGAGAGGATCTCTG (-3009/-2987) and reverse primer CTTGGGGACTGGAGGTGACTGGTC (+61/+38), and inserted into a pGL4.10[luc2] luciferase reporter plasmid (Promega prod no E6651). Subsequent deletions were performed by enzymatic digestion or primer mediated subcloning of the original fragment. 2.5 x 10⁵ cardiomyocytes in 12-well plates were co-transfected at day 2 of culture with 1 μ g of Nmrk2 pGL4.10[luc2] constructs and 100 ng of pGL4.73[hRluc/SV40] Vector (Promega prod no E6911) as an internal control of transfection efficiency using Lipofectamine 2000 (Lifetechnology) as indicated by the

Diguet et al. Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy

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

AMPK, PPAR, RXR Vectors

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

Cloning of mouse Nmrk2 cDNA into recombinant adenovirus

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

Mitochondrial (mtDNA) and nuclear (nDNA) DNA content

Total DNA was extracted from left ventricle. Briefly, tissue were minced in 500 μ l of buffer 1 (TrisHCl 10 mM, NaCl 10 mM, EDTA 25 mM, SDS 1%, proteinase K 0.4mg/ml, pH 7.5) with cleaned scissors and incubated overnight at 37° C. After addition of 50 μ l of saturated NaCl solution, the homogenates were centrifuged at 500 g for 15 minutes. Isopropanol (500 μ l) was added to supernatants which were then incubated 45 minutes at -20° C. After a centrifugation at 16000 g for 20 minutes, the pellets were kept, washed with ethanol 70%, resuspended in buffer 2 and finally warmed at 70°C. mtDNA content was measured by real-time qPCR using specific primers for a mitochondrial gene (Dloop, forward primer ATAGCCGTC AAGGCATGAAA, reverse primer GATTGGGTTTTGCGGACTAA) and a nuclear gene (B2M (beta-2-microglobulin), forward primer TGGTAAAGCAAAGAGGCCTAA, reverse primer AGAAGTAGCCACAGGGTTGG). The difference between the threshold cycle (Ct) of nuclear gene and mtDNA gene (Δ Ct) was used to assess the mtDNA/nDNA ratio, which was calculated using the following formula: $2^{(2 \Delta Ct)}$. For details see.⁷

Measure of O₂ consumption rate in permeabilized cardiac fibers

Mitochondrial respiration was studied in situ in saponin-permeabilized cardiac muscle fibres using a Clarke electrode as previously described.⁸ Oxygen consumption was measured after successive addition of pyruvate-malate (1-4 mM), ADP (0.1 mM), creatine (12 mM), ADP (2 mM), glutamate (10 mM), succinate (15 mM), and amytal (an inhibitor of complex I, 1 mM) to respiration solution (in mM: 2.77 CaK₂EGTA, 7.23 K₂EGTA [100 nM free Ca²⁺], 6.56 MgCl₂ [1 mM free Mg²⁺], 20 taurine, 0.5 DTT, 50 K-methane sulfonate [160 mM ionic strength], 20 imidazole, pH 7.1) at 23°C. From this protocol, sensitivity of mitochondrial respiration to external ADP and creatine were determined (K_m ADP and K_m creatine) and acceptor control ratio (ACR) was calculated from basal mitochondrial respiration rate (in the presence of pyruvate/malate 1/4 mM,

Diguet et al. Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy

without ADP) and oxygen consumption after addition of 2mM ADP. Rates of respiration are given in nmoles O₂/min/mg dry weight.

Biochemical studies

Frozen tissue samples were weighed, homogenized (Bertin Precellys 24) in ice-cold buffer (50 mg/ml) containing HEPES 5 mM (pH 8.7), EGTA 1 mM, DTT 1 mM and 0.1% Triton X- 100. Citrate synthase (CS), complex I and cytochrome oxidase (COX), activities were determined in homogenized ventricles as previously described.⁸ Activities of enzymes were determined by standard spectrophotometric assays. Briefly, for citrate synthase (CS), approximately 0.5 μ g of protein were added in 1 ml of Buffer M (Trizma 100 mM (pH8), 5,5'-dithiobis-(2-Nitrobenzoic acid) 0.1 mM, Acetyl-CoA 0.3 mM, oxaloacetic acid 0.5mM) and the absorbance at 412 nm was measured during 3 min. Cytochrome oxidase (COX) activity was determined by the addition of approximately 0.25 μ g of protein in 1 ml of phosphate buffer (K₂HPO₄ 50 mM (pH 7.4)) containing 50 μ M Cytochrome c (cytochrome c were previously reduced at 90% using sodium dithionite). Loss of reduced cytochrome c were followed by measuring the absorbance at 550 nm during 3 min using fully oxidized cytochrome c (by addition of potassium ferricyanure in excess) as a reference. For the determination of complex I activity, 25 μ g of protein and 100 μ M NADH were added to 1 ml of C1 Buffer (41.1 mM KH₂PO₄, K₂HPO₄ 8.8 mM, Decyl-ubiquinone 100 μ M, BSA 3.75 mg/ml, pH 7.4). Measurements of the absorbance at 340 nm during 3 min in the presence and in the absence of 5 mM rotenone were used to calculate activity of this complex. CS, COX and complex I activities were respectively calculated using an extinction coefficient of 13600 M⁻¹.cm⁻¹, 18500 M⁻¹.cm⁻¹ and 6220 M⁻¹.cm⁻¹ and rates are given in international unit (IU)/g prot. ATP citrate lyase activity was quantified in 1 ml of assay buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.7, 20 mM Potassium citrate monobasic, 10 mM dithiothreitol, 10 mM MgCl₂, 500 unit/ml of Malic Dehydrogenase from porcine heart #M1567 from SIGMA, 330 μ M Coenzyme A sodium salt hydrate, 5 mM ATP, 140 μ M NADH) by measurement of the absorbance at 340 nm during 3 min before and after the addition of 200 μ M SB 204990 inhibitor of ACL (TOCRIS, Cat. No. 4962). The difference between the slopes of the 2 measurements was used to calculate activity of ACL using an extinction coefficient for NADH of 6220 M⁻¹.cm⁻¹.

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

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

Diguet et al. Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy

Vascular reactivity measurement

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (150 mg/kg). Mesenteric bed was quickly isolated and placed in an ice-cold "Krebs" solution of following composition (in mmol/L): NaCl 119, KCl 4.7, CaCl₂(H₂O)₂ 2.5, MgSO₄(H₂O)₇ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11, NaHCO₃ 25, bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂ to maintain pH at 7.4. First order mesenteric arteries (inner diameter 100 – 300 μ m) were carefully dissected, cleaned-off from fat tissue and cut into 1-2 mm segments. Each segment was mounted in the chamber of a small vessel myograph (620 M, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark) using 25 μ m tungsten wire, as described previously.¹⁰ Chambers were filled with Krebs solution, bubbled with 95% O₂ - 5% CO₂ mixture and kept at 37°C. Data were digitized using a Powerlab 8/30 (AD Instruments, Paris, France) and acquired using the Labchart7 software (AD Instruments). Vessels underwent a normalization procedure which consisted in stretching the vessels stepwise to construct tension – circumference relationship. Rings were eventually set at an internal circumference corresponding to 90% of the circumference the vessel would have if submitted to a transmural pressure of 100 mmHg (13.3 kPa). After an equilibration period of 45-60 min, contractile responses of the vessels were evaluated by challenging them either with increasing extracellular [K⁺] (using modified Krebs solution containing various amount of KCl, with equimolar substitution of NaCl). Other vessels were treated with increasing concentrations of the thromboxane A₂ mimetic U46619 (Interchim, Montluçon, France), added cumulatively. All vessels were then washed with Krebs solution and contracted again with U46619 (3.10⁻⁷ mol/L). Relaxant responses to cumulative concentrations of either carbachol (Cch, muscarinic receptor agonist, Sigma-Aldrich) or (2-(N,N-Diethylamino)-diazene-2-oxide diethylammonium salt (DEA-NO), a nitric oxide donor (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France) were then evaluated. Contractile responses were expressed in mN/mm or relative to response to a solution containing 120 mmol/L extracellular [K⁺]. Relaxant responses were expressed in %, relative to the starting contraction amplitude obtained with 3.10⁻⁷ mol/L U46619. Concentration-response curves were fitted with the Hill equation using Prism7 software (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA), allowing to determine EC₅₀ (mol/L) and maximal effect (E_{max}) for each experiment. Because for some responses the curve fitting was not successful, corresponding experiments were excluded from the EC₅₀ and E_{max} analysis. All data were expressed as mean \pm SEM of N experiments, where "N" represents the number of animals. Statistical analysis was performed using Prism7. Mann-Whitney test was used to compare EC₅₀ and E_{max}. Also concentration-response curves were compared using 2-way ANOVA.

Statistical Analyses

For in vivo experiments, animals were randomly assigned into different treatment groups. To assess significance, we performed Student's t test for independent samples when the experimental design compared only 2 groups, or One-Way ANOVA for multiple group comparisons, or Two Way ANOVA for independent factors when appropriate for the experimental design. Tukey tests were used for comparison of specific experimental groups when One-way ANOVA gave a p value < 0.05 or, in the case of Two Way ANOVA for interaction p value < 0.05. Values are expressed as mean \pm SEM.

Supplemental References

Diguet et al. Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy

1. Parlakian A, Charvet C, Escoubet B, Mericskay M, Molkentin JD, Gary-Bobo G, De Windt LJ, Ludosky MA, Paulin D, Daegelen D, Tuil D and Li Z. Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart. *Circulation*. 2005;112:2930-9.
2. Tritsch E, Mallat Y, Lefebvre F, Diguet N, Escoubet B, Blanc J, De Windt LJ, Catalucci D, Vandecasteele G, Li Z and Mericskay M. An SRF/miR-1 axis regulates NCX1 and annexin A5 protein levels in the normal and failing heart. *Cardiovascular research*. 2013;98:372-80.
3. Diguet N, Mallat Y, Ladouce R, Clodic G, Prola A, Tritsch E, Blanc J, Larcher JC, Delcayre C, Samuel JL, Friguet B, Bolbach G, Li Z and Mericskay M. Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end-products in dilated cardiomyopathy. *The Journal of biological chemistry*. 2011.
4. El Hadri K, Denoyelle C, Ravaux L, Viollet B, Foretz M, Friguet B, Rouis M and Raymondjean M. AMPK Signaling Involvement for the Repression of the IL-1beta-Induced Group IIA Secretory Phospholipase A2 Expression in VSMCs. *PLoS one*. 2015;10:e0132498.
5. Ravaux L, Denoyelle C, Monne C, Limon I, Raymondjean M and El Hadri K. Inhibition of interleukin-1beta-induced group IIA secretory phospholipase A2 expression by peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in rat vascular smooth muscle cells: cooperation between PPARbeta and the proto-oncogene BCL-6. *Mol Cell Biol*. 2007;27:8374-87.
6. Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M and Carling D. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell metabolism*. 2005;2:21-33.
7. Dimmock D, Tang LY, Schmitt ES and Wong LJ. Quantitative evaluation of the mitochondrial DNA depletion syndrome. *Clinical chemistry*. 2010;56:1119-27.
8. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R and Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc*. 2008;3:965-976.
9. Trammell SA and Brenner C. Targeted, LCMS-based Metabolomics for Quantitative Measurement of NAD(+) Metabolites. *Computational and structural biotechnology journal*. 2013;4:e201301012.
10. Mulvany MJ and Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*. 1977;41:19-26.

Table I. Patients' characteristics.

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

Cad: coronary artery disease, Nocm: non-obstructive cardiomyopathy, Hdcm: hypertrophic dilated cardiomyopathy. LVEF: left ventricular ejection fraction. Human cardiac tissue control samples (LV, mean age 51 years \pm 4.5, S.D, not in the table) were obtained from general organ donors whose non-diseased hearts were explanted to obtain pulmonary and aortic valves.

Table II. Expression level of genes involved in NAD homeostasis

Probe Set ID	Gene Symbol	Gene Title	Mut D8	Mut D25	Mut D25 +PE	Cont D25 +PE
1452944_at	Afmid /// Syngr2	arylformamidase /// synaptogyrin 2	1.19	0.78	0.92	0.65
1447638_at	Afmid /// Syngr2	arylformamidase /// synaptogyrin 2	0.99	0.90	0.88	0.92
1428885_at	Afmid /// Syngr2	arylformamidase /// synaptogyrin 2	1.31	0.97	1.08	0.97
1431722_a_at	Afmid	arylformamidase	0.97	1.01	0.96	0.99
1432492_a_at	Hao	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	0.99	0.99	0.98	1.00
1420437_at	Ido1	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase 1	0.83	1.09	0.99	1.01
1425778_at	Ido2	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase 2	0.99	0.96	0.95	0.97
1418998_at	Kmo	kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)	0.99	0.98	0.97	1.00
1430570_at	Kynu	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	1.00	0.94	0.93	0.96
1451903_at	Kynu	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	1.00	0.99	0.97	1.00
1430359_a_at	Nadsyn1	NAD synthetase 1	1.00	0.89	0.85	0.92
1417190_at	Nampt	nicotinamide phosphoribosyl transferase	1.02	1.10	0.87	↑ 1.35
1448607_at	Nampt	nicotinamide phosphoribosyl transferase	1.33	1.41	0.99	1.14
1454748_at	Naprt1	nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1	0.64	0.86	0.86	1.06
1425773_s_at	Nmnat1	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 1	0.85	0.92	0.89	1.00
1429819_at	Nmnat1	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 1	0.96	1.05	1.05	1.05
1436155_at	Nmnat2	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2	0.78	1.00	0.95	0.98
1424899_at	Nmnat3	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3	1.11	0.79	0.67	0.73
1432342_at	Nmnat3	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3	1.00	0.97	0.97	0.98
1443149_at	Nmnat3	Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3 (Nmnat3). mRNA	0.99	0.98	0.97	1.00
1459128_at	Nmnat3	Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3 (Nmnat3). mRNA	0.99	0.92	0.90	0.96
1432342_at	Nmnat3	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3	1.00	0.97	0.97	0.98
1443149_at	Nmnat3	Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3 (Nmnat3). mRNA	0.99	0.98	0.97	1.00
1459128_at	Nmnat3	Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3 (Nmnat3). mRNA	0.99	0.92	0.90	0.96
1425646_at	Nmrk1	nicotinamide riboside kinase 1	0.98	0.90	0.91	1.01
1447503_at	Nmrk1	nicotinamide riboside kinase 1	1.00	0.99	0.92	0.98
1453898_at	Nmrk2	nicotinamide riboside kinase 2	8.87	30.6	57.4	↑ 4.15
1422974_at	Nt5e	5' nucleotidase, ecto (CD73)	1.48	2.80	4.22	↑ 1.21
1428547_at	Nt5e	5' nucleotidase, ecto (CD73)	1.06	1.63	2.42	0.94
1416530_a_at	Pnp	purine-nucleoside phosphorylase	0.76	0.83	0.74	0.92
1453299_a_at	Pnp	Similar to purine-nucleoside phosphorylase / LOC545044	0.96	0.84	0.68	0.88
1418836_at	Qprt	quinolinate phosphoribosyltransferase	1.00	0.99	0.99	1.00

Diguet et al. Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy

1418837_at	Qprt	quinolinate phosphoribosyltransferase	1.00	0.99	0.98	1.00
1419093_at	Tdo2	tryptophan 2,3-dioxygenase	0.99	0.99	0.98	1.00
1449337_at	Tdo2	tryptophan 2,3-dioxygenase	0.99	0.99	0.98	1.00
1455770_at	Tdo2	Tryptophan 2,3-dioxygenase. mRNA (cDNA clone MGC:25811 IMAGE:4159877)	0.99	0.99	0.98	1.00

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

Table III. Pharmacological parameters CE_{50} and E_{max} obtained by analysis of concentration-response curves of $[K^+]$, thromboxane mimetic U46619 and NO donor DEA-NO in mesenteric artery rings isolated from NR-supplemented or control mice.

		$[K^+]$	U46619	carbachol	DEA-NO
	N	6	6	4 ^a	5
Control	CE_{50}	24.7 ± 2.7 mmol/L	18 ± 8 nmol/L	1.7 ± 0.6 μmol/L	0.20 ± 0.14 μmol/L
	E_{max}	3.0 ± 0.3 mN/mm	116 ± 4 %	62 ± 8 %	77 ± 6 %
	N	5 ^a	6	3 ^a	5
NR	CE_{50}	31.2 ± 4.0 mmol/L	19 ± 8 nmol/L	0.5 ± 0.1 μmol/L	0.19 ± 0.10 μmol/L
	E_{max}	3.0 ± 0.3 mN/mm	121 ± 15 %	53 ± 6 %	81 ± 3 %

E_{max} for U46619 was expressed relative to the contraction amplitude obtained with solution containing 120 mmol/L $[K^+]$. E_{max} for carbachol and DEA-NO were expressed in %, relative to the starting contraction amplitude obtained with U46619 (100% corresponding to full relaxation). ^a: because for some responses the curve fitting was not successful, corresponding experiments were excluded from the EC_{50} and E_{max} analysis.

Table IV. LCMS analysis of hepatic NAD metabolome from control and SRF^{HKO} mutant mice fed with regular CD diet or NR-enriched diet.

Liver (pmol/mg)	Control (n = 4)	Control + NR (n = 5)	Mutant (n = 6)	Mutant + NR (n = 5)	Anova
NAD	1615 ± 432	1916 ± 636	1163 ± 40	4245 ± 1225	§
NADP	118 ± 27	105 ± 23	117 ± 6	159 ± 15	
NAAD	5.2 ± 1.7	7.5 ± 3.2	1.7 ± 0.4	52.5 ± 31.5	
NMN	6.7 ± 3.2	9.1 ± 3.6	2.5 ± 0.4	23 ± 8.1	§
ADPR	107 ± 21	129 ± 38	89 ± 13	347 ± 76 **	§§, i
Uridine	43 ± 7	53 ± 11	58 ± 5	26 ± 4 *	i
Cytidine	2.5 ± 0.7	2.6 ± 1	3 ± 0.4	1 ± 0.6	
Inosine	311 ± 81	344 ± 54	432 ± 54	489 ± 56	¶
IMP	196 ± 35	210 ± 37	311 ± 32	317 ± 43	¶¶
UMP	292 ± 44	222 ± 25	243 ± 21	223 ± 15	
CMP	20.2 ± 1.6	18.2 ± 3	21.3 ± 0.8	16.5 ± 1.4	
NR ^a	2.7 ± 0.9	2.1 ± 0.4	1 ± 0.5	3.3 ± 1.3	
Nam	479 ± 126	433 ± 86	355 ± 124	956 ± 215 *	i
MeNam	4.2 ± 0.6	23.1 ± 5.3	3 ± 0.7	26.8 ± 6.8	§§
Me-4PY ^b	2.4 ± 0.5	11.7 ± 2.8	1.3 ± 0.5	17.6 ± 3.2	§§

(^a) n=3 for Mutant (^b) n=4 for Mutant

Liver metabolite extraction was performed in the same mice than those analyzed for the cardiac metabolome in the Figure 3 of the main manuscript.

Statistics: 2-way ANOVA for independent samples followed by post-hoc Tukey test: Genotype effect is indicated by ¶ p≤0.05, ¶¶ p≤0.01; NR effect is indicated by § p≤0.05, §§ p≤0.01. Interaction effect is indicated by i p≤0.05. Where interaction was detected, post-hoc Tukey test was performed between individual groups: * p≤0.05 NR vs CD for the same genotype.

Diguet et al. Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy

Table V. Echocardiography after TAC or SHAM surgery

	Baseline					2W				
	SHAM	SHAM + NR	TAC	TAC + NR	Anova	SHAM	SHAM + NR	TAC	TAC + NR	Anova
N	7	7	10	11		7	7	5	7	
IVSThD	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.02	ns	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.02	0.9 ± 0.04	0.9 ± 0.04	ns
LVEDD	3.2 ± 0.08	3.2 ± 0.1	3.3 ± 0.08	3.4 ± 0.07	ns	3.6 ± 0.06	3.6 ± 0.09	4.2 ± 0.22	4.2 ± 0.17	¶¶
PWThD	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.04	0.6 ± 0.04	ns	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.04	0.7 ± 0.08	0.7 ± 0.03	¶¶
IVSThS	1 ± 0.03	1.1 ± 0.02	1 ± 0.03	1.1 ± 0.02	ns	1.1 ± 0.03	1.1 ± 0.03	1.2 ± 0.06	1.2 ± 0.06	¶¶
LVESD	1.7 ± 0.04	1.8 ± 0.06	1.8 ± 0.04	1.9 ± 0.04	ns	2 ± 0.04	2 ± 0.05	3.2 ± 0.26	3.1 ± 0.22	¶¶
PWThS	1.1 ± 0.05	1.1 ± 0.04	1.1 ± 0.04	1 ± 0.02	ns	1.1 ± 0.04	1 ± 0.02	0.9 ± 0.07	0.9 ± 0.03	¶¶
EDV	85 ± 5.7	87 ± 7.8	93 ± 6	98 ± 6	ns	115 ± 5.7	123 ± 9.2	192 ± 30.9	184 ± 20.5	¶¶
ESV	13 ± 1.8	14 ± 2	18 ± 2	17 ± 1.4	ns	20 ± 0	21 ± 1.4	90 ± 20	80 ± 15	¶¶
LVEF %	83 ± 0.4	82 ± 0.7	82 ± 0.3	82 ± 0.4	ns	82 ± 0.4	83 ± 0.3	55 ± 3.8	59 ± 3.7	¶¶
FS %	46 ± 0.5	45 ± 0.7	45 ± 0.3	47 ± 2.6	ns	45 ± 0.4	45 ± 0.32	24 ± 2.3	27 ± 2.3	¶¶
SV	71 ± 5.1	71 ± 7	75 ± 4.3	84 ± 4.9	ns	94 ± 4.8	103 ± 7.1	102 ± 10.2	106 ± 7.2	ns
h/r	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.01	ns	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.02	0.4 ± 0.03	0.4 ± 0.02	¶¶
HR	638 ± 9.7	605 ± 6.7	616 ± 8.4	614 ± 7.1	ns	638 ± 9.7	629 ± 12.8	549 ± 37.8	591 ± 12.3	¶¶
CO	46 ± 3.7	43 ± 4.4	46 ± 2.8	51 ± 2.9	ns	60 ± 3.3	65 ± 4.4	55 ± 2.3	62 ± 3.6	ns
LV mass	54 ± 1.8	55 ± 3.4	59 ± 5.2	58 ± 4.3	ns	66 ± 3.2	67 ± 5	136 ± 13.7	126 ± 9.8	¶¶
	4w					6w				
N	7	7	5	7	Anova	7	7	4	7	Anova
IVSThD	0.6 ± 0.02	0.7 ± 0.02	0.9 ± 0.04	0.8 ± 0.02 **, #	¶¶, ii	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.02	0.8 ± 0	0.9 ± 0.02	¶¶, §§
LVEDD	3.5 ± 0.09	3.7 ± 0.1	4.3 ± 0.33	4.4 ± 0.2	¶¶	3.6 ± 0.07	3.7 ± 0.08	4.8 ± 0.19	4.7 ± 0.25	¶¶
PWThD	0.5 ± 0.02	0.6 ± 0.03	0.8 ± 0.08	0.8 ± 0.07	¶¶	0.6 ± 0.04	0.6 ± 0.03	0.7 ± 0.06	0.8 ± 0.05	¶¶
IVSThS	1.1 ± 0.04	1.1 ± 0.03	1.2 ± 0.07	1 ± 0.02	i	1.1 ± 0.04	1.1 ± 0.02	1.1 ± 0.03	1.1 ± 0.05	ns
LVESD	1.9 ± 0.05	2.1 ± 0.06	3.5 ± 0.47	3.5 ± 0.23	¶¶	1.9 ± 0.04	2.1 ± 0.06	4.1 ± 0.26	3.7 ± 0.28	¶¶
PWThS	1 ± 0.04	1.1 ± 0.04	1.1 ± 0.07	1 ± 0.03	ns	1.1 ± 0.04	1 ± 0.04	0.8 ± 0.05	1 ± 0.05	¶¶
EDV	109 ± 7.4	129 ± 9.9	206 ± 42.5	217 ± 24.8	¶¶	119 ± 5.9	139 ± 6.7	272 ± 28.7	270 ± 35.4	¶¶
ESV	19 ± 1.4	23 ± 1.8	128 ± 39.2	116 ± 19.1	¶¶	19 ± 1.4	24 ± 2	167 ± 27.5	143 ± 25.9	¶¶
LVEF %	82 ± 0.5	81 ± 0.3	46 ± 9.1	48 ± 3.7	¶¶	83 ± 0.4	82 ± 0.5	39 ± 5.1**	50 ± 3.7**, #	¶¶, i
FS %	45 ± 0.6	44 ± 0.3	20 ± 5.2	21 ± 2	¶¶	45 ± 0.5	45 ± 0.5	16 ± 2.6***	22 ± 2.1**, ##	¶¶, i
SV	91 ± 6.3	104 ± 8.4	80 ± 4.5	100 ± 9	ns	97 ± 5.2	110 ± 4.4	105 ± 6.5	130 ± 11.3	¶¶
h/r	0.3 ± 0.01	0.4 ± 0.02	0.4 ± 0.04	0.4 ± 0.01	ns	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.03	0.4 ± 0.02	¶¶
HR	645 ± 11	636 ± 10.8	575 ± 20.7	586 ± 20.9	¶¶	628 ± 6.5	636 ± 10.7	598 ± 38.7	568 ± 24.6	¶¶
CO	59 ± 4.7	67 ± 6	46 ± 1.6	62 ± 2.9	§	61 ± 3.3	70 ± 3.3	63 ± 6.2	74 ± 7.6	ns
LV mass	62 ± 3.6	80 ± 3.8	156 ± 22.6	141 ± 15.8	¶¶	65 ± 5.1	72 ± 4.2	146 ± 6.3	173 ± 18.3	¶¶

Abbreviations: IVSThD and IVSThD, interventricular septum thickness in diastole and systole; LVEDD and LVESD, left ventricle end-diastolic and end-systolic diameter; PWTh, LV posterior wall thickness; EDV and ESV, end-diastolic and end-systolic volume; LVEF, LV ejection fraction; FS, LV fractional shortening; h/r, LV wall thickness/radius ratio; HR, heart rate; CO, cardiac output. Two-way factorial ANOVA for independent samples: ¶¶ p ≤ 0.01 for the TAC effect; § p ≤ 0.05, §§ p ≤ 0.01 for the NR effect; i p < 0.05, ii p ≤ 0.01 for the interaction effect. ANOVA was followed by a post-hoc Tukey test when interaction was significant: **, p ≤ 0.01, ***, p ≤ 0.001 vs the SHAM group; #, p ≤ 0.05, ##, p ≤ 0.01 for the effect of NR within the TAC group.

Table VI: Antibody list

Target protein	Antibody Supplier. ref #	Dilution
Acetyl-CoA Carboxylase (ACC)	Thermoscientific. # MA5-15025	1/1000
ACC Phospho-Ser79	Thermoscientific. # PA5-17725	1/1000
AMPK α	Cell Signaling #2532	1/1000
AMPK α (Phospho-Thr172)	Cell Signaling #2535	1/1000
FKHR (H-128)(FoxO1)	Santa Cruz BT. # sc-11350	1/1000
Ac-FKHR (D-19):	Santa Cruz BT..# sc-49437	1/200
Acetyl-Lysine	Cell Signaling #9441	1/1000
Citrate Synthase	Abcam	
GAPDH	Sigma #G9545	1/3000
Aconitase 2	Kind gift of Anne Laure Bulteau (Bulteau et al. Biochemistry. 2003;42(50):14846-55)	1/500
HA epitope	Sigma #H6908	1/500
NMRK2	Generated by BioGenes (see below)	1/500
PARP	Cell Signaling #9532	1/1000
PAR (Anti-Poly (ADP-Ribose))	Pharmingen #551813	1/500
p53 (acetyl K386)	Abcam #ab52172	1/500

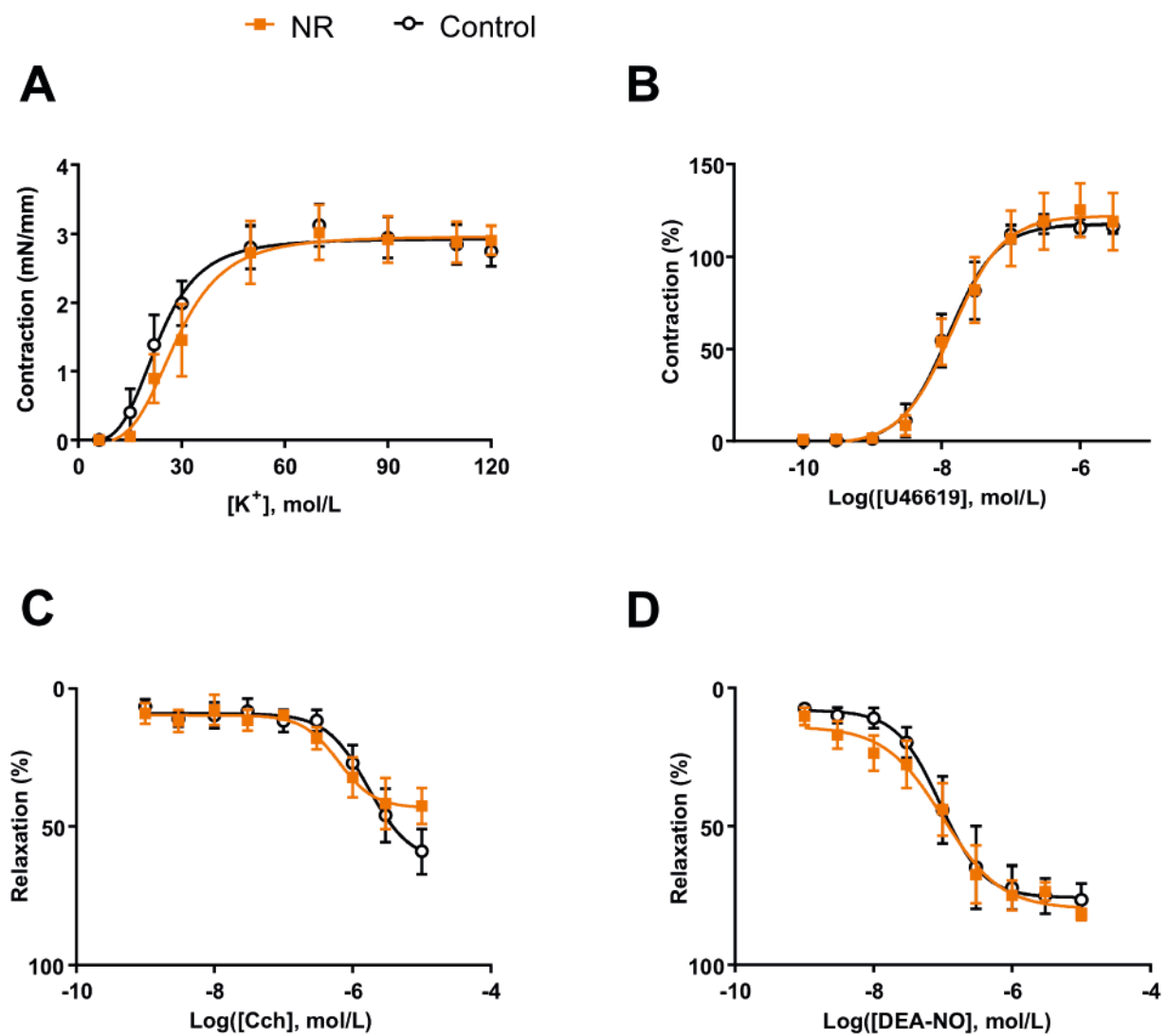


Figure I. NR supplementation did not alter vascular reactivity of isolated mesenteric artery rings. Vasomotor response curves to increasing concentrations of K⁺ (A), the thromboxane mimetic U46619 (B), the muscarinic receptor agonist carbachol (Cch, C) or the NO donor diethylamine-nonoate (DEA-NO, D) were studied on mesenteric artery rings isolated from NR-supplemented mice (NR, filled squares) or control mice (Control, empty circles). In B, contraction was expressed relative to the contraction amplitude obtained with solution containing 120 mmol/L [K⁺]. In C and D, relaxant responses were expressed in %, relative to the contraction amplitude obtained with U46619. Data are mean ± SEM of N=5-6 animals. No significant difference was found between NR and control groups in any of the response tested (2-way ANOVA).

Diguet et al. Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy

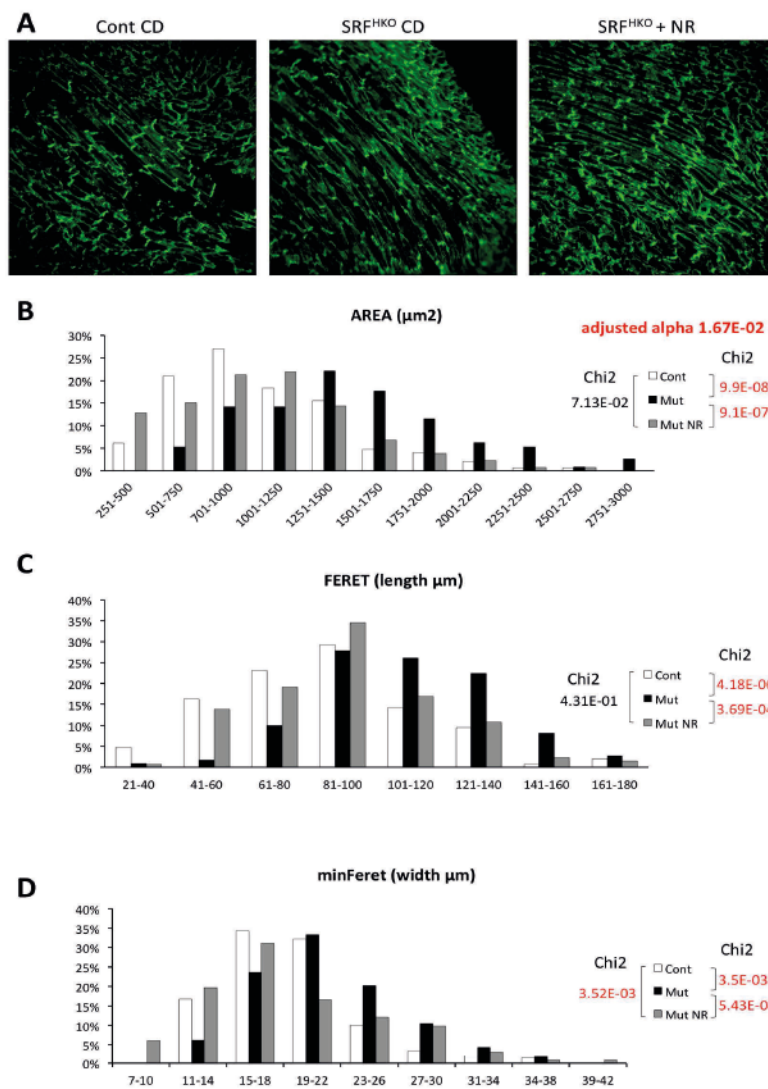


Figure II. Histological assessment of cardiomyocytes shape in SRF^{HKO} mice fed with control diet or NR-enriched diet compared to control mice on regular control diet. (A) Transverse heart section taken in the middle region between apex and base were stained with Anti h1-Vinculin staining was used to label cardiomyocytes sarcolemma and intercalated disks. Confocal images were acquired in the middle of the posterior wall of the LV where cardiomyocytes are cut in the longitudinal axis. (B) Cardiomyocytes area, (C) length (Feret) and (D) width (minFeret) were calculated using Image J software in 3 independent mice for each group. Statistics: A Chi2 test was applied to test the frequency distribution of cardiomyocytes. Alpha level was adjusted to 1.67E-2 (0.05 / 3 comparisons). Control N=3, 148 cardiomyocytes; Mut SRF^{HKO} N=3 individual, 113 cardiomyocytes; Mut SRF^{HKO} + NR, N=3 individuals, 132 cardiomyocytes.

Diguet et al. Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy

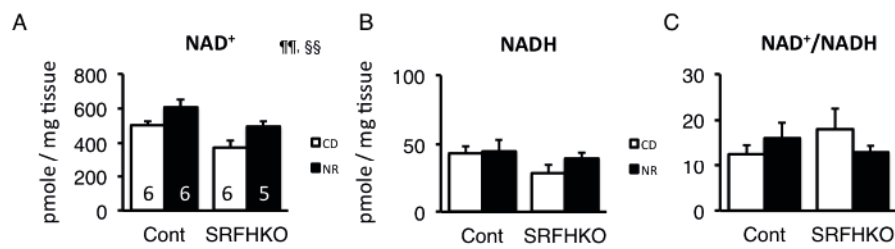


Figure III. Cardiac NAD⁺ and NADH quantification in control and SRF^{HKO} mice at day 50 following 45 days of NR enriched diet.

Cardiac metabolites were extracted by the boiling method in buffered ethanol. The extracts containing the sum of free NAD⁺ and NADH (total free NAD) or NAD⁺ only after selective heat degradation of NADH in acid conditions were quantified by the colorimetric alcohol dehydrogenase NAD recycling assay. NADH levels were calculated by the subtraction of quantified NAD⁺ levels from total NAD. **(A)** NAD⁺ values in pmole/mg of heart tissue; control CD n=6, control NR n=6, SRFHKO CD n=6, SRFHKO NR n=5. **(B)** NADH values in pmole/mg of heart tissue, control CD n=5, control NR n=6, SRFHKO CD n=5, SRFHKO NR n=4. **(C)** NAD⁺/NADH ratio. Two-way factorial ANOVA for independent samples: ¶¶ p ≤ 0.01 for the genotype effect; §§ p ≤ 0.01 for the NR effect.

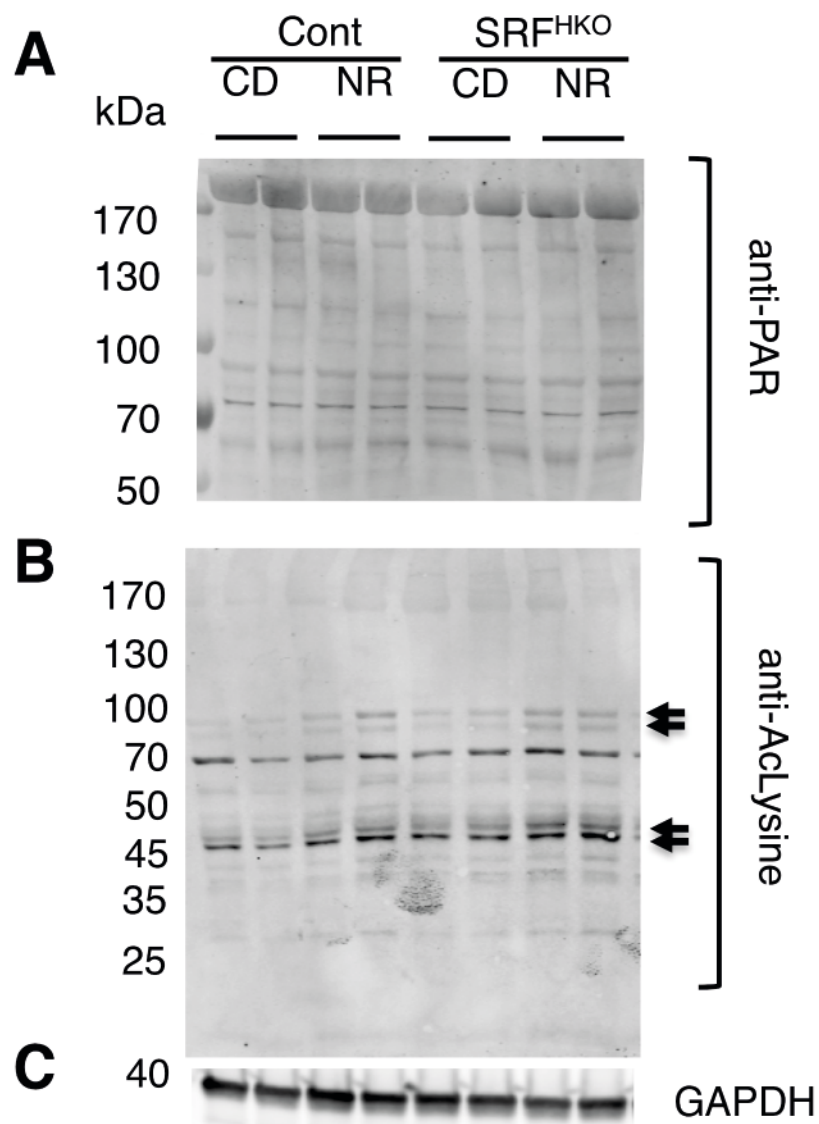


Figure IV. Acetylation and parylation level of cardiac proteins

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

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

(B) Western blot analysis using an anti-acetyl-Lysine antibody. Arrows on the right points to bands whose signal is increased in NR-fed animals compared to CD diet.

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

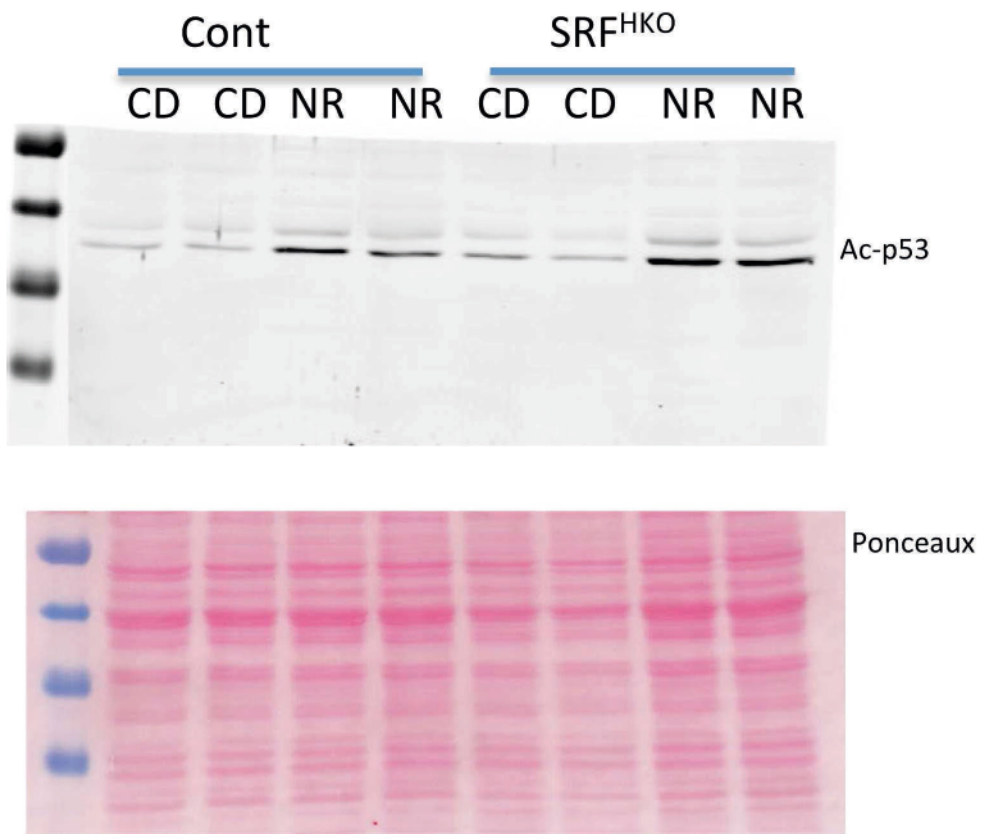


Figure V. Western blot analysis for Acetyl-p53 protein in cardiac extracts from control and and SRF^{HKO} mice fed with control CD diet or NR-diet.

Top: anti-acetyl p53 immunoblot. Bottom: Ponceau staining is shown for loading control

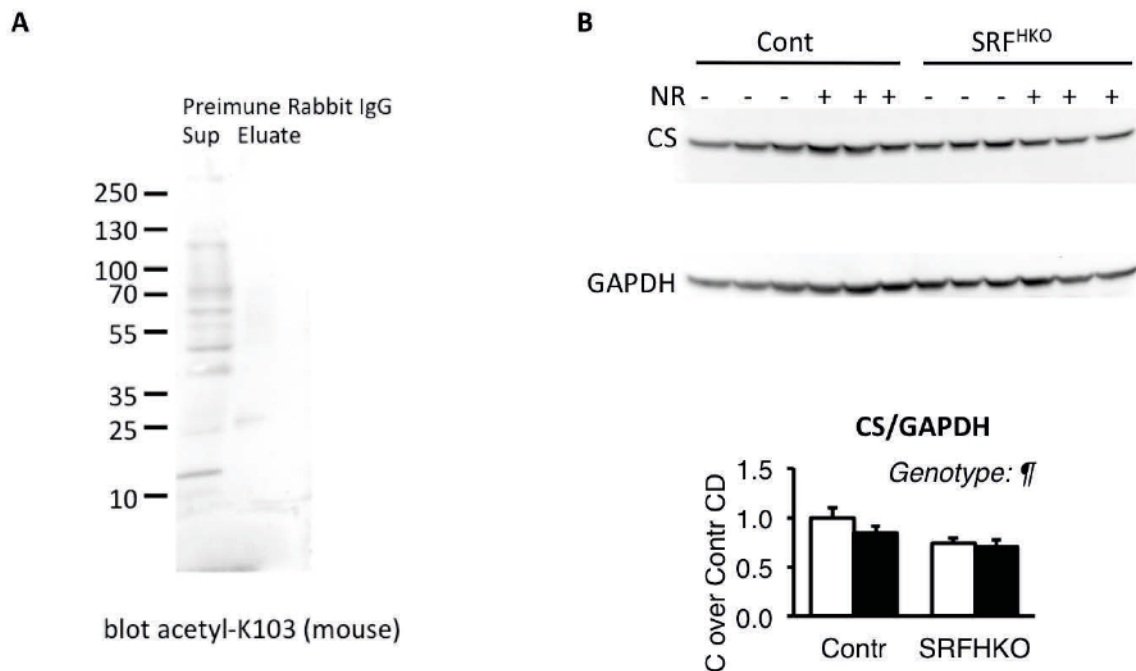


Figure VI. Western blot analysis for mitochondrial proteins in cardiac extracts from control and SRF^{HKO} mice fed with control CD diet or NR-diet. (A) Mouse anti-Acetyl-Lysine (K103) immunoblot of supernatant and eluate of immunoprecipitated cardiac protein extract with preimmune rabbit IgG.

(B) Citrate synthase immunoblot. N=3 for each group. Right graphs show quantification performed with Image J software following the background subtraction method. Two-way factorial ANOVA for independent samples. ¶¶ p≤ 0.05 for the genotype effect.

Diguet et al. Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy

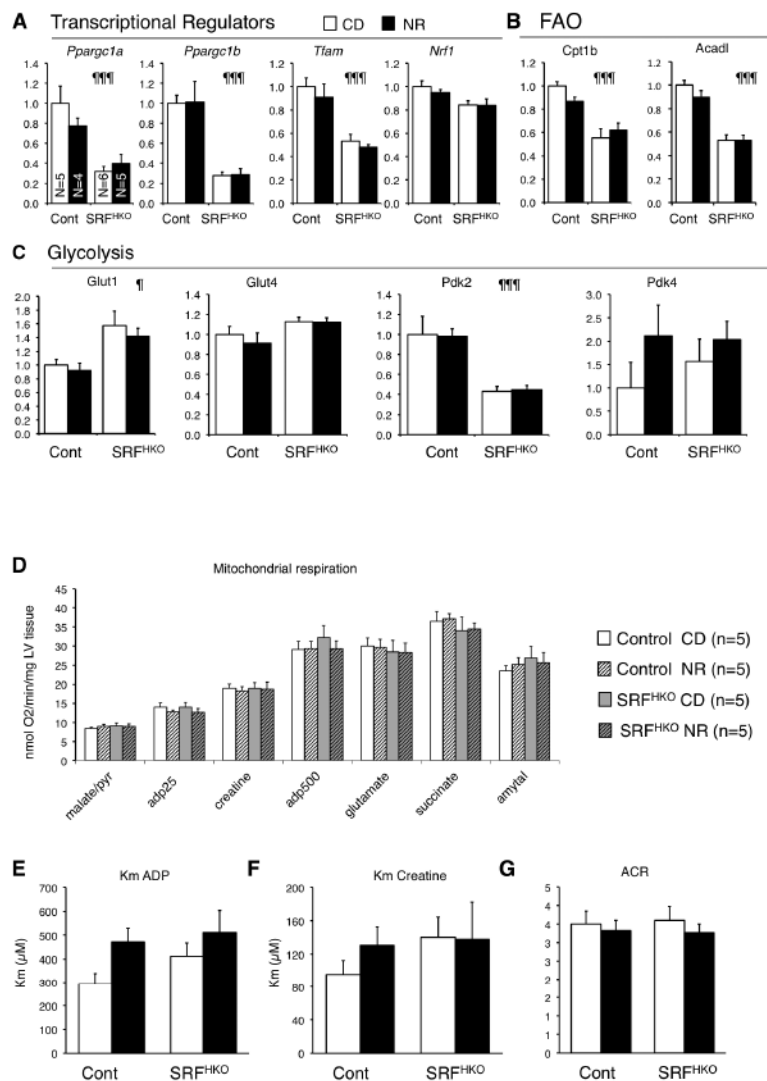


Figure VII. Impact of NR on genes involved in energy metabolism and mitochondrial respiration in permeabilized fibers.

LV tissue were harvested in control and SRF^{HKO} mice fed with regular chow diet (CD) or NR from D5 to day 45 and split for RTqPCR analysis or isolation of cardiac fibers for respiration studies (Figure 3 and S3). **(A-C)** RT qPCR analysis of transcriptional regulators of energy metabolism **(A)**. Genes involved fatty acid beta-oxidation **(B)** and glycolysis **(C)**. **(D-G)** Cardiac fibers were isolated from adults LV 45 days after tamoxifen injection in control and SRF^{HKO} mice fed with regular chow diet (CD) or NR enriched diet (NR) in the same series of mice than shown in Figure 3R-U. **(D)** Rate of mitochondrial oxygen consumption in permeabilized cardiac fibers using a Clarke electrodes after successive addition of indicated substrates. Individual samples were analyzed in triplicates (n=5 individuals for each group). **(E)** Km ADP. **(F)** Km Creatine. **(G)** Acceptor control ratio for ADP (ACR). Two-way factorial ANOVA for independent samples. ¶ p ≤ 0.05, ¶¶¶ p ≤ 0.001 for the genotype effect.

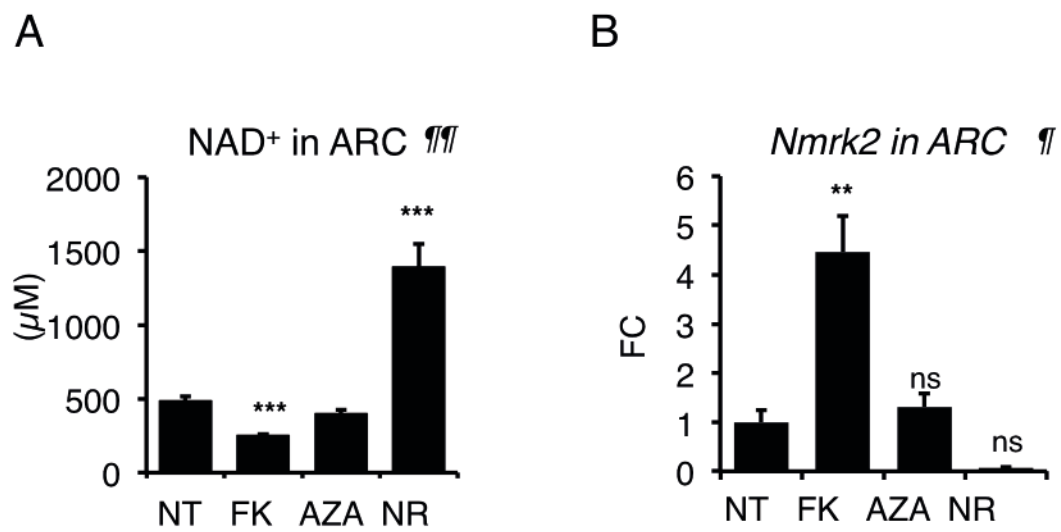


Figure VIII. NR impact in adult rat cardiomyocytes. NAD (A) and Nmrk2 mRNA (B) levels in adult rat cardiomyocytes (ARC). ARC were treated with 10 µM FK866, 20 µM azaserin or 1 mM NR for 65 h. NAD (NAD⁺ + NADH) was extracted by the boiling buffered ethanol method. Data are given as µM concentration in cells using an average 30 pl cellular volume¶, ¶¶: One-Way ANOVA statistic p< 0.05, and p<0.01, respectively. **, ***, p< 0.01 and < 0.001, respectively for post-hoc Tukey test between any group versus NT control cells; ns non-significant.

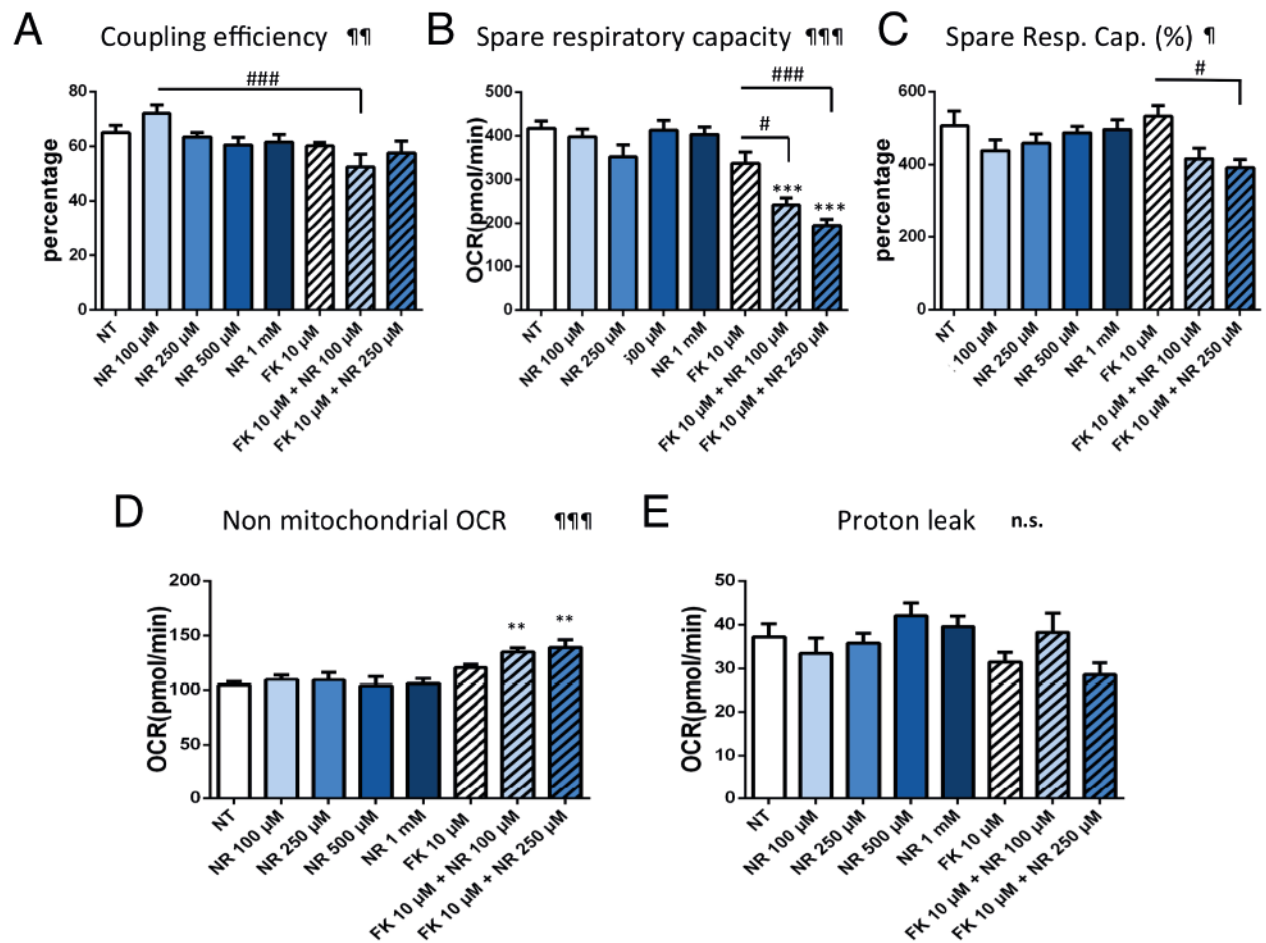


Figure IX. Impact of NR on NRC oxygen consumption rates following mitochondrial stress protocol. This figure complements Figure 4 of the main manuscript. NRC grown on Seahorse 96 well plates were analyzed at day 8 after 5 days of treatment. **(A)** Coupling efficiency is measured as (ATP Production Rate) / (Basal Respiration Rate). **(B)** Spare respiratory capacity is (Maximal Respiration) – (Basal Respiration). **(C)** Spare respiratory capacity as a % is defined as (Maximal Respiration) / (Basal Respiration). **(D)** Non mitochondrial oxygen consumption rate is the minimum rate measurement after inhibition of respiration with rotenone and antimycin A. **(E)** Proton leak is calculated as the (minimum rate measurement after Oligomycin) – (non-mitochondrial respiration). N= 10 for each group. ¶, ¶¶, ¶¶¶: One-Way ANOVA statistic $p < 0.05$, < 0.01 and < 0.001 , respectively. **, ***, $p < 0.01$ and < 0.001 , respectively for post-hoc Tukey test between any group versus NT control cells. #, ###, $p < 0.05$, and < 0.001 , respectively for post-hoc Tukey test for other comparisons, notably NR 100 μ M versus FK866 10 μ M + NR 100 μ M and FK 10 μ M versus FK866 10 μ M + NR 250 μ M.

4.2.3 Discussion

Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois dans le cœur les effets de la supplémentation en NR sur la fonction cardiaque dans le contexte de la CMD induite par la délétion de SRF. De façon très encourageante, nous avons démontré que le NR permettait de prévenir l'altération des paramètres fonctionnels cardiaques mesurés par échocardiographie. La fraction d'éjection du ventricule gauche est ainsi moins diminuée chez les animaux SRF^{HKO} ayant été supplémentés avec la vitamine, et les animaux ont été complètement protégés contre la dilatation cardiaque et l'amincissement des parois du ventricule gauche, préservant ainsi le ratio h/r (épaisseur des parois du VG sur rayon du VG en systole) qui est normalement réduit dans le contexte de la CMD.

Cette amélioration fonctionnelle passe par une protection du métabolisme du NAD. Nous avons montré que comme dans d'autres modèles d'insuffisance cardiaque, le taux de NAD est réduit dans le cœur des animaux SRF-HKO, et que le NR permettait de compenser efficacement cette chute pour maintenir le taux de NAD à un niveau normal. De manière intrigante, nous avons montré que la kinase NMRK2 était induite chez le modèle SRF^{HKO} dès 8 jours après injection de tamoxifène, à un stade encore complètement asymptomatique sur le plan fonctionnel. Cette activation transcriptionnelle se poursuit pour atteindre à 45 jours, lorsque la cardiomyopathie est bien installée, un niveau d'expression équivalent à 40 fois celui retrouvé chez des animaux contrôles. En parallèle, la NAMPT, qui est l'enzyme classiquement responsable de la majorité de la production de NMN à partir du précurseur NAM, voit son niveau d'expression réduit. En interrogeant la base de données *Gene Expression Omnibus* (GEO) nous nous sommes aperçu que l'expression de NMRK2 était également induite dans d'autres modèles de cardiomyopathies liées à des mutations dans les gènes de la lamine A (Muchir et al., 2007), de l'isocitrate déshydrogénase 2 (Akbay et al., 2014), ou PGC-1 α (Martin et al., 2014) par exemple. La NAMPT a également été décrite comme réduite dans plusieurs modèles de stress cardiaque (Hsu et al., 2014). Ces observations ont toutes été faites chez des modèles murins, mais nous montrons dans cette étude qu'une transition similaire est induite dans le cœur chez des patients insuffisants, avec une réduction de l'expression protéique de la NAMPT et une induction de la NMRK2. Si l'on

considère l'hétérogénéité relative entre ces différents modèles et le fait que ce mécanisme est également retrouvé chez l'homme, on peut se permettre de considérer que cette transition d'une voie de synthèse médiée préférentiellement par la NAMPT à une voie de synthèse médiée par la NMRK2 est un mécanisme commun d'adaptation dans le cœur insuffisant.

L'activation de la voie de biosynthèse du NAD⁺ à partir du NR plutôt que par le NAM dans les conditions de déficit énergétique que l'on sait associées à l'insuffisance cardiaque peut s'expliquer par la différence de coût énergétique que nécessitent ces deux voies pour la production d'une molécule de NAD⁺. La synthèse à partir du NR ne nécessite en effet que 2 molécules d'ATP, alors que celle à partir du NAM nécessite 4 molécules d'ATP car elle nécessite en plus 2 ATP pour la formation du phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) dont a besoin la NAMPT pour former le NMN. Ainsi, ce mécanisme serait une réponse adaptative pour épargner au cœur une consommation énergétique trop importante.

J'ai participé à démontrer dans cette étude que l'inhibition pharmacologique de la des voies de biosynthèse du NAD⁺ *via* la NAMPT par traitement à la FK866 chez des cardiomyocytes de rats nouveau-nés induisait une déplétion sévère du taux de NAD⁺ cellulaire, associée à une forte induction de l'expression de la kinase NMRK2 sans modification de l'expression de NMRK1, comme observé *in vivo* en conditions de stress énergétique. En accord avec cette hypothèse, l'étude montre que le promoteur du gène *Nmrk2* est sensible à l'activation de la voie AMPK, soit par l'AICAR qui sous sa forme phosphorylée est un agoniste de l'AMP activateur allostérique de l'AMPK, soit *via* le stress énergétique induit par l'inhibition de la NAMPT et la chute du NAD qui s'ensuit ou encore l'inhibition de la Créatine Kinase. Dans les conditions basales où la NMRK2 n'est pas activée, le traitement au NR n'a que peu d'effets sur les taux de NAD⁺. En revanche, lorsque les cellules sont déplétées par traitement à la FK866, nous avons démontré que le traitement au NR permettait de préserver le taux de NAD⁺, ce qui suggère que cette voie NMRK2 n'est activée et nécessaire au maintien du taux de NAD⁺ qu'en conditions de stress énergétique où la voie principale de la NAMPT est altérée, et corrobore les observations *in vivo* dans le contexte de l'insuffisance cardiaque.

Les analyses métaboliques que j'ai réalisées dans cette étude pour étudier le métabolisme oxydatif mitochondrial et de la glycolyse ont montré que le NR n'avait pas d'impact direct sur l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale chez des cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture, mais qu'il était capable de stimuler la glycolyse de façon dose-dépendante. La FK866, en inhibant la NAMPT et déplaçant les taux de NAD⁺ intracellulaires inhibe la respiration mitochondriale et la glycolyse. Mais de façon surprenante, la supplémentation en NR dans ces conditions permet de restaurer les capacités glycolytiques à un niveau équivalent à des cellules non traitées, mais pas la respiration mitochondriale qui reste altérée, à des doses de NR que nous avons pourtant identifiées comme étant suffisantes pour restaurer complètement les taux cellulaires NAD⁺. Pourquoi cette différence ? Une des hypothèses que soulève ces observations est celle de la compartimentation de la signalisation du NAD. En effet, il est possible que le NAD ne soit pas réparti uniformément dans les cellules mais qu'il existe différents *pools* répartis dans les différents compartiments cellulaires comme le noyau, le cytoplasme et les mitochondries. S'il est probable que le NAD puisse passer librement à travers les pores nucléaires et qu'il soit ainsi globalement à l'équilibre entre le cytoplasme et le noyau, il ne pourrait pas passer à travers la membrane interne mitochondriale (Liana Roberts Stein & Imai, 2012), même s'il existe un mécanisme de transfert des équivalents réducteurs entre cytosol et matrice mitochondriale *via* les navettes malate/aspartate et glycerol-3-phosphate. Il est donc envisageable que si les taux cellulaires globaux du NAD ne soient pas altérés comme on le montre ici, il y ait toutefois des différences de répartition du NAD produit à partir du NR entre le cytosol et la mitochondrie, ce qui pourrait expliquer pourquoi le NR est capable de stimuler la glycolyse en conditions basales et de compenser sa chute après déplétion des taux de NAD, alors qu'il ne restaure pas l'altération de la respiration mitochondriale.

Une autre hypothèse pour expliquer ces différences serait que, sur le même principe que le système des CK qui forment des complexes localisés pour produire localement l'ATP au niveau des sites consommateurs comme au niveau des sarcomères, la NMRK2 ou la kinase NMRK1 soient localement associées dans le cytosol aux complexes glycolytiques. Ainsi, le NR supplémenté serait préférentiellement transformé en NMN pour donner du NAD à proximité des enzymes qui le consommeraient directement pour faire tourner la glycolyse.

4.3 Rôle de la kinase NMRK2 dans le cœur à l'état basal

4.3.1 Introduction

Comme nous l'avons montré précédemment, la kinase NMRK2 semble être activée dans un mécanisme de préservation de l'énergétique cardiaque dans le cœur insuffisant. Cependant, cette protéine est très peu exprimée à l'état basal, et sa fonction dans le muscle cardiaque n'a encore jamais été décrite. Les kinases NMRK ont été identifiées pour la première fois chez la levure par l'équipe de C. Brenner, qui a été la première à identifier le NR comme nouveau précurseur du NAD⁺ (Bieganowski & Brenner, 2004). Depuis, de rares études ont cherché à comprendre le rôle de ces kinases dans différents tissus chez les mammifères, mais rien n'est encore connu sur leur fonction dans le cœur.

Dans cette étude du laboratoire et à laquelle j'ai participé, nous avons cherché à déterminer le rôle de NMRK2 dans le cœur à l'état basal, et son implication dans la signalisation du NAD ainsi que la part qu'elle occupe dans celle-ci en regard de son homologue NMRK1. Pour cela, nous avons généré un modèle murin d'inactivation de NMRK2, dont nous avons suivi la fonction cardiaque par échocardiographie, et analysé au cours du vieillissement les taux de NAD et l'expression de gènes et protéines impliqués dans le métabolisme du NAD.

4.3.2 Résultats

Cette étude en cours de finalisation fera l'objet d'une publication prochainement dans laquelle je suis 2^{ème} auteur. J'ai contribué à ces travaux en réalisant des dosages des taux de NAD et des analyses d'expression de gènes en RT-qPCR.

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

Cynthia Tannous^{1, 2}, Robin Deloux¹, Nathalie Mougenot³, Mélanie Gressette¹, Nicolas Diguët², Jocelyne Blanc², Dean Burkin⁴, Gareth Lavery⁵, Dario Coletti², Zhenlin Li², Mathias Mericskay^{1, ¶}

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

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

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

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

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

¶Corresponding author: mathias.mericskay@inserm.fr

ABSTRACT

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

INTRODUCTION

Dilated Cardiomyopathy (DCM) is a severe heart disease characterized by the dilation of the left and right ventricles leading to a systolic dysfunction and reduced ejection fraction, without hypertension or pressure overload or coronary artery disease sufficient to cause global systolic impairment [1, 2]. DCM most often leads in its final stage to heart failure (HF) and is the principal cause of heart transplantation in the western world [3]. The lack of specific therapeutic options for DCM patient drives the need for further research on the molecular mechanisms involved in the remodeling of cardiac chamber and the transition toward HF. There are genetic and non-genetic causes to DCM. Mutations in genes encoding mostly cytoskeletal or sarcomeric proteins, have been identified in monogenic forms of DCM though modern high-throughput sequencing approaches suggest that multiple gene variants may be involved in some cases [2, 4]. Non-genetic causes are linked to exposure to toxins such as alcohol or anthracyclines, or enteroviral infection (myocarditis) but the susceptibility to develop DCM is likely to be modulated by genetic mechanisms [2].

A common feature for DCM is the combination of cardiac structural remodeling, which involves major alterations in cardiomyocytes shape and connection with the extracellular matrix (ECM); and metabolic remodeling, which involves mitochondrial dysfunction and depressed energy transfer through the creatine-phosphocreatine shuttle [5, 6]. Several gene expression profiling studies have shown that these defects are associated with major changes in the expression level of cardiac genes encoding sarcomeric proteins, cytoskeleton linkers and components of the plasma membrane complexes like the integrin receptors and the dystrophin-glycoprotein complex connected to the extracellular matrix (ECM) [7, 8]. Genes encoding proteins involved in the regulation of energy metabolism and mitochondrial oxidative metabolism are also clearly depressed in DCM [9].

With the aim of identifying pathways common to different forms of DCM, we searched in publicly available transcriptomic data sets analyzing cardiac gene expression. We identified a gene that has two names in different databases, integrin β 1 binding protein 3 (*Itgb1bp3*) or nicotinamide riboside kinase 2 (*Nmrk2*, official symbol), which is very strongly upregulated in

several animal models of DCM with different etiologies. *Nmrk2* expression is increased in models of DCM related to mutations in genes coding phospholamban [9], lamin-A (GEO dataset GDS2746) [10], isocitrate dehydrogenase 2 (GDS4893)[11], cardiac-specific PPAR coactivator 1-alpha (PGC1 α) (GDS4776) [12], or transferrin receptor Tfr1 (GDS4776) [13]. In our own model of Serum Response Factor cardiac-specific knock-out mice that develop a severe DCM phenotype evolving to terminal HF, *Nmrk2* is strongly upregulated up to 30 fold ([GSE84142](#))[14]. Our examination of recent RNA-seq studies on cardiac biopsies of DCM patients revealed that *Nmrk2* can be upregulated in some individuals though the baseline expression level appears to be higher in human non failing hearts [15].

The first identification of this gene and functional analysis of the protein product of *Itgb1bp3*, the muscle integrin binding protein (MIBP) came from a yeast two-hybrid screen for β 1 integrin cytoplasmic tail [16]. MIBP interacts specifically with the α 7 β 1 integrin heterodimer and its overexpression stimulates, via an unknown mechanism, the phosphorylation of paxillin, another integrin binding protein, and inhibits the deposition of laminin in the ECM [17]. Strikingly a mutation of the *Nrk2b* gene, the homologue in zebrafish of mammalian *Nmrk2/Itgb1bp3* gene, also causes a defect in the deposition of laminin and abnormal muscle morphology [18]. The human *NMRK2* gene was identified in a conserved eukaryotic NAD⁺ biosynthetic pathway mediated by the nicotinamide riboside kinase gene *Nrk1* in yeast and *Nmrk1* and *Nmrk2* genes in humans. *NMRK2* was described as encoding a 230 amino acid (aa) splice variant of the previously described 186 aa MIBP protein [19]. While MIBP was unable to phosphorylate the nicotinamide riboside, a B3 vitamin precursor of NAD⁺, the full length *NMRK2* protein was as efficient as *NMRK1*. In the actual build of GenBank, the 186 aa MIBP variant is not described anymore, though a similar 150 aa splice variant (isoform 2) is now reported. The mouse *Nmrk2* gene is described as producing a single 195 aa protein that contains the catalytic domain present in human *NMRK1* and full-length human *NMRK2* proteins with whom it shares 83% identity.

Considering that *Nmrk2* was involved both in i) integrin signaling and extracellular matrix composition which are major altered mechanism in DCM [7]; ii) synthesis of NAD⁺, a major

coenzyme in the oxidation of energetic substrate and mitochondrial oxidative phosphorylation metabolism, and a co-substrate in signaling pathways such as Sirtuins deacetylases, poly(ADPribose) polymerases (PARPs), and CD38 ADPribose cyclase, regulating energy metabolism, resistance to oxidative stress and calcium signaling, which are all involved in cardiac remodeling^[20], we postulated that *Nmrk2* could play a role in the heart during development or in the adult. Here we present the first analysis of *Nmrk2* knock-out mice showing its important role in cardiac functions and remodeling during ageing.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic mice

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

SRF^{HKO} mice bear the tamoxifen-inducible α -MHC-MerCreMer transgene and the *Srffloxed* allele (*Sf/Sf*) as described previously¹⁹. Tamoxifen (Sigma T5648) was administrated by i.p. injection at a dose of 0.7 mg diluted in 100 μ l peanut oil at D0, D1 and D2 to *SRF^{HKO}* mice and *Sf/Sf* littermates used as controls.

Transverse aortic constriction (TAC)

Mice were anesthetized with 2% isoflurane. The neck was opened to release the trachea quietly and gently the skin is cut and the muscle above the trachea gently spread in order to visualize the trachea and to verify that the introduction of the intubation cannula is done correctly. Then the respirator is connected and switched on (about 170 strokes/minute and

V = 200 µl for 30g. TAC was created using 7.0 suture banded between the carotid arteries over a 27-gauge needle. The needle was then gently removed, creating a constriction. The heart accelerates immediately. The 27-gauge needle was then removed and a 6.0 suture was done. Following chest closing and skin suturing, mice were allowed to recover and continued with the experimental process.

Angiotensin-II administration

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

X-Gal staining

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

Nicotinamide Riboside supplementation

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

Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed on lightly anesthetized mice given isoflurane (induction with 2% isoflurane 100% O₂ and maintained with 0.5% isoflurane 1O₂). Non-invasive measurements of left ventricular dimension were evaluated using Doppler echocardiography (Vivid 7 Dimension/Vivid7 PRO; GE Medical Systems) with a probe ultrasound frequency range of 9–14 MHz. The two-dimensionally guided time motion recording mode (parasternal long-axis view) of the left ventricle (LV) provided the following measurements: diastolic and systolic septal (IVS) and posterior wall thicknesses (LVPW); internal end-diastolic (LVEDD) and end-systolic diameters (LVESD); and heart rate. Each set of measurements was obtained from the same cardiac cycle. At least 3 sets of measurements were obtained from 3 different cardiac cycles. LV fractional shortening (FS) was calculated using the formula: $(LVEDD - LVESD) / LVEDD \times 100$. LV myocardial volume (LVV), LV end-diastolic volume (EDV), and end-systolic volume (ESV) were calculated using a half-ellipsoid model of the LV. From these volumes, LV ejection fraction (EF) was calculated using the formula: $(EDV - ESV) / EDV \times 100$.

RNA Extraction and Quantification

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

Western Blot Analysis

Proteins were homogenized in a lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.4) containing protease inhibitors (1mM Phenylmethylsulfonyl fluoride, 5mM EDTA, E64, Aprotinin) and phosphatases inhibitors (1mM Sodium Orthovanadate, 40 mM β-Glycerophosphate, 30mM NaF, 20 mM Sodium

pyrophosphate). Equal amounts of proteins (20 to 30 μg) were separated on one-dimensional PAGE using the NuPAGE[®] Novex[®] 4–12% Bis-Tris Bolt Gel from [Invitrogen](#) according to the manufacturer's instructions. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond C, Amersham Biosciences) and the blots were saturated in TBS buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 136.8 mM NaCl, and 0.1% (v/v) Tween 20) containing 5% (w/v) milk. Proteins were detected by overnight incubation at 4°C with primary antibodies, followed by HRP-labeled secondary antibodies (1:2500) and then exposed to ECL (OzymeRevelBlot[®] Plus) and scanned on FUJIFILM LAS3000 systems.

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

Immunofluorescence staining

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

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

NAD extraction and quantification

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

NAD⁺ and NADH are indistinctly detected in the NADt fraction. Levels of NADH were obtained by the formula: $[NADH] = [NADt] - [NAD^+]$. Data are expressed in pmole of NAD / mg of tissue.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

For transmission electron microscopy, the cells were washed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 and fixed in 2% glutaraldehyde for 1 h at room temperature. The samples were first washed in 0.1 M phosphate buffer and then in bidistilled water and finally post-fixed in 1% osmium-bidistilled water for 1 h at room temperature. After washes in bidistilled water, the samples were dehydrated in increasing concentrations of ethanol, infiltrated in 1:1 ethanol:epon resin for 1 h and finally 100% epon resin for 48 h at 60 °C for polymerization. Seventy-nm-thick sections were cut with an ultracut UCT microtome (LEICA) and picked up on copper rhodium-coated grids. Grids were stained for 2 min in Uranyless (DELTA Microscopies) for 5 min in 0.2% lead citrate. Grids were analysed on an electron microscope (EM 912 OMEGA, ZEISS) at 80 kV, and images were captured with digital camera (Side-Mounted TEM CCD, Veleta 2kx2k). The software used is iTEM.

RESULTS

Nmrk2 is a striated muscle specific protein

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

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

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

To assess cardiac functions in the *Nmrk2-KO* mice, we performed echocardiography in adult mice at 2 months of age. We observed no differences in left ventricle ejection fraction (LVEF) and cardiac chamber dimensions in systole or diastole (**Table 1A**) at this age. *Nmrk2* is also known under the name of MIBP, or Itgb1p3, as a binding protein of integrin $\beta 1$. Integrin $\beta 1$ or its partners such as melusin (Itgb1bp2) play an important role in the transduction of biomechanical stress in the heart, especially in the context of hemodynamic loading leading to pressure-overload hypertrophy^[23, 24]. To assess the role of NMRK2 kinase in this context, we performed transverse aortic constriction (TAC) in *Nmrk2-KO* mice and compared the response to control mice subjected to the same procedure and followed the mice by echocardiography over a period of 8 weeks (**Table 1A and 1B**). We performed this experiment at 2 month of age when the response to TAC is maximal. There was no difference in mortality between the two groups of mice until 6 weeks. ANOVA statistics indicated a significant genotype effect of TAC on left ventricle ejection fraction (LVEF) and most cardiac remodeling parameters, notably the increase in LV mass index (LVMI) and LV posterior wall thickness (LVPWT) but not for the

transient increase of the interventricular septum thickness (IVST) that occurred at 2 weeks after TAC in both groups. The continuous trend over the survey period was that TAC triggered a more pronounced decrease in LVEF and increase in dilatation and thinning of the LV in *Nmrk2-KO* mice than in control mice.

In order to compare the response of *Nmrk2-KO* and controls hearts to the TAC procedure at the cellular and molecular level, we selected the stage of 2 weeks post-TAC, when the controls develop concentric cardiac hypertrophy whereas the KO mice develop a more eccentric type of cardiac remodeling. Echocardiography analysis on this second series of mice reproduced the results obtained in the first series (**Table 2**). After sacrifice, the hearts were weighted and processed for histological examination as well as mRNA, protein and metabolites extraction. The heart weight/body weight ratio was increased in both groups subjected to TAC compared to controls and *Nmrk2-KO* mice subjected to sham surgery (**Fig. 2A**). Immunostaining with anti-laminin $\alpha 2$ antibody allowed delineating cardiac fibers contours to perform histomorphometric analyses (**Fig. 2B**). The mean cross-sectional area (CSA) and diameter of cardiomyocytes (LV endomyocardium) was increased in WT and *Nmrk2* KO mice following TAC compared to baseline but did not differ between the two groups (**Fig. 2C, D**). Frequency plot of cardiomyocytes CSA showed the decreased frequency of small to intermediate size cardiomyocytes and increased frequency of large cardiomyocytes in control and *Nmrk2-KO* mice subjected to TAC (Chi2 p value = 5.13E-08 and 3.28E-05 for controls TAC versus baseline and *Nmrk2-KO* TAC versus baseline, respectively) but no difference between the two TAC groups (**Fig. 2E**). TAC procedure increased the expression of cardiac stress markers to a similar extent in control and *Nmrk2-KO* mice (**Fig. 2F**). TAC increased the level of *Nmrk2* mRNA in control mice but decreased the expression of *Nmrk1* (**Fig. 2G**). TAC repressed *Sirt1* expression level in both genotypes (**Fig. 2H**). Changes in *Nampt* and *Sirt3* expression were not significant (**Fig. 2G, H**). Despite the modulations in *Nmrk2* and *Nmrk1* expression, myocardial NAD levels were unchanged in TAC compared to SHAM groups. TAC has been reported to recruit integrin and MAPK signaling^[24] and *Nmrk2* level has been linked to paxillin phosphorylation status in C2C12 skeletal myotubes^[17]. TAC increased ERK1/2 phosphorylation, a target of MAPK signaling and decreased paxillin phosphorylation

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

Nmrk2 mutants develop dilated cardiomyopathy with ageing

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

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

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

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

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

We observed a decrease in the expression of *Nmrk2* with age in control mice. Levels of the mRNAs of the genes encoding *Nmrk1* and *Nampt* were also reduced during aging and were moderately increased in the mutant at 12 and 24 months (Fig. 5A). The levels of *Sirt1* and *Sirt3* decreased similarly in both groups with age (Fig. 5B). To determine the contribution of *Nmrk2* in maintaining cardiac total NAD levels (NADt = NAD⁺ + NADH), we measured the NAD concentration in metabolite extracts of control and *Nmrk2-KO* hearts at the ages of 4, 12 and 24 months. The results showed a 50% NADt loss in the heart of *Nmrk2-KO* mice compared to controls at 24 months (Fig. 5C). This loss in the global pool of NAD reflected a similar trend to lower NAD⁺ and NADH levels at 24 months, though there was more individual variation in the respective percentage of oxidized and reduced NAD at 24 month than at 4 months.

To test whether NMRK2 could be required to boost NAD⁺ synthesis in the heart in response to nicotinamide riboside (NR) administration, we provided NR in drinking water (2 mg/ml, i.e. 400 mg/kg/day for a 30 g mouse) during 40 days to control and *Nmrk2-KO* mice at 7 months when *Nmrk2* is still expressed. We compared myocardial NAD levels to NAD levels in the liver that

express NMRK1^[26]. NR increased hepatic NAD⁺ and NADH levels, so total NADt level, by ~193% in the control group and ~174% in the mutants (**Supplementary Fig. S4**), confirming the efficiency of the NR-enriched diet. However, NR did not increase myocardial NAD levels in controls or *Nmrk2-KO* mice.

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

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

observed the presence of large collagen fibers in the extracellular space that were not observed in the controls (Fig. 7G, H).

DISCUSSION

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

Role of *Nmrk2* in NAD biosynthesis

NMRK kinases phosphorylate NR to generate NMN, an immediate precursor of NAD⁺ in the pathway. We found that the lack of NMRK2 does not affect the steady-state level of NAD⁺ or NADH in the myocardium at baseline in young adults and that NR supplementation does not increase significantly myocardial NAD level in control expressing NMRK2. Similarly, there was no reduction at baseline in tissue NAD levels in the mice knocked out for the more ubiquitously expressed gene *Nmrk1*, as measured in the liver, brown adipose tissue (BAT), kidney and skeletal muscles [26]. However, these authors showed that NR supplementation does increase NAD levels in these tissues as we found in our own experiment in the liver. The increase in NAD⁺ levels in these tissues following NR treatment is only partially blunted in absence of NMRK1 [26]. The lack or extremely low level of NMRK2 in these non-muscular tissues and conversely the very low level of NMRK1 in the heart seems to limit the possibility of

compensation of one enzyme by the other. Another, non exclusive hypothesis is that a part of the NR that is administrated systematically is converted to alternative NAD⁺ precursors such as NAM by the purine nucleoside phosphorylase and NAM is efficiently transformed into NMN precursor by the NAMPT enzyme, a major rate-limiting enzyme in mammals [27]. Moreover the tryptophane-kynurenin pathway and the nicotinic acid pathway provide additional sources of NAD⁺ precursors[28]. Hence it is clear that NMRK enzymes are not essential for NAD maintenance in young healthy adults. However, we found, that the expression of *Nmrk1*, *Nmrk2* and especially *Nampt* strongly decline with ageing in the heart at 24 months. This observation revealed the necessary contribution of NMRK2 kinase to the maintenance of NAD levels in the heart at 24 months that were reduced by 50%. This finding opens interesting perspectives for the future treatment of age-associated cardiac diseases as loss of NAD⁺-dependant sirtuin activity has been involved in aging and diseases[29].

Role of NMRK2 in laminin deposition and integrin stabilization

Overexpression of MIBP in skeletal myoblasts^[17] and knock-out of *Nrk2b* gene in zebrafish embryo ^[18] have both been shown to impact on laminin deposition in the basal membrane of muscle cells. In this study, we found that an aberrant pattern of laminin organization in the extracellular matrix of the myocardium is one of the earliest defects that we can observe in the mouse *Nmrk2-KO* model, suggesting a conserved function for this gene through evolution. The expression of *laminin α2* gene, which is the predominant isoform in the basal membrane of cardiomyocytes, is developmentally regulated in both human and rodents. Its relative level increases rapidly after birth to follow normal cardiomyocyte growth and then decreases progressively to adulthood. During the development of cardiac hypertrophy and failure, the imbalance between the increased size of myocyte and the steady state or decreased level of laminin-α2 chain might contribute to the altered sarcolemma properties in the failing heart^[30]. A thickening of the laminin layer has been described in the rat heart in isoproterenol-induced cardiac failure, and during hypertrophy induced by myocardial infarction ^[31]. We observed a similar defect in the laminin organization in the young *Nmrk2-KO* after TAC and during late

postnatal maturation of the heart between 3 to 4 months when their heart start to dilate and systolic function decreases. Interestingly, mutations in the laminin- α 2 gene, which are essentially associated with a phenotype of muscular dystrophy^[32] can also be associated with DCM phenotype in some patients^[33, 34].

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

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

mechanisms that relate to AMPK signaling and integrin post-translational glycosylation can probably be extended to other cell types in the future^[3].

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

Funding

This research was supported by a grant from the Association Française contre les Myopathies (AFM), project MUSCLE-MINDS. C.T was supported by a joint PhD Fellowship from UPMC University and Collège des Ingénieurs. The laboratory UMR1180 is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-LABX-33

Acknowledgement

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

REFERENCES

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

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

LEGENDS

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

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

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

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

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

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

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

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

Figure 6. Membrane and extracellular matrix organization

(A) RT-qPCR analysis of integrins and melusin mRNA s from control and *Nmrk2-KO* mice at the age of 6, 12 and 24 months. (B) Frozen heart sections from 6 month-old control and mutant mice were incubated with an antibody directed against total laminin. Top panel, low magnification, bar = 50 μM. Bottom, high magnification, bar = 20 μM. Note how the laminin staining delineates a thin linear basal lamina in controls (arrowheads) whereas it spreads on a thicker disorganized area in the mutant (arrowheads). (C) Endomyocardium cross sections of 24 month-old control and *Nmrk2-KO* mice stained with anti-integrin α7 antibody. (D) LV posterior wall longitudinal sections of the same mice co-labelled with anti-integrin α7 and vinculin for intercalated disks. Note the thicker intercalated disks in the KO. Bar = 20 μm. (E) Western blot showing integrin α7 expression in the heart of control and *Nmrk2-KO* mice at 4, 12, and 24 months age. GAPDH was used as loading control.

Figure 7. Histological analysis and ultrastructural analysis of cardiac muscle

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

observed in *Nmrk2-KO* sections but not in controls. Inset graph: quantification of the space between cardiomyocytes (Image J fit ellipse plugin) shows that the intercellular space between adjacent cardiomyocytes (black bar) in the *Nmrk2-KO* heart is twice as large as between the cardiomyocyte in controls (white bar). Data are presented as means \pm SEM. Student test was applied to calculate p value * $p \leq 0.05$.

SUPPLEMENTARY DATA

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

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

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

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

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

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

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

Figure S6. Integrin β 1 immunostaining

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

Fig. 1

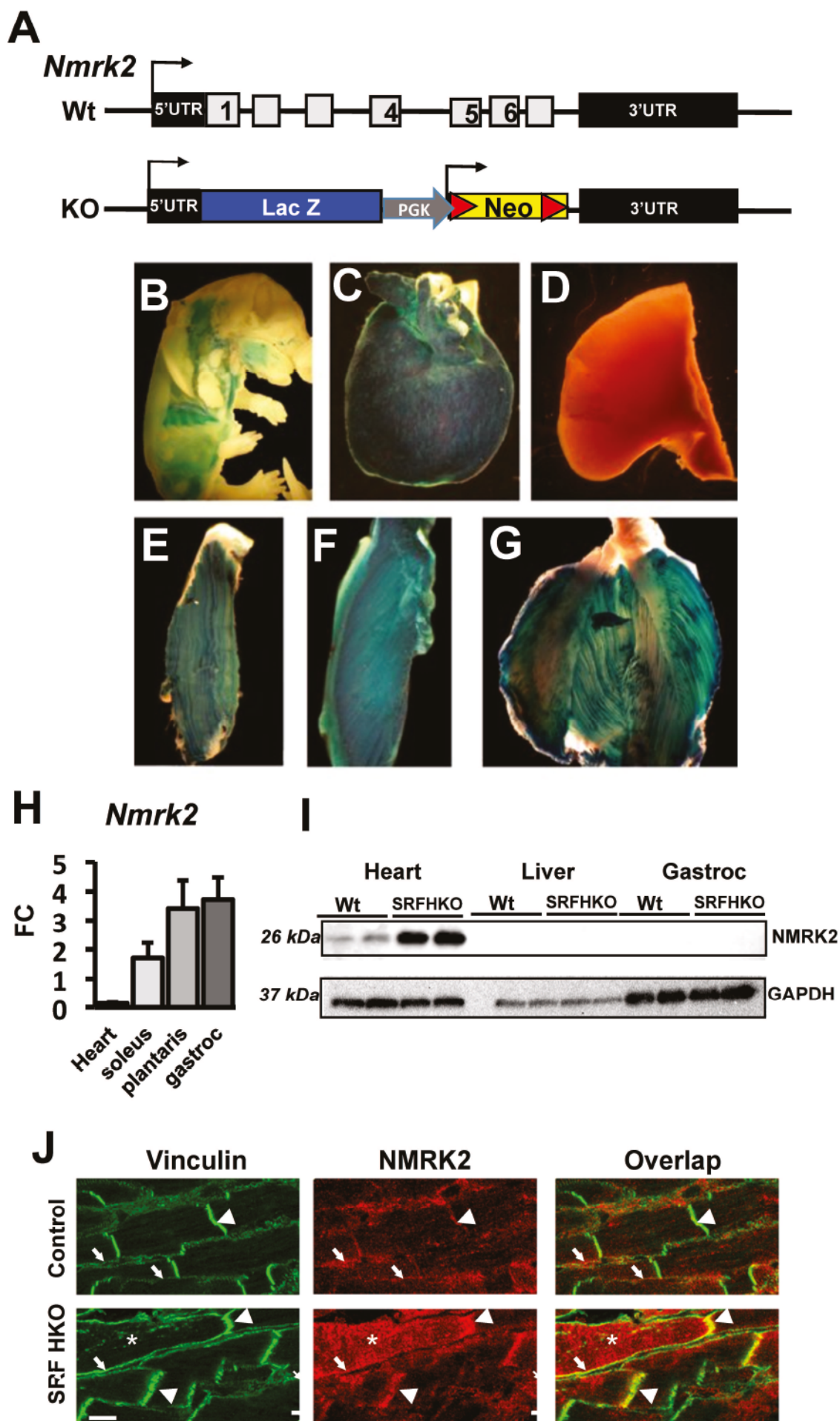


Fig. 2

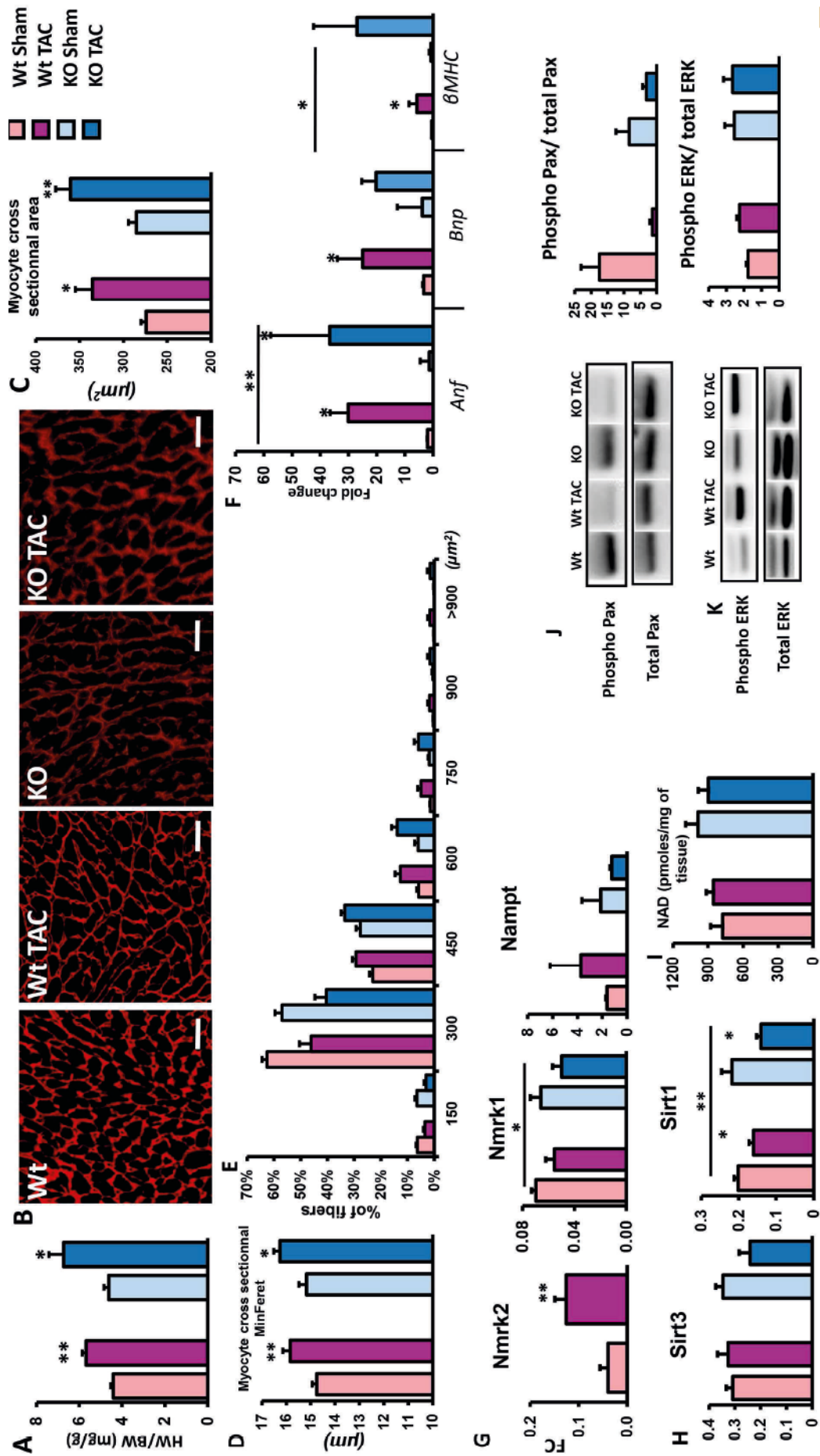


Fig.3

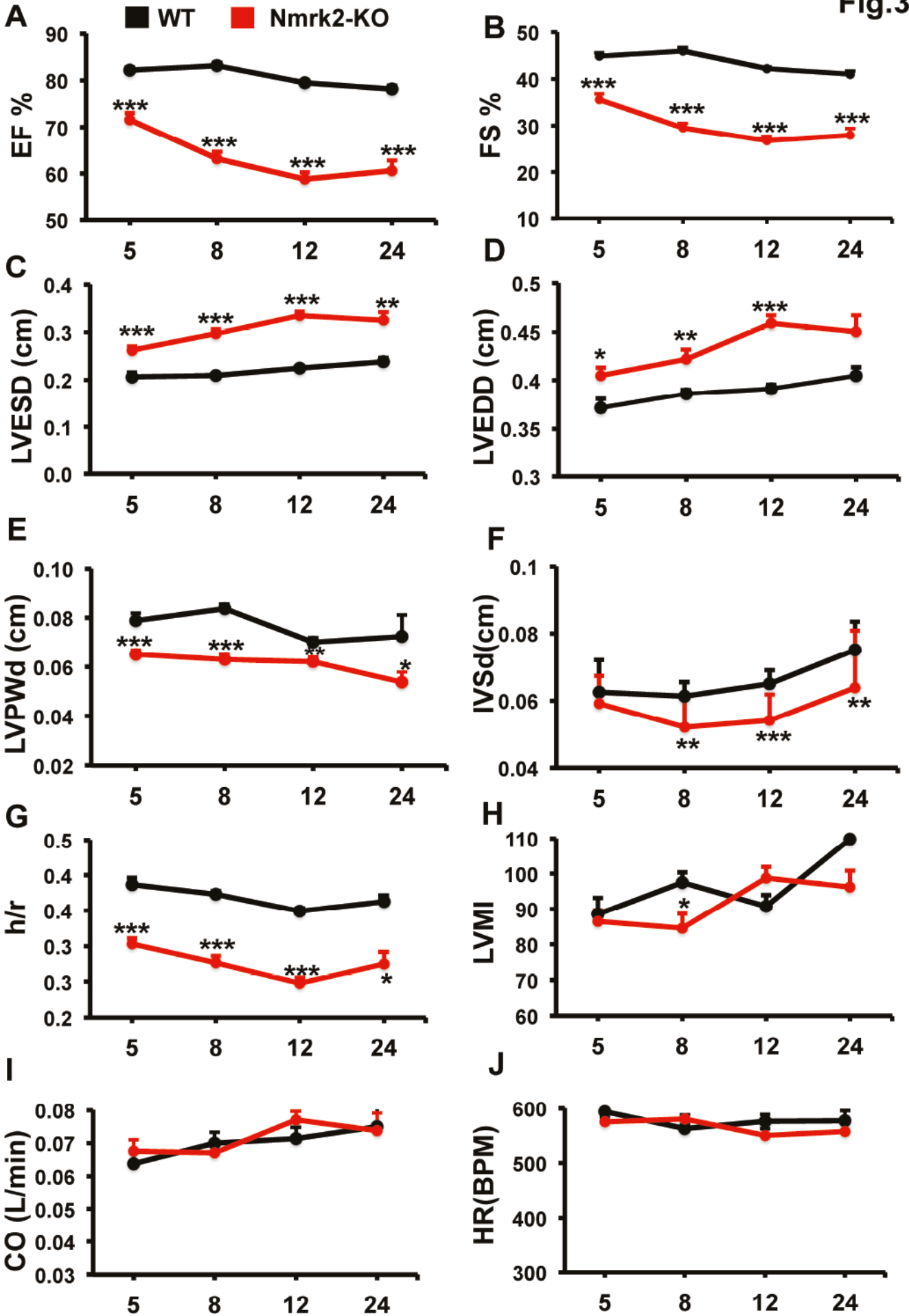


Fig.4

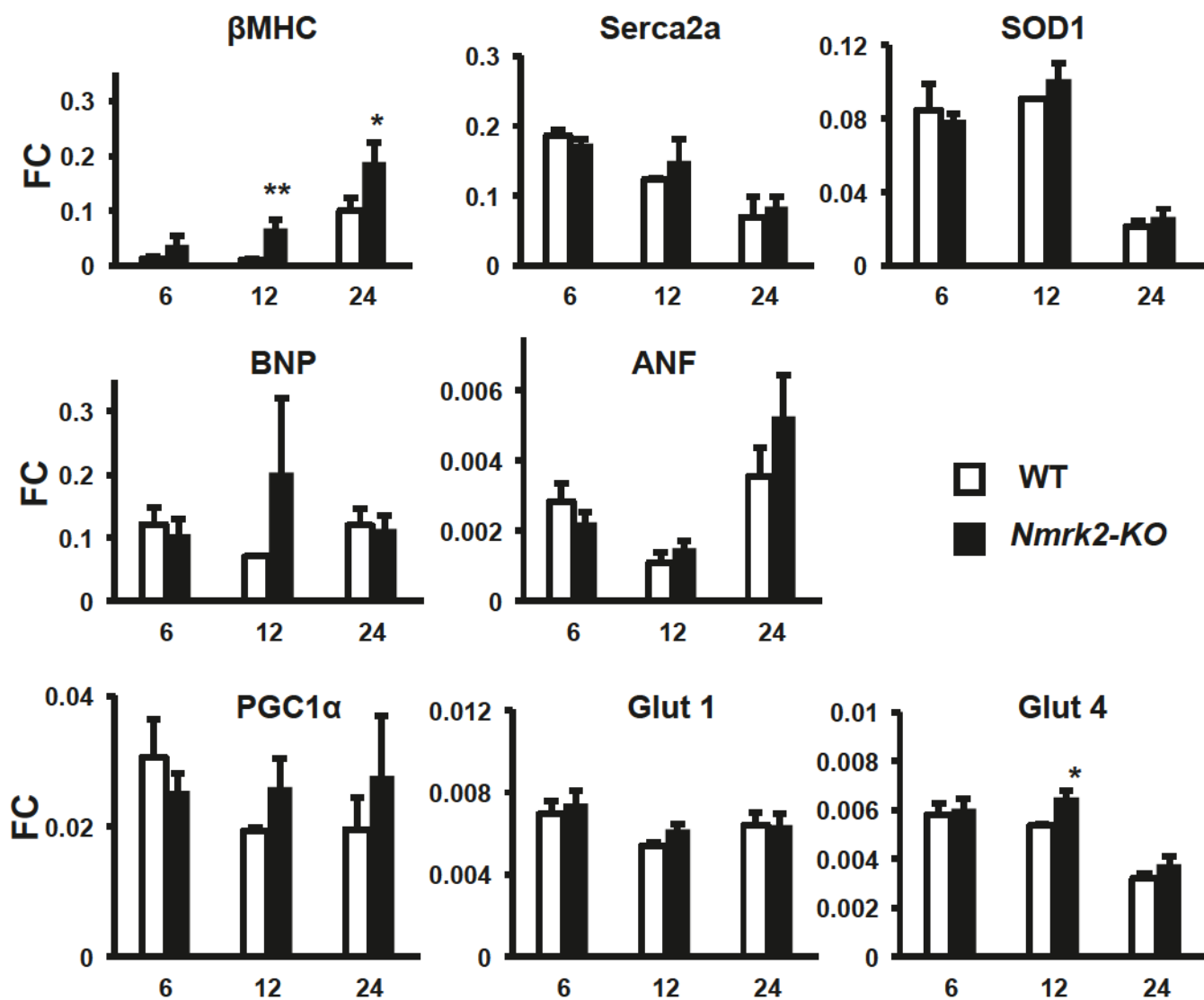


Fig.5

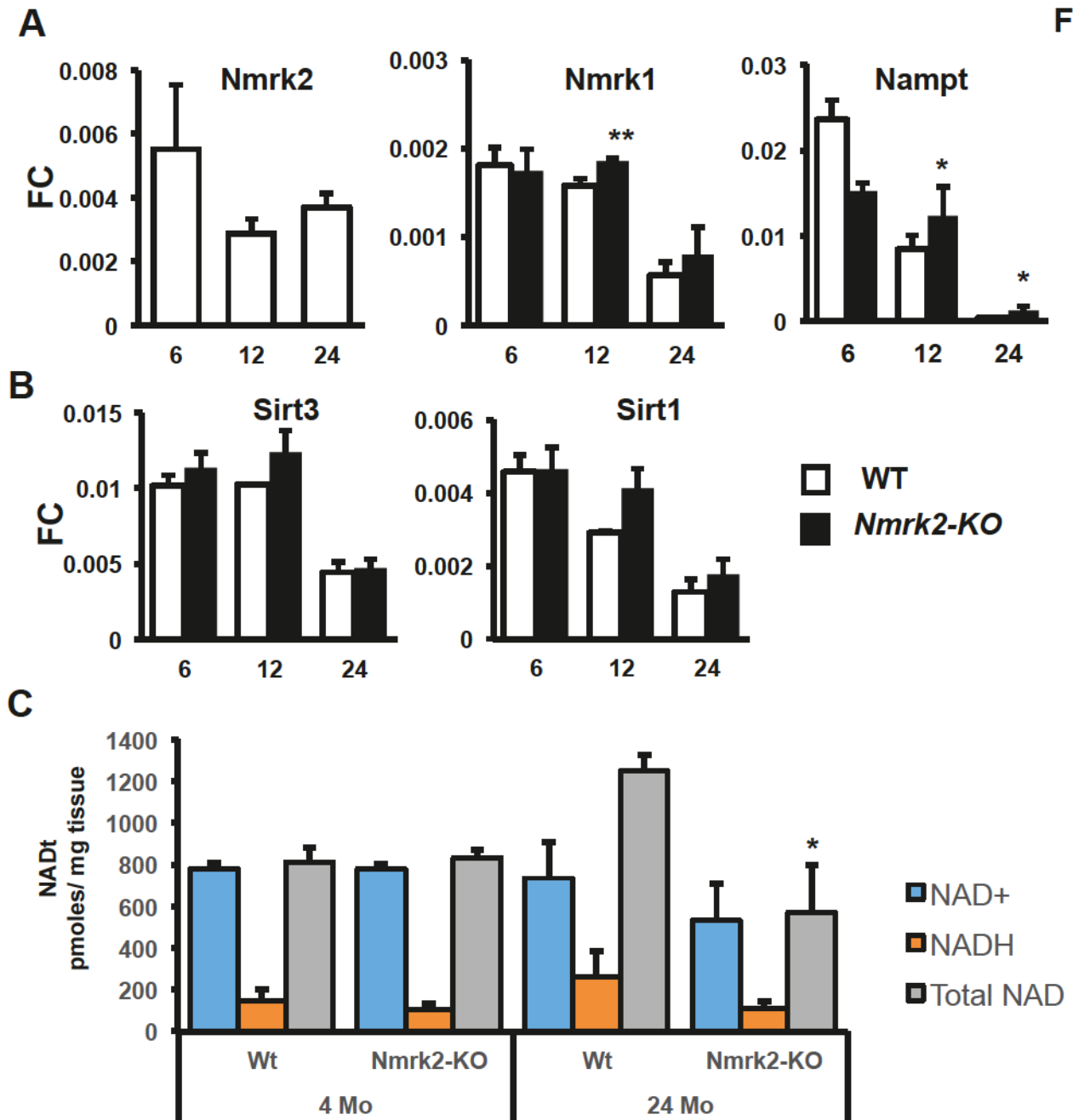


Fig.7

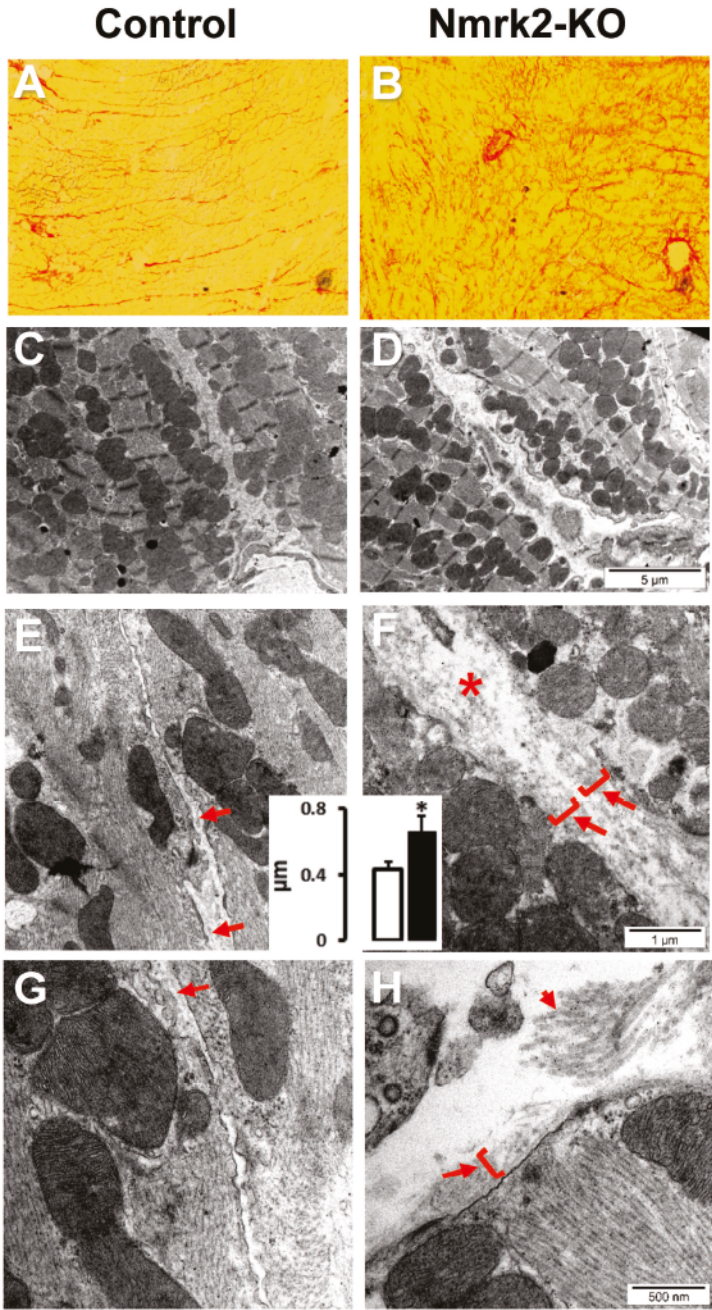


Fig.S1

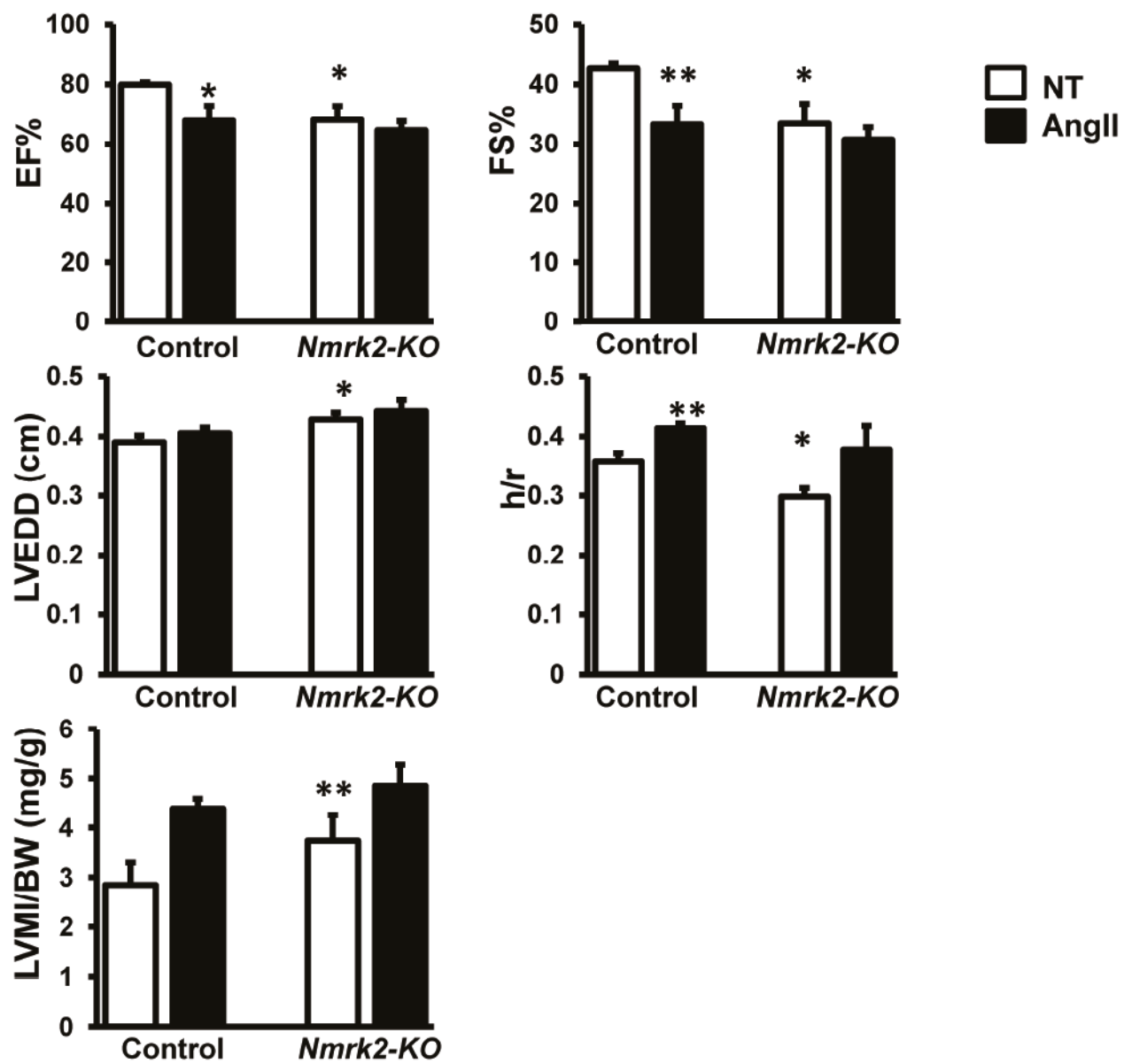


Fig.S2

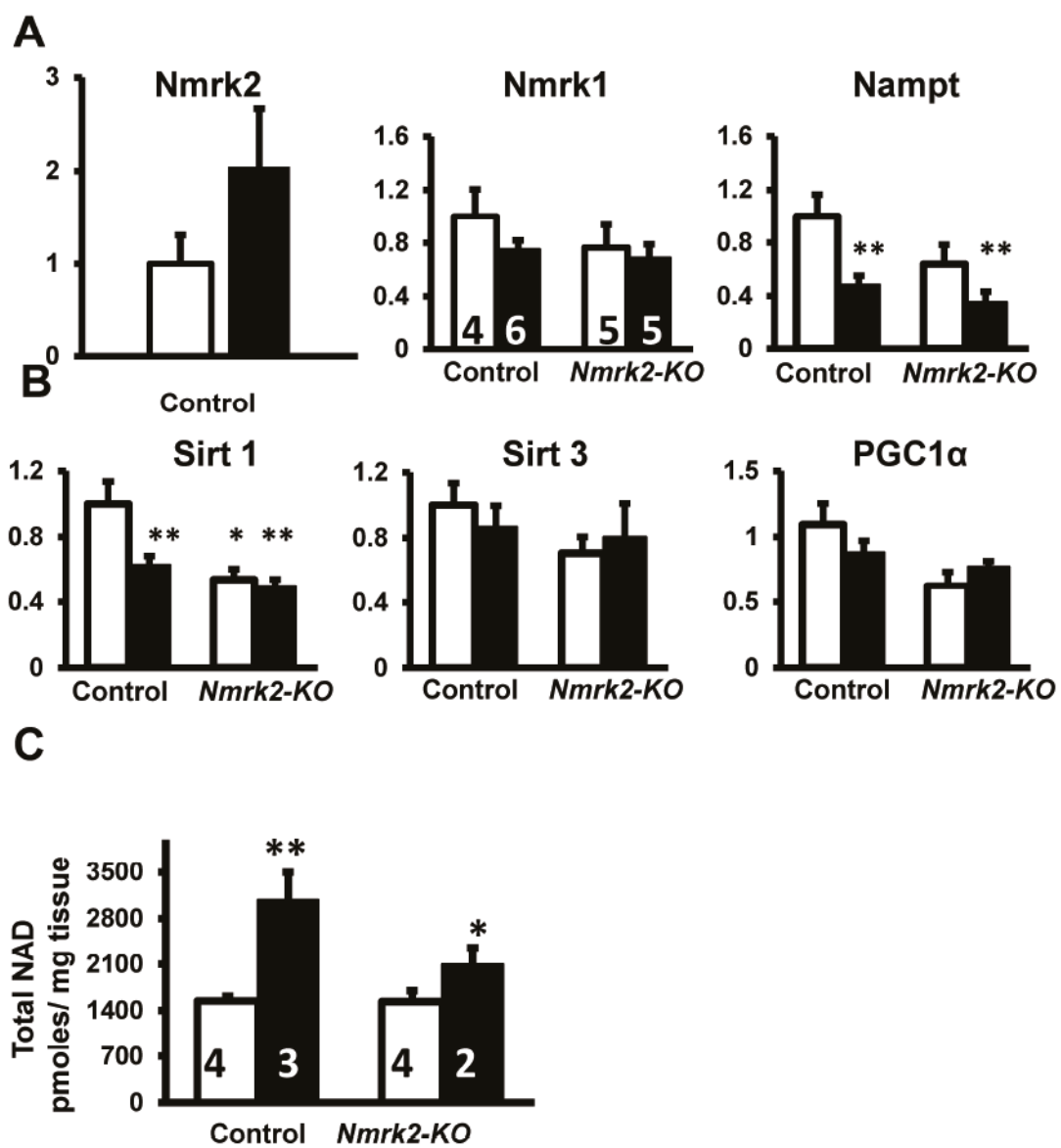


Fig.S3

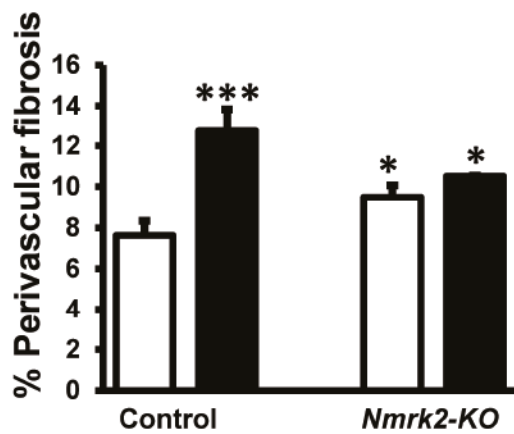
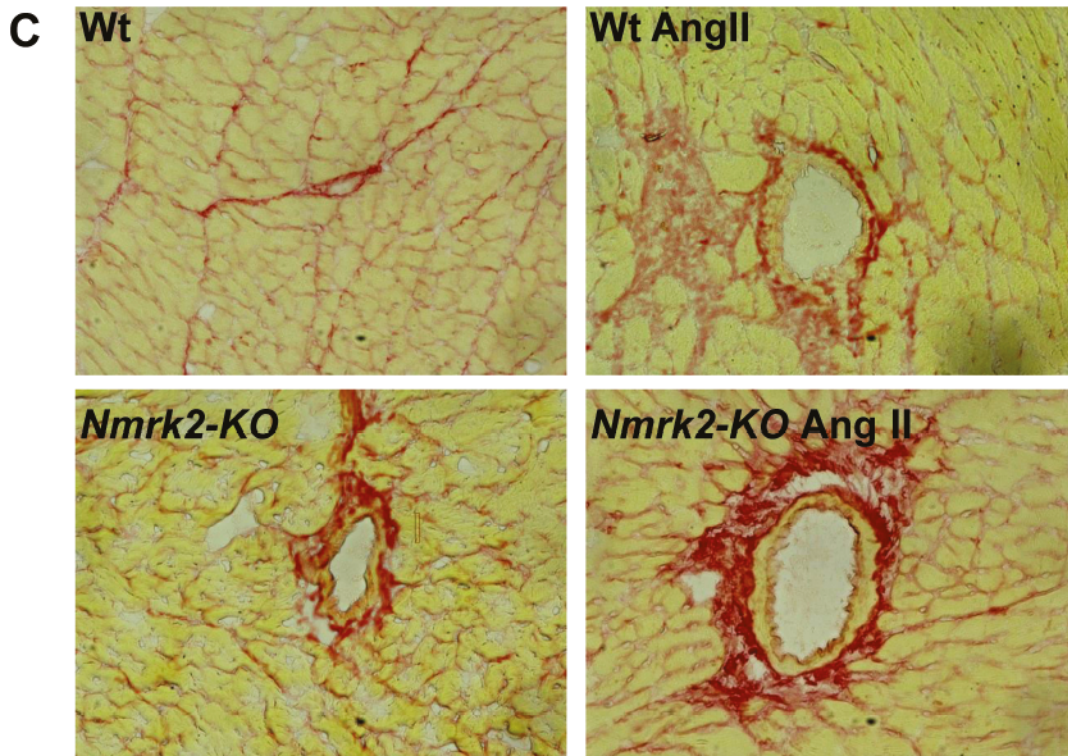
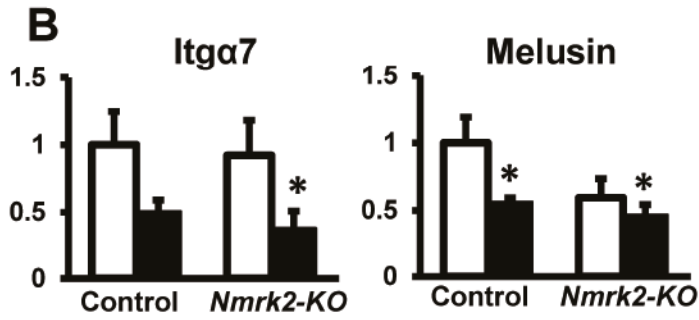
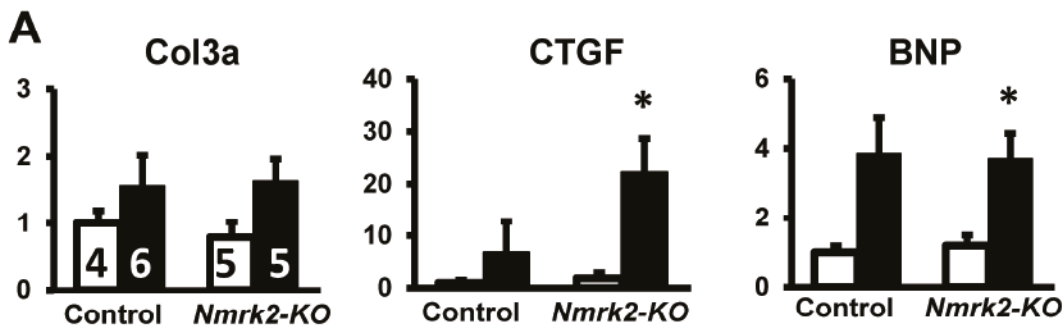


Fig.S4

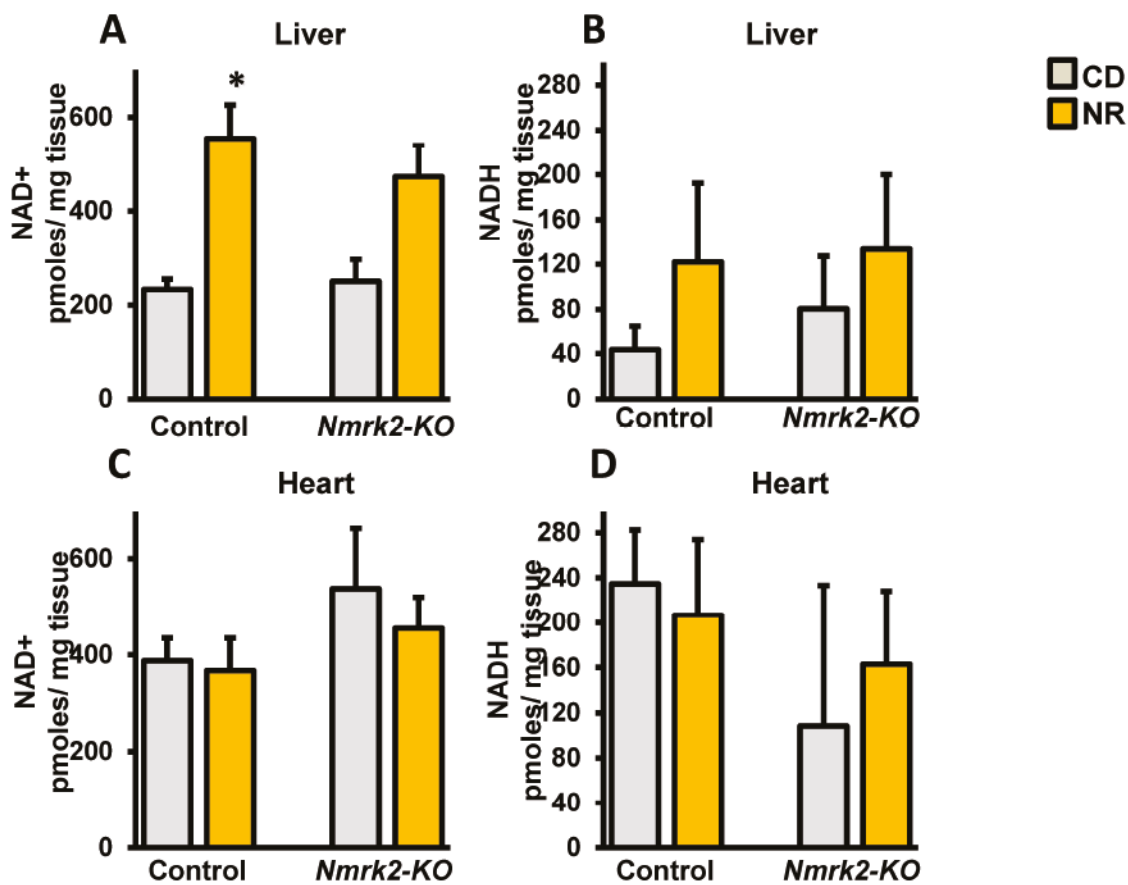
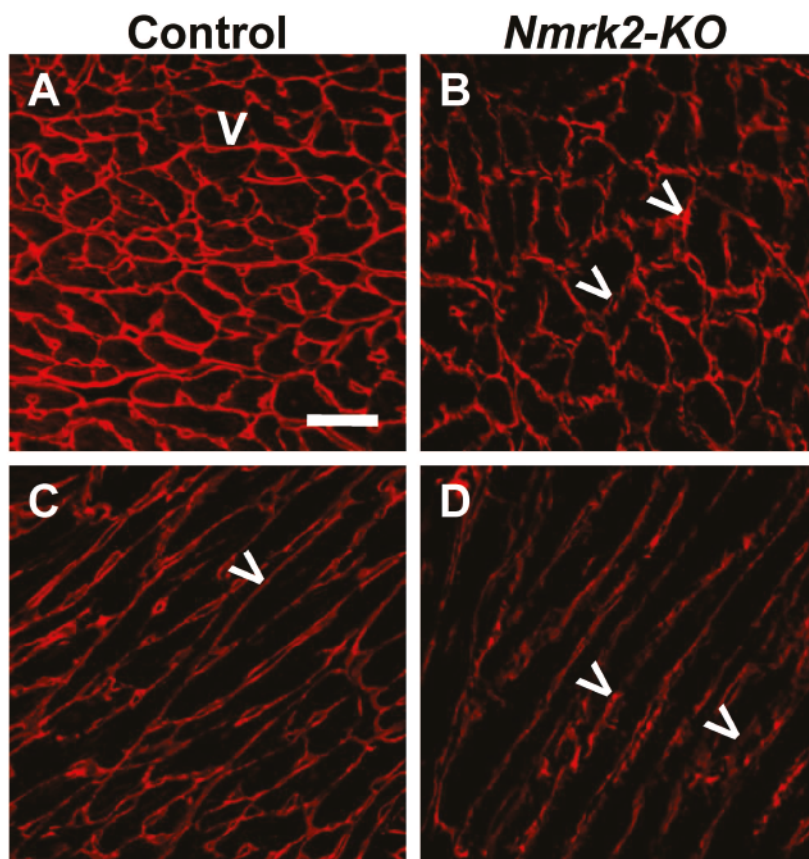


Fig.S5



Control

Nmrk2-KO

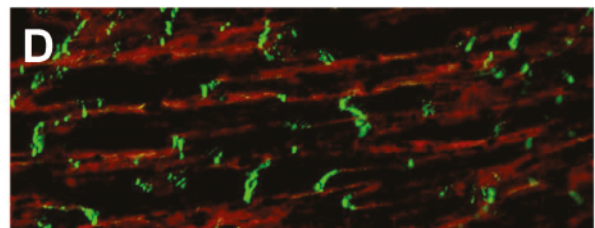
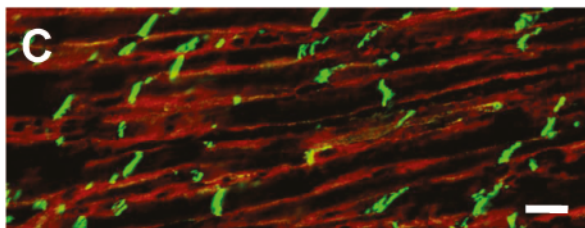
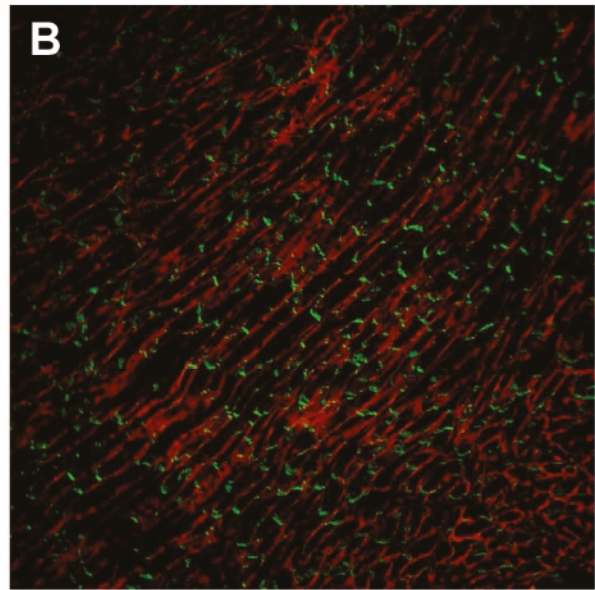
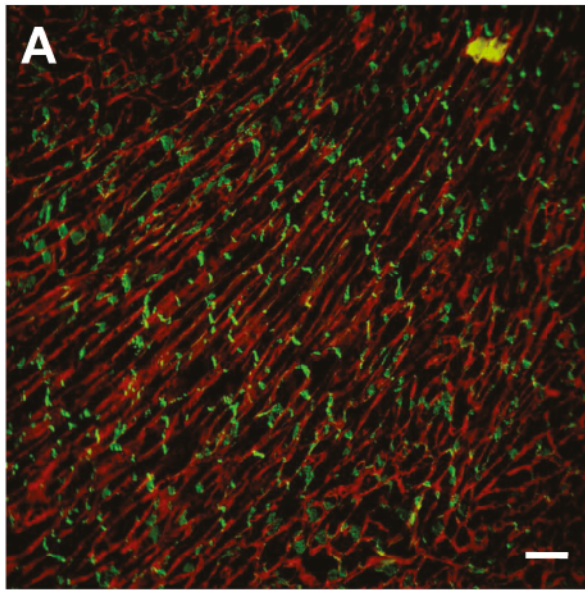


TABLE 1A: Echocardiographic analysis of control and Nmrk2 KO at baseline and evolution after TAC

	Baseline		2 wk TAC		4 wk TAC	
	5 Wt	5 Nmrk2-KO	5 Wt	5 Nmrk2-KO	5 Wt	3 Nmrk2-KO
N						
IVSd (cm) \$\$\$	0.06 ± 0.001	0.06 ± 0	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.003
LVd (cm) ** \$\$\$	0.34 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.37 ± 0.03	0.4 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.48 ± 0.03
LVPWd (cm) * \$\$\$	0.06 ± 0.001	0.06 ± 0.003	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01
IVSs (cm) \$\$	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.005	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.004
LVs (cm) ** \$\$\$	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.39 ± 0.03
LVPWs (cm) *** \$\$\$	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.005	0.13 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01
EDV (mL) ** \$\$\$	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.27 ± 0.04
ESV (mL) ** \$\$\$	0.02 ± 0.002	0.02 ± 0.002	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.1 ± 0.02	0.15 ± 0.03
EF (%) * \$\$\$	81.93 ± 0.38	82.2 ± 0.63	75.41 ± 4.38	66.17 ± 4.23	50.89 ± 6.81	45.17 ± 3.96
SF (%) * \$\$\$	44.55 ± 0.41	45.2 ± 0.64	38.62 ± 3.93	31.85 ± 2.9	22.68 ± 3.91	19.2 ± 2.005
SV (mL)	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.1 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.003	0.12 ± 0.01
h/r ** \$\$\$	0.34 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.48 ± 0.06	0.42 ± 0.03	0.42 ± 0.05	0.32 ± 0.04
HR (bpm)	603.29 ± 16.95	599.17 ± 17.63	564.8 ± 38.97	544.2 ± 29.98	602.8 ± 21.85	609.8 ± 19.37
LVMI (mg/g) ** \$\$\$	2.37 ± 0.23	2.91 ± 0.14	4.62 ± 0.43	5.92 ± 0.32	5.55 ± 0.47	6.84 ± 0.44
BW (g)	25.26 ± 0.88	21.52 ± 0.85	24.9 ± 2.07	21.52 ± 0.85	24.95 ± 0.97	21.86 ± 0.96

TABLE 1B: Echocardiographic analysis of control and Nmrk2 KO and evolution after TAC

N	5 wk TAC		6 wk TAC		8 wk TAC	
	Wt 5	Nmrk2-KO 5	Wt 5	Nmrk2-KO 5	Wt 5	Nmrk2-KO 3
IVSd (cm) ^{§§§}	0.08 ± 0.004	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.002	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01 ^{##}	0.07 ± 0.01
LVd (cm) ^{**§§§}	0.47 ± 0.02	0.5 ± 0.01	0.45 ± 0.03	0.5 ± 0.01	0.52 ± 0.02 ^{###}	0.55 ± 0.02 ^{###}
LVPWd (cm) ^{*§§§}	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.004	0.06 ± 0.004	0.06 ± 0.004	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.003
IVSs (cm) ^{§§}	0.1 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.002	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.09 ± 0.01
LVs (cm) ^{**§§§}	0.38 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.45 ± 0.02 ^{###}	0.45 ± 0.03 ^{###}
LVPWs (cm) ^{***§§§}	0.08 ± 0.004	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.004	0.08 ± 0.004	0.07 ± 0.01 ^{###}	0.07 ± 0.003 [#]
EDV (mL) ^{**§§§}	0.25 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.3 ± 0.02	0.35 ± 0.03 ^{###}	0.39 ± 0.05 ^{###}
ESV (mL) ^{**§§§}	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.03 ^{###}	0.23 ± 0.04 ^{###}
EF (%) ^{*§§§}	44.04 ± 3.44	37.65 ± 3.45	45 ± 3.01	39.87 ± 3.44	37.52 ± 3.54 ^{###}	40.85 ± 2.89 ^{###}
SF (%) ^{*§§§}	18.35 ± 1.62	15.43 ± 1.65	18.99 ± 1.55	16.5 ± 1.64	15.41 ± 1.66 ^{###}	16.99 ± 1.43 ^{###}
SV (mL)	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.002	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.005	0.13 ± 0.01 [#]	0.16 ± 0.02 [#]
h/r ^{**§§§}	0.32 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.28 ± 0.013	0.28 ± 0.01 ^{##}	0.22 ± 0.02 [#]
HR (bpm)	598.4 ± 30.38	619.6 ± 12.13	637.2 ± 24.07	596.2 ± 18.59	599 ± 31.87	556 ± 73.12
LVMI (mg/g) ^{***§§§}	5.26 ± 0.68	5.79 ± 0.35	4.93 ± 0.75	6.75 ± 0.65	6.2 ± 0.96 [#]	5.79 ± 0.33 ^{###}
BW (g)	26.06 ± 1.22	22.4 ± 1.17	26.36 ± 1.2	22.22 ± 1.31	26.96 ± 0.95	24.23 ± 0.98

Cardiac structure and function were evaluated non-invasively by transthoracic echocardiography before TAC surgery (baseline) and at 2, 4, 5, 6 and 8 weeks after TAC.

Abbreviations: IVSd, interventricular septum thickness in diastole; LVd, left ventricle end diastolic diameter; LVPWd, left ventricle posterior wall thickness in diastole; IVSs, interventricular septum thickness in systole; LVs, left ventricle end systolic diameter; LVPWs, left ventricle posterior wall thickness in systole; EDV, end diastolic volume; ESV, end systolic volume; EF, ejection fraction; SF, shortening fraction; SV, stroke volume; h/r, thickness/radius ratio; HR, heart rate; LVMI, left ventricular mass index; BW, body weight. ANOVA test was applied to calculate p value from time zero (baseline) until 6 weeks of TAC because of the preservation of the rule of equal sample size: *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001 for the genotype effect and §, P<0.05; §§, P<0.01; §§§, P<0.001 for the duration of TAC effect. Student test was applied to calculate p value for 8 weeks of TAC: #, P<0.05; ##, P<0.01; ###, P<0.001 versus baseline for each genotype. No significant difference was observed between Wt TAC and Nmrk2-KO TAC group at 8 weeks.

TABLE 2: Echocardiographic analysis of control and Nmrk2 KO after 2 weeks of TAC

	Baseline		TACJ15	
	Wt	Nmrk2-KO	Wt	Nmrk2-KO
N	3	5	3	5
IVSd (cm)	0.06 ± 0.003	0.06 ± 0.003	0.1 ± 0 ###	0.09 ± 0.004 * ###
LVd (cm)	0.34 ± 0.003	0.34 ± 0.014	0.35 ± 0.009	0.39 ± 0.022 #
LVPWd (cm)	0.07 ± 0.003	0.08 ± 0.004	0.09 ± 0.007 #	0.08 ± 0.004
IVSs (cm)	0.11 ± 0.003	0.11 ± 0.004	0.14 ± 0 ###	0.12 ± 0.007 *
LVs (cm)	0.18 ± 0.003	0.19 ± 0.012	0.2 ± 0.01	0.27 ± 0.032 * #
LVPWs (cm)	0.11 ± 0.006	0.12 ± 0.004	0.14 ± 0.003	0.11 ± 0.005 **
EDV (mL)	0.1 ± 0	0.11 ± 0.012	0.11 ± 0.006	0.16 ± 0.026
ESV (mL)	0.02 ± 0	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.003	0.06 ± 0.021
EF (%)	81.72 ± 0.5	81.85 ± 1.24	80.64 ± 1.61	65.79 ± 6.99 #
SF (%)	44.52 ± 0.65	44.54 ± 1.29	43.31 ± 1.58	32.1 ± 4.76 #
SV (mL)	0.08 ± 0	0.09 ± 0.009	0.09 ± 0.003	0.1 ± 0.009
h/r	0.41 ± 0.012	0.42 ± 0.02	0.55 ± 0.011 ###	0.44 ± 0.024 **
HR (bpm)	609.67 ± 12.39	613.4 ± 7.56	565.67 ± 7.45 #	541 ± 27.81 #
LVMI (mg/g)	71.83 ± 5.49	77.63 ± 5.48	122.79 ± 10.51 ##	122.88 ± 8.53 ###

Left ventricle remodeling and function before TAC surgery (baseline) and 2 weeks after TAC in wild-type control and Nmrk2-KO mice. Mice series related to Figure 2. Abbreviations as in Table 1. Student test was applied to calculate p value for 15 days post TAC, * p<0.05 and **, p<0.01 Nmrk2-KO TAC versus wild-type TAC, ###, p<0.001 versus basal.

4.3.3 Discussion

Dans cette étude, nous avons démontré que NMRK2 était une protéine spécifique du muscle strié, à la différence de son homologue NMRK1 qui est exprimée de façon ubiquitaire dans tous les types cellulaires. En effet, des expériences par coloration β -galactosidase grâce au rapporteur LacZ exprimé à la place de l'ARNm de *Nmrk2* dans notre modèle, et confirmées par analyse d'expression du gène *Nmrk2* par RT-qPCR, nous ont permis de montrer que *Nmrk2* était exprimée exclusivement dans le cœur et les muscles squelettique et que son expression n'était pas détectée dans d'autres tissus comme les poumons, le foie ou encore le cerveau. L'expression de l'ARNm de *Nmrk2* est d'ailleurs plus élevée dans les muscles plantaris et gastrocnemius, qui sont des muscles riches en fibres rapides glycolytiques, que dans le soleus, un muscle postural au métabolisme lent et oxydatif, et le cœur, très oxydatif.

Les animaux *Nmrk2*^{KO} présentent au cours du vieillissement un phénotype de cardiomyopathie dilatée modérée qui se manifeste dès l'âge de 5 mois par une fraction d'éjection réduite, une dilatation du ventricule et un amincissement des parois du ventricule gauche. Cette altération s'installe progressivement jusqu'à l'âge de 12 mois, puis se stabilise jusqu'à l'âge de 24 mois, avec une fraction d'éjection diminuée mais supérieure à 50%. Ces résultats indiquent que le défaut de NMRK2 induit un remodelage cardiaque progressif du ventricule gauche qui altère la fonction contractile, même si cette altération reste stabilisée et n'évolue pas vers une insuffisance cardiaque terminale.

L'analyse des taux de NAD au cours du vieillissement a montré que ceux-ci restaient stables durant la majeure partie de la vie des animaux *Nmrk2*^{KO}, mais étaient réduits de 50% à l'âge de 24 mois en comparaison avec les animaux contrôles. En parallèle de cette observation, nous avons mesuré une réduction de l'expression de *Nmrk2* chez les animaux contrôles à 24 mois, ainsi que de celle des gènes codant pour *Nmrk1* et la *Nampt* à la fois chez les animaux contrôles et invalidés. Il semble donc que la kinase NMRK2 ne soit pas indispensable pour le maintien des taux de NAD chez la souris adulte avant 12 mois, mais qu'elle pourrait être nécessaire au cours du vieillissement.

Ainsi, l'altération de la fonction cardiaque observée dès l'âge de 5 mois chez ces mutants ne pourrait pas être expliquée par corrélation directe avec les taux de NAD cardiaques qui ne sont pas encore réduits à cet âge. Pour expliquer ce phénotype, il faut peut-être s'intéresser à une autre fonction moins étudiée de NMRK2, qui est celle de se lier aux complexes des intégrines sous-membranaires. En effet, NMRK2 est également connu sous le nom de *Muscle Integrin-Binding Protein* (MIBP), une protéine identifiée par l'équipe de J. Li pour sa particularité de se lier à la partie cytosolique du complexe formé par les intégrines $\beta 1$ et $\alpha 7$ et dont la surexpression dans des myoblastes murins C2C12 perturbe la différenciation myogénique (J. Li et al., 1999). Une étude chez le poisson zèbre a également démontré que *Nrk2b*, orthologue de *Nmrk2*, était requis pour la formation normale des dépôts de laminine aux jonctions myotendineuses (Goody et al., 2010), suggérant dans l'ensemble que NMRK2 pourrait être important pour une morphogénèse musculaire et matricielle normale. Dans notre étude, nous avons mis en évidence que la perte de NMRK2 induisait un dépôt et une organisation anormale de la laminine dans la matrice extracellulaire du myocarde. La laminine $\alpha 2$, qui est l'isoforme prédominante dans la lame basale des cardiomyocytes, est régulée au cours du développement chez l'homme et les modèles murins. Son expression augmente rapidement dès la naissance et suit la croissance des cardiomyocytes pour ensuite progressivement diminuer à l'âge adulte. Au cours du développement de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque, le déséquilibre entre l'augmentation de la taille ces cardiomyocytes et la stabilité de l'expression de la laminine $\alpha 2$ pourrait contribuer à l'altération des propriétés du sarcolemme dans le cœur insuffisant (Oliviero et al., 2000). Chez le mutant NMRK2, nous avons observé dès l'âge de 4 mois un épaissement des dépôts de laminine $\alpha 2$ à la lame basale, comme décrit chez le rat dans l'insuffisance cardiaque induite par injection d'isoprotérénol et au cours de l'hypertrophie induite par l'infarctus du myocarde (Grimm et al., 1998). Le lien entre la liaison de la kinase NMRK2 aux intégrines $\alpha 7$ et $\beta 1$ est loin d'être clairement identifié, mais on sait par exemple que l'ADP-ribosylation de l'intégrine $\alpha 7$, qui est une modification post-traductionnelle dépendante du NAD^+ via ART1, augmente son affinité pour la laminine (Haas et al., 2015). Ainsi, l'absence de NMRK2 à proximité de l'intégrine $\alpha 7$ pourrait altérer localement la production de NAD^+ nécessaire à son ADP-ribosylation et déstabiliser le lien avec la laminine et la matrice extracellulaire.

4.4 Implication de la kinase NMRK2 dans la réponse à l'exercice dans le muscle strié squelettique et cardiaque

4.4.1 Introduction

Comme nous l'avons montré, NMRK2 semble être impliquée dans l'homéostasie du NAD au cours du vieillissement. Les mutants *Nmrk2*^{KO} présentent un phénotype cardiaque modéré caractérisé par une cardiomyopathie dilatée, même si elle se stabilise et n'évolue pas vers une insuffisance cardiaque terminale, et qui est en effet associée à une réduction des taux de NAD à 24 mois. D'autre part, on sait que le vieillissement du muscle squelettique est associé à un processus de sarcopénie, caractérisé par une réduction de la masse musculaire et de la force développée. Parmi les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus liés à l'âge, l'altération du métabolisme du NAD⁺ a été décrite comme jouant un rôle majeur dans un grand nombre de tissus, incluant le cœur et les muscles squelettiques (Mericskay, 2016; Yoshino et al., 2018). Le vieillissement musculaire est associé à une réduction des capacités à l'endurance, qui est attribuée non seulement à une altération des performances cardiovasculaires mais également à une réduction de la qualité et de la quantité des mitochondries dans les cellules musculaires (Johnson et al., 2013; Lanza & Nair, 2010). En dépit de ces limitations, la pratique d'une activité physique régulière reste l'une des stratégies les plus efficaces pour contrer le processus de sarcopénie et réduire l'inflammation chronique (Cruz-Jentoft et al., 2014; Denison et al., 2015; Monteiro-Junior et al., 2018; Ziaaldini et al., 2017).

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés dans cette étude au rôle de la kinase NMRK2 dans l'adaptation à l'exercice chez des animaux âgés. Pour cela, nous avons donc exploré la capacité d'animaux *Nmrk2*^{KO} âgés de 16 mois à suivre un protocole d'entraînement en endurance, puis nous avons évalué les processus adaptatifs mis en place dans le muscle squelettique en terme notamment de diamètre et de type de fibres musculaires en réponse à l'exercice, ainsi que la modulation des voies métaboliques dans le cœur et le muscle squelettique.

4.4.2 Résultats

Cette étude a fait l'objet d'une publication en premier auteur dans le journal *Frontiers in Physiology* en Septembre 2018. J'ai réalisé la totalité des expériences publiées dans ce papier, de l'entraînement en endurance des animaux jusqu'aux analyses histologiques et en biologie moléculaire



Aged Nicotinamide Riboside Kinase 2 Deficient Mice Present an Altered Response to Endurance Exercise Training

Robin Deloux^{1,2}, Cynthia Tannous^{1,2}, Arnaud Ferry^{3,4}, Zhenlin Li² and Mathias Mericskay^{1*}

¹ Signalling and Cardiovascular Pathophysiology—UMR-S 1180, Univ. Paris-Sud, INSERM, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France, ² Department of Biology of Adaptation and Ageing, CNRS UMR8256, INSERM U1164, Institute of Biology Paris-Seine, DHU FAST, Sorbonne Universités, Paris, France, ³ Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, Paris, France, ⁴ Institut de Myologie, UMR-S 794, INSERM, CNRS, Sorbonne Universités, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Valentina Di Felice,
Università degli Studi di Palermo, Italy

Reviewed by:

Marina Bouche,
Università degli Studi di Roma La
Sapienza, Italy

Antonio Paolo Beltrami,
Università degli Studi di Udine, Italy

*Correspondence:

Mathias Mericskay
mathias.mericskay@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Striated Muscle Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 05 July 2018

Accepted: 27 August 2018

Published: 19 September 2018

Citation:

Deloux R, Tannous C, Ferry A, Li Z
and Mericskay M (2018) Aged
Nicotinamide Riboside Kinase 2
Deficient Mice Present an Altered
Response to Endurance Exercise
Training. *Front. Physiol.* 9:1290.
doi: 10.3389/fphys.2018.01290

Background: Skeletal muscle aging is marked by the development of a sarcopenic phenotype, a global decline of muscle energetic capacities, and an intolerance to exercise. Among the metabolic disorders involved in this syndrome, NAD metabolism was shown to be altered in skeletal muscle, with an important role for the NAMPT enzyme recycling the nicotinamide precursor. An alternative pathway for NAD biosynthesis has been described for the nicotinamide riboside vitamin B3 precursor used by the NMRK kinases, including the striated muscle-specific NMRK2.

Aim: With this study, our goal is to explore the ability of 16-month-old *Nmrk2*^{-/-} mice to perform endurance exercise and study the consequences on muscle adaptation to exercise.

Methods: 10 control and 6 *Nmrk2*^{-/-} mice were used and randomly assigned to sedentary and treadmill endurance training groups. After 9 weeks of training, heart and skeletal muscle samples were harvested and used for gene expression analysis, NAD levels measurements and immunohistochemistry staining.

Results: Endurance training triggered a reduction in the expression of *Cpt1b* and *AcadL* genes involved in fatty acid catabolism in the heart of *Nmrk2*^{-/-} mice, not in control mice. NAD levels were not altered in heart or skeletal muscle, nor at baseline neither after exercise training in any group. *Myh7* gene encoding for the slow MHC-I was more strongly induced by exercise in *Nmrk2*^{-/-} mice than in controls. Moreover, *IL-15* expression levels is higher in *Nmrk2*^{-/-} mice skeletal muscle at baseline compared to controls. No fiber type switch was observed in plantaris after exercise, but fast fibers diameter was reduced in aged control mice, not in *Nmrk2*^{-/-} mice. No fiber type switch or diameter modification was observed in soleus muscle.

Conclusion: In this study, we demonstrated for the first time a phenotype in old *Nmrk2*^{-/-} mice in response to endurance exercise training. Although NMRK2 seems to

be predominantly dispensable to maintain global NAD levels in heart and skeletal muscle, we demonstrated a maladaptive metabolic response to exercise in cardiac and skeletal muscle, showing that NMRK2 has a specific and restricted role in NAD signaling compared to the NAMPT pathway.

Keywords: heart, skeletal muscle, aging, NAD, NMRK2, exercise, endurance training

INTRODUCTION

Skeletal muscles are highly plastic organs that adapt their shape and performance to the physiological demand. In a simplified way, resistance training leads to hypertrophy of fibers while endurance training stimulates oxidative metabolism in fibers. This plasticity however is progressively lost with aging, which is associated both with a reduction in muscle mass and strength at baseline (sarcopenia) and a reduced gain in performance and muscle remodeling in response to resistance exercise (Kumar et al., 2009). Muscle aging is also associated with reduced endurance exercise capacity that is attributed not only to decreased cardiovascular performance but also to an intrinsic decrease in the quality and quantity of muscle cell mitochondria (Lanza and Nair, 2010; Johnson et al., 2013). Hence, sarcopenic muscles are supposed to differ in the various biochemical pathways involved in exercise response (Ziaaldini et al., 2017). Yet, despite these limitations, regular exercise remains one of the most effective strategy to counteract sarcopenia and lower chronic inflammatory cytokines overload although optimization of the protocols and a better understanding of the mechanisms involved in the lower response of sarcopenic muscles resistance training are still required (Cruz-Jentoft et al., 2014; Denison et al., 2015; Ziaaldini et al., 2017; Monteiro-Junior et al., 2018).

Among the molecular mechanisms involved in the aging process, alterations in the metabolism of the Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD⁺) has been shown to play a major role in most tissues, including heart and skeletal muscles (Mericskay, 2016; Yoshino et al., 2018).

NAD has the particularity of being both a coenzyme and a signaling molecule. As a coenzyme, NAD is recycled from oxidized NAD⁺ to reduced NADH in the oxido-reduction reactions of the energy metabolism, without net consumption of the total NAD pool in these processes. As a signaling molecule, NAD is a co-substrate molecule hydrolyzed by several cellular enzymes, notably the sirtuins (SIRT) deacetylases, the polyADPribose polymerases (PARP) and the CD38 and CD157 ADPribose cyclases (Mericskay, 2016; Yoshino et al., 2018). These pathways act as sensors of energetic and redox state to regulate energy metabolism (SIRT1, SIRT3), oxidative stress response and cell survival (PARP1) and Ca²⁺ signaling (CD38) in all cell types. In aged mouse skeletal muscle, there is more than 50% decline in NAD⁺ levels that alters SIRT1 activity and reduced the level of nuclear and mitochondrial encoded mitochondrial proteins (Gomes et al., 2013).

The sirtuins, PARP1 and CD38/CD157 proteins all cleave the NAD⁺ into nicotinamide (NAM) and adenine diphosphate-ribose (ADPR) for their enzymatic activities.

Different salvage pathway exist that compensate for this cellular consumption of NAD⁺ (Mericskay, 2016; Yoshino et al., 2018). A major pathway in muscle is initiated by the nicotinamide phosphoribosyl transferase (NAMPT). NAMPT uses the NAM derived from the activity of NAD⁺ consuming enzymes but also nutritional NAM (vitamin B3), to generate nicotinamide mononucleotide (NMN) that is then fused to the ADP moiety of ATP by the nicotinamide adenyl transferases (NMNAT, 1 to 3) to form the dinucleotide. Genetic depletion of the NAMPT enzyme in adult skeletal muscles leads to fiber degeneration and progressive loss of both muscle strength and treadmill endurance (Frederick et al., 2016). The contribution of the deamidated precursors, nicotinic acid and tryptophan to NAD⁺ synthesis is minimal in skeletal muscles (Mori et al., 2014).

More recently, an alternative pathway for the synthesis of NMN was discovered based on the phosphorylation of the nucleoside form of the NAM base, the nicotinamide riboside (NR), by the NR kinases NRK1 and NRK2 (official symbol NMRK1 and NMRK2; Bieganowski and Brenner, 2004; Belenky et al., 2007). NMRK2 is expressed predominantly in skeletal muscles whereas NMRK1 seems to be ubiquitously expressed but more abundant in liver and kidneys (Ratajczak et al., 2016; Fletcher et al., 2017). *Nmrk2*^{-/-} mice (12–14 weeks) showed no alteration in total NAD levels in skeletal muscles and no phenotype at baseline or after 6 weeks of endurance exercise protocol as regard muscle fiber cross-sectional area and muscle fiber type distribution (Fletcher et al., 2017).

Considering that NAD metabolism becomes crucial during aging, we explored in the present study the ability of middle-age *Nmrk2*^{-/-} mice (16 month) to perform endurance exercise training and the impact of this training on muscle fiber cross-sectional area, muscle fiber type distribution and myokines expression in different muscles.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Endurance Training

All experiments with animals conformed to the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and were approved by the ethics committee Charles Darwin #5 and authorized by the Ministry of Research in application of the French Rural Code, notably the articles R. 214-87 to R. 214-126 (agreement 00369.03: Role of the kinase NMRK2 in skeletal muscles). The animal experiments were performed in the UPMC university Center for Experimental Exploration, UMS 028, 105 Boulevard de l'Hôpital, Paris 75013, holding the agreement # A751315.

Constitutive *Nmrk2* knocked-out mice were obtained and genotyped in a C57BL/6NTac genetic background as previously

described (Vaur et al., 2017). Homozygous *Nmrk2*^{-/-} mice were viable and fertile. For this study, 16 sixteen-month old female mice were used ($n = 10$ C57BL/6N wild-type mice and $n = 6$ *Nmrk2*^{-/-} mice). Half of the animals were then randomly assigned to sedentary or endurance training groups ($n = 5$ C57BL/6N wild-type mice and $n = 3$ *Nmrk2*^{-/-} mice for each condition). Mice were acclimated to the treadmill for 3 consecutive days, and first submitted to an exercise performance test involving a warm up phase at 5 to 15 cm/s for 15 min, followed by an acute exercise phase where the speed of the treadmill was progressively increased until reaching signs of exhaustion (more than 5 shocks within 60 s, or more than 5 consecutive seconds on the shock grid with attempting to reengage on the treadmill). Endurance training protocol was carried out for 9 weeks and was composed of a warm up phase at 5 to 15 cm/s for 15 min followed by 0 to 45 min at 15 cm/s and after that 45 min in which speed was progressively increased from 15 to 30 cm/s. Protocol was strictly identical for every animal used in this study.

RT-qPCR Analysis

Total RNA were extracted from tissue samples using TRI Reagent[®] (Molecular Research Center) and a tissue homogenizer (Precellys[®], Bertin Instruments) following the manufacturer instructions. RNA concentrations were quantified by spectrophotometry using NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). cDNAs were reverse transcribed from 2 μ g of RNA using the iScript[™] Reverse Transcription kit (Biorad). Quantitative PCR reactions were carried out on CFX[™] Real-Time PCR Detection System (Biorad), in triplicates for each sample in a 7.5 μ L volume containing 3.75 μ L of SsoAdvanced[™] Universal SYBR[®] Green Supermix, 0.5 μ M of each forward and reverse primers and 2.5 μ L of 1:20 diluted cDNA. Primers sequences used in this study are available on request. The expression of *Hprt* (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) gene or the mean of the expression of *Rplp0* (Ribosomal Protein, Large, P0) and *Ywhaz* (Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta) genes were used as a reference for normalization in heart and gastrocnemius muscle, and plantaris and soleus muscles, respectively.

NAD Extraction and Quantification

Metabolites were extracted by homogenizing tissue samples in a buffered ethanol solution (75% ethanol/25% HEPES 10 mM pH 7.1, 10 μ L/mg of tissue) with a tissue homogenizer (Precellys[®], Bertin Instruments). Extracts were heated at 80°C for 5 min, chilled on ice and centrifuged for at 15000g for 15 min at 4°C. NAD levels were quantified using an MTT-formazan recycling assay. Samples extracts were diluted in water to a final volume of 25 μ L. After adding 100 μ L of reaction buffer (600 mM ethanol, 0.5 mM 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2 mM phenazine ethosulfate (PES), 120 mM Bicine (pH7.8), yeast alcohol dehydrogenase 0.05 mg/mL (SIGMA A3263), kinetics of the reaction was assessed by measuring OD at 550 nm every 30 s for 40 min using a TECAN Infinite F500 microplate reader.

Samples NAD concentrations were determined by comparing the slope of the reaction (OD/s) to a range of standard NAD⁺ concentrations.

Immunofluorescent Staining

Immediately after sacrifice, fast (plantaris) and slow-twitch (soleus) muscles were embed in Tissue-Tek (Sakura, USA) and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane at -150°C. They were then stored at -80°C and sliced into 8 μ m cryosections with CM1860 Cryostat, (Leica). Immunohistochemical staining of Myosin Heavy Chain (MHC) isoforms was performed using mouse monoclonal antibodies BAD5 (MHC-I specific, alternate name β -MHC, IgG2b, 1:100 dilution), SC-71 (MHC-IIA specific, IgG1, 1:100 dilution) and BF-F3 (MHC-IIB specific, IgM, 1:100 dilution) respectively, obtained from Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB, University of Iowa). Laminin staining was also performed for labeling basement membranes using a rabbit polyclonal antibody (L9393, Sigma). Briefly, muscle sections were fixed with 4% PFA for 5 min, washed twice (5 min each) in PBS, permeabilized in 0.1% Triton for 10 min, washed twice in PBS, saturated in 5% IgG-free BSA for 45 min, washed once in PBS, incubated with 1:100 mouse FAB for 20 min, washed once in PBS. Primary antibodies were then incubated overnight at 4°C. After washing 3 times in 0.1% Tween20 in PBS, secondary antibodies were used to selectively bind to each primary antibody: goat anti-mouse IgG2b conjugated with Alexa Fluor[®] 350, goat anti-mouse IgG1 conjugated with Alexa Fluor[®] 555, goat anti-mouse IgM conjugated with Alexa Fluor[®] 488, and goat anti-rabbit conjugated with Alexa Fluor[®] 633, all diluted at 1:400 in 5% IgG-free BSA. After 3 washes in 0.1% Tween20 in PBS, muscle section were mounted using 70% glycerol. Pictures were taken using an inverted fluorescence microscope (DMi8, Leica). Pure MHC-IIX fibers were not stained by these antibodies and appeared black. Fiber type distribution and MinFerret were assessed using ImageJ software.

Statistical Analysis

Animals were assigned to sedentary or endurance training groups by randomization. Shapiro–Wilk test were applied to test for normality of distribution before to use parametric test. To assess statistical significance between control and *Nmrk2*^{-/-} mice at exhaustion test, *t*-tests for independent samples were performed. For RT-qPCR analysis, NAD levels and fiber type and MinFerret comparisons, two-way ANOVA for independent samples were performed, followed by *post-hoc* Tukey tests for multiple comparison when an interaction between the genotype and the endurance training factors was established. Global MinFerret distribution statistical differences were assessed using Chi-square test. Values are expressed as mean \pm SEM.

RESULTS

Endurance Training and Muscle Performance in *Nmrk2*^{-/-} Mice

Considering the old age of the mice, 16 months at the beginning of the endurance training protocol, and the potential effect of *Nmrk2* deficiency on exercise capacities, training protocol was

adapted by starting at a very low speed (15cm/s, 100 m run per session) that was progressively increased to reach 30 cm/s (890 m per session) at the end of the protocol. All animals were able to follow the complete training (Figure 1A). To assess if there was any difference in term of exercise capacity and endurance between control and *Nmrk2*^{-/-} mice, animals were submitted to a treadmill exhaustion test 1 week after the beginning of the protocol. *Nmrk2*^{-/-} mice reached exhaustion after 24.0 ± 2.3 min vs. 22.6 ± 1.8 min for control mice (Figure 1B), at a speed of 39.0 ± 2.3 cm/s vs. 36.7 ± 1.8 cm/s for control mice (Figure 1C), with no statistical difference between the groups. After 9 weeks of training, there was no significant body weight change in trained control and *Nmrk2*^{-/-} mice (Figure 1D).

Effects of Endurance Training on Cardiac Gene Expression and NAD Levels

To gain insight on NAD metabolism modulation in heart by exercise in old mice, we first analyzed the gene expression profile of several main enzymes responsible for its biosynthesis and consumption. *Nmrk2* gene expression was absent as expected in *Nmrk2*^{-/-} mice, but not modified by training in control mice. *Nmrk1* and *Nampt* expressions were not modulated by endurance training in control and in *Nmrk2*^{-/-} mice, neither was the expression of the sirtuins *Sirt1* and *Sirt3* (Figure 2A).

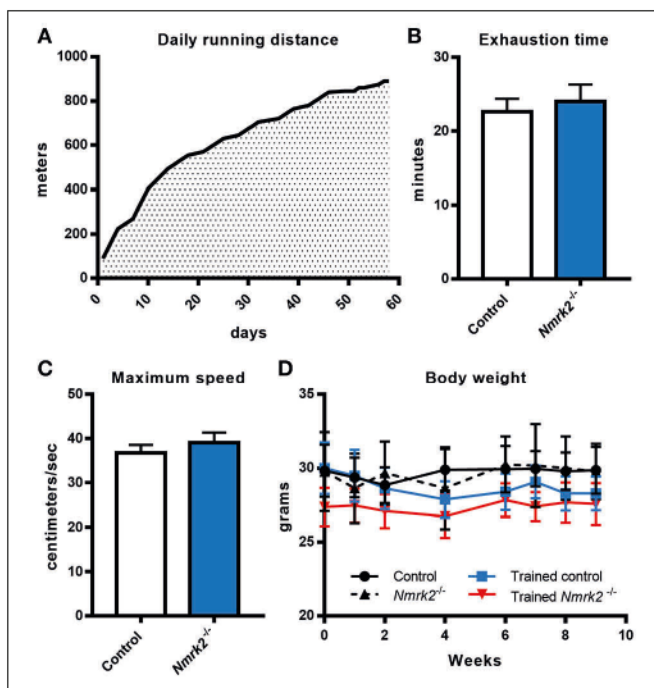


FIGURE 1 | Daily running distance during endurance training, endurance test and body weight evolution. **(A)** Evolution of the daily running distance imposed to control and *Nmrk2*^{-/-} mice during the 9 weeks of endurance training. **(B, C)** Maximum speed **(B)** and time **(C)** reached at exhaustion during endurance test. **(D)** Evolution of body weight along the training protocol. $N = 5$ in each sedentary and trained control group, and $N = 3$ in each sedentary and trained *Nmrk2*^{-/-} group. Statistical analysis: **(B, C)**, *t*-test for independent samples. **(D)** two-way ANOVA for independent samples.

In line with those observations, we did not observe a difference regarding NAD levels in cardiac muscle (Figure 2B). *Pgc1a*, known to be activated in the heart by exercise, was slightly increased without reaching statistical significance, when there was no induction in *Nmrk2*^{-/-} mice (Figure 2C). Cardiac stress marker *Bnf* was not clearly modulated by exercise or lack of NMRK2 (Figure 2D). The *Myh7* gene encoding the slow β -MHC was increased in only one sedentary *Nmrk2*^{-/-} mouse that did not show any other major difference in other tested genes in the heart and skeletal muscle compared to the rest of the group. Interestingly, *Cpt1b* and *AcadL* genes, involved in fatty acids catabolism, were significantly lowered by exercise in *Nmrk2*^{-/-} mice, but not control mice ($p < 0.05$, Figure 2E). No clear effects could be identified on *Pdk2* and *Pdk4* expression, two isoforms of PDK, which negatively regulates glycolysis, neither on glucose transporters *Glut1* and *Glut4* (Figure 2F).

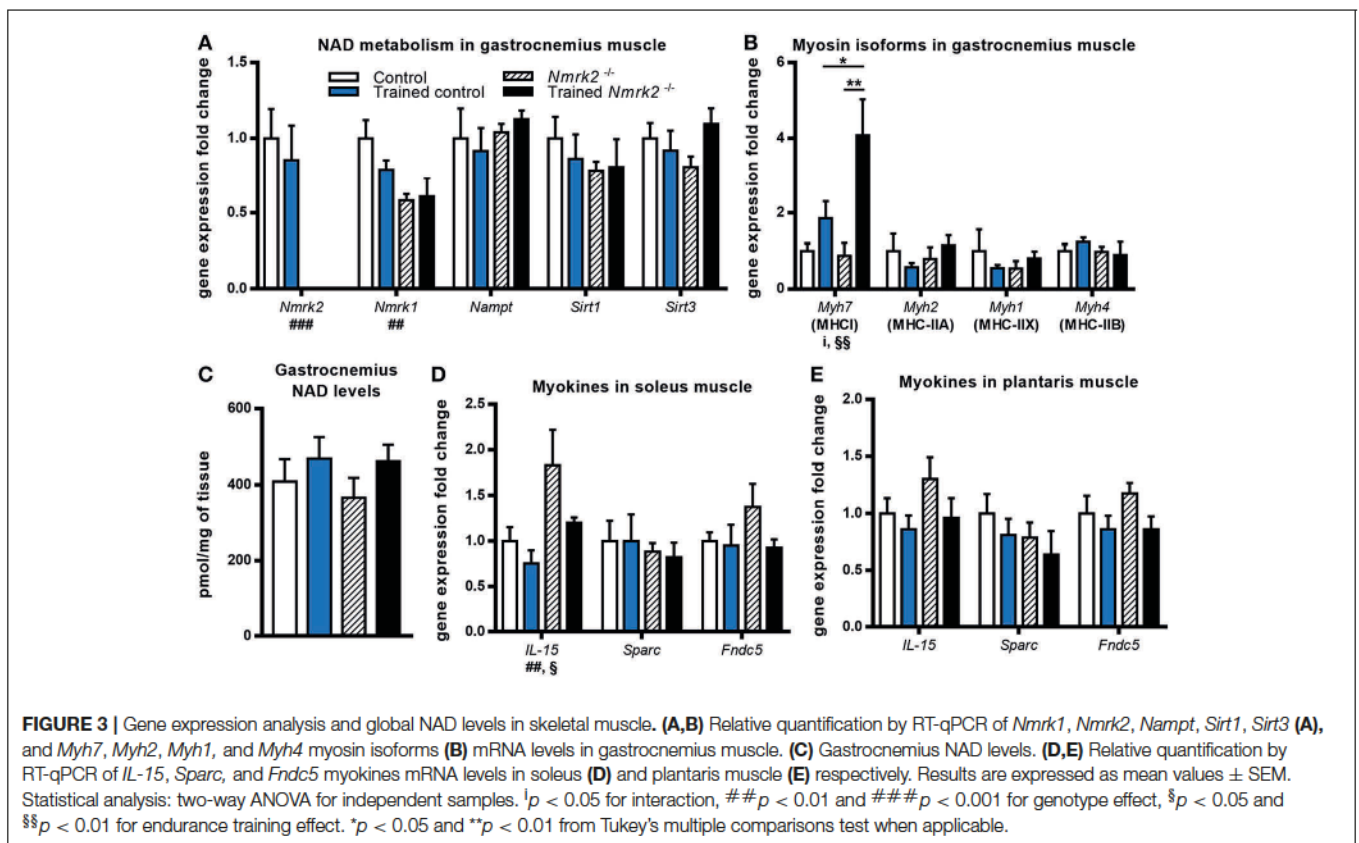
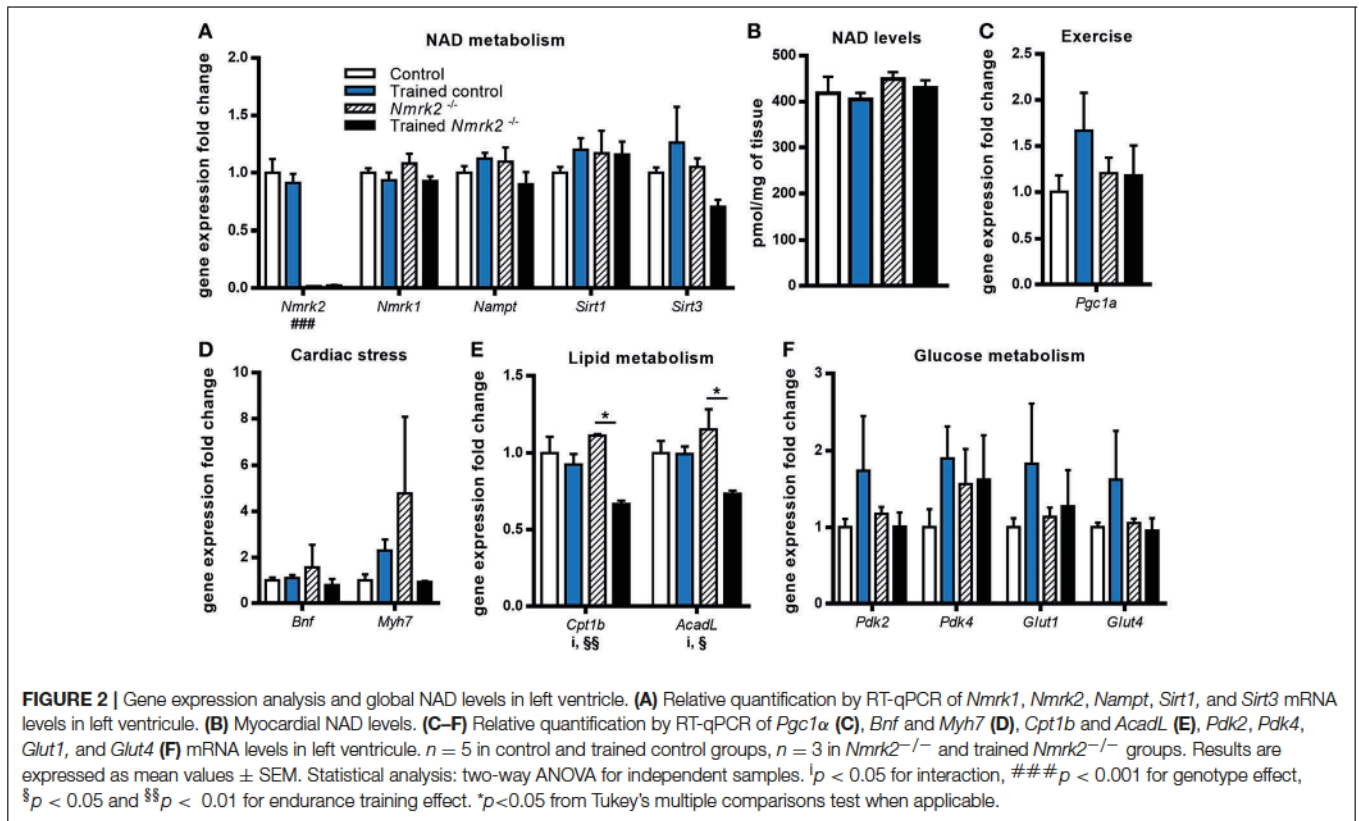
Effects of Endurance Training on Skeletal Muscle Gene Expression and NAD Levels

Nmrk2 being highly expressed in skeletal muscle, we also investigated NAD metabolism modulation enzymes in gastrocnemius muscle. No effect was observed regarding *Nampt* or *Sirt1* and *Sirt3* genes expression, but *Nmrk1* was reduced in *Nmrk2*^{-/-} mice in comparison to controls (genotype effect, $p < 0.01$, Figure 3A). In parallel with these observations, no major modulation of total NAD levels was observed (Figure 3C). We also studied the expression levels of myosin heavy-chain isoforms, known to be modulated by endurance training in young mice. Interestingly, *Myh7* gene coding for the slow MHC-I isoform was strongly induced by exercise in *Nmrk2*^{-/-} mice ($p < 0.01$, Figure 3B), to a higher level compared to trained control mice ($p < 0.05$) when no statistically significant effect of exercise was found in control mice. No modulation of other MHC isoforms gene expression was observed (*Myh2* for MHC-II1, *Myh1* for MHC-IIX or *Myh4* for MHC-IIB).

Considering the emerging role of skeletal muscle in autocrine and paracrine signaling, we also analyzed the expression of several myokines in slow (soleus) and fast-twitch (plantaris) muscles. In soleus muscle, an effect of training and genotype was observed for *IL-15* expression, a myokine that mediates muscle-fat crosstalk, seems to be higher in trained *Nmrk2*^{-/-} mice but no interaction could be identified (Figure 3D). *Sparc*, a myokine linked to muscle atrophy, and *Fndc5*, a precursor of irisin correlated to browning of adipose tissue, were not modified by exercise, even in control animals. No modifications of the expression of these 3 genes was observed in plantaris muscle although the global profile was strikingly similar to the one observed in the soleus muscle (Figure 3E).

Modulation of MHC Isoforms Distribution and Minferet Diameter in Fast and Mixed Muscles

To go further in the understanding of the effects of NMRK2 deficiency on skeletal muscle adaptation to exercise, we analyzed the distribution of MHC isoforms and minimal Feret diameter of fibers in fast plantaris muscle and the mixed more oxidative



soleus muscles by immuno-histochemical staining. In plantaris muscle, no fiber type switch with exercise could be detected (Figures 4A–E). As expected, no type I fibers were detected in this fast muscle. MinFeret diameter trend to be reduced with exercise in control mice, reaching statistical significance for MHC-IIX fibers, when no changes were observed in *Nmrk2*^{-/-} mice (Figure 4F). Analysis of MinFeret diameter distributions of all muscle fibers showed a statistically significant shift of distribution toward thinner muscle fibers with training in control mice ($p < 0.0001$, Figure 4G), when no effect of training was observed with *Nmrk2*^{-/-} mice (Figure 4H).

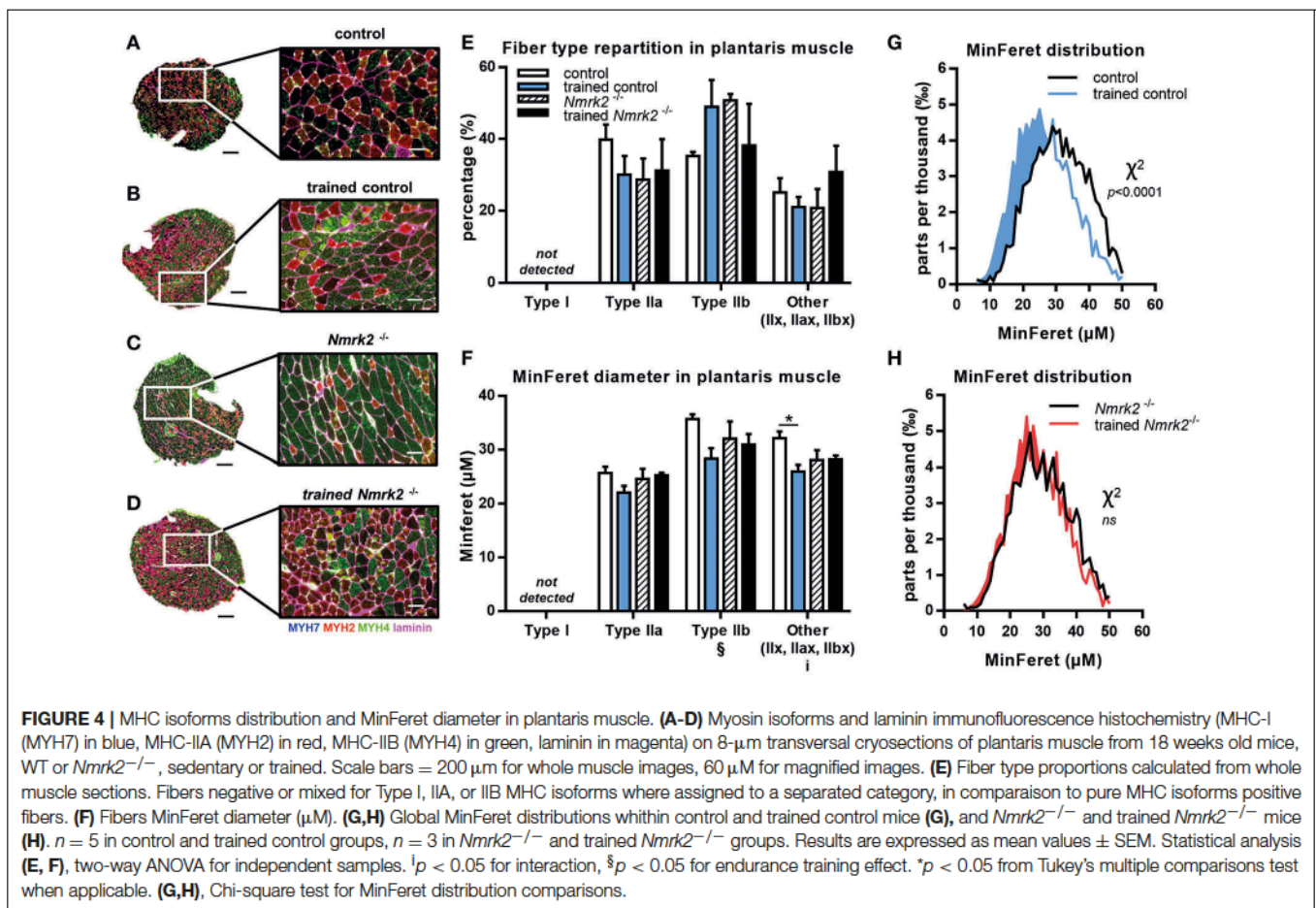
In the soleus muscle, there was no difference in term of fiber type repartition between control and *Nmrk2*^{-/-} mice, and no fiber type switching was observed with exercise in any group (Figures 5A–E). Note that no Type IIb fast twitch glycolytic fibers were detected in this muscle as expected. No difference either was found regarding all muscle fibers MinFeret diameter distributions, in term of genotype or exercise effect (Figures F–H).

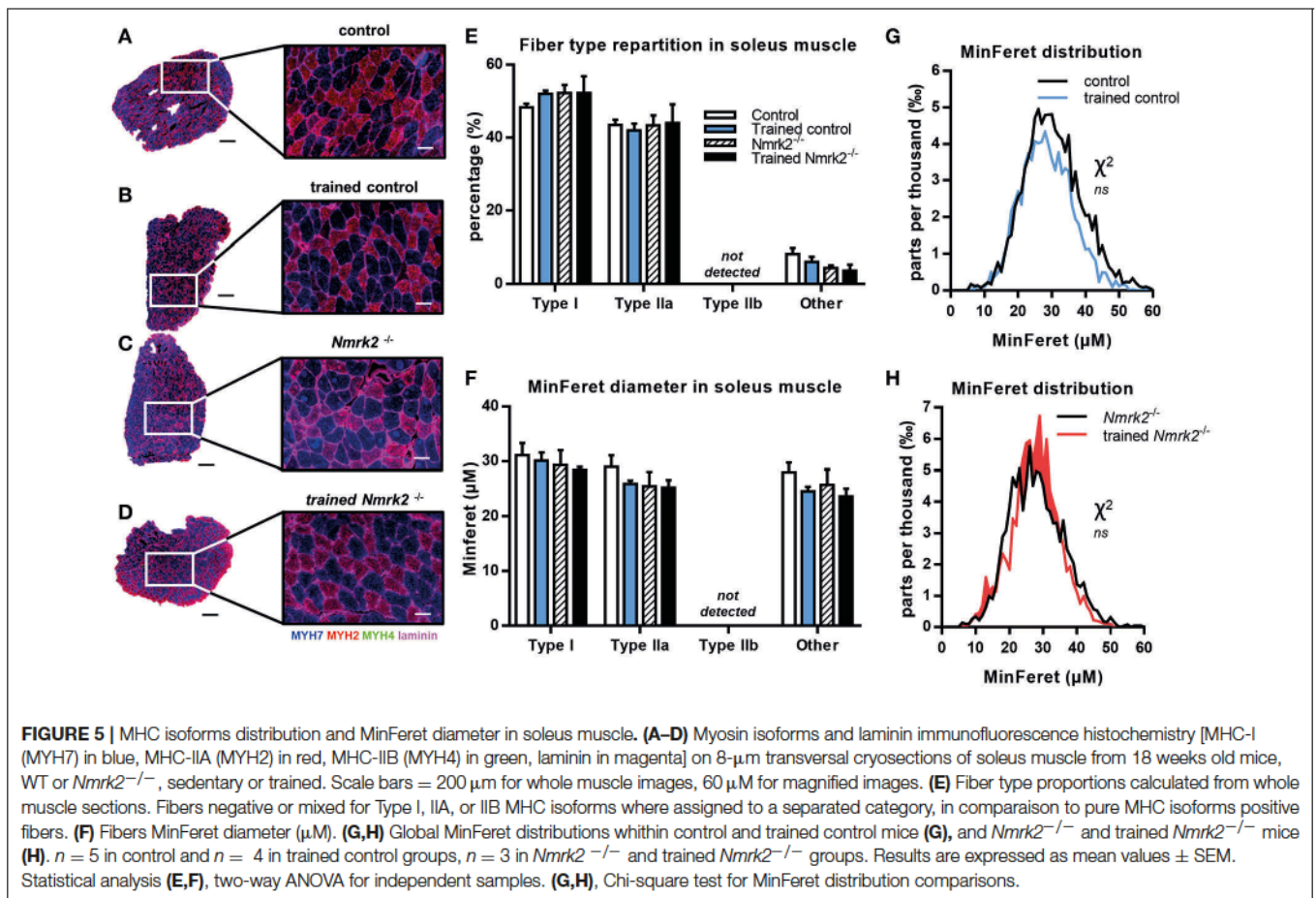
DISCUSSION

The stimulation of NAD⁺ synthesis by the NR vitamin B3, the substrate of NMRK enzymes, has been shown to be beneficial for

muscle physiology and mitochondrial function in the context of aging or genetic myopathies in many studies (Mouchiroud et al., 2013; Cerutti et al., 2014; Khan et al., 2014; Frederick et al., 2016; Ryu et al., 2016; Zhang et al., 2016). One exception being a short report that NR mildly decreases exercise performance in rats in a swimming exhaustion test although no muscle phenotyping or molecular analyses were performed to understand this lack of response (Kourtzidis et al., 2016).

We have shown recently that *Nmrk2* levels are strongly induced in the context dilated cardiomyopathy triggered by heart-specific deletion of the SRF transcription factor and that NR-supplemented diet or voluntary wheel running delays the onset of heart failure in this model (Deloux et al., 2017; Diguet et al., 2018). NMRK2, a striated muscle specific kinase has recently been shown to be required in muscle cells, in redundancy with the more ubiquitous NMRK1, to respond to the boosting effect of NR on NAD level (Fletcher et al., 2017). Here, we showed that aged NMRK2 deficient mice present an altered response to exercise training. In the heart, *Cpt1b* and *AcadL* genes, involved in β -oxidation, were reduced with exercise in *Nmrk2*^{-/-} mice. In gastrocnemius muscle, *Nmrk1* levels were reduced in NMRK2 deficient mice, and slow MHC isoform *Myh7* was more strongly induced by exercise in *Nmrk2*^{-/-} mice than in controls. Endurance training reduced the diameter of fibers in control mice but not in *Nmrk2*^{-/-} mice.





In cardiac and skeletal muscle, NAD levels has been described to be highly regulated by NAMPT, that acts as a rate limiting enzyme recycling NAM into NMN to form NAD⁺ (Mori et al., 2014). NMRK1 and NMRK2 enzymes were identified more recently as alternative enzyme using NR as an alternative precursor to salvage NAD⁺ levels (Bieganowski and Brenner, 2004). Here we show that global steady tissue levels of NAD are not altered in the heart and skeletal muscle despite the absence of NMRK2. This result is in agreement with a recently published study in young *Nmrk2*^{-/-} mice that also reported there was no alteration of global NAD levels in quadriceps muscle in the KO mice in comparison to controls, with concentrations around 400 pmol/mg of tissue, which are identical to our findings in 18 month-old mice (Fletcher et al., 2017). In contrast, however, the authors did not observe a difference in term of *Nmrk1* expression in young *Nmrk2*^{-/-} mice, when we found a clear reduction at 18-month of age. However *Nampt* expression is maintained at this age in *Nmrk2*^{-/-} mice, which is apparently sufficient to sustain global levels of NAD. Interestingly, while NAD levels were strongly reduced in the skeletal muscle-specific *Nampt*^{-/-} mice that were intolerant to exercise, NR had a potent rescuing effect on exercise intolerance, fiber size and ATP production despite having no impact on total NAD tissue levels and very minor effect on mitochondrial NAD pool (Frederick et al., 2016).

These finding show that the NMN produced from NR by NMRK enzymes is not equivalent to the NMN produced by NAMPT to synthesize NAD. So, while it is clear now that NMRK2 is dispensable for the maintenance of global tissue NAD levels, it suggests that NMRK2 is involved in the synthesis of a subfraction of the NAD pool that is efficiently used by the muscle cells.

Skeletal muscle adaptations to exercise varies depending on the type of exercise. To focus on endurance exercise, different studies have clearly demonstrated in human that endurance training induces a switch from glycolytic to a more oxidative phenotype (Andersen and Henriksson, 1977). In young rats, 10 weeks running program triggers a similar shift toward slower oxidative isoforms of myosin in plantaris muscle, when no shift was reported in soleus muscle (Fitzsimons et al., 1990). Here, we show that in aged mice, treadmill running exercise increases the expression of *Myh7* gene, which encodes a slow contractile isoform of myosin heavy chain (MHCI) that uses less ATP per unit of work because of its lower myosin ATPase activity, relative to fast myosin isoforms, and is thus more metabolically efficient in the context of endurance training. Interestingly, the increase in *Myh7* expression was significantly stronger in *Nmrk2*^{-/-} mice compared to controls, suggesting that NMRK2 signaling is normally blunting the expression of slow myosin in muscle or reciprocally that the lack of NMRK2 results in a higher need

for the muscle to reduce the energy required for contraction. We also found that endurance exercise led to a reduction of the mean diameter of muscle fibers in the plantaris but not the soleus of control mice whereas this phenomenon did not occur in *Nmrk2*^{-/-} mice. It is important to notice that *Nmrk2* expression is 2 times higher in plantaris muscle compared to soleus (Fletcher et al., 2017), which may explain while it function is more easily put in evidence in this muscle.

Considering the emerging role of skeletal muscle in autocrine and paracrine signaling, we also analyzed the expression of several myokines known to be activated by exercise. Among them, IL-15 is a cytokine secreted by skeletal muscle that promotes endurance adaptations via a stimulation of the oxidative energy metabolism and the Sirt1/PGC1a axis in young mice (Quinn et al., 2013). IL-15 levels are increased by exercise in humans (Rinnov et al., 2014). On the other skeletal muscle aging and sarcopenia are associated with low levels of IL-15 (Yalcin et al., 2018). Here, we show that exercise reduced IL-15 mRNA level in aged control and *Nmrk2*^{-/-} mice. On the other hand, we showed that the *IL-15* gene expression is upregulated at baseline in the soleus of *Nmrk2*^{-/-} mice. Since we observed a trend to have thinner muscle fibers in plantaris but not soleus muscle of *Nmrk2*^{-/-} compared to controls, it suggests that the local increase in IL-15 production in the soleus may contribute to preserve muscle mass. The link between NMRK2-dependent NAD metabolism and IL-15 signaling in oxidative metabolism will deserve to be further explored in the future. In the same line,

our observation that genes involved in fatty acids β -oxidation (FAO) are abnormally repressed in the heart of *Nmrk2*^{-/-} mice upon training while it is well known that FAO is increased during exercise to respond to the higher energy demand (Jeppesen and Kiens, 2012) suggest a maladaptive metabolic response in absence of NMRK2.

In conclusion, we demonstrated for the first time a phenotype in old *Nmrk2*^{-/-} mice in response to endurance training suggesting that NMRK2 deficient mice are prone to develop muscle dysfunction with aging.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MM and ZL conceived the study. RD and CT performed the laboratory experiments. AF performed and supervised RD for the endurance training protocol. RD and MM wrote the draft of the manuscript. AF corrected the draft of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM grant #16282, ZL, MM). RD and CT were supported by a PhD fellowship of French Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. We thank the UPMC university Center for Experimental Exploration, UMS 028 for taking care of the mice.

REFERENCES

- Andersen, P., and Henriksson, J. (1977). Training induced changes in the subgroups of human type II skeletal muscle fibres. *Acta Physiol. Scand.* 99, 123–125. doi: 10.1111/j.1748-1716.1977.tb10361.x
- Belenky, P., Racette, F. G., Bogan, K. L., McClure, J. M., Smith, J. S., and Brenner, C. (2007). Nicotinamide riboside promotes Sir2 silencing and extends lifespan via Nrk and Urh1/Pnp1/Meu1 pathways to NAD⁺. *Cell* 129, 473–484. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.024
- Bieganowski, P., and Brenner, C. (2004). Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell* 117, 495–502. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00416-7
- Cerutti, R., Pirinen, E., Lamperti, C., Marchet, S., Sauve, A. A., Li, W., et al. (2014). NAD(+)-dependent activation of Sirt1 corrects the phenotype in a mouse model of mitochondrial disease. *Cell Metab.* 19, 1042–1049. doi: 10.1016/j.cmet.2014.04.001
- Cruz-Jentoft, A. J., Landi, F., Schneider, S. M., Zúñiga, C., Arai, H., Boirie, Y., et al. (2014). Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: a systematic review. report of the international sarcopenia initiative (EWGSOP and IWGS). *Age Ageing* 43, 748–759. doi: 10.1093/ageing/afu115
- Deloux, R., Vitiello, D., Mougenot, N., Noirez, P., Li, Z., Mericskay, M., et al. (2017). Voluntary exercise improves cardiac function and prevents cardiac remodeling in a mouse model of dilated cardiomyopathy. *Front. Physiol.* 8:899. doi: 10.3389/fphys.2017.00899
- Denison, H. J., Cooper, C., Sayer, A. A., and Robinson, S. M. (2015). Prevention and optimal management of sarcopenia: a review of combined exercise and nutrition interventions to improve muscle outcomes in older people. *Clin. Int. Aging* 10, 859–869. doi: 10.2147/CI.A.S55842
- Diguet, N., Trammell, S. A. J., Tannous, C., Deloux, R., Piquereau, J., Mougenot, N., et al. (2018). Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 137, 2256–2273. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026099
- Fitzsimons, D. P., Diffie, G. M., Herrick, R. E., and Baldwin, K. M. (1990). Effects of endurance exercise on isomyosin patterns in fast- and slow-twitch skeletal muscles. *J. App. Physiol.* 68, 1950–1955.
- Fletcher, R. S., Ratajczak, J., Doig, C. L., Oakey, L. A., Callingham, R., and Da Silva, Xavier, G., et al. (2017). Nicotinamide riboside kinases display redundancy in mediating nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in skeletal muscle cells. *Mol. Metab.* 6, 819–832. doi: 10.1016/j.molmet.2017.05.011
- Frederick, D. W., Loro, E., Liu, L., Davila, A. Jr., Chellappa, K., Silverman, I., et al. (2016). Loss of NAD homeostasis leads to progressive and reversible degeneration of skeletal muscle. *Cell Metab.* 24, 269–282. doi: 10.1016/j.cmet.2016.07.005
- Gomes, A. P., Price, N. L., Ling, A. J., Moslehi, J. J., Montgomery, M. K., Rajman, L., White, J. P., et al. (2013). Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell* 155, 1624–1638. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.037
- Jeppesen, J., and Kiens, B. (2012). Regulation and limitations to fatty acid oxidation during exercise. *J. Physiol.* 590, 1059–1068. doi: 10.1113/jphysiol.2011.225011
- Johnson, M. L., Robinson, M. M., and Nair, K. S. (2013). Skeletal muscle aging and the mitochondria. *Trends Endocrinol. Metabol.* 24, 247–256. doi: 10.1016/j.tem.2012.12.003
- Khan, N. A., Auranen, M., Paetau, I., Pirinen, E., Euro, L., Forsstrom, S., et al. (2014). Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3. *EMBO Mol. Med.* 6, 721–731. doi: 10.1002/emmm.201403943
- Kourtzidis, I. A., Stoupas, A. T., Gioris, I. S., Veskoukis, A. S., Margaritelis, N. V., Taitzoglou, M., et al. (2016). The NAD(+) precursor nicotinamide riboside decreases exercise performance in rats. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 13, 32. doi: 10.1186/s12970-016-0143-x

- Kumar, V., Selby, A., Rankin, D., Patel, R., Atherton, P., Hildebrandt, W., et al. (2009). Age-related differences in the dose-response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men. *J. Physiol.* 587, 211–217. doi: 10.1113/jphysiol.2008.164483
- Lanza, I. R., and Nair, K. S. (2010). Mitochondrial Function as a Determinant of Life Span. *Pflugers Archiv.* 459, 277–289. doi: 10.1007/s00424-009-0724-5
- Mericskay, M. (2016). Nicotinamide adenine dinucleotide homeostasis and signalling in heart disease: Pathophysiological implications and therapeutic potential. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 109, 207–215. doi: 10.1016/j.acvd.2015.10.004
- Monteiro-Junior, R. S, de Tarso Maciel-Pinheiro, P., da Matta Mello Portugal, E., da Silva Figueiredo, L. F., Terra, R., Carneiro, L. S. F, et al. (2018). Effect of exercise on inflammatory profile of older persons: systematic review and meta-analyses. *J. Phys. Act. Health* 15, 64–71. doi: 10.1123/jpah.2016-0735
- Mori, V., Amici, A., Mazzola, F., Di Stefano, M., Conforti, L., Magni, G., et al. (2014). Metabolic profiling of alternative NAD biosynthetic routes in mouse tissues. *PLoS ONE* 9:e113939. doi: 10.1371/journal.pone.0113939
- Mouchiroud, L., Houtkooper, R. H., Moullan, N., Katsyuba, E., Ryu, D., Canto, C., et al. (2013). The NAD(+)/sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling. *Cell* 154, 430–441. doi: 10.1016/j.cell.2013.06.016
- Quinn, L. S., Anderson, B. G., Conner, J. D., and Wolden-Hanson, T. (2013). IL-15 Overexpression promotes endurance, oxidative energy metabolism, and muscle PPAR δ , SIRT1, PGC-1 α , and PGC-1 β expression in male mice. *Endocrinology* 154, 232–245. doi: 10.1210/en.2012-1773
- Ratajczak, J., Joffraud, M., Trammell, S. A. J., Ras, R., Canela, N., Boutant, M., et al. (2016). NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells. *Nat. Commun.* 7:13103. doi: 10.1038/ncomms13103
- Rinnov, A., Yfanti, C., Nielsen, S., Akerström, T. C., Peijs, L., Zankari, A., et al. (2014). Endurance training enhances skeletal muscle interleukin-15 in human male subjects. *Endocrine* 45, 271–278. doi: 10.1007/s12020-013-9969-z
- Ryu, D., Zhang, H., Ropelle, E. R., Sorrentino, V., Mázala, D. A. G., Mouchiroud, L., et al. (2016). NAD⁺ repletion improves muscle function in muscular dystrophy and counters global PARylation. *Sci. Trans. Med.* 8:361ra139. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf5504
- Vaur, P., Brugg, B., Mericskay, M., Li, Z., Schmidt, M. S., Vivien, D., et al. (2017). Nicotinamide riboside, a form of vitamin B3, protects against excitotoxicity-induced axonal degeneration. *FASEB J.* 31, 5440–5452. doi: 10.1096/fj.201700221RR
- Yalcin, A., Silay, K., Balik, A. R., Avcioglu, G., and Aydin, A. S. (2018). The relationship between plasma interleukin-15 levels and sarcopenia in outpatient older people. *Aging Clin. Exp. Res.* 30, 783–790. doi: 10.1007/s40520-017-0848-y
- Yoshino, J., Baur, J. A., and Imai, S. I. (2018). NAD⁺ intermediates: the biology and therapeutic potential of NMN and NR. *Cell Metabol.* 27, 513–528. doi: 10.1016/j.cmet.2017.11.002
- Zhang, H., Ryu, D., Wu, Y., Gariani, K., Wang, X., Luan, P., et al. (2016). NAD(+) repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science* 352, 1436–1443. doi: 10.1126/science.aaf2693
- Ziaaldini, M. M., Marzetti, E., Picca, A., and Murlasits, Z. (2017). biochemical pathways of sarcopenia and their modulation by physical exercise: a narrative review. *Front. Med.* 4:167. doi: 10.3389/fmed.2017.00167

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Deloux, Tannous, Ferry, Li and Mericskay. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4.4.3 Discussion

Dans cette étude, nous montrons que les animaux âgés *Nmrk2*^{KO} sont capables de subir un protocole d'entraînement en endurance et ne présentent pas d'intolérance à l'exercice, corroborant l'idée que ces mutants ne développent pas d'insuffisance cardiaque à un stade avancé. Cependant ces animaux présentent une expression cardiaque réduite des gènes *Cpt1b* et *AcadL* impliqués dans le métabolisme des acides gras qui peut être interprétée comme une réponse maladaptative quand on sait que les acides gras sont la source d'énergie majoritaire des cellules cardiaques, notamment au cours de l'entraînement en endurance.

Dans le cœur et le muscle squelettique, les taux de NAD⁺ ont été décrits comme étant principalement régulés par la NAMPT, qui agit en tant qu'enzyme limitante dans le recyclage du NAM en NMN pour former du NAD⁺ (Mori et al., 2014). Les kinases NMRK1 et NMRK2 ont été identifiées plus récemment comme des enzymes alternatives utilisant le NR comme précurseur alternatif pour restaurer les taux de NAD⁺ (Bieganowski & Brenner, 2004). Dans cette étude nous montrons que les niveaux tissulaires globaux de NAD ne sont pas altérés dans le cœur et le muscle squelettique, en dépit de l'absence de NMRK2. Ces résultats sont en accord avec une autre étude récemment publiée chez des animaux *Nmrk2*^{KO} jeunes dans laquelle aucune altération des niveaux globaux de NAD n'a été retrouvée dans le muscle du quadriceps en comparaison avec des animaux contrôles, avec des concentrations de 400 pmol/mg similaires à notre étude (Fletcher et al., 2017). Cependant, les auteurs n'observent pas à cet âge de différence d'expression de *Nmrk1* chez les jeunes souris *Nmrk2*^{KO}, alors que nous rapportons une réduction nette à l'âge de 18 mois. L'expression de la *Nampt* est cependant stable à cet âge chez ces souris, et est apparemment suffisante pour maintenir les taux globaux de NAD. De manière intéressante, les taux de NAD sont drastiquement réduits dans un modèle d'inactivation de la *Nampt* spécifiquement dans le muscle squelettique et les animaux présentent une intolérance à l'exercice, et le traitement au NR permet dans ce modèle d'abolir cette intolérance et de restaurer la taille des fibres musculaires et la production d'ATP sans pour autant augmenter les taux tissulaires de NAD (Frederick et al., 2016). Ces résultats montrent que le NMN

produit à partir du NR par les kinases NMRK n'est pas forcément équivalent à celui produit par la NAMPT pour la synthèse du NAD. Ainsi, s'il est assez clair que NMRK2 n'est pas nécessaire au maintien des concentrations tissulaires de NAD, cela suggère que NMRK2 est potentiellement impliquée dans la synthèse de NAD à un niveau plus compartimenté pour être utilisé efficacement par les cellules musculaires.

Les adaptations du muscle squelettique à l'exercice varient selon le type d'entraînement effectué. Si l'on se concentre sur l'exercice en endurance, un certain nombre d'études ont clairement démontré chez l'homme que l'entraînement en endurance induit une transition des fibres musculaires d'un phénotype glycolytique vers un phénotype plus oxydatif (Andersen & Henriksson, 1977). Dans une étude chez de jeunes rats, un programme d'entraînement de 10 semaines induit une transition similaire vers des isoformes de myosine plus lentes et oxydatives dans le muscle plantaris, sans transition observée dans le muscle soleus (Fitzsimons et al., 1990). Dans notre étude, nous montrons que chez la souris âgée, l'entraînement en endurance augmente l'expression du gène *Myh7*, qui code pour l'isoforme de myosine lente MHC-I. Cette isoforme consomme en effet moins d'ATP en comparaison avec des isoformes plus rapides, et permet ainsi une meilleure efficacité métabolique dans le contexte de l'exercice en endurance. De manière intéressante, l'induction de la *Myh7* est significativement plus élevée chez les animaux invalidés pour *Nmrk2*, suggérant que l'activité de la kinase réprime en temps normal légèrement l'expression de cette isoforme de myosine ou à l'inverse que la perte de NMRK2 résulte en une hausse des besoins d'économie énergétique pour le muscle. Nous avons également observé que l'exercice en endurance induisait une réduction de la taille des fibres musculaires dans le plantaris mais pas dans le soleus des animaux contrôles, et que ce phénomène n'a pas lieu chez les animaux *Nmrk2*^{KO}. Mais il est important de souligner que l'expression de *Nmrk2* est deux fois plus élevée dans le muscle plantaris en comparaison avec le muscle soleus (Fletcher et al., 2017), ce qui pourrait expliquer pourquoi cet effet est plus facilement mis en évidence dans ce muscle.

Compte-tenu du rôle émergent du muscle squelettique dans la signalisation autocrine et paracrine, nous avons également étudié l'expression de certaines myokines connues pour être activées par l'exercice. Parmi elles, l'IL-15 est une cytokine sécrétée par

le muscle squelettique et qui induit une adaptation à l'exercice en stimulant le métabolisme oxydatif et l'axe SIRT1/PGC-1 α chez des animaux jeunes (Quinn et al., 2013). Les taux d'IL-15 sont induits avec l'exercice également chez l'homme (Rinnov et al., 2014). Cependant, le vieillissement musculaire et la sarcopénie sont connus pour être associés à une réduction de l'expression de cette myokine (Yalcin et al., 2018). Dans cette étude, nous montrons que l'exercice réduit les taux l'expression de l'ARNm IL-15 chez les souris contrôles et *Nmrk2*^{KO} âgées. Cependant, nous montrons que l'expression d'IL-15 est augmentée à l'état basal chez les animaux *Nmrk2*^{KO} sédentaires dans le soleus. En lien avec la tendance observée à l'amincissement des fibres musculaires dans le muscle plantaris mais pas le muscle soleus chez les souris *Nmrk2*^{KO}, ces résultats suggèrent que la production locale d'IL-15 dans le soleus peut avoir contribué à la préservation de la masse musculaire. Le lien entre le métabolisme du NAD dépendant de la NMRK2 et la signalisation IL-15 sur le métabolisme énergétique devra être étudiée plus en détail. De même, la répression anormale de gènes impliqués dans l'utilisation des acides gras que nous avons observés dans le cœur des souris *Nmrk2*^{KO} avec l'entraînement, alors que la β -oxydation est bien connue pour être augmentée avec l'exercice pour répondre à la demande énergétique (Jeppesen & Kiens, 2012), suggère également une réponse métabolique maladaptée dans le cœur en absence de NMRK2.

En conclusion, nous avons pu observer pour la première fois dans cette étude un phénotype chez des souris *Nmrk2*^{KO} âgées en réponse à l'entraînement en endurance, démontrant que la déficience en NMRK2 peut induire une dysfonction musculaire avec le vieillissement.

4.5 Implication de la kinase NMRK2 dans les effets liés à la supplémentation au NR dans la cardiomyopathie dilatée

4.5.1 Introduction

Dans l'étude publiée récemment par l'équipe dans le journal *Circulation*, nous avons démontré que la supplémentation en NR dans le contexte de l'insuffisance cardiaque induite par la cardiomyopathie dilatée (CMD) avait des effets bénéfiques sur la fonction cardiaque en protégeant notamment le cœur en partie de la dilatation et de l'altération de la fonction contractile (Diguët et al., 2018). Ces effets sont corrélés à une protection du métabolisme du NAD, et associés à une induction de la voie de la kinase NMRK2. Pour mieux comprendre les effets de cette suractivation de NMRK2 dans le contexte de la CMD et déterminer dans quelle mesure les effets constatés de la supplémentation en NR sont liés à cette kinase et non à celle de son isoforme ubiquitaire NMRK1, nous avons généré un modèle d'animaux double-transgéniques en croisant des animaux de nos modèles SRF^{HKO} et $Nmrk2^{KO}$ de manière à empêcher l'action de la kinase NMRK2 lors de l'installation de la CMD. Ces animaux sont appelés « dKO » pour *double-knockout* dans la suite de ces travaux. Nous avons également cherché à comprendre quels étaient les effets de cette suractivation de NMRK2 en dehors du stress énergétique associé au contexte pathologique, et avons pour cela généré un nouveau modèle d'animaux transgéniques permettant la suractivation de la kinase de façon inductible dans le cœur. Chez ces deux modèles, nous avons suivi la fonction cardiaque par échocardiographie, et étudié la modulation du métabolisme du NAD et du métabolisme énergétique dans le muscle cardiaque, sous régime normal ou supplémenté en NR.

Ces travaux sont en cours de finalisation et seront bientôt soumis dans un journal pour publication. Dans un souci d'uniformité de ce manuscrit et pour la compréhension d'un des membres du jury anglophone, les parties résultats et discussion qui suivent sont rédigées en anglais.

4.5.2 Results

Impact of NR treatment on cardiac function and morphology in SRF^{HKO} in presence of absence of *Nmrk2* gene activation

Five days after tamoxifen injection, eighteen SRF^{HKO} and nineteen double SRF^{HKO} and *Nmrk2*^{KO} (dKO) mice were assigned to control diet or NR supplemented groups. LV function was assessed by echocardiography before (at baseline) and forty days after tamoxifen injection (**Figure 1**). For the statistical analysis, 2-way ANOVA for independent factors was performed. We observed an effect of the NR diet on LV ejection fraction (LVEF) at 40 days, that was significantly improved ($p=0.0048$) in comparison to control diet (CD) in both SRF^{HKO} ($44.4 \pm 4.6\%$ vs. $32.6 \pm 3.1\%$) and dKO ($55.2 \pm 4.6\%$ vs. $40.7 \pm 4.3\%$) mice (**Figure 1A**). Interestingly, we also evidenced a genotype effect between SRF^{HKO} and dKO mice independently of the diet, with a slightly improved LVEF at 40 days in dKO mice ($p=0.0375$). There was no significant interaction between these 2 factors. NR treatment also reduced LV dilation during systole as illustrated by a smaller increase in end-systolic volume (ESV) at 40 days ($p=0.0212$, **Figure 1B**). A similar trend occurred with end-diastolic volume (EDV) but without reaching statistical significance ($p=0.0625$, **Figure 1C**). In accordance to these findings on LV chamber volumes, NR treatment also reduced the thinning of the LV posterior wall (LVPW) at 40 days in systole ($p=0.0161$, **Figure 1E**), with a similar trend in diastole ($p=0.0517$, **Figure 1F**). We also observed that the stroke volume was slightly larger at 40 days in dKO mice compared to SRF^{HKO} mice ($p=0.0352$, **Figure 1D**) but no effect of NR treatment was evidenced ($p=0.3947$, **Figure 1D**). The stroke volume represents the difference between EDV and ESV, and it can be increased because of a reduction of ESV, which is associated with a more powerful systolic contraction, and/or because of an increase in EDV, associated with increased filling in diastole. The echocardiography data for dKO mice indicates that the increase in the stroke volume is rather due to the latter, i.e. increased chamber dilation. Despite this small difference in stroke volume, there was no effect of NR treatment or NMRK2 inactivation at 40 days after treatment on cardiac output (CO), which represents the product of the stroke volume and the heart rate, even though it seemed more preserved within dKO mice compared to SRF^{HKO} mice (**Figure 1G**). LV mass index, calculated from LV mass estimated from the echocardiography measurements normalized

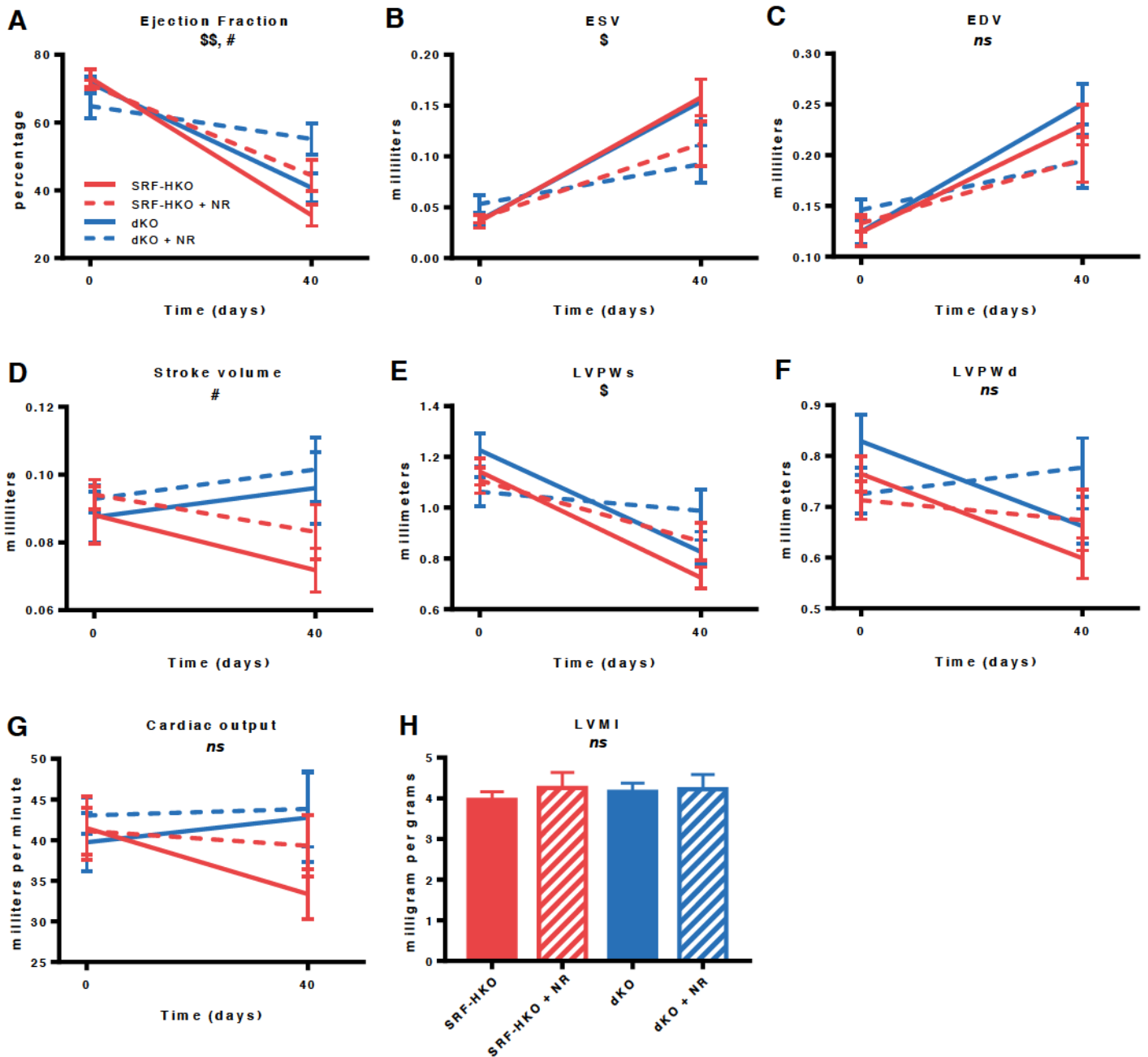


Figure 1: Impact of NR treatment on cardiac function and morphology in SRF-HKO and dKO mice. A-G. Evolution of cardiac parameters before and 40 days after tamoxifen injection. Ejection fraction (A) ; left ventricule end-systolic (B) and end-diastolic volumes (C), stroke volume (D), left ventricule posterior wall thickness in systole (E) and in diastole (F), cardiac output (G) an left ventricular mass index (LVMI) with LV calculated from echocardiography data and normalized over body weight at 40 days (H). Results are expressed as mean values \pm SEM. $n=12$ SRF-HKO, $n=6$ SRF-HKO + NR, $n=12$ dKO and $n=7$ dKO + NR mice. Statistical analysis : two-way ANOVA for independant samples at the 40 days for NR treatment and genotype factors. If an effect of one of the factors or an interaction between the two factors was observed, post-hoc Tukey comparisons was performed. $^{\$}p<0.05$ and $^{**}p<0.01$ for NR treatment effect, $^{\#}p<0.05$ for genotype effect.

	Two-way ANOVA		Control		SRFHKO - CD		SRF-HKO - NR	
	Baseline	D40	Baseline	D40	Baseline	D40	Baseline	D40
IVSd (cm)	ns	ns	0,81 ± 0,04	0,83 ± 0,04	0,77 ± 0,04	0,61 ± 0,03	0,68 ± 0,02	0,69 ± 0,06
LVd (cm)	ns	ns	3,69 ± 0,10	3,79 ± 0,09	3,60 ± 0,15	4,50 ± 0,15	3,74 ± 0,08	4,26 ± 0,18
LVPWd (cm)	ns	ns	0,82 ± 0,04	0,86 ± 0,04	0,76 ± 0,03	0,60 ± 0,04	0,71 ± 0,04	0,67 ± 0,06
IVSs (cm)	ns	ns	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,20 ± 0,02
LVs (cm)	ns	\$	1,29 ± 0,04	1,29 ± 0,07	1,26 ± 0,07	0,86 ± 0,06	1,13 ± 0,05	0,95 ± 0,07
LVPWs (cm)	ns	\$	2,47 ± 0,11	2,62 ± 0,10	2,28 ± 0,16	3,91 ± 0,17	2,43 ± 0,09	3,47 ± 0,23
EDV (mL)	ns	ns	1,22 ± 0,05	1,20 ± 0,05	1,14 ± 0,05	0,72 ± 0,04	1,11 ± 0,05	0,87 ± 0,07
ESV (mL)	ns	\$	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,11 ± 0,02
SV (mL)	ns	#	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,01
EF (%)	ns	\$\$,#	68,30 ± 2,28	64,70 ± 3,47	73,19 ± 2,57	32,63 ± 3,11	71,16 ± 1,31	44,44 ± 4,58
SF (%)	ns	\$\$,#	33,15 ± 1,70	30,88 ± 2,27	37,34 ± 2,18	13,18 ± 1,47	35,06 ± 1,01	18,84 ± 2,24
LV mass (mg)	ns	ns	105,88 ± 8,37	114,07 ± 4,42	91,78 ± 4,16	98,11 ± 5,72	87,29 ± 6,84	105,67 ± 12,40
HR (bpm)	ns	ns	458,53 ± 15,52	459,58 ± 18,49	471,86 ± 12,38	464,89 ± 14,12	435,25 ± 14,47	474,50 ± 26,50
CO (L/min)	ns	ns	40,24 ± 3,63	41,00 ± 3,54	41,48 ± 3,91	33,35 ± 3,05	41,12 ± 2,90	39,30 ± 3,79
h/r	ns	\$	0,44 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,44 ± 0,04	0,28 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,32 ± 0,03

	Two-way ANOVA		dKO - CD		dKO - NR	
	Baseline	D40	Baseline	D40	Baseline	D40
IVSd (cm)	ns	ns	0,78 ± 0,04	0,65 ± 0,04	0,69 ± 0,05	0,74 ± 0,05
LVd (cm)	ns	ns	3,62 ± 0,14	4,64 ± 0,14	3,86 ± 0,10	4,22 ± 0,21
LVPWd (cm)	ns	ns	0,83 ± 0,05	0,66 ± 0,03	0,73 ± 0,04	0,78 ± 0,06
IVSs (cm)	ns	ns	0,12 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,19 ± 0,03
LVs (cm)	ns	\$	1,27 ± 0,04	0,95 ± 0,09	1,18 ± 0,06	1,16 ± 0,09
LVPWs (cm)	ns	\$	2,34 ± 0,13	3,86 ± 0,19	2,68 ± 0,16	3,20 ± 0,26
EDV (mL)	ns	ns	1,23 ± 0,07	0,83 ± 0,05	1,06 ± 0,06	0,99 ± 0,08
ESV (mL)	ns	\$	0,04 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,02
SV (mL)	ns	#	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,01
EF (%)	ns	\$\$,#	71,68 ± 2,05	40,72 ± 4,27	64,88 ± 3,70	55,15 ± 4,60
SF (%)	ns	\$\$,#	35,83 ± 1,73	17,26 ± 2,06	31,01 ± 2,65	25,08 ± 3,10
LV mass (mg)	ns	ns	99,95 ± 8,30	115,57 ± 7,56	93,68 ± 7,50	118,40 ± 8,41
HR (bpm)	ns	ns	453,35 ± 11,86	441,88 ± 10,01	464,98 ± 21,91	429,28 ± 11,39
CO (L/min)	ns	ns	39,74 ± 3,58	42,77 ± 5,47	43,03 ± 2,23	43,84 ± 4,67
h/r	ns	\$	0,46 ± 0,04	0,29 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,37 ± 0,04

Table 1: LV measurements in echocardiography of SRFHKO and dKO mice. Abbreviations are identical to Figure 1. Results are expressed as mean values ± SEM. n=9 control, n=12 SRFHKO, n=6 SRFHKO + NR, n=12 dKO and n=7 dKO + NR mice. Statistical analysis: two-way ANOVA for independent samples at the 40 days for NR treatment and genotype factors. If an effect of one of the factors or an interaction between the two factors was observed, post-hoc Tukey comparisons was performed. \$p<0.05 and \$\$p<0.01 for NR treatment effect, #p<0.05 for genotype effect.

over the animals body weights, showed no difference between SRF^{HKO} and dKO mice nor with NR supplementation (**Figure 1H**). Detailed measurements of each parameter at baseline and 40 days after tamoxifen injection are presented in **Table 1**. In conclusion, in agreement with our previous finding (Diguët et al., 2018), NR supplementation improves LVEF and limits LV chamber dilatation and thinning in SRFHKO mice though we show here that this effect is not dependent on the expression of *Nmrk2*. Surprisingly, and on the contrary to our expectations, *Nmrk2* deletion even seems to provide a slight improvement to cardiac function and remodeling in the context of the SRF^{HKO} cardiomyopathy at this age of 3.3 month (40 days of treatment starting at 2 month).

Impact of NR treatment on NAD levels and energy metabolism in SRF^{HKO} and dKO mice

Global NAD levels were measured in liver and heart tissue 40 days after tamoxifen injection. In the liver, NR diet triggered a strong induction of total NAD levels compared with control diet, in both SRF^{HKO} (1206.2 ± 99.1 vs. 622.8 ± 43.3 pmol/mg of tissue, $p=0.0203$) and dKO mice (1370.9 ± 287.0 vs. 727.6 ± 56.2 pmol/mg of tissue, $p=0.0134$) (**Figure 2A**). This increase was essentially due to an increase of NAD⁺ content, as NR did not modify NADH levels in any of the groups. Interestingly, total NAD levels in the heart were more reduced in dKO mice under control diet in comparison to control mice (760.7 ± 40.4 vs. 971.3 ± 46.1 pmol/mg of tissue, $p=0.0275$), as SRF^{HKO} total NAD levels were reduced as well but without reaching statistical significance with controls (867.1 ± 43.9 vs. 971.3 ± 46.1 pmol/mg of tissue, $p=0.4707$) (**Figure 2B**). NR did not modify total NAD levels in both SRF^{HKO} (814.7 ± 26.2 vs. 867.1 ± 43.9 pmol/mg of tissue, $p=0.9461$) and dKO mice (897.1 ± 58.8 vs. 760.7 ± 40.4 pmol/mg of tissue, $p=0.3783$). *Nmrk2* gene expression was strongly induced in SRF^{HKO} mice with control and NR diet, and no expression was detected in dKO mice as expected (**Figure 2C**). mRNA levels of *Nampt* were reduced in SRF^{HKO} and dKO mice (**Figure 2D**). Expression of cardiac stress marker *Bnp* was induced in every condition in comparison to controls but without reaching statistical difference (**Figure 2E**), and *Myh7* levels were strongly induced in every groups as well (**Figure 2F**). Expression of *Sod2*

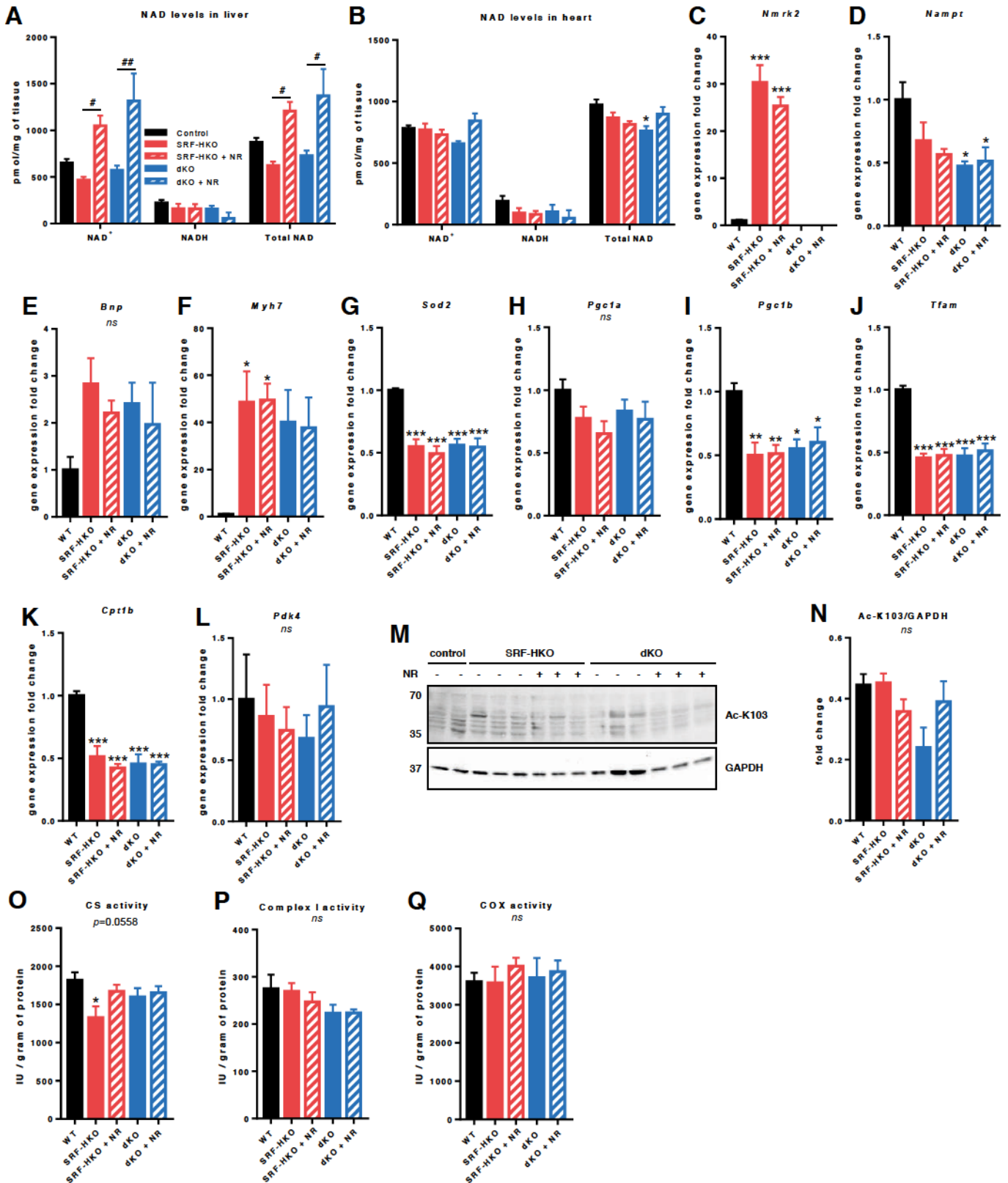


Figure 2 : Impact of NR treatment on NAD levels and energy metabolism in SRF-HKO and dKO mice.

A-B. Quantification of total NAD⁺ and NADH levels in liver and cardiac muscle. **C-L.** Relative quantification by RT-qPCR of *Nmrk2*, *Nampt*, *Bnp*, *Myh7*, *Sod2*, *Pgc1a*, *Pgc1b*, *Tfam*, *Cpt1b* and *Pdk4* genes expression in cardiac muscle. **M-N.** Quantification of global cardiac acetylation by western blot. **O-Q.** Mitochondrial enzymes activity measurements : citrate synthase (CS), complex I and cytochrome-c oxydase (COX). Results are expressed as mean values \pm SEM. n=7 control, n=6 SRF-HKO, n=6 SRF-HKO + NR, n=5 dKO and n=6 dKO + NR mice for all experiments (except n = 11 controls in NAD measurements and n=4 controls in western blot analysis). Statistical analysis : one-way ANOVA for independent samples, with post-hoc Tukey comparisons. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ in comparison with control group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and between NR diet and respective CD group.

enzyme involved in superoxide anion detoxification was reduced in every group and was not modified change by NR treatment (**Figure 2G**). Genes involved in mitochondrial biogenesis were altered as well, with a reduction of the expression of *Pgt1b* (**Figure 2I**) and *Tfam* (**Figure 2J**), but interestingly not *Pgt1a* (**Figure 2H**). mRNA levels of *Cpt1b*, involved in fatty acid oxidation which are the major source of energy in adult heart, were reduced in all experimental groups in comparisons to controls (**Figure 2K**) but not the expression of *Pdk4* involved in glucose metabolism (**Figure 2L**). Global protein acetylation assessed by western blot was not statistically changed between SR^{FHKO} or dKO mice nor in consequence of NR treatment, even though there was a trend for a reduction of acetylation within dKO mice under control diet (**Figure 2N**). Enzymatic assay revealed that citrate synthase (CS) activity were reduced in the heart of SR^{FHKO} mice compared to controls, and that NR was able to protect against this decline (**Figure 2O**). Surprisingly, dKO mice under control diet had CS activity equivalent to controls, and NR did not change it. Activity of mitochondrial respiratory chain complex I (**Figure 2P**) and cytochrome-c oxidase (**Figure 2Q**) were not modified in any condition.

Impact of NMRK2 overexpression and NR treatment on cardiac function and morphology

To assess the effects of NMRK2 overexpression in a non-pathological context in the heart, we followed cardiac function by echocardiography, before (at baseline) and 1 to 8 months after tamoxifen injection triggering the overexpression of NMRK2. Five days after tamoxifen injection, nine control and fourteen *Nmrk2*^{TG} mice were randomly assigned to control diet or NR supplemented groups. Cardiac muscle contractility, illustrated by LV ejection fraction, was progressively reduced in every group between baseline and 8 months after tamoxifen injection when the study was ended (**Figure 3A**). There was also a mild dilation of the LV with time between those timepoints in systole as showed with the enlargement of the LV diameter and the increase of the end-systolic LV volume in systole (**Figures 3B and 3D**). The same trend was observed on those parameters in diastole

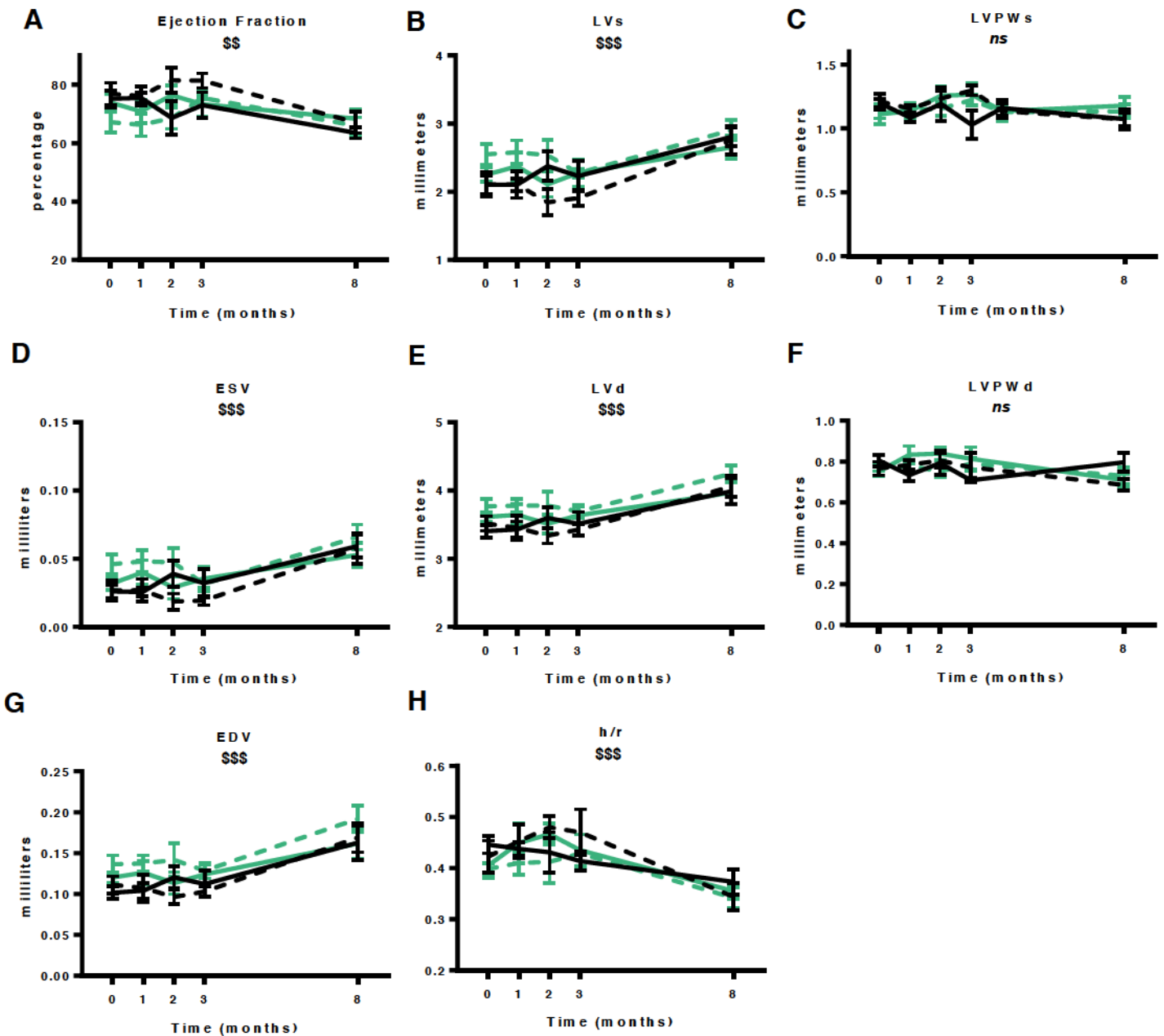


Figure 3 : Impact of NMRK2 overexpression and NR treatment on cardiac function and morphology measured by echocardiography. A-H. Follow-up of cardiac parameters before and 1 to 8 months after tamoxifen injection. Ejection fraction (A) ; left ventricle diameter (B), posterior wall thickness (C) and volume (D) in systole ; left ventricle diameter (E), posterior wall thickness (F) and volume (G) in diastole ; thickness/radius ratio (H). Results are expressed as mean values \pm SEM. $n=5$ control, $n=4$ control + NR, $n=8$ Nmrk2-TG, $n=6$ Nmrk2-TG + NR mice. Statistical analysis : two-way ANOVA for repeated measurements between with post-hoc Tukey comparisons between 0 and 8 months time points. \$\$ $p < 0.05$ and \$\$\$ $p < 0.001$ for time effect.

(**Figures 3E and 3G**). However, no thinning of the cardiac walls was detected neither in systole nor in diastole (**Figures 3C and 3F**), resulting in an increase of the thickness/radius ratio (**Figure 3H**) overtime, indicative of an eccentric dilation process. No difference was observed in any of those parameters between control and transgenic mice nor with or without NR supplementation at any timepoint.

Impact of NMRK2 overexpression and NR treatment on NAD levels and energy metabolism

Considering that no effect of NMRK2 overexpression could be observed overtime on cardiac function until at least 8 months of overexpression, we chose to analyze the NAD and energy metabolism phenotype on *Nmrk2*^{TG} mice after 2 months of overexpression. In the heart, there was a moderate but significant trend for *Nmrk2*^{TG} mice to have higher NAD levels compared to control mice (**Figure 4A**), with no global effect of NR treatment even though it almost reached statistical significance ($p=0.0871$, **Figure 4A**). In the liver, no global effect of NR treatment could be evidenced even though a close to statistical trend was observed ($p=0.0984$, **Figure 4B**), due to dispersion between individuals in NR treated groups. As expected, *Nmrk2* gene expression was highly increased with a fold change to control around a hundred times in *Nmrk2*^{TG} mice, with no changes induced by NR treatment (**Figure 4C**). At the protein level, NMRK2 was also higher in *Nmrk2*^{TG} mice compared to control mice under control diet (**Figure 4L**), and NR diet surprisingly induced a reduction of the NMRK2 protein expression in *Nmrk2*^{TG} mice. No changes in *Nampt* expression occurred with NR treatment or NMRK2 overexpression (**Figure 4D**), but interestingly *Nmrk2*^{TG} mice showed higher *Sirt1* mRNA levels in comparison to control mice (**Figure 4E**). At the protein level, there was no changes of NAMPT, SIRT1 or SIRT3 expression with NMRK2 overexpression or NR treatment (**Figures 4M-P**). Expression of cardiac stress markers *Anf* and *Myh7* were slightly improved in groups under NR diet (**Figures 4F-G**), but this is to put in comparison with the much higher induction of those markers, especially *Myh7*, that occurs in the context of severe cardiac stress during DCM (**Figure 2F**). *Pgc1a* expression was globally higher in transgenic mice compared to control mice with no effect of NR

(**Figure 4H**). Expression of mitochondrial transcription factors *Tfam* and *Nrf1* was not modified in transgenic mice or in response to NR (**Figure 4I-J**).

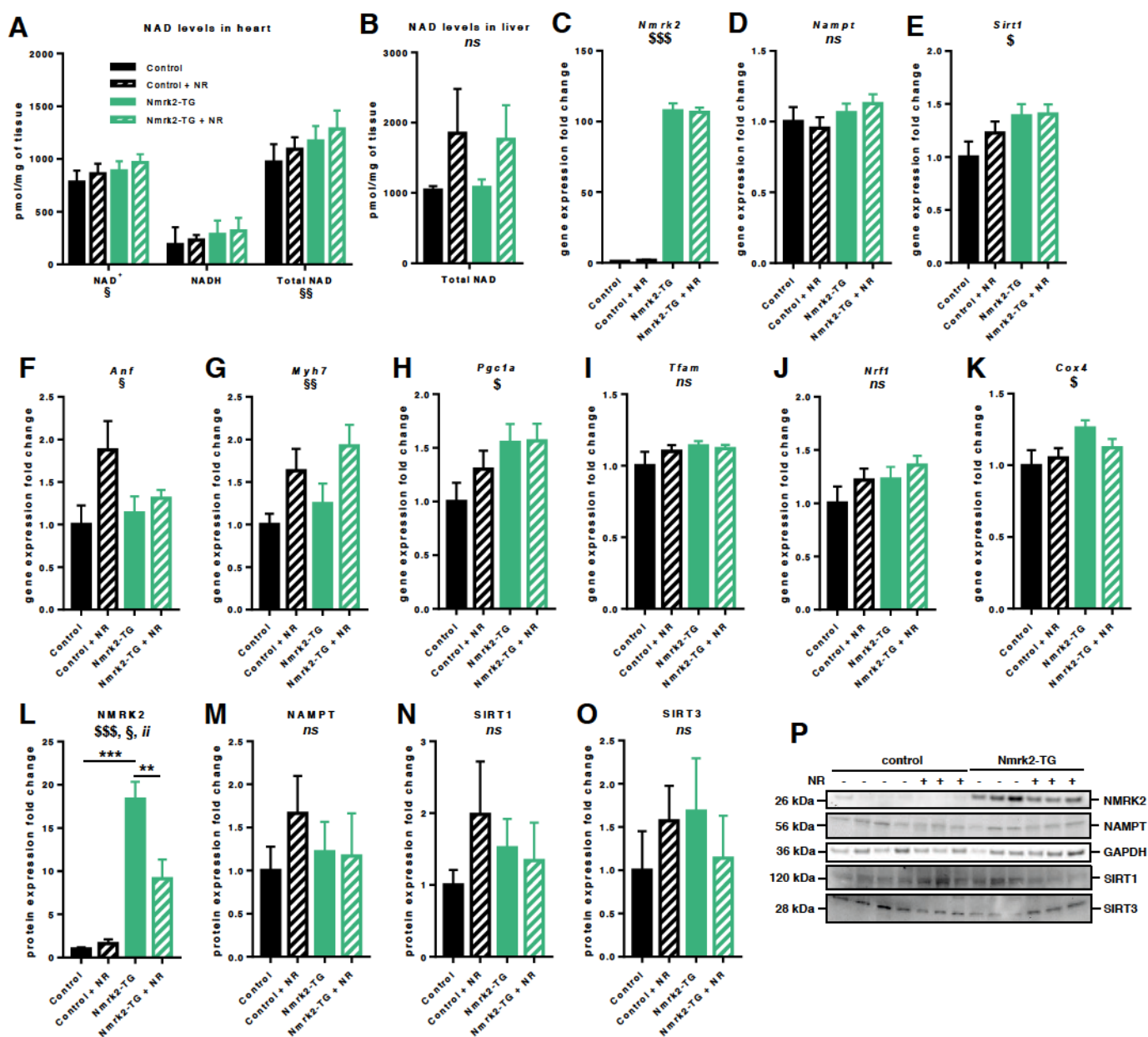


Figure 4 : Impact of NMRK2 overexpression and NR treatment on NAD levels and energy metabolism. A-B. Quantification of NAD levels in cardiac muscle and liver. C-K. Relative quantification by RT-qPCR of *Nmrk2*, *Nampt*, *Sirt1*, *Anf*, *Myh7*, *Pgc1a*, *Tfam*, *Nrf1* and *Cox4* genes expression in cardiac muscle. L-P. Quantification of NMRK2, NAMPT, SIRT1 and SIRT3 proteins expression by western blot. Results are expressed as mean values \pm SEM. n=7 control, n=8 control + NR, n=8 Nmrk2-TG, n=7 Nmrk2-TG + NR. Statistical analysis : two-way ANOVA for independent samples for genotype and diet factors, with post-hoc Tukey comparisons when an interaction between the two factors was detected. \$ p <0.05, \$\$ p <0.01 and \$\$\$ p <0.001 for genotype effect, \$ p <0.05 and \$\$ p <0.01 for NR diet effect. i p <0.01 for interaction. ** p <0.01 and *** p <0.001 for post-hoc Tuckey comparisons.

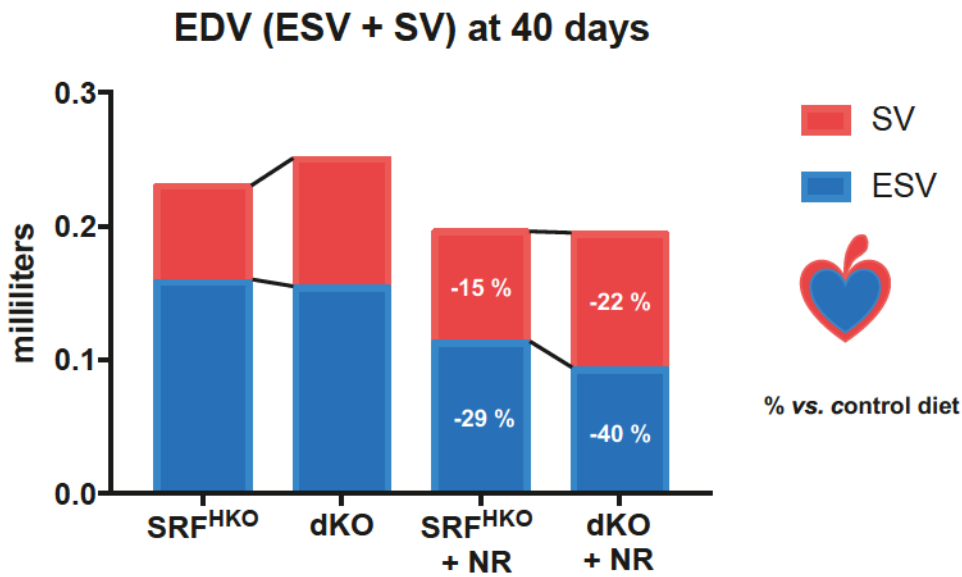
4.5.3 Discussion

In this study, we showed that NR treatment was able to improve LVEF and counteract LV chamber dilation in SRF^{HKO} mice, reinforcing our previous findings (Diguët et al., 2018). However, *Nmrk2* gene deletion did not alter those beneficial effects of NR, suggesting they're not dependent on the expression of the kinase. Surprisingly, and on the contrary to our expectations, *Nmrk2* deletion even seems to provide a slight improvement to cardiac function and remodeling in the context of the SRF^{HKO} induced cardiomyopathy. This was exhibited by a slight increase in LVEF and stroke volume with a two-way ANOVA genotype effect, even though post-hoc Tuckey's did not show any significance between 2 by 2 groups comparison.

The paradoxical improvement in LVEF and stroke volume in the dKO mice compared to SRF^{HKO} mice is complex to understand and require to consider different parameters that varies in a different way within the non treated and NR treated groups.

In absence of NR treatment, the difference in stroke volume between dKO and SRF^{HKO} is around 24.3 μ L (96.1 μ L in SRF^{HKO} vs. 71.8 μ L in dKO mice). However, the decomposition of this parameter, which is the difference between ESV and EDV, shows that it is essentially a larger EDV in dKO (250 μ L vs. 230 μ L in SRF^{HKO} mice) that explains this difference while the ESV are similar between both genotypes (157.9 μ L in SRF^{HKO} vs. 153.9 μ L in dKO). Hence, in absence of NMRK2, the LV filling in diastole is increased while maintaining systolic function, suggesting either an improvement of relaxation of the LV wall and/or a trend to structural dilatation that does not yet impair systolic function. The latter would interestingly be a similar phenomenon to the one we observed previously in young simple *Nmrk2*^{KO} that dilated more and had an increased EDV in comparison to control mice in response to transverse aortic constriction surgery (Tannous et al., in preparation).

With NR treatment, EDV and ESV were reduced in both genotypes, SRF^{HKO} and dKO, in comparison to respective control diet groups, but ESV was even more reduced in dKO mice resulting in a higher stroke volume. The mild improvement of cardiac function in the context of DCM within mice deleted for NMRK2 is surprising, as the induction of this



pathway with heart failure led us to think it would be important for NAD salvage and the improvement of energy metabolism. However, we could not shed into light any preservation of mitochondrial biogenesis pathways such as a *Tfam* or *Pgc1b* transcription factors, or energy metabolism pathways such as *Cpt1b*, indicating that dKO mice still present the same molecular alterations that SRF^{HKO} mice.

Global cardiac NAD levels were not drastically altered with DCM in SRF^{HKO} nor dKO mice in this study, in contrast to our previous findings (Diguet et al., 2018). This could be at least partially explained by the difference in the age of the mice used in our last study and this one. Indeed, mice used in our previous study were 9-month-old at the beginning of NR treatment and 10.5-month-old at the end of the study after 45 days, whereas mice used in this study were younger and 2-month-old at the beginning of the study, ending at 3.3-month-old after 40 days of treatment. The choice to study the effects of NRMK2 deletion in the SRF^{HKO} model at a younger age was made after we showed that LV function was already altered in *Nmrk2*^{KO} mice at this age of 9 to 11 months. Inactivating the SRF gene at this age would result in inducing a DCM in a context of an already altered LV function, and that's what we wanted to avoid with starting on with 2-month-old mice. NAD metabolism is known to be altered with aging, in parallel with an alteration of the enzymes consuming NAD, which could explain why NAD levels are less altered in consequence of DCM in younger mice.

Even if NMRK2 pathway is not essential to maintain global NAD levels using NR in cardiac stress conditions, the role of its induction remains unclear and we aimed to investigate it further in a non-pathological context. For this, we generated *Nmrk2*^{TG} mice in collaboration with Gareth Lavery at the University of Birmingham. The follow-up of cardiac function by echocardiography revealed that between baseline and 8 months after tamoxifen injection (10-month-old mice) a mild dilation of the LV developed in systole as evidenced by the increased EDV. No thinning of the LV walls was measured, sign of an eccentric dilation remodeling. This trend was the same overtime between all groups, independently of the genotype or the diet, indicating this dilation process was probably related to the aging process when the heart adapts its morphology to follow the increase of the animals' body weight, and that NMRK2 overexpression had no positive or negative impact on LV function at least until 8 months after induction. There was a mild but significant increase of NAD levels in *Nmrk2*^{TG} mice in comparison to controls, independently of NR treatment. Interestingly, there was a mild activation of the Sirt1/Pgc1a axis at least at a transcriptional level, which has been described previously as a pathway activated in energetic stress conditions by AMPK and upregulated in pressure-overload in the heart (Oka et al., 2011). *Nmrk2*^{TG} mice do not present major signs of cardiac dysfunction, but this could be an interesting field to investigate as it could be one early sign of an underlying condition not detectable by echocardiography. *Nmrk2*^{TG} mice also present a very moderate increase of cardiac stress markers *Anf* and *Myh7*, but this has to be compared with the level of induction of these markers in a strong model of cardiac stress such as the *SRF*^{HKO} mice. It would be interesting to see in the future how *Nmrk2*^{TG} mice would be able to react to cardiac stress, using TAC or myocardial infarction models.

In conclusion of this study, we showed that NR treatment was able to prevent the alteration of cardiac function in *SRF*^{HKO} mice, but that the kinase NMRK2 was not necessary to support those effects and to maintain global NAD levels in this context. The overexpression of NMRK2 in the heart in a non-pathological context had no positive or negative effect on cardiac function by echocardiography, in correlation with the previous findings.

V. Conclusion générale

Les objectifs de ces travaux de thèse ont été de déterminer le rôle de deux stratégies thérapeutiques pour lutter contre les altérations métaboliques qui sont décrites dans l'insuffisance cardiaque associée à la CMD, l'exercice musculaire et la stimulation du métabolisme du NAD par le NR.

Comme nous l'avons montré, l'exercice musculaire permet de façon très encourageante d'améliorer la fonction cardiaque dans le contexte de la CMD induite par la délétion du gène SRF (Deloux et al., 2017). Ces effets bénéfiques de l'exercice dans la CMD sont également décrits chez l'homme (Holloway et al., 2012; Legallois et al., 2016), mais les mécanismes sous-jacents à cette amélioration ne sont pas particulièrement bien identifiés. Notre étude chez la souris a ainsi participé à lever le voile sur les mécanismes impliqués et à montrer que cette amélioration fonctionnelle passerait par une réduction de l'installation de la fibrose cardiaque, associée à une répression transcriptionnelle des isoforme de collagènes I et III, améliorant ainsi la compliance ventriculaire. Les voies de signalisations médiées par l'AMPK, senseur du stress énergétique cardiaque, pourraient être impliquées dans ces mécanismes de remodelage bénéfique. En effet, des résultats préliminaires encore non publiés par le laboratoire montrent que l'inactivation de l'isoforme $\alpha 2$ de l'AMPK est corrélée à un développement fibrotique, ce qui suggère qu'elle pourrait être impliquée en temps normal dans l'inhibition des voies d'installation de la fibrose. De manière intéressante, nous avons également montré une réactivation des voies PPAR α et PGC-1 α , impliquées dans l'utilisation des acides gras et la stimulation de la biogenèse mitochondriale dans le cœur, et qui sont habituellement altérées dans le contexte de la CMD, et l'AMPK est connue pour activer la voie PGC-1 α (Cantó & Auwerx, 2009). L'AMPK étant activée par l'exercice (Kemp et al., 1999), elle pourrait ainsi être un acteur central dans les modifications structurelles et métaboliques qui permettent l'amélioration de la fonction cardiaque dans notre modèle. Des croisements sont en cours au laboratoire entre nos lignées d'animaux AMPK $\alpha 2^{KO}$ et SRF HKO pour confirmer cette hypothèse. En parallèle, il n'est également pas à exclure que les effets bénéfiques du NR sur la fonction cardiaque puissent en partie liés à des effets systémiques de l'exercice sur la fonction vasculaire et musculaire.

D'autre part, nous avons démontré que la stimulation des voies de biosynthèse du NAD⁺ par le NR, utilisé par les kinases NMRK, permettait également de compenser en partie

la perte de fonction cardiaque induite par la CMD (Diguët et al., 2018). Cette amélioration fonctionnelle est associée à une stimulation du métabolisme du NAD comme le montre l'augmentation des taux de métabolites dérivés du nicotinamide et est associée à une induction de la kinase NMRK2 au niveau transcriptomique et protéique, corrélé à une réduction de la NAMPT habituellement majoritaire pour le maintien des taux cellulaires de NAD. Ces résultats nous ont conduit à étudier plus en détails l'activité de cette kinase *in vivo* dans le cœur et aussi dans les muscles squelettiques puisque ce sont les deux seuls tissus dans lesquels cette kinase est exprimée.

Rôle de la voie Nmrk2 dans la biosynthèse du NAD⁺ et les effets liés au NR

Les kinases NMRKs sont des enzymes qui phosphorylent le NR pour donner du NMN, qui est ensuite utilisé par les NMNATs pour donner du NAD⁺. Une augmentation du taux de NAD a été observée en réponse au traitement au NR chez la levure (Belenky et al., 2007; Bieganowski & Brenner, 2004), ainsi que dans des cellules humaines en culture (Yang et al., 2007). Une autre étude publiée par l'équipe de Johan Auwerx a également montré que le traitement au NR chez la souris induisait une augmentation des taux globaux de NAD dans différents organes comme le muscle squelettique, le foie ou le tissu adipeux, même si malheureusement le cœur n'est pas décrit dans cette étude (Cantó et al., 2012).

Il existe deux isoformes des kinases NMRK utilisant le NR : une isoforme ubiquitaire NMRK1, présente dans tous les types cellulaires, et une seconde isoforme NMRK2 spécifique du muscle strié, localisée uniquement dans le tissu cardiaque et le muscle squelettique comme nous l'avons montré. Si ces deux kinases NMRK1 et NMRK2 sont relativement proches, elles présentent des particularités distinctes comme une affinité différente au NR, NMRK1 ayant un K_M de 0.088 mM pour le NR, quand NMRK2 présente un K_M de 0.19 mM (Tempel et al., 2007). Cependant la constante catalytique K_{cat} de NMRK2 est plus élevée que celle de NMRK1. De plus, la kinase NMRK1 peut utiliser l'ATP et le guanosine triphosphate (GTP) comme substrat pour phosphoryler le NR en NMN, alors que

la NMRK2 utilise spécifiquement l'ATP pour cette réaction (Dölle & Ziegler, 2009; Tempel et al., 2007).

Nos résultats chez les mutants *Nmrk2*^{KO} et *Nmrk2*^{TG} suggèrent que l'isoforme NMRK2 spécifique du muscle strié n'est pas essentielle pour le maintien des taux globaux de NAD dans le cœur en conditions basale, son inhibition ou sa surexpression n'ayant pas d'impact majeur. Notre étude chez le double mutant *SRF*^{HKO}-*Nmrk2*^{KO} a également montré que la kinase NMRK2 ne semble pas essentielle dans un contexte de stress énergétique cardiaque malgré l'activation de cette voie, et qu'il existe probablement une redondance entre l'activité de cette kinase et celle de la NMRK1. Une étude récente a montré que la perte de fonction de NMRK1 n'est pas critique pour le maintien des taux de NAD⁺ dans le foie (Ratajczak et al., 2016), même si cette kinase prends tout de même une part importante dans la biosynthèse du NAD⁺ dans les hépatocytes en réponse à une supplémentation en NR et en NMN. Une étude encore plus récente suggère que la perte de fonction de NMRK2 n'a pas d'impact sur les taux de NAD⁺ dans le muscle squelettique et qu'elle n'induit pas de dysfonction majeure chez des animaux jeunes (Fletcher et al., 2017), comme nous l'avons également observé chez nos souris *Nmrk2*^{KO} plus âgées (Deloux et al., 2018). Dans un modèle cellulaire de myoblastes en culture, cette même équipe a démontré que l'inactivation sélective de chacune des kinases NMRK n'empêchait pas l'augmentation des taux cellulaires de NAD⁺ en réponse à une supplémentation en NR, sauf en cas de double inactivation de ces kinases. Ainsi, ces observations corrélées à nos différentes études semblent indiquer que les kinases NMRK1 et NMRK2 partagent une redondance dans leur utilisation du NR pour produire le NMN nécessaire à la formation du NAD⁺, et qu'il est nécessaire d'inactiver simultanément ces deux kinases pour vraiment altérer la biosynthèse de NAD à partir du NR.

Compartmentation du NAD et de la kinase NMRK2

Si les taux globaux de NAD ne sont pas majoritairement altérés par la délétion de la kinase NMRK2 ou augmentés par la supplémentation en NR, on peut envisager qu'ils soient

modulés de façon différente en fonction des compartiments cellulaires. En effet, il est possible que le NAD ne soit pas réparti uniformément dans les cellules mais qu'il existe différents *pools* répartis dans les différents compartiments cellulaires que sont le noyau, le cytoplasme et les mitochondries. Il est généralement admis que le NAD peut passer librement à travers les pores nucléaires et qu'il est ainsi globalement à l'équilibre entre le cytoplasme et le noyau, en revanche, il ne pourrait pas passer la membrane interne mitochondriale. Le pool de NAD mitochondrial est ainsi considéré comme relativement distinct du reste de la cellule, avec des ratios NAD^+/NADH très différents entre le cytosol et les mitochondries (Pittelli et al., 2010; Stein & Imai, 2012). La répartition du NAD entre le cytosol et la mitochondrie est d'ailleurs également différente en fonction du type cellulaire et peut atteindre 70% dans les mitochondries des cardiomyocytes, où les besoins en phosphorylation oxydative sont particulièrement élevées (Alano et al., 2007). Chez la levure, deux transporteurs du NAD^+ à la membrane mitochondriale ont été identifiés (Todisco et al., 2006), mais ils ne semble pas avoir d'équivalent chez les mammifères (Ying, 2008). Les mitochondries disposeraient d'ailleurs en partie de leur propre machinerie de production du NAD^+ avec notamment la NMNAT3, localisée spécifiquement à la matrice interne mitochondriale. La NAMPT serait cependant une enzyme strictement cytosolique, comme suggéré dans plusieurs études dans différents types cellulaires (Nikiforov et al., 2011; Revollo et al., 2004; Sasaki et al., 2006). Il faut donc faire l'hypothèse que le NMN serait lui capable de passer dans la mitochondrie du moins dans des cellules humaines HeLa et des hépatocytes de rats (Barile et al., 1996; Nikiforov et al., 2011), bien qu'il n'y ait pas de transporteur identifié à l'heure actuelle. De façon intéressante, une possible implication de la thymidine kinase 2 dans la phosphorylation du NR en NMN dans la mitochondrie a été évoquée, mais cette activité n'a pas pu être mise en évidence (Nikiforov et al., 2011). Ainsi à l'heure actuelle, le dogme est que le NAD mitochondrial serait issu du NAM et du NR convertis préalablement en NMN dans le cytosol, puis transportés dans la mitochondrie pour donner du NAD *via* la NMNAT3.

Une étude très récente est cependant venue challenger ce dogme (Davila et al., 2018). Dans ces travaux, basés sur l'utilisation d'acide nicotinique riboside (NAR) doublement marqué avec des isotopes lourds, les auteurs montrent que les mitochondries

isolées à partir de myoblastes et d'hépatocytes en culture seraient capables d'incorporer le NAR directement, donc potentiellement le NR, pour être ensuite transformé en NAD à l'intérieur des mitochondries. Les auteurs ont cependant observé ce phénomène dans deux types cellulaires, et on ne sait pas encore si cela s'applique également aux cardiomyocytes.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse vont cependant dans le sens d'une compartimentation de la synthèse du NAD en réponse au NR, du moins d'après les résultats de mesure de l'activité glycolytique et de la chaîne respiratoire en réponse au NR dans des cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture. En effet, nous avons montré que la supplémentation en NR dans des cellules déplétées en NAD était capable d'agir sur la biosynthèse du NAD de manière à stimuler la glycolyse dans le cytosol, mais pas l'activité de la chaîne respiratoire dans la mitochondrie. Une des hypothèses serait que les kinases NMRK pourraient aussi être localisées de façon préférentielle dans le cytosol à proximité des complexes glycolytiques et ainsi fournir localement à partir du NR le NAD nécessaire à l'activité de ces complexes. Ces hypothèses devront être vérifiées par des expériences de co-immunoprécipitation des kinases NMRK avec les complexes glycolytiques. Il serait également intéressant de confirmer la compartimentalisation de la production de NAD en réponse au NR en utilisant des sondes fluorescentes sensibles au taux de NAD et adressées spécifiquement dans les différents compartiments développées récemment (Cambronne et al., 2016). De nouvelles sondes sensibles à l'état redox du NAD^+/NADH sont également disponibles depuis peu (Zhao et al., 2016) et permettraient d'avoir une nouvelle vision de la régulation du métabolisme énergétique *in vivo* par le NR dans le modèle SRF^{HKO} . Des expériences de traçage métabolique du glucose en réponse au NR en utilisant du $[^{13}\text{C}_6]$ -Glucose sont actuellement en cours pour affiner l'hypothèse du lien entre la supplémentation en NR et la stimulation préférentielle de la glycolyse, *ex vivo* dans des cardiomyocytes en culture et *in vivo* dans les souris SRF^{HKO} .

Le fait qu'on ne détecte pas de modulation majeure du taux global de NAD dans le cœur lorsqu'on inactive la NMRK2 n'exclue pas qu'elle puisse contribuer à la production de NAD dans un ou plusieurs microdomaines cellulaires. Cette contribution locale à la synthèse de NAD ne représenterait probablement qu'une fraction très minoritaire du *pool* global de NAD et les variations induites par la perte de NMRK2 ne pourraient pas être détectées dans

des extraits tissulaires. Cette hypothèse est soulevée par le fait que le mutant *Nmrk2*^{KO} développe un phénotype cardiaque associé à une altération des dépôts de laminine dans la matrice extracellulaire plusieurs mois avant qu'une atteinte sur le *pool* global de NAD dans le cœur puisse être détectée (Tannous et al., en préparation). Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la perte de NMRK2 induisait un dépôt et une organisation anormale de la laminine dans la matrice extracellulaire du myocarde. NMRK2, connue également sous une isoforme du nom de *Muscle integrin binding protein* (MIBP), aurait un lien avec les intégrines $\alpha 7$ et $\beta 1$ sous membranaires et connectées à la laminine dans la matrice cellulaire. L'ADP-ribosylation de l'intégrine $\alpha 7$ NAD⁺-dépendante *via* ART1 serait importante pour son adhésion à la laminine (Haas et al., 2015), et l'absence de NMRK2 dans ce microdomaine à proximité de l'intégrine $\alpha 7$ pourrait ainsi altérer localement la production de NAD⁺ nécessaire à son ADP-ribosylation et déstabiliser le lien avec la laminine et la matrice extracellulaire.

Pharmacodynamique et effets systémiques du NR

Dans les travaux effectués dans le cadre de cette thèse, nous avons principalement étudié les effets du NR au niveau du tissu cardiaque dans le modèle de CMD induit par la délétion du gène SRF. Cependant, il n'est pas à exclure que les effets du NR puissent également être liés à des effets systémiques sur les autres organes, sur lesquels le NR aurait un effet bénéfique et qui agiraient ensuite indirectement sur la fonction cardiaque en réduisant la charge hémodynamique sur le cœur des souris SRF^{HKO}. On parle d'ailleurs d'administration de NR, mais on ne sait pas s'il arrive réellement intact dans le cœur et les organes périphériques, ou s'il est transformé au cours de son absorption en d'autres métabolites comme le NMN ou le NAM. Deux études publiées dès les années 1980 chez le rat a montré que le NAD⁺ administré par gavage était rapidement transformé en NMN et NR dans l'intestin, avant d'être convertis en NAM pour passer dans la circulation (Baum et al., 1982; Gross & Henderson, 1983). Le NR administré dans l'eau de boisson semble arriver intact dans le foie dans une faible proportion, mais pas dans le muscle squelettique par exemple (Frederick et al., 2016). Une étude récente visant à évaluer le devenir du NR et du

NMN après administration a montré que ces deux précurseurs étaient rapidement dégradés et étaient retrouvés principalement sous forme de NAM dans la circulation sanguine, et comme l'étude de Frederick qu'une certaine quantité de NR arrivait finalement intact dans le foie, et également dans d'autres tissus comme le rein ou le muscle squelettique mais dans une moindre mesure (L. Liu et al., 2018). Si ces nouvelles données sont intéressantes et permettent de réfléchir quant au devenir du NR administré *in vivo*, il faut cependant rappeler que le mode d'administration de ces précurseurs, réalisé ici par gavage ou en intraveineuse, n'est pas la norme dans la littérature où est plutôt privilégiée l'administration de ces précurseurs à plus long terme dans l'eau de boisson ou la nourriture. Si le NR administré oralement est principalement transformé en NAM avant d'atteindre le cœur, cela pourrait expliquer pourquoi la kinase NMRK2 n'a que peu d'impact dans le tissu cardiaque, et que ce soit la NAMPT qui soit l'enzyme prédominante pour le maintien des taux de NAD.

Dans tous les cas, l'administration de NR a été décrite comme permettant d'atténuer les atteintes hépatiques et préserver la fonction mitochondriale en réduisant notamment le stress oxydant chez la souris (S. Wang et al., 2018). Le NR améliore également la fonction mitochondriale en stimulant la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique de modèles murins de maladies mitochondriales (Cerutti et al., 2014; N. A. Khan et al., 2014). Dans un modèle d'obésité induite par un régime riche en graisses, le NR permet d'augmenter la synthèse du NAD⁺ dans les tissus musculaires et le foie, et ainsi préserver l'activité des sirtuines 1 et 3, et permet une meilleure sensibilité à l'insuline et une réduction du cholestérol (Cantó et al., 2012). Une autre étude montre que le NR diminue aussi l'intolérance au glucose tout en réduisant le développement de la stéatose hépatique chez des souris pré-diabétiques (Trammell, Weidemann, et al., 2016). Chez l'homme également, de plus en plus d'études s'intéressent à l'administration chronique de NR, et on sait déjà qu'il permet de réduire la rigidité vasculaire qui se développe au cours du vieillissement (C. Martens et al., 2017).

Ainsi, ces différentes études montrent que le NR peut agir sur des tissus périphériques comme le foie, le muscle squelettique ou les vaisseaux qui sont habituellement atteints dans le contexte de l'insuffisance cardiaque, et dont la préservation

pourrait influencer en retour par un effet systémique global pour améliorer la fonction cardiaque.

Pour conclure, ces travaux ont permis de mettre en évidence le rôle bénéfique de l'exercice et de la supplémentation en NR sur la fonction cardiaque dans le contexte de la CMD, même si la kinase NMRK2 ne semble pas prendre une part essentielle à ces effets. Compte tenu des études préliminaires chez les modèles animaux et des premières études cliniques chez l'homme montrant que l'administration chronique de NR est bien tolérée chez les patients sains (C. R. Martens et al., 2018), il semble que la thérapie métabolique par la supplémentation au NR soit très prometteuse. De nombreuses études sont réalisées à l'heure actuelle pour évaluer son impact dans différents contextes physiopathologiques chez l'homme. En effet, 25 essais cliniques en cours s'intéressent à l'utilisation du NR dans le cadre du vieillissement, du syndrome métabolique ou des fonctions cognitives et cardiovasculaires, et notamment une étude sur l'insuffisance cardiaque systolique¹. Ces études apporteront dans les années qui viennent des réponses essentielles sur l'intérêt de la supplémentation thérapeutique en vitamine NR chez l'homme.

¹ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03423342?term=Nicotinamide+riboside&rank=3>

Bibliographie

- Adamopoulos, S., Coats, A. J. S., Brunotte, F., Arnolda, L., Meyer, T., Thompson, C. H., Dunn, J. F., Stratton, J., Kemp, G. J., Radda, G. K., & Rajagopalan, B. (1993). Physical training improves skeletal muscle metabolism in patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, *21*(5), 1101-1106. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(93\)90231-O](https://doi.org/10.1016/0735-1097(93)90231-O)
- Affolter, M., Montagne, J., Walldorf, U., Groppe, J., Kloter, U., LaRosa, M., & Gehring, W. J. (1994). The Drosophila SRF homolog is expressed in a subset of tracheal cells and maps within a genomic region required for tracheal development. *Development (Cambridge, England)*, *120*(4), 743-753. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600954>
- Akbay, E. A., Moslehi, J., Christensen, C. L., Saha, S., Tchaicha, J. H., Ramkisson, S. H., Stewart, K. M., Carretero, J., Kikuchi, E., Zhang, H., Cohoon, T. J., Murray, S., Liu, W., Uno, K., Fisch, S., Jones, K., Gurumurthy, S., Gliser, C., Choe, S., Keenan, M., Son, J., Stanley, I., Losman, J. A., Padera, R., Bronson, R. T., Asara, J. M., Abdel-Wahab, O., Amrein, P. C., Fathi, A. T., Danial, N. N., Kimmelman, A. C., Kung, A. L., Ligon, K. L., Yen, K. E., Kaelin, W. G., Bardeesy, N., & Wong, K. K. (2014). D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH2 causes cardiomyopathy and neurodegeneration in mice. *Genes and Development*, *28*(5), 479-490. <https://doi.org/10.1101/gad.231233.113>
- Akimoto, T., Pohnert, S. C., Li, P., Zhang, M., Gumbs, C., Rosenberg, P. B., Williams, R. S., & Yan, Z. (2005). Exercise stimulates Pgc-1 α transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(20), 19587-19593. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408862200>
- Aksoy, P., White, T. A., Thompson, M., & Chini, E. N. (2006). Regulation of intracellular levels of NAD: A novel role for CD38. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *345*(4), 1386-1392. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.042>
- Alano, C. C., Tran, A., Tao, R., Ying, W., Karliner, J. S., & Swanson, R. A. (2007). Differences among cell types in NAD⁺ compartmentalization: A comparison of neurons, astrocytes, and cardiac myocytes. *Journal of Neuroscience Research*, *85*(15), 3378-3385. <https://doi.org/10.1002/jnr.21479>
- Alcendor, R. R., Gao, S., Zhai, P., Zablocki, D., Holle, E., Yu, X., Tian, B., Wagner, T., Vatner, S. F., & Sadoshima, J. (2007). Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circulation Research*, *100*(10), 1512-1521. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000267723.65696.4a>
- Allen, D., Harrison, B. C., Maass, A., Bell, M. L., Byrnes, W. C., Leinwand, L. A., Byrnes, C., Bruno, N. E., Kelly, K. A., Hawkins, R., Lawani, M. B., Antonio, L., Nwachukwu, J. C., Nettles, K. W., Conkright, M. D., Genest, D. S., Falcao, S., Michel, C., Kajla, S., Germano, M. F., Lacasse, A., Vaillancourt, C., Gutkowska, J., Lavoie, J. L., Byrnes, W. W. C., & David, L. (2001). Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *Journal of Applied Physiology*, *90*(5), 1900-1908. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.5.1900>
- Altschul, R., Hoffer, A., & Stephen, J. D. (1955). Influence of Nicotinic Acid on Serum Cholesterol in Man. *Arch. Biochem. Biophys.*, *54*(2), 558-559.

[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(55\)90070-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(55)90070-9)

- Andersen, P., & Henriksson, J. (1977). Training Induced Changes in the Subgroups of Human Type II Skeletal Muscle Fibres. *Acta Physiologica Scandinavica*, *99*(1), 123-125. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1977.tb10361.x>
- Angelini, A., Li, Z., Mericskay, M., Decaux, J. F., & Samuel, J. L. (2015). Regulation of connective tissue growth factor and cardiac fibrosis by an SRF/MicroRNA-133a Axis. *PLoS ONE*, *10*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139858>
- Arbustini, E., Diegoli, M., Fasani, R., Grasso, M., Morbini, P., Banchieri, N., Bellini, O., Dal Bello, B., Pilotto, A., Magrini, G., Campana, C., Fortina, P., Gavazzi, A., Narula, J., & Viganò, M. (1998). Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy. *American Journal of Pathology*, *153*(5), 1501-1510. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65738-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65738-0)
- Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschläger, M., Rütther, U., & Nordheim, A. (1998). Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *The EMBO Journal*, *17*(21), 6289-6299. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6289>
- Backes, R. J., & Gersh, B. J. (1992). Cardiomyopathies in the elderly. *Cardiovascular Clinics*, *22*(2), 105-125. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1586913>
- Bai, P., Cantó, C., Oudart, H., Brunyánszki, A., Cen, Y., Thomas, C., Yamamoto, H., Huber, A., Kiss, B., Houtkooper, R. H., Schoonjans, K., Schreiber, V., Sauve, A. A., Menissier-De Murcia, J., & Auwerx, J. (2011). PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell Metabolism*, *13*(4), 461-468. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.004>
- Barger, P. M., & Kelly, D. P. (2000, August). PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends in Cardiovascular Medicine*. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(00\)00077-3](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(00)00077-3)
- Barile, M., Passarella, S., Danese, G., & Quagliariello, E. (1996). Rat liver mitochondria can synthesize nicotinamide adenine dinucleotide from nicotinamide mononucleotide and ATP via a putative matrix nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Biochemistry and Molecular Biology International*, *38*(2), 297-306.
- Barreto, T., Cleto, L., Gioda, C., Silva, R., Campi-Azevedo, A., De Sousa-Franco, J., De Magalhães, J. C., Penaforte, C. L., De Castro Pinto, K. M., Dos Santos Cruz, J., & Rocha-Vieira, E. (2012). Swim training does not protect mice from skeletal muscle oxidative damage following a maximum exercise test. *European Journal of Applied Physiology*, *112*(7), 2523-2530. <https://doi.org/10.1007/s00421-011-2211-x>
- Baum, C. L., Selhub, J., & Rosenberg, I. H. (1982). The hydrolysis of nicotinamide adenine dinucleotide by brush border membranes of rat intestine. *Society*, *204*, 203-207. <https://doi.org/10.1042/bj2040203>
- Belaguli, N., Schildmeyer, L. A., & Schwartz, R. J. (1997). Organization and myogenic restricted expression of the murine serum response factor gene. A role for autoregulation. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(29), 18222-18231. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.18222>
- Belenky, P., Racette, F. G., Bogan, K. L., McClure, J. M., Smith, J. S., & Brenner, C. (2007).

- Nicotinamide Riboside Promotes Sir2 Silencing and Extends Lifespan via Nrk and Urh1/Pnp1/Meu1 Pathways to NAD⁺. *Cell*, 129(3), 473-484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.024>
- Bellafiore, M., Sivverini, G., Palumbo, D., Macaluso, F., Bianco, A., Palma, A., & Farina, F. (2007). Increased Cx43 and angiogenesis in exercised mouse hearts. *International Journal of Sports Medicine*, 28(9), 749-755. <https://doi.org/10.1055/s-2007-964899>
- Benyo, Z., Gille, A., Bennett, C. L., Clausen, B. E., & Offermanns, S. (2006). Nicotinic Acid-Induced Flushing Is Mediated by Activation of Epidermal Langerhans Cells. *Molecular Pharmacology*, 70(6), 1844-1849. <https://doi.org/10.1124/mol.106.030833>
- Bieganowski, P., & Brenner, C. (2004). Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a preiss-handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell*, 117(4), 495-502. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00416-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00416-7)
- Bottomley, P. A., Panjra, G. S., Lai, S., Hirsch, G. A., Wu, K., Najjar, S. S., Steinberg, A., Gerstenblith, G., & Weiss, R. G. (2013). Metabolic rates of ATP transfer through creatine kinase (CK flux) predict clinical heart failure events and death. *Science Translational Medicine*, 5(215). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007328>
- Braidy, N., Guillemin, G. J., Mansour, H., Chan-Ling, T., Poljak, A., & Grant, R. (2011). Age related changes in NAD⁺ metabolism oxidative stress and sirt1 activity in wistar rats. *PLoS ONE*, 6(4), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019194>
- Brown, K. D., Maqsood, S., Huang, J. Y., Pan, Y., Harkcom, W., Li, W., Sauve, A., Verdin, E., & Jaffrey, S. R. (2014). Activation of SIRT3 by the NAD⁺precursor nicotinamide riboside protects from noise-induced hearing loss. *Cell Metabolism*, 20(6), 1059-1068. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.11.003>
- Camacho-Pereira, J., Tarragó, M. G., Chini, C. C. S., Nin, V., Escande, C., Warner, G. M., Puranik, A. S., Schoon, R. A., Reid, J. M., Galina, A., & Chini, E. N. (2016). CD38 Dictates Age-Related NAD Decline and Mitochondrial Dysfunction through an SIRT3-Dependent Mechanism. *Cell Metabolism*, 23(6), 1127-1139. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.006>
- Cambronne, X. A., Stewart, M. L., Kim, D., Jones-Brunette, A. M., Morgan, R. K., Farrens, D. L., Cohen, M. S., & Goodman, R. H. (2016). Biosensor reveals multiple sources for mitochondrial NAD⁺. *Science (New York, N.Y.)*. <https://doi.org/10.1126/science.aad5168>
- Cantó, C., & Auwerx, J. (2009, April). PGC-1α, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Current Opinion in Lipidology*. Europe PMC Funders. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328328d0a4>
- Cantó, C., Houtkooper, R. H., Pirinen, E., Youn, D. Y., Oosterveer, M. H., Cen, Y., Fernandez-Marcos, P. J., Yamamoto, H., Andreux, P., Cettour-Rose, P., Gademann, K., Rinsch, C., Schoonjans, K., Sauve, A. A., & Auwerx, J. (2012). The NAD⁺ precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metabolism*, 15(6), 838-847. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.022>

- Cencioni, C., Spallotta, F., Mai, A., Martelli, F., Farsetti, A., Zeiher, A. M., & Gaetano, C. (2015). Sirtuin function in aging heart and vessels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *83*, 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.12.023>
- Cerutti, R., Pirinen, E., Lamperti, C., Marchet, S., Sauve, A. A., Li, W., Leoni, V., Schon, E. A., Dantzer, F., Auwerx, J., Viscomi, C., & Zeviani, M. (2014). NAD⁺-dependent activation of Sirt1 corrects the phenotype in a mouse model of mitochondrial disease. *Cell Metabolism*, *19*(6), 1042-1049. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.04.001>
- Chai, J., Jones, M. K., & Tarnawski, A. S. (2004). Serum response factor is a critical requirement for VEGF signaling in endothelial cells and VEGF-induced angiogenesis. *The FASEB Journal*, *18*(11), 1264-1266. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1232fje>
- Chai, J., & Tarnawski, A. S. (2002). Serum response factor: Discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *Journal of Physiology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s12630-011-9636-x>
- Chang, J., Wei, L., Otani, T., Youker, K. A., Entman, M. L., & Schwartz, R. J. (2003). Inhibitory cardiac transcription factor, SRF-N, is generated by caspase 3 cleavage in human heart failure and attenuated by ventricular unloading. *Circulation*, *108*(4), 407-413. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000084502.02147.83>
- Charron, M., & Bonner-Weir, S. (1999). Implicating PARP and NAD⁺ depletion in type I diabetes. *Nature Medicine*, *5*(3), 269-270. <https://doi.org/10.1038/6479>
- Chen, L., Gong, Q., Stice, J. P., & Knowlton, A. A. (2009). Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovascular Research*, *84*(1), 91-99. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp181>
- Chrusciel, P., Rysz, J., & Banach, M. (2014, June). Defining the role of trimetazidine in the treatment of cardiovascular disorders: Some insights on its role in heart failure and peripheral artery disease. *Drugs*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0233-5>
- Clegg, A. J., Scott, D. A., Loveman, E., Colquitt, J. L., Royle, P., & Bryant, J. (2006). Clinical and cost-effectiveness of left ventricular assist devices as a bridge to heart transplantation for people with end-stage heart failure: A systematic review and economic evaluation. *European Heart Journal*. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi857>
- Coleman, R., Weiss, A., Finkelbrand, S., & Silbermann, M. (1988). Age and exercise-related changes in myocardial mitochondria in mice. *Acta Histochemica*, *83*(1), 81-90. [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(88\)80075-8](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(88)80075-8)
- Conway, M. A., Allis, J., Ouwerkerk, R., Niioka, T., Rajagopalan, B., & Radda, G. K. (1991). Detection of low phosphocreatine to ATP ratio in failing hypertrophied human myocardium by ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *The Lancet*, *338*(8773), 973-976. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91838-L](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91838-L)
- Correia, R., Oba-Shinjo, S., Uno, M., Huang, N., & Marie, S. K. (2011). Mitochondrial DNA depletion and its correlation with TFAM, TFB1M, TFB2M and POLG in human diffusely infiltrating astrocytomas. *Mitochondrion*, *11*(1), 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.07.001>

- Cruz-Jentoft, A. J., Landi, F., Schneider, S. M., Zúñiga, C., Arai, H., Boirie, Y., Chen, L. K., Fielding, R. A., Martin, F. C., Michel, J.-P., Sieber, C., Stout, J. R., Studenski, S. A., Vellas, B., Woo, J., Zamboni, M., & Cederholm, T. (2014). Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: A systematic review. Report of the International Sarcopenia Initiative (EWGSOP and IWGS). *Age and Ageing*, *43*(6), 748-759. <https://doi.org/10.1093/ageing/afu115>
- Dávila-Román, V. G., Vedala, G., Herrero, P., De Las Fuentes, L., Rogers, J. G., Kelly, D. P., & Gropler, R. J. (2002). Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, *40*(2), 271-277. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(02\)01967-8](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(02)01967-8)
- Davila, A., Liu, L., Chellappa, K., Redpath, P., Nakamaru-ogiso, E., Paoletta, L. M., Zhang, Z., Migaud, M. E., Rabinowitz, J. D., Baur, J. A., Lauren, M., Zhang, Z., Migaud, M. E., Rabinowitz, J. D., Baur, J. A., & Ireland, N. (2018). Nicotinamide adenine dinucleotide is transported into mammalian mitochondria. *ELife*, *7*(215). <https://doi.org/10.7554/eLife.33246>
- Davis, F. J., Gupta, M., Pogwizd, S. M., Bacha, E., Jeevanandam, V., & Gupta, M. P. (2002). Increased expression of alternatively spliced dominant-negative isoform of SRF in human failing hearts. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *282*(4), H1521-H1533. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00844.2001>
- de Picciotto, N. E., Gano, L. B., Johnson, L. C., Martens, C. R., Sindler, A. L., Mills, K. F., Imai, S., & Seals, D. R. (2016). Nicotinamide mononucleotide supplementation reverses vascular dysfunction and oxidative stress with aging in mice. *Aging Cell*, *15*(3), 522-530. <https://doi.org/10.1111/acel.12461>
- Deloux, R., Tannous, C., Ferry, A., Li, Z., & Mericskay, M. (2018). Aged Nicotinamide Riboside Kinase 2 Deficient Mice Present an Altered Response to Endurance Exercise Training. *Frontiers in Physiology*, *9*, 1290. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01290>
- Deloux, R., Vitiello, D., Mougnot, N., Noirez, P., Li, Z., Mericskay, M., Ferry, A., & Agbulut, O. (2017). Voluntary exercise improves cardiac function and prevents cardiac remodeling in a mouse model of dilated cardiomyopathy. *Frontiers in Physiology*, *8*(NOV). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00899>
- Denison, H. J., Cooper, C., Sayer, A. A., & Robinson, S. M. (2015). Prevention and optimal management of sarcopenia: a review of combined exercise and nutrition interventions to improve muscle outcomes in older people. *Clinical Interventions in Aging*, *10*, 859-869. <https://doi.org/10.2147/CIA.S55842>
- Diakos, N. A., Navankasattusas, S., Abel, E. D., Rutter, J., McCreath, L., Ferrin, P., McKellar, S. H., Miller, D. V., Park, S. Y., Richardson, R. S., Deberardinis, R., Cox, J. E., Kfoury, A. G., Selzman, C. H., Stehlik, J., Fang, J. C., Li, D. Y., & Drakos, S. G. (2016). Evidence of Glycolysis Up-Regulation and Pyruvate Mitochondrial Oxidation Mismatch During Mechanical Unloading of the Failing Human Heart: Implications for Cardiac Reloading and Conditioning. *JACC: Basic to Translational Science*, *1*(6), 432-444. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.06.009>
- Diffie, G. M., & Nagle, D. F. (2003). Regional differences in effects of exercise training on contractile and biochemical properties of rat cardiac myocytes. *Journal of Applied*

- Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 95(1), 35–42.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00951.2002>
- Diguet, N., Mallat, Y., Ladouce, R., Clodic, G., Prola, A., Tritsch, E., Blanc, J., Larcher, J. C., Delcayre, C., Samuel, J. L., Friguet, B., Bolbach, G., Li, Z., & Mericskay, M. (2011). Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end products in dilated cardiomyopathy. *Journal of Biological Chemistry*, 286(40), 35007–35019.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.252395>
- Diguet, N., Trammell, S. A. J., Tannous, C., Deloux, R., Piquereau, J., Mougnot, N., Gouge, A., Gressette, M., Manoury, B., Blanc, J., Breton, M., Decaux, J.-F., Lavery, G. G., Baczkó, I., Zoll, J., Garnier, A., Li, Z., Brenner, C., & Mericskay, M. (2018). Nicotinamide Riboside Preserves Cardiac Function in a Mouse Model of Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*, 137(21), 2256–2273.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026099>
- Dölle, C., & Ziegler, M. (2009). Application of a coupled enzyme assay to characterize nicotinamide riboside kinases. *Analytical Biochemistry*, 385(2), 377–379.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.10.033>
- Downing, J., & Balady, G. J. (2011). The role of exercise training in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(6), 561–569.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.04.020>
- Dzeja, P. P., Redfield, M. M., Burnett, J. C., & Terzic, A. (2000). Failing energetics in failing hearts. *Current Cardiology Reports*, 2(3), 212–217. <https://doi.org/10.1007/s11886-000-0071-9>
- Dzeja, P. P., Vitkevicius, K. T., Redfield, M. M., Burnett, J. C., & Terzic, A. (1999). Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: Increased contribution in heart failure. *Circulation Research*, 84(10), 1137–1143.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.84.10.1137>
- Egan, B., Dowling, P., O'Connor, P. L., Henry, M., Meleady, P., Zierath, J. R., & O'Gorman, D. J. (2011). 2-D DIGE analysis of the mitochondrial proteome from human skeletal muscle reveals time course-dependent remodelling in response to 14 consecutive days of endurance exercise training. *Proteomics*, 11(8), 1413–1428.
<https://doi.org/10.1002/pmic.201000597>
- El-Hattab, A. W., & Scaglia, F. (2016). Mitochondrial Cardiomyopathies. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 3. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2016.00025>
- Entman, M. L., Bornet, E. P., Van Winkle, W. B., Goldstein, M. A., & Schwartz, A. (1977). Association of glycogenolysis with cardiac sarcoplasmic reticulum: II. Effect of glycogen depletion, deoxycholate solubilization and cardiac ischemia: Evidence for a phosphorylase kinase membrane complex. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 9(7), 515–528. [https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(77\)80367-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(77)80367-2)
- Faerber, G., Barreto-Perreia, F., Schoepe, M., Gilsbach, R., Schreppe, A., Schwarzer, M., Mohr, F. W., Hein, L., & Doenst, T. (2011). Induction of heart failure by minimally invasive aortic constriction in mice: Reduced peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator levels and mitochondrial dysfunction. *Journal of Thoracic and*

- Cardiovascular Surgery*, 141(2), 492-500. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2010.03.029>
- Fatkin, D., & Graham, R. M. (2002). Molecular Mechanisms of Inherited Cardiomyopathies. *Physiological Reviews*, 82(4), 945-980. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2002>
- Feige, J. N., Lagouge, M., Cantó, C., Strehle, A., Houten, S. M., Milne, J. C., Lambert, P. D., Matak, C., Elliott, P. J., & Auwerx, J. (2008). Specific SIRT1 Activation Mimics Low Energy Levels and Protects against Diet-Induced Metabolic Disorders by Enhancing Fat Oxidation. *Cell Metabolism*, 8(5), 347-358. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.08.017>
- Felker, G. M., Thompson, R. E., Hare, J. M., Hruban, R. H., Clemetson, D. E., Howard, D. L., Baughman, K. L., & Kasper, E. K. (2000). Underlying Causes and Long-Term Survival in Patients with Initially Unexplained Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 342(15), 1077-1084. <https://doi.org/10.1056/NEJM200004133421502>
- Fenning, A., Harrison, G., Dwyer, D., Meyer, R. R., & Brown, L. (2003). Cardiac adaptation to endurance exercise in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 251(1-2), 51-59. <https://doi.org/10.1023/A:1025465412329>
- Fewell, J. G., Osinska, H., Klevitsky, R., Ng, W., Sfyris, G., Bahrehmand, F., & Robbins, J. (1997). A treadmill exercise regimen for identifying cardiovascular phenotypes in transgenic mice. *The American Journal of Physiology*, 273(3 Pt 2), H1595-605. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.3.H1595>
- Finsterer, J., & Kothari, S. (2014). Cardiac manifestations of primary mitochondrial disorders. *International Journal of Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.11.014>
- Fitzsimons, D. P., Diffie, G. M., Herrick, R. E., & Baldwin, K. M. (1990). Effects of endurance exercise on isomyosin patterns in fast- and slow-twitch skeletal muscles. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 68(5), 1950-1955. Retrieved from <https://www-physiology-org.gate2.inist.fr/doi/pdf/10.1152/jappl.1990.68.5.1950>
- Fletcher, R. S., Ratajczak, J., Doig, C. L., Oakey, L. A., Callingham, R., Da Silva Xavier, G., Garten, A., Elhassan, Y. S., Redpath, P., Migaud, M. E., Philp, A., Brenner, C., Cantó, C., & Lavery, G. G. (2017). Nicotinamide riboside kinases display redundancy in mediating nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in skeletal muscle cells. *Molecular Metabolism*, 6(8), 819-832. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.05.011>
- Frederick, D. W., Loro, E., Liu, L., Davila, A., Chellappa, K., Silverman, I. M., Quinn, W. J., Gosai, S. J., Tichy, E. D., Davis, J. G., Mourkioti, F., Gregory, B. D., Dellinger, R. W., Redpath, P., Migaud, M. E., Nakamaru-Ogiso, E., Rabinowitz, J. D., Khurana, T. S., & Baur, J. A. (2016). Loss of NAD Homeostasis Leads to Progressive and Reversible Degeneration of Skeletal Muscle. *Cell Metabolism*, 24(2), 269-282. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.005>
- Freya, T. G., & Mannellab, C. A. (2000, July). The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences*. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01609-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01609-1)
- Frøsig, C., Jørgensen, S., Hardie, D., Richter, E., & Wojtaszewski, J. (2003). 5'-AMP-activated protein kinase activity and protein expression are regulated by endurance

- training in human skeletal muscle. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 286(3), 411E-417. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00317.2003>
- Fujitaka, K., Otani, H., Jo, F., Jo, H., Nomura, E., Iwasaki, M., Nishikawa, M., Iwasaka, T., & Das, D. K. (2011). Modified resveratrol Longevinex improves endothelial function in adults with metabolic syndrome receiving standard treatment. *Nutrition Research*, 31(11), 842-847. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2011.09.028>
- Gan, L., Jiang, W., Xiao, Y. F., Deng, L., Gu, L. Da, Guo, Z. Y., Zhou, Z. C., Wu, D., & Xin, H. B. (2011). Disruption of CD38 gene enhances cardiac functions by elevating serum testosterone in the male null mice. *Life Sciences*, 89(13-14), 491-497. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.07.020>
- Garcia-Roves, P., Huss, J., & Holloszy, J. (2006). Role of calcineurin in exercise-induced mitochondrial biogenesis. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 290(6), E1172-E1179. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00633.2005>
- Garnier, A., Fortin, D., Deloménie, C., Momken, I., Veksler, V., & Ventura-Clapier, R. (2003). Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *Journal of Physiology*, 551(2), 491-501. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.045104>
- Garnier, A., Fortin, D., Zoll, J., N'Guessan, B., Mettauer, B., Lampert, E., Veksler, V., Ventura-Clapier, R., N'Guessan, B., Mettauer, B., Lampert, E., Veksler, V., & Ventura-Clapier, R. (2005). Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle. *The FASEB Journal*, 19(1), 43-52. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2173com>
- Garnier, A., Zoll, J., Fortin, D., N'Guessan, B., Lefebvre, F., Geny, B., Mettauer, B., Veksler, V., & Clapier, R. V. (2009). Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure. *Circulation: Heart Failure*, 2(4), 342-350. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.812099>
- Garten, A., Schuster, S., Penke, M., Gorski, T., De Giorgis, T., & Kiess, W. (2015). Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(9), 535-546. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.117>
- Gasiorowski, A., & Dutkiewicz, J. (2013). Comprehensive rehabilitation in chronic heart failure. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20(3), 606-612. Retrieved from <http://aaem.pl/fulltxt.php?ICID=1067448%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed11&AN=2013594680%5Cnhttp://sfx.scholarsportal.info/uhn?sid=OVID:embase&id=pmid:&id=doi:&issn=1232-1966&isbn=&volume=20&issue=3&spage=606&pa>
- Gauthier-Rouviere, C., Vandromme, M., Tuil, D., Lautredou, N., Morris, M., Soulez, M., Kahn, A., Fernandez, A., Lamb, N., & Yamamoto, K. R. (1996). Expression and Activity of Serum Response Factor Is Required for Expression of the Muscle-determining Factor MyoD in Both Dividing and Differentiating Mouse C2C12 Myoblasts. *Molecular Biology of the Cell*, 7(5), 719-729. <https://doi.org/10.1091/mbc.7.5.719>
- Gayda, M., Ribeiro, P. A. B., Juneau, M., & Nigam, A. (2016). Comparison of Different Forms of Exercise Training in Patients With Cardiac Disease: Where Does High-

- Intensity Interval Training Fit? *Canadian Journal of Cardiology*, 32(4), 485–494.
<https://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.01.017>
- Giblin, W., Skinner, M. E., & Lombard, D. B. (2014, July). Sirtuins: Guardians of mammalian healthspan. *Trends in Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.04.007>
- Glatz, J. F. C., Bonen, A., Ouwens, D. M., & Luiken, J. J. F. P. (2006, December 22). Regulation of sarcolemmal transport of substrates in the healthy and diseased heart. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. Kluwer Academic Publishers.
<https://doi.org/10.1007/s10557-006-0582-8>
- Goldberger, J. (1914). Weekly Reports for OCTOBER 23, 1914. *Public Health Reports*, 29(43), 2821–2881. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19314430>
- Goody, M. F., Kelly, M. W., Lessard, K. N., Khalil, A., & Henry, C. A. (2010). Nr2b-mediated NAD⁺ production regulates cell adhesion and is required for muscle morphogenesis in vivo. Nr2b and NAD⁺ in muscle morphogenesis. *Developmental Biology*, 344(2), 809–826. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.05.513>
- Grimm, D., Elsner, D., Schunkert, H., Pfeifer, M., Griese, D., Bruckschlegel, G., Muders, F., Riegger, G. A., & Kromer, E. P. (1998). Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Cardiovascular Research*, 37(1), 91–100. [https://doi.org/S0008-6363\(97\)00212-5](https://doi.org/S0008-6363(97)00212-5) [pii]
- Gross, C. J., & Henderson, L. M. (1983). Digestion and Absorption of NAD by the Small Intestine of the Rat. *The Journal of Nutrition*, 113(2), 412–420.
<https://doi.org/10.1093/jn/113.2.412>
- Gu, X. S., Wang, Z. B., Ye, Z., Lei, J. P., Li, L., Su, D. F., & Zheng, X. (2014). Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates AMPK and improves cardiac function in heart failure. *Genetics and Molecular Research*, 13(1), 323–335.
<https://doi.org/10.4238/2014.January.17.17>
- Guerci, A., Lahoute, C., Hébrard, S., Collard, L., Graindorge, D., Favier, M., Cagnard, N., Batonnet-Pichon, S., Précigout, G., Garcia, L., Tuil, D., Daegelen, D., & Sotiropoulos, A. (2012). Srf-dependent paracrine signals produced by myofibers control satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metabolism*, 15(1), 25–37.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.001>
- Gul, R., Kim, S.-Y., Park, K.-H., Kim, B.-J., Kim, S.-J., Im, M.-J., & Kim, U.-H. (2008). A novel signaling pathway of ADP-ribosyl cyclase activation by angiotensin II in adult rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 295(1), H77–H88. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01355.2007>
- Haas, J., Frese, K. S., Peil, B., ... Meder, B. (2015). Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy. *European Heart Journal*.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu301>
- Hara, N., Yamada, K., Terashima, M., Osago, H., Shimoyama, M., & Tsuchiya, M. (2003). Molecular Identification of Human Glutamine- and Ammonia-dependent NAD Synthetases. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 10914–10921.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M209203200>
- Haram, P. M., Kemi, O. J., Lee, S. J., Bendheim, M., Al-Share, Q. Y., Waldum, H. L., Gilligan,

- L. J., Koch, L. G., Britton, S. L., Najjar, S. M., & Wisløff, U. (2009). Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovascular Research*, *81*(4), 723-732. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn332>
- Hardy, C. J., Weiss, R. G., Bottomley, P. A., & Gerstenblith, G. (1991). Altered myocardial high-energy phosphate metabolites in patients with dilated cardiomyopathy. *American Heart Journal*, *122*(3 PART 1), 795-801. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(91\)90527-O](https://doi.org/10.1016/0002-8703(91)90527-O)
- Hariharan, N., Maejima, Y., Nakae, J., Paik, J., Depinho, R. A., & Sadoshima, J. (2010). Deacetylation of FoxO by Sirt1 plays an essential role in mediating starvation-induced autophagy in cardiac myocytes. *Circulation Research*, *107*(12), 1470-1482. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227371>
- Hasmann, M., & Schemainda, I. (2003). FK866, a Highly Specific Noncompetitive Inhibitor of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase, Represents a Novel Mechanism for Induction of Tumor Cell Apoptosis. *Cancer Research*, *63*(21), 7436-7442.
- Hazebroek, M., Dennert, R., & Heymans, S. (2012). Idiopathic dilated cardiomyopathy: possible triggers and treatment strategies. *Netherlands Heart Journal*, *20*(7-8), 332-335. <https://doi.org/10.1007/s12471-012-0285-7>
- Hill, C. S., Wynne, J., & Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, *81*(7), 1159-1170. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80020-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80020-0)
- Hirschey, M. D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., Lombard, D. B., Grueter, C. A., Harris, C., Biddinger, S., Ilkayeva, O. R., Stevens, R. D., Li, Y., Saha, A. K., Ruderman, N. B., Bain, J. R., Newgard, C. B., Farese, R. V., Alt, F. W., Kahn, C. R., & Verdin, E. (2010). SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature*, *464*(7285), 121-125. <https://doi.org/10.1038/nature08778>
- Ho, C. Y., Jaalouk, D. E., Vartiainen, M. K., & Lammerding, J. (2013). Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature*, *497*(7450), 507-513. <https://doi.org/10.1038/nature12105>
- Holloszy, J. O. (1967). Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, *242*(9), 2278-2282.
- Holloway, C. J., Dass, S., Suttie, J. J., Rider, O. J., Cox, P., Cochlin, L. E., Jackson, H., Fast, A. M., Johnson, A. W., Karamitsos, T. D., Neubauer, S., & Clarke, K. (2012). Exercise training in dilated cardiomyopathy improves rest and stress cardiac function without changes in cardiac high energy phosphate metabolism. *Heart*, *98*(14), 1083-1090. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2012-302145>
- Hood, D. (2001). Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *(90)*, 1137-1157. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00017.2004>
- Hood, D. (2006). Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *Journal of*

- Experimental Biology*, 209(12), 2265-2275. <https://doi.org/10.1242/jeb.02182>
- Hood, D., Uguccioni, G., Vainshtein, A., & D'souza, D. (2011). Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Comprehensive Physiology*, 1(3), 1119-1134. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100074>
- Hottiger, M. O., Hassa, P. O., Lüscher, B., Schüler, H., & Koch-Nolte, F. (2010). Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.12.003>
- Howald, H., Hoppeler, H., Claassen, H., Mathieu, O., & Straub, R. (1985). Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *European Journal of Physiology*, 403(4), 369-376. <https://doi.org/10.1007/BF00589248>
- Hsu, C. P., Oka, S., Shao, D., Hariharan, N., & Sadoshima, J. (2009). Nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates cell survival through nad⁺ synthesis in cardiac myocytes. *Circulation Research*, 105(5), 481-491. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.203703>
- Hsu, C. P., Yamamoto, T., Oka, S., & Sadoshima, J. (2014). The function of nicotinamide phosphoribosyltransferase in the heart. *DNA Repair*, 23, 64-68. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.08.005>
- Huss, J. M., Torra, I. P., Staels, B., Giguere, V., & Kelly, D. P. (2004). Estrogen-Related Receptor Directs Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Signaling in the Transcriptional Control of Energy Metabolism in Cardiac and Skeletal Muscle. *Molecular and Cellular Biology*, 24(20), 9079-9091. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.20.9079-9091.2004>
- Hydock, D., Lien, C., Schneider, C., & Hayward, R. (2007). Effects of voluntary wheel running on cardiac function and myosin heavy chain in chemically gonadectomized rats. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 293(6), H3254-H3264. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00801.2007>
- Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., Nakamura, K. I., Utsumi, H., Hamasaki, N., & Takeshita, A. (2001). Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circulation Research*, 88(5), 529-535. <https://doi.org/10.1161/01.RES.88.5.529>
- Imai, S.-I. I., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., & Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403(6771), 795-800. <https://doi.org/10.1038/35001622>
- Ingwall, J. S. (2009, October 29). Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovascular Research*. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn301>
- Ingwall, J. S., Atkinson, D. E., Clarke, K., & Fetters, J. K. (1990). Energetic correlates of cardiac failure: changes in the creatine kinase system in the failing myocardium. *European Heart Journal*, 11 Suppl B, 108-115. https://doi.org/10.1093/eurheartj/11.suppl_B.108
- Ingwall, J. S., & Weiss, R. G. (2004, June 10). Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circulation Research*.

<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000137170.41939.d9>

- Jeppesen, J., & Kiens, B. (2012). Regulation and limitations to fatty acid oxidation during exercise. *Journal of Physiology*, *590*(5), 1059-1068.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.225011>
- John, C. M., Ramasamy, R., Al Nageeb, G., Al-Nuaimi, A. H. D., & Adam, A. (2012). Nicotinamide Supplementation Protects Gestational Diabetic Rats by Reducing Oxidative Stress and Enhancing Immune Responses. *Current Medicinal Chemistry*, *19*(30), 5181-5186. <https://doi.org/10.2174/092986712803530449>
- Johnson, M. L., Robinson, M. M., & Nair, K. S. (2013). Skeletal muscle aging and the mitochondria. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *24*(5), 247-256.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.12.003>
- Kaasik, A., Veksler, V., Boehm, E., Novotova, M., Minajeva, A., & Ventura-Clapier, R. (2001). Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circulation Research*, *89*(2), 153-159. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463722>
- Kaplan, M., Cheslow, Y., Vikstrom, K., Malhotra, A., Geenen, D., Nakouzi, A., Leinwand, L. a, & Buttrick, P. M. (1994). Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. *The American Journal of Physiology*, *267*(3 Pt 2), H1167-73.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.267.3.H1167>
- Karamanlidis, G., Nascimben, L., Couper, G. S., Shekar, P. S., Del Monte, F., & Tian, R. (2010). Defective DNA replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts. *Circulation Research*, *106*(9), 1541-1548.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.212753>
- Karbowska, J., Kochan, Z., & Smolenski, R. T. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is downregulated in the failing human heart. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *8*(1), 49-53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12655356>
- Kariya, F., Yamauchi, H., Kobayashi, K., Narusawa, M., & Nakahara, Y. (2004). Effects of prolonged voluntary wheel-running on muscle structure and function in rat skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, *92*(1-2), 90-97.
<https://doi.org/10.1007/s00421-004-1061-1>
- Kawai, S., & Murata, K. (2008). Structure and Function of NAD Kinase and NADP Phosphatase: Key Enzymes That Regulate the Intracellular Balance of NAD(H) and NADP(H). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *72*(4), 919-930.
<https://doi.org/10.1271/bbb.70738>
- Kayar, S. R., Conley, K. E., Claassen, H., & Hoppeler, H. (1986). Capillarity and mitochondrial distribution in rat myocardium following exercise training. *The Journal of Experimental Biology*, *120*, 189-199. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3958670>
- Kemi, O., Høydal, M. A., Haram, P. M., Garnier, A., Fortin, D., Ventura-Clapier, R., & Ellingsen, Ø. (2007). Exercise training restores aerobic capacity and energy transfer systems in heart failure treated with losartan. *Cardiovascular Research*, *76*(1), 91-99.

<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.06.008>

- Kemi, O. J., Haram, P. M., Loennechen, J. P., Osnes, J. B., Skomedal, T., Wisløff, U., & Ellingsen, Ø. (2005). Moderate vs. high exercise intensity: Differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovascular Research*, *67*(1), 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.03.010>
- Kemp, B. E., Mitchelhill, K. I., Stapleton, D., Michell, B. J., Chen, Z. P., & Witters, L. A. (1999, January). Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends in Biochemical Sciences*. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01340-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01340-1)
- Kennedy, B. K., Austriaco, N. R., Zhang, J., & Guarente, L. (1995). Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*. *Cell*, *80*(3), 485–496. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90499-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90499-9)
- Khan, D., Sarikhani, M., Dasgupta, S., Maniyadath, B., Pandit, A. S., Mishra, S., Ahamed, F., Dubey, A., Fathma, N., Atreya, H. S., Kolthur-Seetharam, U., & Sundaresan, N. R. (2018). SIRT6 deacetylase transcriptionally regulates glucose metabolism in heart. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(7), 5478–5489. <https://doi.org/10.1002/jcp.26434>
- Khan, N. A., Auranen, M., Paetau, I., Pirinen, E., Euro, L., Forsström, S., Pasila, L., Velagapudi, V., Carroll, C. J., Auwerx, J., & Suomalainen, A. (2014). Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3. *EMBO Molecular Medicine*, *6*(6), 721–731. <https://doi.org/10.1002/emmm.201403943>
- Kobayashi, K., & Neely, J. R. (1979). Control of maximum rates of glycolysis in rat cardiac muscle. *Circulation Research*, *44*(2), 166–175. <https://doi.org/10.1161/01.RES.44.2.166>
- Kusuoka, H., & Marban, E. (1994). Mechanism of the diastolic dysfunction induced by glycolytic inhibition: Does adenosine triphosphate derived from glycolysis play a favored role in cellular Ca²⁺ homeostasis in ferret myocardium? *Journal of Clinical Investigation*, *93*(3), 1216–1223. <https://doi.org/10.1172/JCI117075>
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., & Auwerx, J. (2006). Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*, *127*(6), 1109–1122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.013>
- Lahoute, C., Sotiropoulos, A., Favier, M., Guillet-Deniau, I., Charvet, C., Ferry, A., Butler-Browne, G., Metzger, D., Tuil, D., & Daegelen, D. (2008). Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor. *PLoS ONE*, *3*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003910>
- Lange, I., Penner, R., Fleig, A., & Beck, A. (2008). Synergistic regulation of endogenous TRPM2 channels by adenine dinucleotides in primary human neutrophils. *Cell Calcium*, *44*(6), 604–615. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2008.05.001>
- Lanza, I. R., & Nair, K. S. (2010). Mitochondrial function as a determinant of life span. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, *459*(2), 277–289. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0724-5>
- Lee, S. J., Choi, S. E., Jung, I. R., Lee, K. W., & Kang, Y. (2013). Protective effect of

- nicotinamide on high glucose/palmitate-induced glucolipototoxicity to INS-1 beta cells is attributed to its inhibitory activity to sirtuins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 535(2), 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.03.011>
- Legallois, D., Belin, A., Nesterov, S. V., Milliez, P., Parienti, J. J., Knuuti, J., Abbas, A., Tirel, O., Agostini, D., & Manrique, A. (2016). Cardiac rehabilitation improves coronary endothelial function in patients with heart failure due to dilated cardiomyopathy: A positron emission tomography study. *European Journal of Preventive Cardiology*, 23(2), 129-136. <https://doi.org/10.1177/2047487314565739>
- Legros, F., Lombès, A., Frachon, P., & Rojo, M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4343-4354. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-06-0330>
- Lehmann, M., Pirinen, E., Mirsaidi, A., Kunze, F. A., Richards, P. J., Auwerx, J., & Hottiger, M. O. (2015). ARTD1-induced poly-ADP-ribose formation enhances PPAR γ ligand binding and co-factor exchange. *Nucleic Acids Research*, 43(1), 129-142. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1260>
- Lei, B., Lionetti, V., Young, M. E., Chandler, M. P., D'Agostino, C., Kang, E., Altarejos, M., Matsuo, K., Hintze, T. H., Stanley, W. C., & Recchia, F. A. (2004). Paradoxical downregulation of the glucose oxidation pathway despite enhanced flux in severe heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 36(4), 567-576. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.02.004>
- Li, D., Tian, Y. J., Guo, J., Sun, W. P., Lun, Y. Z., Guo, M., Luo, N., Cao, Y., Cao, J. M., Gong, X. J., & Zhou, S. S. (2013). Nicotinamide supplementation induces detrimental metabolic and epigenetic changes in developing rats. *British Journal of Nutrition*, 110(12), 2156-2164. <https://doi.org/10.1017/S0007114513001815>
- Li, J., Mayne, R., & Wu, C. (1999). A novel muscle-specific β 1 integrin binding protein (MIBP) that modulates myogenic differentiation. *Journal of Cell Biology*, 147(7), 1391-1397. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.7.1391>
- Li, J., Rao, H., Burkin, D., Kaufman, S. J., & Wu, C. (2003). The muscle integrin binding protein (MIBP) interacts with α 7 β 1 integrin and regulates cell adhesion and laminin matrix deposition. *Developmental Biology*, 261(1), 209-219. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00304-X](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00304-X)
- Li, S., Czubyrt, M. P., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Richardson, J. A., Wiebel, F. F., Nordheim, A., & Olson, E. N. (2005). Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(4), 1082-1087. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409103102>
- Liesa, M., Palacin, M., & Zorzano, A. (2009). Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease. *Physiological Reviews*, 89(3), 799-845. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2008>
- Lin, J., Handschin, C., & Spiegelman, B. M. (2005, June). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.004>

- Liu, D., Gharavi, R., Pitta, M., Gleichmann, M., & Mattson, M. P. (2009). Nicotinamide prevents NAD⁺ depletion and protects neurons against excitotoxicity and cerebral ischemia: NAD⁺ consumption by sirt1 may endanger energetically compromised neurons. *NeuroMolecular Medicine*, *11*(1), 28–42. <https://doi.org/10.1007/s12017-009-8058-1>
- Liu, L., Su, X., Quinn, W. J., Mitchison, T. J., Baur, J. A., & Rabinowitz, J. D. (2018). Quantitative Analysis of NAD Synthesis-Breakdown Fluxes. *Cell Metabolism*, *27*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.018>
- Lukyanenko, V., Gyorke, I., Wiesner, T. F., & Gyorke, S. (2001). Potentiation of Ca²⁺ Release by cADP-Ribose in the Heart Is Mediated by Enhanced SR Ca²⁺ Uptake Into the Sarcoplasmic Reticulum. *Circulation Research*, *89*(7), 614–622. <https://doi.org/10.1161/hh1901.098066>
- Martens, C., Denman, B., Mazzo, M., Armstrong, M., Reisdorph, N., McQueen, M., Chonchol, M., & Seals, D. (2017). Nicotinamide riboside supplementation reduces aortic stiffness and blood pressure in middle-aged and older adults. *Artery Research*, *20*, 49. <https://doi.org/10.1016/j.artres.2017.10.021>
- Martens, C. R., Denman, B. A., Mazzo, M. R., Armstrong, M. L., Reisdorph, N., McQueen, M. B., Chonchol, M., & Seals, D. R. (2018). Chronic nicotinamide riboside supplementation is well-Tolerated and elevates NAD⁺ in healthy middle-Aged and older adults. *Nature Communications*, *9*(1), 1286. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03421-7>
- Martin, O. J., Lai, L., Soundarapandian, M. M., Leone, T. C., Zorzano, A., Keller, M. P., Attie, A. D., Muoio, D. M., & Kelly, D. P. (2014). A role for peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 in the control of mitochondrial dynamics during postnatal cardiac growth. *Circulation Research*, *114*(4), 626–636. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302562>
- McNally, E. M., & Mestroni, L. (2017). Dilated cardiomyopathy: Genetic determinants and mechanisms. *Circulation Research*, *121*(7), 731–748. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309396>
- Medeiros, A., Oliveira, E., Gianolla, R., Casarini, D., Negrão, C., & Brum, P. (2004). Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *37*(12), 1909–1917. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004001200018>
- Mericskay, M. (2016). Nicotinamide adenine dinucleotide homeostasis and signalling in heart disease: Pathophysiological implications and therapeutic potential. *Archives of Cardiovascular Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2015.10.004>
- Mericskay, M., Blanc, J., Tritsch, E., Moriez, R., Aubert, P., Neunlist, M., Feil, R., & Li, Z. (2007). Inducible Mouse Model of Chronic Intestinal Pseudo-Obstruction by Smooth Muscle-Specific Inactivation of the SRF Gene. *Gastroenterology*, *133*(6), 1960–1970. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.09.010>
- Mettauer, B., Zoll, J., Garnier, A., & Ventura-Clapier, R. (2006). Heart failure: a model of cardiac and skeletal muscle energetic failure. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *452*(6), 653–666. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0072-7>

- Miano, J. M., Long, X., & Fujiwara, K. (2007). Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(1), C70-C81. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00386.2006>
- Milenkovic, D., Blaza, J. N., Larsson, N. G., & Hirst, J. (2017). The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex. *Cell Metabolism*, 25(4), 765-776. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.009>
- Milne, J. C., Lambert, P. D., Schenk, S., Carney, D. P., Smith, J. J., Gagne, D. J., Jin, L., Boss, O., Perni, R. B., Vu, C. B., Bemis, J. E., Xie, R., Disch, J. S., Ng, P. Y., Nunes, J. J., Lynch, A. V., Yang, H., Galonek, H., Israelian, K., Choy, W., Iffland, A., Lavu, S., Medvedik, O., Sinclair, D. A., Olefsky, J. M., Jirousek, M. R., Elliott, P. J., & Westphal, C. H. (2007). Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*, 450(7170), 712-716. <https://doi.org/10.1038/nature06261>
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A. I., & Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*, 113(3), 329-342. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00278-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00278-2)
- Montecucco, F., Bauer, I., Braunersreuther, V., Bruzzone, S., Akhmedov, A., Lüscher, T. F., Speer, T., Poggi, A., Mannino, E., Pelli, G., Galan, K., Bertolotto, M., Lenglet, S., Garuti, A., Montessuit, C., Lerch, R., Pellieux, C., Vuilleumier, N., Dallegri, F., Mage, J., Sebastian, C., Mostoslavsky, R., Gayet-Ageron, A., Patrone, F., Mach, F., & Nencioni, A. (2013). Inhibition of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Reduces Neutrophil-Mediated Injury in Myocardial Infarction. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(6), 630-641. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4487>
- Monteiro-Junior, R. S., de Tarso Maciel-Pinheiro, P., da Matta Mello Portugal, E., da Silva Figueiredo, L. F., Terra, R., Carneiro, L. S. F., Rodrigues, V. D., Nascimento, O. J. M., Deslandes, A. C., & Laks, J. (2018). Effect of Exercise on Inflammatory Profile of Older Persons: Systematic Review and Meta-Analyses. *Journal of Physical Activity and Health*, 15(1), 64-71. <https://doi.org/10.1123/jpah.2016-0735>
- Moore, R. (1998). Cellular adaptations of the heart muscle to exercise training. *Annals of Medicine*, 30 Suppl 1, 46-53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9800883>
- Morán, M., Saborido, A., & Megías, A. (2003). Ca²⁺ regulatory systems in rat myocardium are altered by 24 weeks treadmill training. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 446(2), 161-168. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1019-x>
- Mori, V., Amici, A., Mazzola, F., Di Stefano, M., Conforti, L., Magni, G., Ruggieri, S., Raffaelli, N., & Orsomando, G. (2014). Metabolic profiling of alternative NAD biosynthetic routes in mouse tissues. *PLoS ONE*, 9(11), e113939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113939>
- Muchir, A., Pavlidis, P., Decostre, V., Herron, A. J., Arimura, T., Bonne, G., & Worman, H. J. (2007). Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1282-1293. <https://doi.org/10.1172/JCI29042>
- Murakami, T., Shimomura, Y., Fujitsuka, N., & Sugiyama, S. (1995). Differential adaptation to endurance training between heart and gastrocnemius muscle mitochondria in rats.

- Biochemistry and Molecular Biology International*, 36(2), 285–290. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7663432>
- Naveen, K. N., Pai, V. V., Bagalkot, P., Kulkarni, V., Rashme, P., & Athanikar, S. B. (2013). Pellagra in a child-A rare entity. *Nutrition*, 29(11-12), 1426–1428. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.05.020>
- Neglia, D., De Caterina, A., Marraccini, P., Natali, A., Ciardetti, M., Vecoli, C., Gastaldelli, A., Ciociaro, D., Pellegrini, P., Testa, R., Menichetti, L., L'Abbate, A., Stanley, W. C., & Recchia, F. A. (2007). Impaired myocardial metabolic reserve and substrate selection flexibility during stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 293(6), H3270–H3278. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00887.2007>
- Neubauer, S. (2007). The Failing Heart – An Engine Out of Fuel. *New England Journal of Medicine*, 356(11), 1140–1151. <https://doi.org/10.1056/NEJMra063052>
- Neubauer, S., Horn, M., Naumann, A., Tian, R., Hu, K., Laser, M., Friedrich, J., Gaudron, P., Schnackerz, K., Ingwall, J. S., & Ertl, G. (1995). Impairment of energy metabolism in intact residual myocardium of rat hearts with chronic myocardial infarction. *Journal of Clinical Investigation*, 95(3), 1092–1100. <https://doi.org/10.1172/JCI117756>
- Nickel, A. G., Von Hardenberg, A., Hohl, M., ... Maack, C. (2015). Reversal of mitochondrial transhydrogenase causes oxidative stress in heart failure. *Cell Metabolism*, 22(3), 472–484. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.008>
- Nikiforov, A., Dölle, C., Niere, M., & Ziegler, M. (2011). Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: From entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21767–21778. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.213298>
- Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S., & Carruba, M. O. (2003). Mitochondrial biogenesis in mammals: The role of endogenous nitric oxide. *Science*, 299(5608), 896–899. <https://doi.org/10.1126/science.1079368>
- Novotová, M., Pavlovicová, M., Veksler, V., Ventura-Clapier, R., & Zahradník, I. (2006). Ultrastructural remodeling of fast skeletal muscle fibers induced by invalidation of creatine kinase. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 291(6), C1279–85. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00114.2006>
- Ogunbayo, O. A., Zhu, Y., Rossi, D., Sorrentino, V., Ma, J., Zhu, M. X., & Evans, A. M. (2011). Cyclic adenosine diphosphate ribose activates ryanodine receptors, whereas NAADP activates two-pore domain channels. *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), 9136–9140. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.202002>
- Oka, S., Alcendor, R., Zhai, P., Park, J. Y., Shao, D., Cho, J., Yamamoto, T., Tian, B., & Sadoshima, J. (2011). PPAR α -sirt1 complex mediates cardiac hypertrophy and failure through suppression of the *err* transcriptional pathway. *Cell Metabolism*, 14(5), 598–611. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.10.001>
- Olichon, A., Emorine, L. J., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C. P., Ducommun, B., Lenaers, G., & Belenguer, P.

- (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Letters*, 523(1-3), 171-176. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02985-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02985-X)
- Oliviéro, P., Chassagne, C., Salichon, N., Corbier, A., Hamon, G., Marotte, F., Charlemagne, D., Rappaport, L., & Samuel, J. L. (2000). Expression of laminin α 2 chain during normal and pathological growth of myocardium in rat and human. *Cardiovascular Research*, 46(2), 346-355. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00034-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00034-1)
- Olson, E. N., & Nordheim, A. (2010). Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm2890>
- Osorio, J. C., Stanley, W. C., Linke, A., Castellari, M., Diep, Q. N., Panchal, A. R., Hintze, T. H., Lopaschuk, G. D., & Recchia, F. A. (2002). Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor-alpha in pacing-induced heart failure. *Circulation*, 106(5), 606-612. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000023531.22727.C1>
- P.T., P. (2005). Pellagra. *Cahiers Sante*.
- Parlakian, A., Charvet, C., Escoubet, B., Mericskay, M., Molkentin, J. D., Gary-Bobo, G., De Windt, L. J., Ludosky, M. A., Paulin, D., Daegelen, D., Tuil, D., & Li, Z. (2005). Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the *srf* gene in adult heart. *Circulation*, 112(19), 2930-2939. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.533778>
- Parlakian, A., Tuil, D., Hamard, G., Tavernier, G., Hentzen, D., Concordet, J.-P., Paulin, D., Li, Z., & Daegelen, D. (2004). Targeted Inactivation of Serum Response Factor in the Developing Heart Results in Myocardial Defects and Embryonic Lethality. *Molecular and Cellular Biology*, 24(12), 5281-5289. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.12.5281-5289.2004>
- Perraud, A. L., Fleig, A., Dunn, C. A., Bagley, L. A., Launay, P., Schmitz, C., Stokes, A. J., Zhu, Q., Bessman, M. J., Penner, R., Kinet, J. P., & Scharenberg, A. M. (2001). ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*, 411(6837), 595-599. <https://doi.org/10.1038/35079100>
- Perseghin, G., Price, T. B., Petersen, K. F., Roden, M., Cline, G. W., Gerow, K., Rothman, D. L., & Shulman, G. I. (1996). Increased Glucose Transport-Phosphorylation and Muscle Glycogen Synthesis after Exercise Training in Insulin-Resistant Subjects. *New England Journal of Medicine*, 335(18), 1357-1362. <https://doi.org/10.1056/NEJM199610313351804>
- Phillips, S. M., Green, H. J., Tarnopolsky, M. A., Heigenhauser, G. J., & Grant, S. M. (1996). Progressive effect of endurance training on metabolic adaptations in working skeletal muscle. *The American Journal of Physiology*, 270(2 Pt 1), E265-72. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1996.270.2.E265>
- Picard, M., Hepple, R. T., & Buelle, Y. (2012). Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *AJP: Cell Physiology*, 302(4), C629-C641. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00368.2011>

- Pillai, J. B., Isbatan, A., Imai, S.-I., & Gupta, M. P. (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD⁺ depletion and reduced Sir2alpha deacetylase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 43121–43130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506162200>
- Pillai, V. B., Sundaresan, N. R., Kim, G., Gupta, M., Rajamohan, S. B., Pillai, J. B., Samant, S., Ravindra, P. V., Isbatan, A., & Gupta, M. P. (2010). Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 285(5), 3133–3144. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077271>
- Pillai, V. B., Sundaresan, N. R., Kim, G., Samant, S., Moreno-Vinasco, L., Garcia, J. G. N., & Gupta, M. P. (2013). Nampt secreted from cardiomyocytes promotes development of cardiac hypertrophy and adverse ventricular remodeling. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 304(3), H415–H426. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00468.2012>
- Pittelli, M., Formentini, L., Faraco, G., Lapucci, A., Rapizzi, E., Cialdai, F., Romano, G., Moneti, G., Moroni, F., & Chiarugi, A. (2010). Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase: Cellular bioenergetics reveals a mitochondrial insensitive NAD pool. *Journal of Biological Chemistry*, 285(44), 34106–34114. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.136739>
- Posern, G., & Treisman, R. (2006). Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.09.008>
- Prathima, S., & Devi, S. (1999). Adaptations in lactate dehydrogenase and its isozymes in aging mammalian myocardium: Interaction of exercise and temperature. *Mechanisms of Ageing and Development*, 108(1), 61–75. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(99\)00004-4](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(99)00004-4)
- Preiss, J., & Handler, P. (1958). Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. I. Identification of intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*, 233(2), 488–492. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13563526>
- Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2003, February). Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α (PGC-1α): Transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0012>
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6), 829–839. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81410-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81410-5)
- Quinn, L. S., Anderson, B., Conner, J. D., & Wolden-Hanson, T. (2013). IL-15 overexpression promotes endurance, oxidative energy metabolism, and muscle PPARdelta, SIRT1, PGC-1alpha, and PGC-1beta expression in male mice. *Endocrinology*, 154(1), 232–245. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1773>
- Ratajczak, J., Joffraud, M., Trammell, S. A. J., Ras, R., Canela, N., Boutant, M., Kulkarni, S. S., Rodrigues, M., Redpath, P., Migaud, M. E., Auwerx, J., Yanes, O., Brenner, C., & Cantó, C. (2016). NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells. *Nature Communications*, 7, 13103. <https://doi.org/10.1038/ncomms13103>

- Razeghi, P., Young, M. E., Alcorn, J. L., Moravec, C. S., Frazier, O. H., & Taegtmeyer, H. (2001). Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation*, *104*(24), 2923-2931. <https://doi.org/10.1161/hc4901.100526>
- Revollo, J. R., Grimm, A. A., & Imai, S. I. (2004). The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(49), 50754-50763. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408388200>
- Rimbaud, S., Ruiz, M., Piquereau, J., Mateo, P., Fortin, D., Veksler, V., Garnier, A., & Ventura-Clapier, R. (2011). Resveratrol improves survival, hemodynamics and energetics in a rat model of hypertension leading to heart failure. *PLoS ONE*, *6*(10), e26391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026391>
- Rimbaud, S., Sanchez, H., Garnier, A., Fortin, D., Bigard, X., Veksler, V., & Ventura-Clapier, R. (2009). Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *46*(6), 952-959. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.01.013>
- Rinnov, A., Yfanti, C., Nielsen, S., Åkerström, T. C. A., Peijs, L., Zankari, A., Fischer, C. P., & Pedersen, B. K. (2014). Endurance training enhances skeletal muscle interleukin-15 in human male subjects. *Endocrine*, *45*(2), 271-278. <https://doi.org/10.1007/s12020-013-9969-z>
- Rocher, C., Taanman, J., Pierron, D., Faustin, B., Benard, G., Rossignol, R., Malgat, M., Pedespan, L., & Letellier, T. (2008). Influence of mitochondrial DNA level on cellular energy metabolism: Implications for mitochondrial diseases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *40*(2), 59-67. <https://doi.org/10.1007/s10863-008-9130-5>
- Romacho, T., Azcutia, V., Vázquez-Bella, M., Matesanz, N., Cercas, E., Nevado, J., Carraro, R., Rodríguez-Mañas, L., Sánchez-Ferrer, C., & Peiró, C. (2009). Extracellular PBEF/NAMPT/visfatin activates pro-inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *Diabetologia*, *52*(11), 2455-2463. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1509-2>
- Rosa, E. F., Silva, A. C., Ihara, S. S. M., Mora, O. A., Aboulafia, J., & Nouailhetas, V. L. A. (2005). Habitual exercise program protects murine intestinal, skeletal, and cardiac muscles against aging. *Journal of Applied Physiology*, *99*(4), 1569-1575. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00417.2005>
- Rosenblatt-Velin, N., Montessuit, C., Papageorgiou, I., Terrand, J., & Lerch, R. (2001). Postinfarction heart failure in rats is associated with upregulation of GLUT-1 and downregulation of genes of fatty acid metabolism. *Cardiovascular Research*, *52*(3), 407-416. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00393-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00393-5)
- Sabbah, H. N., Sharov, V., Riddle, J. M., Kono, T., Lesch, M., & Goldstein, S. (1992). Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *24*(11), 1333-1347. [https://doi.org/10.1016/0022-2828\(92\)93098-5](https://doi.org/10.1016/0022-2828(92)93098-5)
- Sack, M. N., Rader, T. A., Park, S., Bastin, J., McCune, S. A., & Kelly, D. P. (1996). Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation*, *94*(11), 2837-2842. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.11.2837>

- Saks, V. A., Favier, R., Guzun, R., Schlattner, U., & Wallimann, T. (2006). Molecular system bioenergetics: Regulation of substrate supply in response to heart energy demands. *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.120584>
- Saks, V. A., Ventura-clapier, R., & Aliev, M. K. (1996). Metabolic control and metabolic capacity: Two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(96\)00011-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(96)00011-4)
- Sasaki, Y., Araki, T., & Milbrandt, J. (2006). Stimulation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthetic Pathways Delays Axonal Degeneration after Axotomy. *Journal of Neuroscience*, *26*(33), 8484-8491. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2320-06.2006>
- Savabi, F. (1994). Interaction of creatine kinase and adenylate kinase systems in muscle cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *133-134*(1), 145-152. <https://doi.org/10.1007/BF01267953>
- Savvatis, K., Schultheiss, H. P., & Tschöpe, C. (2015). Endomyocardial biopsy and ultrastructural changes in dilated cardiomyopathy: Taking a "deeper" look into patients' prognosis. *European Heart Journal*, *36*(12), 708-710. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu461>
- Scarpulla, R. (2008). Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function. *Physiological Reviews*, *88*(2), 611-638. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2007>
- Schaper, J., Froede, R., Hein, S., Buck, A., Hashizume, H., Speiser, B., Friedl, A., & Blease, N. (1991). Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, *83*(2), 504-514. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.83.2.504>
- Sebastiani, M., Giordano, C., Nediani, C., Travaglini, C., Borch, E., Zani, M., Feccia, M., Mancini, M., Petrozza, V., Cossarizza, A., Gallo, P., Taylor, R. W., & d'Amati, G. (2007). Induction of Mitochondrial Biogenesis Is a Maladaptive Mechanism in Mitochondrial Cardiomyopathies. *Journal of the American College of Cardiology*, *50*(14), 1362-1369. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.06.035>
- Sepulveda, J. L., Vlahopoulos, S., Iyer, D., Belaguli, N., & Schwartz, R. J. (2002). Combinatorial expression of GATA4, Nkx2-5, and serum response factor directs early cardiac gene activity. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(28), 25775-25782. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203122200>
- Shore, P., & Sharrocks, A. D. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.*, *229*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.00011.x>
- Sihag, S., Cresci, S., Li, A. Y., Sucharov, C. C., & Lehman, J. J. (2009). PGC-1alpha and ERRalpha target gene downregulation is a signature of the failing human heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.10.025>
- Smith, C. S., Bottomley, P. A., Schulman, S. P., Gerstenblith, G., & Weiss, R. G. (2006). Altered creatine kinase adenosine triphosphate kinetics in failing hypertrophied human myocardium. *Circulation*, *114*(11), 1151-1158.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.613646>

- Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J. W., & Treisman, R. (1999). *Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. Cell* (Vol. 98). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81011-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81011-9)
- Stanley, W. C., Recchia, F. A., & Lopaschuk, G. D. (2005). Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiological Reviews*, 85(3), 1093-1129. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2004>
- Stein, L. R., & Imai, S.-I. (2012). The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23(9), 420-428. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.005>
- Stein, L. R., & Imai, S.-I. (2014). Specific ablation of Nampt in adult neural stem cells recapitulates their functional defects during aging. *EMBO Journal*, 33(12), 1321-1340. <https://doi.org/10.1002/emboj.201386917>
- Stuewe, S., Gwartz, P., & Mallet, R. (2001). Exercise training increases creatine kinase capacity in canine myocardium. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 33(1), 92-98.
- Stuewe, S. R., Gwartz, P. A., Agarwal, N., & Mallet, R. T. (2000). Exercise training enhances glycolytic and oxidative enzymes in canine ventricular myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(6), 903-913. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1131>
- Sun, C.-K., Chang, L.-T., Sheu, J.-J., Wang, C.-Y., Youssef, A. a, Wu, C.-J., Chua, S., & Yip, H.-K. (2007). Losartan preserves integrity of cardiac gap junctions and PGC-1 alpha gene expression and prevents cellular apoptosis in remote area of left ventricular myocardium following acute myocardial infarction. *International Heart Journal*, 48(4), 533-546. <https://doi.org/JST.JSTAGE/ihj/48.533> [pii]
- Sun, Q., Chen, G., Streb, J. W., Long, X., Yang, Y., Stoeckert, C. J., & Miano, J. M. (2006). Defining the mammalian CArGome. *Genome Research*, 16(2), 197-207. <https://doi.org/10.1101/gr.4108706>
- Sundaresan, N. R., Gupta, M., Kim, G., Rajamohan, S. B., Isbatan, A., & Gupta, M. P. (2009). Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2758-2771. <https://doi.org/10.1172/JCI39162>
- Szeto, H. H. (2014, April 1). First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *British Journal of Pharmacology*. Wiley/Blackwell (10.1111). <https://doi.org/10.1111/bph.12461>
- Talanian, J. L., Holloway, G. P., Snook, L. A., Heigenhauser, G. J. F., Bonen, A., & Spriet, L. L. (2010). Exercise training increases sarcolemmal and mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00073.2010>
- Tan, B., Young, D., Lu, Z., Wang, T., Meier, T., Shepard, R., Roth, K., Zhai, Y., Huss, K., Kuo, M., Gillig, J., Parthasarathy, S., Burkholder, T., Smith, M. C., Geeganage, S., & Zhao, G. (2013). Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase

- (NAMPT), an enzyme essential for NAD⁺ biosynthesis, in human cancer cells: Metabolic basis and potential clinical implications. *Journal of Biological Chemistry*, 288(5), 3500–3511. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.394510>
- Taskinen, M. R., & Nikkilä, E. A. (1988). Effects of acipimox on serum lipids, lipoproteins and lipolytic enzymes in hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*, 69(2–3), 249–255. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(88\)90021-4](https://doi.org/10.1016/0021-9150(88)90021-4)
- Tempel, W., Rabeh, W. M., Bogan, K. L., Belenky, P., Wojcik, M., Seidle, H. F., Nedyalkova, L., Yang, T., Sauve, A. A., Park, H. W., & Brenner, C. (2007). Nicotinamide riboside kinase structures reveal new pathways to NAD⁺. *PLoS Biology*, 5(10), 2220–2230. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050263>
- Terada, S., Goto, M., Kato, M., Kawanaka, K., Shimokawa, T., & Tabata, I. (2002). Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(2), 350–354. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00881-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00881-1)
- To, C., Kim, E. H., Royce, D. B., Williams, C. R., Collins, R. M., Risingsong, R., Sporn, M. B., & Liby, K. T. (2014). The PARP inhibitors, veliparib and olaparib, are effective chemopreventive agents for delaying mammary tumor development in BRCA1-deficient mice. *Cancer Prevention Research*, 7(7), 698–707. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0047>
- Todisco, S., Agrimi, G., Castegna, A., & Palmieri, F. (2006). Identification of the mitochondrial NAD⁺ transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(3), 1524–1531. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510425200>
- Trammell, S. A. J., Schmidt, M. S., Weidemann, B. J., Redpath, P., Jaksch, F., Dellinger, R. W., Li, Z., Abel, E. D., Migaud, M. E., & Brenner, C. (2016). Nicotinamide riboside is uniquely and orally bioavailable in mice and humans. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms12948>
- Trammell, S. A. J., Weidemann, B. J., Chadda, A., Yorek, M. A. M. S., Holmes, A., Coppey, L. J., Obrosov, A., Kardon, R. H., Yorek, M. A. M. S., & Brenner, C. (2016). Nicotinamide riboside opposes type 2 diabetes and neuropathy in mice. *Scientific Reports*, 6(1), 26933. <https://doi.org/10.1038/srep26933>
- Treisman, R. (1987). Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. *The EMBO Journal*, 6(9), 2711–2717. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3119326>
- Tremblay, A., Simoneau, J., & Bouchard, C. (1994). Impact of exercise intensity on body fatness and skeletal muscle metabolism. *Metabolism*, 43(7), 814–818. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(94\)90259-3](https://doi.org/10.1016/0026-0495(94)90259-3)
- Upadhyaya, B., Haykowsky, M. J., Eggebeen, J., & Kitzman, D. W. (2015). Exercise intolerance in heart failure with preserved ejection fraction: More than a heart problem. *Journal of Geriatric Cardiology*, 12(3), 294–304. <https://doi.org/10.11909/j.issn.1671-5411.2015.03.013>
- Vakhrusheva, O., Smolka, C., Gajawada, P., Kostin, S., Boettger, T., Kubin, T., Braun, T., & Bober, E. (2008). Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents

- apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circulation Research*, 102(6), 703-710. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.164558>
- Van Bilsen, M. (2004). "Energetics" of heart failure. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1015(1), 238-249. <https://doi.org/10.1196/annals.1302.020>
- van de Weijer, T., Phielix, E., Bilet, L., Williams, E. G., Ropelle, E. R., Bierwagen, A., Livingstone, R., Nowotny, P., Sparks, L. M., Pagliarlunga, S., Szendroedi, J., Havekes, B., Moullan, N., Pirinen, E., Hwang, J.-H., Schrauwen-Hinderling, V. B., Hesselink, M. K. C., Auwerx, J., Roden, M., & Schrauwen, P. (2015). Evidence for a Direct Effect of the NAD⁺ Precursor Acipimox on Muscle Mitochondrial Function in Humans. In *Diabetes* (Vol. 64, pp. 1193-1201). <https://doi.org/10.2337/db14-0667>
- Vartiainen, M. K., Guettler, S., Larijani, B., & Treisman, R. (2007). Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science*, 316(5832), 1749-1752. <https://doi.org/10.1126/science.1141084>
- Vatner, D. E., & Ingwall, J. S. (1984). Effects of moderate pressure overload cardiac hypertrophy on the distribution of creatine kinase isozymes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 175(1), 5-9. <https://doi.org/10.3181/00379727-175-1-RC2>
- Ventura-Clapier, R. (1998, August). Creatine kinases et transferts d'énergie dans le myocyte cardiaque. *Medecine/Sciences*. <https://doi.org/10.4267/10608/906>
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., & Veksler, V. (2004). Energy metabolism in heart failure. *The Journal of Physiology*, 555(1), 1-13. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.055095>
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., & Veksler, V. (2008, April 30). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: The central role of PGC-1 α . *Cardiovascular Research*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn098>
- Ventura-clapier, R., Garnier, A., Veksler, V., & Joubert, F. (2011). Bioenergetics of the failing heart. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(7), 1360-1372. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.006>
- Villard, E., Perret, C., Gary, F., Proust, C., Dilanian, G., Hengstenberg, C., Ruppert, V., Arbustini, E., Wichter, T., Germain, M., Dubourg, O., Tavazzi, L., Aumont, M. C., De Groote, P., Fauchier, L., Trochu, J. N., Gibelin, P., Aupetit, J. F., Stark, K., Erdmann, J., Hetzer, R., Roberts, A. M., Barton, P. J. R., Regitz-Zagrosek, V., Consortium, C., Aslam, U., Duboscq-Bidot, L., Meyborg, M., Maisch, B., Madeira, H., Waldenström, A., Galve, E., Cleland, J. G., Dorent, R., Roizes, G., Zeller, T., Blankenberg, S., Goodall, A. H., Cook, S., Tregouet, D. A., Tiret, L., Isnard, R., Komajda, M., Charron, P., & Cambien, F. (2011). A genome-wide association study identifies two loci associated with heart failure due to dilated cardiomyopathy. *European Heart Journal*, 32(9), 1065-1076. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr105>
- Vollaard, N. B. J., Constantin-Teodosiu, D., Fredriksson, K., Rooyackers, O., Jansson, E., Greenhaff, P. L., Timmons, J. A., & Sundberg, C. J. (2009). Systematic analysis of adaptations in aerobic capacity and submaximal energy metabolism provides a unique insight into determinants of human aerobic performance. *Journal of Applied Physiology*, 106(5), 1479-1486. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91453.2008>

- Wai, T., García-Prieto, J., Baker, M. J., Merkwirth, C., Benit, P., Rustin, P., Rupérez, F. J., Barbas, C., Ibañez, B., & Langer, T. (2015). Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. *Science*, *350*(6265). <https://doi.org/10.1126/science.aad0116>
- Wang, P., Liu, J., Li, Y., Wu, S., Luo, J., Yang, H., Subbiah, R., Chatham, J., Zhelyabovska, O., & Yang, Q. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor δ is an essential transcriptional regulator for mitochondrial protection and biogenesis in adult heart. *Circulation Research*, *106*(5), 911-919. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.206185>
- Wang, S., Wan, T., Ye, M., Qiu, Y., Pei, L., Jiang, R., Pang, N., Huang, Y., Liang, B., Ling, W., Lin, X., Zhang, Z., & Yang, L. (2018). Nicotinamide riboside attenuates alcohol induced liver injuries via activation of SirT1/PGC-1 α /mitochondrial biosynthesis pathway. *Redox Biology*, *17*, 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.04.006>
- Wang, T., Zhang, X., Bheda, P., Revollo, J., Imai, S., & Wolberger, C. (2006). Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD⁺ biosynthetic enzyme. *Nature Structural & Molecular Biology*, *13*(7), 661-662. <https://doi.org/10.1038/nsmb1114>
- Weiss, R. G., Gerstenblith, G., & Bottomley, P. A. (2005). ATP flux through creatine kinase in the normal, stressed, and failing human heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(3), 808-813. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408962102>
- Wilding, J., Joubert, F., De Araujo, C., Fortin, D., Novotova, M., Veksler, V., & Ventura-clapier, R. (2006). Altered energy transfer from mitochondria to sarcoplasmic reticulum after cytoarchitectural perturbations in mice hearts. *Journal of Physiology*, *575*(1), 191-200. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.114116>
- Winder, W., Holmes, B., Rubink, D., Jensen, E., Chen, M., & Holloszy, J. (2000). Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, *88*(6), 2219-2226. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.6.2219>
- Wood, I. S., & Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition*, *89*(01), 3. <https://doi.org/10.1079/BJN2002763>
- Wu, H., Kanatous, S. B., Thurmond, F. A., Gallardo, T., Isotani, E., Bassel-Duby, R., & Williams, R. S. (2002). Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by caMK. *Science*, *296*(5566), 349-352. <https://doi.org/10.1126/science.1071163>
- Wyss, M., Smeitink, J., Wevers, R. A., & Wallimann, T. (1992, September 25). Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *BBA - Bioenergetics*. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(92\)90096-K](https://doi.org/10.1016/0005-2728(92)90096-K)
- Xiao, C.-Y., Chen, M., Zsengellér, Z., Li, H., Kiss, L., Kollai, M., & Szabó, C. (2005). Poly(ADP-Ribose) polymerase promotes cardiac remodeling, contractile failure, and translocation of apoptosis-inducing factor in a murine experimental model of aortic banding and heart failure. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *312*(3), 891-898. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.077164>
- Xu, K. Y., Zweier, J. L., & Becker, L. C. (1995). Functional coupling between glycolysis and

- sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport. *Circulation Research*, 77(1), 88–97.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.77.1.88>
- Yalcin, A., Silay, K., Balik, A. R., Avcioglu, G., & Aydin, A. S. (2018). The relationship between plasma interleukin-15 levels and sarcopenia in outpatient older people. *Aging Clinical and Experimental Research*, 30(7), 783–790.
<https://doi.org/10.1007/s40520-017-0848-y>
- Yang, H., Yang, T., Baur, J. A., Perez, E., Matsui, T., Carmona, J. J., Lamming, D. W. W., Souza-Pinto, N. C., Bohr, V. A., Rosenzweig, A., de Cabo, R., Sauve, A. A. A., & Sinclair, D. A. (2007). Nutrient-Sensitive Mitochondrial NAD⁺ Levels Dictate Cell Survival. *Cell*, 130(6), 1095–1107. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.035>
- Ye, Y., Wang, C., Zhang, J., Cho, Y. K., Gong, G., Murakami, Y., & Bache, R. J. (2001). Myocardial creatine kinase kinetics and isoform expression in hearts with severe LV hypertrophy. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, 281(0363–6135 (Print)), H376–H386.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.1.H376>
- Ying, W. (2008). NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(2), 179–206. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1672>
- Yoshino, J., Baur, J. A., & Imai, S.-I. (2018). NAD⁺ Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR. *Cell Metabolism*, 27(3), 513–528.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.11.002>
- Yoshino, J., Mills, K. F. F., Yoon, M. J. J., & Imai, S. (2011). Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metabolism*, 14(4), 528–536.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.014>
- Young, G. S., Choleris, E., Lund, F. E., & Kirkland, J. B. (2006). Decreased cADPR and increased NAD⁺ in the Cd38^{-/-} mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(1), 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.100>
- Yu, W., Dittenhafer-Reed, K. E., & Denu, J. M. (2012). SIRT3 protein deacetylates isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) and regulates mitochondrial redox status. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.355206>
- Zhang, Y., Wang, B., Fu, X., Guan, S., Han, W., Zhang, J., Gan, Q., Fang, W., Ying, W., & Qu, X. (2016). Exogenous NAD(+) administration significantly protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in rat model. *American Journal of Translational Research*, 8(8), 3342–3350. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27648125>
- Zhao, Y., Wang, A., Zou, Y., Su, N., Loscalzo, J., & Yang, Y. (2016). In vivo monitoring of cellular energy metabolism using SoNar, a highly responsive sensor for NAD⁺/NADH redox state. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.074>
- Zhou, C. C., Yang, X., Hua, X., Liu, J., Fan, M. B., Li, G. Q., Song, J., Xu, T. Y., Li, Z. Y., Guan, Y. F., Wang, P., & Miao, C. Y. (2016). Hepatic NAD⁺ deficiency as a therapeutic target for non-alcoholic fatty liver disease in ageing. *British Journal of Pharmacology*, 2352–2368. <https://doi.org/10.1111/bph.13513>
- Ziaaldini, M. M., Marzetti, E., Picca, A., & Murlasits, Z. (2017). Biochemical Pathways of

Sarcopenia and Their Modulation by Physical Exercise: A Narrative Review. *Frontiers in Medicine*, 4, 167. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00167>

Zolkiewska, A., & Moss, J. (1997). The alpha 7 integrin as a target protein for cell surface mono-ADP-ribosylation in muscle cells. *Adv Exp Med Biol*, 419, 297–303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9193669>

Zoll, J., Koulmann, N., Bahi, L., Ventura-clapier, R., & Bigard, X. (2003). Quantitative and qualitative adaptation of skeletal muscle mitochondria to increased physical activity. *Journal of Cellular Physiology*, 194(2), 186–193. <https://doi.org/10.1002/jcp.10224>

Zoll, J., N'Guessan, B., Ribera, F., Lampert, E., Fortin, D., Veksler, V., Bigard, X., Geny, B., Lonsdorfer, J., Ventura-clapier, R., & Mettauer, B. (2003). Preserved response of mitochondrial function to short-term endurance training in skeletal muscle of heart transplant recipients. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(1), 126–132. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00499-6](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00499-6)

Zoll, J., Sanchez, H., N'Guessan, B., Ribera, F., Lampert, E., Bigard, X., Serrurier, B., Fortin, D., Geny, B., Veksler, V., Ventura-clapier, R., & Mettauer, B. (2002). Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 543(1), 191–200. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.019661>

Table des illustrations

Figure 1 : Voies métaboliques de dégradation du glucose et des acides gras.....	9
Figure 2 : La chaîne respiratoire mitochondriale.....	14
Figure 3 : Compartimentalisation mitochondriale et cytosolique de la CK. A.	17
Figure 4 : Cascade de régulation coordonnée par PGC-1 α	23
Figure 5 : Déséquilibre énergétique dans l'insuffisance cardiaque.	25
Figure 6 : SRF contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes par interaction avec ses différents cofacteurs.	34
Figure 7 : Couple redox de la molécule de NAD sous sa forme oxydée (NAD ⁺) et réduite (NADH).	46
Figure 8 : Représentation schématique des réactions de déacétylation et mono-ADP-ribosylation catalysées par les sirtuines.....	48
Tableau 1 : Résumé des différentes activités enzymatiques, localisations et principales cibles des sirtuines chez les mammifères.....	51
Figure 9 : Les voies de biosynthèse du NAD ⁺	55
Figure 10 : La molécule de NAD ⁺ et ses précurseurs.	57
Figure 11 : Structure du gène <i>NMRK2</i> figurant dans les banques de données ENSEMBL et Genbank	61
Figure 12 : Alignement des différentes isoformes protéiques de <i>NMRK2</i>	62
Figure 13 : Schéma récapitulatif des voies d'utilisation et de production du NAD ⁺	64
Figure 14 : Représentation schématique de la construction génétique permettant l'inactivation du gène SRF par injection de tamoxifène	72
Figure 15 : Représentation schématique de la construction génétique permettant l'inactivation constitutive du gène de la kinase <i>NMRK2</i>	73
Figure 16 : Profil du « Mitochondrial Stress Test » Seahorse et paramètres calculés.	88
Figure 17 : Profil du test de « Glycolysis Stress Test » Seahorse et paramètres calculés.....	89