



**HAL**  
open science

## Modifications post-traductionnelles de la protéine superoxyde dismutase 2 dans le coeur

Victoriane Peugnet

► **To cite this version:**

Victoriane Peugnet. Modifications post-traductionnelles de la protéine superoxyde dismutase 2 dans le coeur. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS010 . tel-03697502

**HAL Id: tel-03697502**

**<https://theses.hal.science/tel-03697502>**

Submitted on 17 Jun 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE LILLE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

**THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE**  
**En Sciences de la Vie et de la Santé**

**Modifications post-traductionnelles de la protéine  
superoxyde dismutase 2 dans le cœur**

Soutenue le 16 juin 2021 par  
**Victoriane PEUGNET**

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Philippe AMOUYEL

Madame le Professeur Geneviève DERUMEAUX

Monsieur le Docteur Gabriel BIDAUX

Monsieur le Professeur Luc BERTRAND

Madame le Dr Florence PINET

Madame le Dr Emilie DUBOIS-DERUY

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

**Thèse réalisée dans l'unité de recherche  
INSERM U1167 RID-AGE, équipe 2, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille**



## *Remerciements*

En premier lieu, je tiens à remercier l'**Institut Pasteur de Lille** ainsi que la **région Hauts-de-France** qui ont cofinancés mon projet de thèse ainsi que sa prolongation de 8 mois suite à la pandémie de COVID-19. Je souhaite également remercier **l'I-SITE ULNE** qui m'a octroyé une bourse de mobilité internationale de recherche qui m'a permis de rendre dans le laboratoire du Pr Luc Bertrand à Bruxelles en septembre 2020.

Mes remerciements s'adressent ensuite particulièrement à :

**Monsieur le Professeur Philippe AMOUYEL,**  
*Président de mon jury de thèse et directeur de l'unité INSERM U1167*

Je souhaite vous exprimer ici toute ma gratitude pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire « Facteurs de risques et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement » et de m'avoir accordé votre confiance. Je suis très honorée que vous présidiez mon jury de thèse. Je vous adresse mes plus sincères remerciements et mon plus profond respect.

**Madame le Docteur Emilie DUBOIS-DERUY,**  
*Directrice de thèse*

Je n'aurai jamais assez de mots pour t'exprimer toute la reconnaissance que j'ai à ton égard. Tu m'as accompagné dès mes premiers pas dans la recherche et la vie de laboratoire, et tu as su me transmettre la passion qui t'anime dans tes projets. Toujours à l'écoute et bienveillante, tu as su trouver les mots en toutes circonstances pour me guider et m'aider à me dépasser et donner le meilleur de moi-même. Bien plus qu'une directrice de thèse, tu es une confidente et une personne sur laquelle on peut toujours compter en toutes circonstances. Je te souhaite toute la réussite et le bonheur que tu mérites à la fois dans ta vie professionnelle et personnelle, et je terminerai juste par un immense merci pour tout ce que tu m'as apporté.



## *Remerciements*

**Madame le Docteur Florence PINET,**  
*Directrice de l'équipe 2 de l'unité INSERM U1167*

Je vous suis extrêmement reconnaissante de m'avoir accueillie dans votre équipe dès mon tout premier stage de Licence 3, de m'avoir renouvelé votre confiance en Master et permis de réaliser ma thèse dans le laboratoire. Je vous remercie de m'avoir confié ce projet de thèse ainsi que de m'avoir permis de participer à de nombreux congrès. Merci également pour le temps que vous m'avez consacré ces six dernières années, pour vos conseils toujours avisés et pour votre encadrement quotidien. J'ai énormément appris à vos côtés et je suis fière et honorée d'avoir pu travailler avec vous.

**Madame le Professeur Geneviève DERUMEAUX**

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse ainsi que pour le temps passé à la lecture du manuscrit. Je suis très honorée de votre participation à mon jury de thèse.

**Monsieur le Docteur Gabriel BIDAUX**

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse. Je tiens également à vous remercier du temps que vous avez accordé et de votre implication dans la lecture de mon manuscrit, ainsi que pour les remarques constructives que vous m'avez apporté pour la préparation de la soutenance.

**Monsieur le Professeur Luc BERTRAND,**

Je vous remercie d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse. Je vous remercie également de m'avoir accueillie à plusieurs reprises au sein de votre laboratoire et pour la collaboration que nous avons mis en place autour de mon projet de thèse. Je vous prie de recevoir mes remerciements les plus sincères et mon profond respect.

## *Remerciements*

**Monsieur le Professeur Vincent RICHARD**  
**Monsieur le Docteur Amar ABDERAHMANI**  
**Madame le Docteur Anne GARNIER**

Je vous suis reconnaissante d'avoir participé à mes Comité de Suivi Individuel ainsi que de l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Je vous remercie également pour les conseils que vous m'avez apporté et de m'avoir orienté dans mes recherches pour mener à bien mon projet de thèse. Veuillez recevoir mon respect et mes remerciements les plus sincères.

### **L'équipe CARD de l'IREC à Bruxelles**

Merci à tous pour votre accueil lors de ma venue dans le laboratoire. Un merci tout particulier à Laurent pour m'avoir aidé dans la logistique de ma venue (et la COVID-19 ne nous a pas facilité la tâche), pour m'avoir formé à la formation des cardiomyocytes adultes ainsi que pour ta sympathie. Merci également à Edith, Marine et Laura pour votre travail avec les souris SIRT3 KO. Merci également à Natasha, Justine et également Julien que j'ai eu le plaisir de retrouver à Lille. Merci à tous pour votre aide, votre gentillesse et votre bonne humeur.

Je souhaite ensuite remercier tout particulièrement :

### **L'ensemble des membres de l'équipe Protéo de l'unité U1167**

*Emilie*, cette fois ci plus en tant que directrice mais en tant que collègue et amie, pour tes délicieux gâteaux, nos discussions variées sur des sujets parfois sérieux, parfois tous plus croustillants les uns que les autres et pour ton soutien sans faille depuis 6 ans.

*Annie*, pour ta bonne humeur communicative, pour m'avoir fait découvrir la gastronomie libanaise et un peu la langue aussi, avec le succès qu'on lui connaît ! Merci aussi pour tes conseils tout au long de ma thèse et l'intérêt que tu as porté mon projet. Après avoir consacré beaucoup de ton temps aux autres, je compte maintenant sur toi pour te chouchouter et prendre soin de toi !

## *Remerciements*

**Henri**, mon acolyte de la team SOD2 et fidèle binôme d'animalerie. Tu as toujours su, à ta manière, trouver les mots pour nous faire rire. N'oublie pas que j'ai toujours une revanche à prendre sur cette magnifique boule de neige en pleine tête ! Je ne te souhaite que le meilleur dans ta vie personnelle et professionnelle.

**Marie**, ma copine !!! bien plus qu'une collègue, tu es devenue une véritable amie. Merci pour ta gentillesse, pour ton soutien de chaque instant et pour ton oreille attentive dans toutes les situations. A nos coups de téléphone interminables (qui fatiguent même le téléphone lui-même !), nos fous-rires, nos sorties shopping-mojito-restau qu'il me tarde de reprendre et aux prochaines victoires Françaises au rugby ! Je te souhaite toute la réussite et le bonheur que tu mérites pour la suite des tes aventures...

Et à tous les quatre, merci pour tous ces bons moments passés ensemble, dans le labo ou en dehors, qui ont fait de ma thèse une expérience aussi riche professionnellement qu'humainement.

**Maggy**, merci pour soutien et ton aide tout au long de ma thèse. La culture est maintenant passée entre deux bonnes mains !

**Olivia**, merci pour ton aide et ton soutien, et pour avoir égayé le bureau, encore plus particulièrement ces derniers mois. Et merci pour le café qui a réveillé mes matinées de rédaction !

**Fadi**, merci de m'avoir permis de m'exercer à l'anglais et pour ta bonne humeur et ton calme en toutes circonstances ! Je te souhaite le meilleur pour la suite...

**Wilfried**, la COVID aura au moins eu le mérite que l'on se croise plus souvent au labo ! Merci pour ta bonne humeur communicative et bon courage pour la suite de la thèse !

Merci également à tous les membres de l'équipe, actuels ou passés : **Arthur, Thomas, Marion, Ouriel, Audrey, Sina, Yara...**

## *Remerciements*

Merci enfin aux stagiaires qui ont contribué, chacun à leur manière, à ce travail de thèse : **Maurine, Laurine, Chloé** et **Fabien**. Avec une mention spéciale pour **Frédéric** et un grand merci pour ton aide sur les manip pendant la rédaction.

### *L'ensemble de l'unité U1167*

Pour leur sympathie, leurs conseils, leur aide, et leur soutien : Camille, Anne-Sophie, Jean, Jean-Charles, Pierre, Julien, Devrim, Anne-Marie, Fanny, Amandine, Anaïs-Camille, Chloé, Audrey, Erwann, Xavier, Valérie, Florie, Tiago, Julie, Aline, Manon, Benjamin, Nadine... et tellement d'autres encore !

Enfin, je tiens à remercier sincèrement :

**Mes parents, Fabienne et Charles**, merci pour votre soutien en toutes circonstances, pendant mes études, ma thèse et dans mes projets personnels. Merci pour votre amour inconditionnel. Merci d'avoir toujours cru en moi et d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, je n'en serai pas là sans vous...

**Mon frère, Alexandre**, merci pour tes encouragements, ton aide et ton soutien quotidien. Tu as contribué bien plus que tu ne le penses à la réussite de mes études, de bien des manières ! Je suis fière de toi et de la personne que tu es devenue...

**Mon grand-père, Félix**, pour avoir toujours cru en moi et pousser à me dépasser. Tu m'a transmis ta force de caractère, et quel caractère nous avons tous les deux ! Rien ne vaut tes conseils, ta présence dans tous les moments importants de ma vie, et ton amour...

Et enfin **William**, mon « âme soeur », pour toutes ces belles années passées et à venir. Merci pour ton amour, ta patience (et toutes ces soirées à m'avoir entendue taper sur le clavier de l'ordinateur!) et pour m'avoir toujours soutenue dans mes projets. Nous n'aurons peut-être jamais rien fait simplement (jusqu'au mariage !), mais nous serons toujours là l'un pour l'autre, et c'est le plus important...



A William,

A ma famille,

Et à ma grand-mère,

Je ne t'oublie pas...

*kochanie złota miliardy*



## Liste des publications et communications

### Publications

**Peugnet V**, Chwastyniak M, Beseme O, Renguet E, De Loof M, Ventura Clapier R, Lemaire C, Amouyel P, Garnier-Fagart A, Bertrand L, Pinet F, Dubois-Deruy E. Deacetylase SIRT3 activates SOD2 to protect cardiomyocytes from Iso-induced oxidative stress and hypertrophy. (en préparation)

**Peugnet V**, Chwastyniak M, Lancel S, Bultot L, Fourny N, Beseme O, Loyens A, Heyse W, Amouyel P, Bertrand L, Pinet F, Dubois-Deruy E. Mitochondrial targeted therapies require mitophagy to prevent oxidative stress induced by cardiac hypertrophy. (soumis)

Kluza J, **Peugnet V**, Laine W, Kervoaze G, Remy G, Loyens A, Maboudou P, Wolowczuck I, Gosset P, Garcon G, Marchetti P, Pinet F, Pichavant M, Dubois-Deruy E. Validation of a new strategy to maintain functional mitochondrial metabolism in conserved murine tissue. (soumis)

Bouvet M, Dubois-Deruy E, Turkieh A, **Peugnet V**, Mulder P, Dechaumes A, Chwastyniak M, Beseme O, Amouyel P, Balligand JL, Lamblin N, Richard V, Pinet F. Desmin aggregophagy in rat and human ischemic heart failure through protein kinase C  $\zeta$  and GSK3 $\beta$  as an upstream signaling pathway. (accepté)

Dubois-Deruy E, **Peugnet V**, Turkieh A, Pinet F. Oxidative stress in cardiovascular diseases. *Antioxidants*.2020;9(9):1-15.<https://doi.org/10.3390/antiox9090864>.

### Communications orales

**Peugnet V**, Beseme O, Chwastyniak M, Mulder P, Bugger H, Renguet E, Amouyel P, Richard V, Bertrand L, Pinet F. Role of superoxide dismutase 2 acetylation during left ventricular remodeling and cardiac hypertrophy.

→Journée André Verbert 2019, septembre 2019, Lille, France.



**Peugnet V**, Dubois-Deruy E, Beseme O, Mulder P, Chwastyniak M, Amouyel P, Richard V, Pinet F. Role of superoxide dismutase 2 acetylation in cardiac hypertrophy.

→Printemps de la cardiologie, avril 2018, Montpellier, France.

→Deuxième journée scientifique de la FHU REMOD-VHF, mai 2018, Rouen, France.

## **Communications écrites**

**Peugnet V**, Stephan Y, Soulié M, Heyse W, Mulder P, Pinet F, Dubois-Deruy E. Impact of SOD-mimicking anti-oxidant treatment on oxidative stress and cardiac function.

→ Printemps de la cardiologie 2021, mai 2021, online congress.

**Peugnet V**, Beseme O, Chwastyniak M, Bugger H, Renguet E, Amouyel P, Bertrand L, Pinet F, Dubois-Deruy E. Acetylation regulates SOD2 activity to decrease oxidative stress in hypertrophied cardiomyocytes.

→Printemps de la cardiologie 2020, octobre 2020, online congress.

**Peugnet V**, Beseme O, Chwastyniak M, Bugger H, Renguet E, Ventura-Clapier R, Lemaire C, Amouyel P, Garnier-Fagart A, Bertrand L, Pinet F, Dubois-Deruy E. Involvement of deacetylases sirtuins 1, 3 and 6 in regulation of superoxide dismutase 2 acetylation in the heart.

→Printemps de la cardiologie 2019, mai 2019, Lille, France

→Troisième journée scientifique de la FHU REMOD-VHF, mai 2019, Rouen, France  
(Prix poster)

→*Translational research on diabetic cardiomyopathy* (AVIESAN), juin 2019, Paris, France.

**Peugnet V**, Dubois-Deruy E, Beseme O, Mulder P, Chwastyniak M, Amouyel P, Richard V, Pinet F. Role of superoxide dismutase 2 acetylation in cardiac hypertrophy.

→Printemps de la cardiologie, avril 2018, Montpellier, France.

→Deuxième journée scientifique de la FHU REMOD-VHF, mai 2018, Rouen, France.

## Résumé

De nos jours, les pathologies cardiovasculaires représentent un enjeu de santé publique majeur dans les pays développés. Particulièrement, le remodelage ventriculaire gauche touche 30% des patients suite à un infarctus du myocarde et peut mener à terme à une insuffisance cardiaque. Le remodelage et l'insuffisance cardiaque sont associés au développement d'un stress oxydant, participant aux modifications structurales et fonctionnelles du cœur. L'objectif de ma thèse consistait en l'étude des modifications post-traductionnelles de la protéine anti-oxydante mitochondriale superoxyde dismutase 2 (SOD2), et plus particulièrement de son inactivation par acétylation, dans le contexte des pathologies cardiovasculaires.

J'ai montré que l'inactivation de SOD2 par acétylation de la lysine 68 favorise le stress oxydant et la dysfonction mitochondriale. Parmi les différents isoformes SIRT, la protéine mitochondriale SIRT3 a été identifiée comme responsable de l'activation de SOD2 par désacétylation, tandis que la protéine acetyl transferase P300 serait impliquée dans la régulation transcriptionnelle de SOD2. J'ai également montré que la protéine SIRT3 protège les cardiomyocytes du stress oxydant et de l'hypertrophie induite par stimulation à l'isoprénaline en activant la protéine SOD2. Ces données m'ont permis d'identifier la protéine SOD2 comme cible moléculaire potentielle dans les stratégies thérapeutiques anti-oxydantes.

J'ai donc étudié l'impact des anti-oxydants MitoQuinone (MitoQ, antioxydant mitochondrial) et EUK 134 (mimétique des SOD) sur les cardiomyocytes et montré les effets protecteurs de la MitoQ et du EUK 134 sur le stress oxydant et l'hypertrophie. Cependant, la MitoQ entraîne des dysfonctions mitochondriales et un arrêt de la mitophagie délétères pour les cardiomyocytes, contrairement au EUK 134 qui permet de restaurer la fonction mitochondriale en maintenant l'équilibre de la mitophagie. Ces données mettent en évidence le rôle primordial du métabolisme mitochondrial dans le développement des thérapies anti-oxydantes.

Mots clés : superoxyde dismutase 2 ; acétylation ; cœur ; stress oxydant

## Abstract

Nowadays, cardiovascular diseases remain a main public health issue in developed countries. Especially, left ventricular remodeling concerns 30% of patients after myocardial infarction and can lead to heart failure. Left ventricular remodeling and heart failure are associated with oxidative stress, contributing to structural and functional modifications of the heart. The aim of my PhD thesis was to study post-translational modifications of the mitochondrial anti-oxidant enzyme superoxide dismutase 2 (SOD2), especially its acetylation that inactivates it, in the pathophysiological context of cardiovascular diseases.

I showed that cardiac SOD2 is inactivated by acetylation on lysin 68, contributing to mitochondrial oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Among SIRT isoforms, the mitochondrial protein SIRT3 was identified as responsible for SOD2 deacetylation and subsequent activation, whereas protein acetyl transferase P300 could be involved in SOD2 transcriptional regulation. I also showed that SIRT3-mediated SOD2 activation protects cardiomyocytes from isoproterenol-induced oxidative stress and hypertrophy. These data allowed us to identify SOD2 as a potential molecular target in anti-oxidant therapeutic strategies.

I then studied the impact of anti-oxidant molecules MitoQuinone (MitoQ, mitochondrial anti-oxidant) and EUK 134 (SOD mimetic) on cardiomyocytes. I showed that MitoQ and EUK 134 had protective effect on cardiac oxidative stress and hypertrophy. However, MitoQ is associated with mitochondrial dysfunctions and altered mitophagy in cardiomyocytes, contrary to EUK 134 that restore mitochondrial function and maintains mitophagy balance. These data highlight the key role of mitochondrial metabolism in development of anti-oxidant therapeutics.

Key words : superoxide dismutase 2 ; acetylation ; heart ; oxidative stress

# *Sommaire*



## Sommaire

<b>Sommaire .....</b>	<b>15</b>
<b>Abréviations .....</b>	<b>23</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>29</b>
<b>I) Physiopathologie du cœur.....</b>	<b>31</b>
1) <i>Le cœur sain</i> .....	31
1.1) Anatomie et histologie .....	31
1.2) La révolution cardiaque .....	33
1.3) Protéines contractiles .....	34
2) <i>L'insuffisance cardiaque</i> .....	37
2.1) Définition .....	37
2.2) Dépistage et biomarqueurs.....	38
2.3) Epidémiologie .....	40
3) <i>L'infarctus du myocarde</i> .....	41
3.1) Définition .....	41
3.2) Epidémiologie .....	43
3.3) Facteurs de risques .....	44
3.4) Dépistage et biomarqueurs.....	45
4) <i>Le remodelage ventriculaire gauche</i> .....	48
4.1) Définition .....	48
4.2) Epidémiologie .....	49
4.3) Dépistage.....	50
4.4) Mécanismes physiopathologiques .....	51
4.4.1) Réexpression des gènes fœtaux .....	52
4.4.2) Mort des cardiomyocytes de la zone infarctée .....	52
4.4.3) Formation de la cicatrice fibreuse .....	53
4.4.4) Hypertrophie des cardiomyocytes .....	55
<b>II) La mitochondrie.....</b>	<b>60</b>
1) <i>Structure et composition</i> .....	60
1.1) Structure .....	60
1.2) Le génome mitochondrial .....	61
1.3) Import de protéines cytosoliques .....	62

2) <i>Dynamique mitochondriale</i> .....	64
2.1) Le contrôle de la qualité mitochondriale .....	64
2.2) Fusion.....	66
2.3) Fission.....	67
2.4) Mitophagie .....	68
2.5) La dynamique mitochondriale dans le cœur .....	70
3) <i>Fonctions mitochondriales</i> .....	72
3.1) La production d'énergie .....	72
3.1.1) Métabolisme énergétique.....	72
3.1.2) La chaîne respiratoire mitochondriale .....	73
3.1.3) La navette créatine kinase.....	75
3.1.4) Métabolisme énergétique dans le cœur.....	76
3.2) La mort cellulaire .....	78
3.2.1) Voie mitochondriale de l'apoptose.....	78
3.2.2) Voie mitochondriale de la nécrose. ....	80
3.2.3) Mort cellulaire mitochondriale dans le cœur.....	82
<b>III) Le stress oxydant .....</b>	<b>84</b>
3) <i>Définition</i> .....	84
4) <i>Principales sources de production des ROS</i> .....	86
2.1) La chaîne respiratoire mitochondriale .....	86
2.1.1) Le complexe I .....	87
2.1.2) Le complexe II .....	87
2.1.3) Le complexe III.....	88
2.2) Les NADPH oxydases .....	89
2.3) Les xanthines oxydoréductases .....	92
2.4) Les NO synthases.....	93
2.5) Autres sources de ROS .....	95
3) <i>Systèmes anti-oxydants</i> .....	96
3.1) Principaux systèmes de défense enzymatiques.....	96
3.1.1) Les superoxydes dismutases .....	96
3.1.2) La catalase .....	97
3.1.3) Les peroxyrédoxines .....	97
3.1.4) Les glutathion peroxydases .....	99
3.2) Principaux systèmes de défense non enzymatiques.....	100
3.2.1) Le glutathion et les composés à groupements thiols .....	100

3.2.2) La vitamine C .....	101
3.2.3) La vitamine E.....	101
3.2.4) Autres systèmes de défense non enzymatiques .....	102
4) <i>Le stress oxydant dans le coeur</i> .....	103
<b>IV) La superoxyde dismutase 2.....</b>	<b>107</b>
1) <i>Structure et fonction</i> .....	107
1.1) Le gène sod2 .....	107
1.2) La protéine SOD2 .....	107
1.3) Mécanisme d'action de SOD2 .....	109
1.4) Rôle de SOD2 dans le coeur .....	110
2) <i>Régulation transcriptionnelle</i> .....	111
3) <i>Modifications post-traductionnelles</i> .....	113
3.1) La phosphorylation .....	113
3.1.1) Généralités .....	113
3.1.2) Mécanismes et acteurs impliqués.....	114
3.1.3) Rôle de la phosphorylation dans le cœur .....	115
3.1.4) Phosphorylation de SOD2.....	115
3.2) L'acétylation .....	116
3.2.1) Généralités .....	116
3.2.2) L'acétylation N-terminale .....	117
3.2.3) L'acétylation des résidus lysine .....	117
3.2.4) L'acétylation non enzymatique.....	121
3.2.5) Rôle de l'acétylation dans le cœur .....	121
3.2.6) Acétylation de SOD2 .....	124
<b>Objectifs .....</b>	<b>125</b>
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>130</b>
<b>I) Modèles animaux .....</b>	<b>137</b>
1) <i>VG de rats IC</i> .....	137
2) <i>Souris SIRT1 KO</i> .....	138
3) <i>Souris SIRT3 KO</i> .....	138
<b>II) Culture cellulaire .....</b>	<b>139</b>
1) <i>Modèles cellulaires</i> .....	139
1.1) Culture primaire de cardiomyocytes de rats néonataux.....	139
1.2) Culture primaire de cardiomyocytes de rats adultes .....	140



2) Traitements pharmacologiques.....	141
2.1) Stimulation pro-hypertrophique à l'isoprénaline .....	141
2.2) Traitements anti-oxydants.....	142
2.2.1) Traitement au EUK 134.....	142
2.2.2) Traitement à la MitoQuinone .....	143
3) Transfection des cellules.....	144
3.1) Transfection de siRNA .....	144
3.2) Transfection de plasmides.....	145
4) Analyse cellulaire en temps réel .....	145
5) Mesure de la respiration par la technique d'oxygraphie .....	146
<b>III) Analyses biochimiques .....</b>	<b>146</b>
1) Extractions protéiques .....	146
2) Fractionnement cytoplasme-noyaux .....	147
3) Fractionnement cytoplasme-mitochondries.....	148
4) Dosage de protéines.....	148
5) Western blot .....	149
5.1) Electrophorèse SDS-PAGE .....	149
5.2) Transfert des protéines sur membrane .....	150
5.3) Immunodétection .....	151
5.4) Révélation et quantification du signal obtenu.....	152
<b>IV) Mesure de la production de ROS.....</b>	<b>153</b>
1) Fluorométrie .....	153
2) Marquage par la sonde MitoSOX.....	153
<b>V) Mesure du potentiel membranaire mitochondrial.....</b>	<b>154</b>
<b>VI) Marquages fluorescents .....</b>	<b>154</b>
1) Marquage des mitochondries .....	154
2) Immunofluorescence.....	155
2.1) Fixation de l'échantillon .....	155
2.2) Perméabilisation.....	155
2.3) Incubation des Ac .....	155
2.4) Microscopie de fluorescence.....	156
3) « Proximity Ligation Assay ».....	156
<b>V) Analyses statistiques .....</b>	<b>158</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>152</b>

<b>Partie 1 : Etude et identification des acteurs moléculaires impliqués dans la régulation de l'acétylation de SOD2 dans le cœur. ....</b>	<b>154</b>
<b>I) Données préliminaires.....</b>	<b>163</b>
<b>II) Résultats.....</b>	<b>165</b>
1) <i>Impact du traitement à l'isoprénaline dans les NCM. ....</i>	165
2) <i>Caractérisation du stress oxydant et des enzymes anti-oxydantes dans les NCM hypertrophiés.....</i>	167
3) <i>Etude du rôle des désacétylases SIRT1, 3 et 6 dans la régulation de l'activité de SOD2. ....</i>	171
3.1) <i>Expression des SIRT1, 3 et 6 dans les NCM. ....</i>	171
3.2) <i>Localisation subcellulaire des SIRT et de SOD2 dans les NCM.....</i>	172
3.3) <i>Impact de l'inhibition de l'expression de SIRT1 dans les NCM. ....</i>	175
3.4) <i>Impact de l'inhibition de l'expression de SIRT6 dans les NCM. ....</i>	176
4) <i>Rôle de SIRT3 dans la régulation de l'acétylation de SOD2, du stress oxydant et de l'hypertrophie in vitro dans les NCM. ....</i>	177
4.1) <i>Impact de l'inhibition de l'expression de SIRT3 dans les NCM traités à l'isoprénaline. ....</i>	178
4.2) <i>Impact de la surexpression de SIRT3 dans les NCM traités à l'isoprénaline.....</i>	180
5) <i>Etude de l'implication des SIRT dans la désacétylation de SOD2 in vivo dans le cœur. ....</i>	183
5.1) <i>Impact de la délétion de SIRT3 in vivo dans les cardiomyocytes isolés de souris SIRT3 KO. ....</i>	183
5.2) <i>Impact de la délétion cardiaque spécifique de SIRT1 dans le cœur de souris SIRT1 KO. ....</i>	184
5.3) <i>Caractérisation de la régulation de l'acétylation de SOD2 et du stress oxydant in vivo dans un modèle expérimental de rats IC. ....</i>	185
6) <i>Caractérisation du rôle de l'acetyl transferase P300 dans la régulation de l'acétylation de SOD2 ....</i>	187
<b>III) Conclusions .....</b>	<b>191</b>
<b>Partie 2 : Etude de l'impact des traitements anti-oxydants EUK 134 et MitoQuinone dans le cœur .....</b>	<b>186</b>
<b>I) Données préliminaires.....</b>	<b>195</b>
<b>II) Résultats.....</b>	<b>196</b>
1) <i>Etude de l'impact du traitement anti-oxydant MitoQ dans le cœur.....</i>	196
1.1) <i>Impact du prétraitement à la MitoQ sur le stress oxydant dans les NCM traitées à l'isoprénaline. ....</i>	196

## Sommaire

1.2) Impact du prétraitement à la MitoQ sur le métabolisme mitochondrial dans les NCM traités à l'isoprénaline. ....	199
2) <i>Etude de l'impact du traitement anti-oxydant EUK 134 dans le cœur.</i> .....	202
2.1) Etude des effets préventifs du EUK 134 dans les NCM. ....	202
2.1.1) Impact du prétraitement au EUK 134 sur le stress oxydant dans les NCM traités à l'isoprénaline. ....	202
2.2.2) Impact du prétraitement au EUK 134 sur le métabolisme mitochondrial dans les NCM traités à l'isoprénaline. ....	204
2.2) Etude des effets préventifs du EUK 134 dans les ACM. ....	207
2.3) Etude des effets thérapeutiques du EUK 134 dans les NCM. ....	209
2.4) Etude de l'impact du traitement au EUK 134 chez les rats IC. ....	210
<b>III) Conclusions</b> .....	<b>212</b>
<b>Discussion et perspectives</b> .....	<b>208</b>
<b>I) La protéine SOD2, une nouvelle cible dans la prise en charge du stress oxydant pathologique ?</b> .....	<b>217</b>
<b>II) L'utilisation des molécules anti-oxydantes comme perspective thérapeutique.</b> .....	<b>223</b>
<b>III) Conclusion générale</b> .....	<b>227</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>220</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>231</b>

# *Abréviations*



## Abréviations

°C : degré Celsius  
•O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anion superoxyde  
•OH : radical hydroxyl  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub> : oxygène singulet  
% : pour cent  
α-KG : alpha cétooglutarate  
μg : microgramme  
μL : microlitre  
μM : micromolaire  
I<sub>F</sub> : *flavine site of complex I*  
II<sub>F</sub> : *flavine site of complex II*  
I<sub>Q</sub> : *ubiquinone reducing site of complex I*  
AA : acide aminé  
Ac : anticorps  
Ac I : anticorps primaire  
Ac II : anticorps secondaire  
ACE : *angiotensine conversion enzyme*  
ACM : *adult cardiomyocytes*  
Acetyl CoA : acetyl coenzyme A  
AG : acide gras  
Ang : angiotensine  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADP : adénosine diphosphate  
AMPK : *AMP-activated kinase*  
ANP : *atrial natriuretic peptide*  
AP-1/2 : *activator protein 1/2*  
ARN : acide ribonucléique  
Aso : aspartate  
ATP : adénosine triphosphate  
AWT ED : *anterior wall thickness end-diastolic*  
AWT ES : *anterior wall thickness end-systolic*  
Bcl-x1 : *B cell lymphoma extra large*  
Bcl2 : *B cell lymphoma 2*  
BH<sub>4</sub> : tétrahydrobioptérine  
BNIP3 : *Bcl2 interacting protein 3*  
BNP : *brain natriuretic peptide*  
bpm : battements par minute  
BSA : *bovine serum albumin*  
C/EBP : *CCAAT/enhancer binding protein*  
CaCl<sub>2</sub> : chlorure de calcium  
CaM KII : *calmoduline dependant kinase II*  
Cdk1/4 : *cyclin dependant kinase 1/4*  
cm : centimètres  
CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone  
CoA : coenzyme A  
CoQ : coenzyme Q  
CK-MB : créatine kinase MB

## Abréviations

CK2 : caséine kinase 2  
Cl<sup>-</sup> : ion chlorure  
CRP : *C reactive protein*  
cTn : troponines cardiaques  
Cys : cystéine  
CyD : cyclophilline D  
DAMPS : *danger associated molecular patterns*  
DMEM : *Dulbecco's minimum essential medium*  
DRP1 : *dynamin-related protein 1*  
DUOX : *dual oxidase*  
e<sup>-</sup> : électron  
ECG : électrocardiogramme  
EDTA : éthylène diamine tétraacétique  
ERR : *estrogenes related receptor*  
ESCO1/2 : *establishment of sister chromatin N-acetyl transferase 1/2*  
FAD : flavine adénine dinucléotide  
Fe<sup>2+</sup> : ion fer II  
Fe<sup>3+</sup> : ion fer III  
FET : *forward electron transport*  
FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche  
FIS1 : *mitochondrial fission protein 1*  
FMN : flavine mononulcéotide  
FOXO3a : *forkhead box O3a*  
FS : *fractional shortening*  
FUNDCl : *FUN14 domain containing 1*  
GCN5L1 : *general control of amino acid synthesis like 1*  
GDP : guanosine diphosphate  
GPCR : *G protein coupled receptor*  
GPX : glutathion peroxydase  
GR : glutathione réductase  
GRK : GPCR kinase  
S• : radical thyl  
GSH : glutathione  
GSK3β : *glycogen synthase kinase 3 bêta*  
GSSG : glutathione disulfure  
GTP : guanosine triphosphate  
h : heure  
H<sup>+</sup> : proton  
H<sub>2</sub>O : eau  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène  
HAS : Haute Autorité de Santé  
HDAC : histone désacétylase  
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine ethane sulfonique  
HIF-1 : *hypoxia induced factor 1*  
His : histidine  
HMGB1 : *high mobility group box 1*  
HOCl : acide hypochloreux  
HSP : *heat shock protein*  
HR : *heptad repeat*  
IDM : infarctus du myocarde

## Abréviations

IF : immunofluorescence  
IL-1 $\alpha$  : interleukine 1 $\alpha$   
IM : *inner membrane*  
IMS : *intermembrane space*  
INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale  
IRM : imagerie par résonance magnétique  
Iso : isoprénaline  
ISP : *iron sulphur protein*  
KAT : lysine acetyltransferase  
KCl : chlorure de potassium  
KDAC : lysine deacetylases  
kg : kilogramme  
L-OPA1 : *long optic atrophy 1*  
LC3 : *microtubule-associated protein 1A/1A light chain 3*  
LDIR : *low dose ionizing radiations*  
LDL : *low density lipoprotein*  
lncRNA : *long non coding ribonucleo-acids*  
LVEDD : *left ventricle end-diastolic diameter*  
LVESD : *left ventricle end-systolic diameter*  
M199 : medium 199  
MEC : matrice extracellulaire  
MEF : *myocyte enhancement factor*  
MEM : *minimum essential medium*  
MFF : *mitochondrial fission factor*  
Mfn : mitofusine  
mg : milligramme  
MgSO<sub>4</sub> : sulfate de magnésium  
MHC : *myosin heavy chain*  
MIA : *mitochondrial intermembrane space assembly*  
MiD49 : *mitochondrial dynamic protein of 49 kDa*  
MiD51 : *mitochondrial dynamic protein of 51 kDa*  
MIM : *mitochondrial import complex*  
min : minutes  
miR : *micro ribonucleic acid*  
MitoQ : mitoquinone  
mL : millilitre  
mm : millimètre  
mM : millimolaire  
MMP : *matrix metalloproteinase*  
Mn : manganèse  
Mo-Co : molybdopétrin  
MOM : *mitochondrial outer membrane*  
MPO : myéloperoxydases  
MPP : *matrice processing peptidase*  
mV : millivolt  
N : azote  
NaCl : chlorure de sodium  
NAD : nicotinamide adenine dinucléotide  
NAT : N-ter acetyltransferase  
NCM : *neonatal cardiomyocytes*



## Abréviations

NF1 : *nuclear factor 1*  
NF-κB : *nuclear factor Kb*  
NFAT : *nuclear factor of activated T cells*  
nm : nanomètre  
NO : oxyde nitrique  
NOS : NO synthase  
NOS1 ou nNOS : NO synthase neuronale  
NOS2 ou iNOS : NO synthase inductible  
NOS3 ou eNOS : NO synthase endothéliale  
NOX : NADPH oxydase  
NPM : *nucleophosphomin*  
NT-proBNP : *N-terminal pro brain natriuretic peptide*  
Nrf : *nuclear respiratory factor*  
NYHA : *New York Heart Association*  
O : oxygène  
O<sub>2</sub> : dioxygène  
OD : oreillette droite  
OG : oreillette gauche  
OH : anion hydroxyle  
OM : *outer membrane*  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
ONOO<sup>-</sup> : peroxydinitrite  
ONOOH : acide peroxydinitreux  
OPA1 : *optic atrophy 1*  
P/S: penicilline/streptomycine  
p53: *tumor protein*  
PAM: *presequence associated motor*  
PBS : *phosphate buffer saline*  
PE : phényléphrine  
PGAM5: *PGAM family member 5*  
PI3K: phosphoinositide-3-kinase  
PGC1-α : *proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*  
Pi : phosphate inositol  
PINK1 : *PTEN induced kinase 1*  
PKA : protéine kinase A  
PKC : protéine kinase C  
PLA : *proximity ligation assay*  
PLC : phospholipase C  
POLDIP2 : *polymerase δ-interacting protein 2*  
PPAR : *peroxisome proliferator activated receptor*  
PREP : *presequence peptidase*  
Prx : peroxyredoxines  
PWT ED : *posterior wall thickness end-diastolic*  
PWT ES : *posterior wall thickness end-systolic*  
QH<sub>2</sub> : ubiquinol  
RET : *reverse electron transport*  
REVE : REmodelageVentriculaire  
ROS : *reactive oxygen species*  
rpm : rotations par minute  
RT : *room temperature*

## Abréviations

RTCA : *real time cell analysis*  
RVG : remodelage ventriculaire gauche  
RXR : *retinoid X receptor*  
S-OPA : *short optic atrophy 1*  
SAM : *sorting and assembly machinery*  
Ser : serine  
siRNA : *silencing ribonucleic acid*  
SIRT : sirtuine  
SOD : superoxyde dismutase  
SOD2 Ac K68 : forme acétylée de SOD2 en lysine 68  
SOD2 Ac K122 : forme acétylée de SOD2 en lysine 122  
Sp1 : *specificity protein 1*  
SQ : semiquinone  
STAT3 : *signal transducer and activator of protein 3*  
SV : *stroke volume*  
SVF : sérum de veau fœtal  
TAT1 :  *$\alpha$ -tubulin N-acetyltransferase 1*  
Tg : transgénique  
TGF- $\beta$  : *tumor growth factor  $\beta$*   
Thr : thréonine  
TIM : *translocase of the inner membrane*  
TIMP : *tissue inhibitor of metalloproteinase*  
TLR : *toll-like receptor*  
TNF- $\alpha$  : *tumor necrosis factor  $\alpha$*   
TnT : troponine T  
TOM : *translocase of the outer membrane*  
Tyr : tyrosine  
VD : ventricule droit  
VG : ventricule gauche  
VTI : *velocity-time integral*  
XDH : xanthine déshydrogénase  
XOD : xanthine oxydase



# *Introduction*



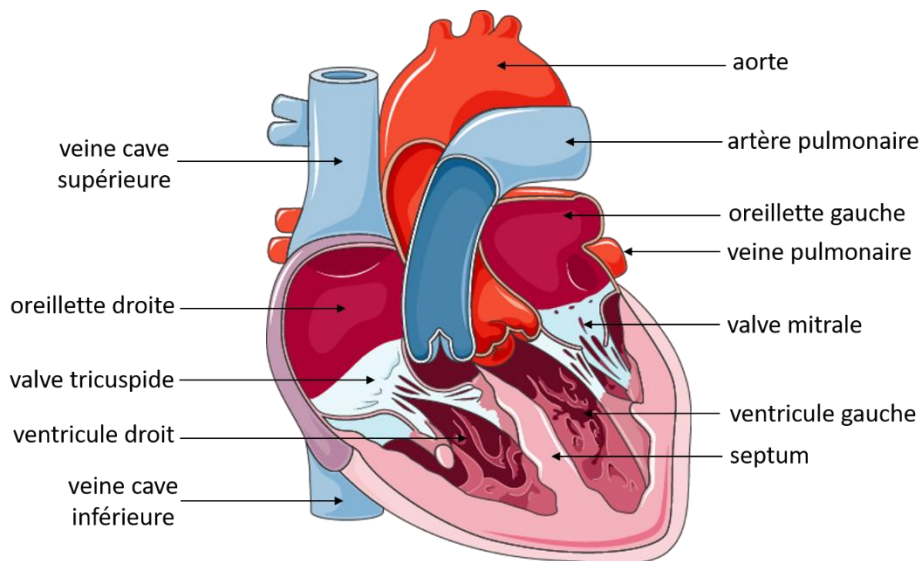
## I) Physiopathologie du cœur

### 1) Le cœur sain

#### 1.1) Anatomie et histologie

Le cœur est un organe musculaire creux situé au sein du thorax, entre les deux poumons. La pompe cardiaque assure les besoins en oxygène de l'organisme en éjectant le sang vers les vaisseaux sanguins et permet d'éliminer les déchets métaboliques tels que le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>).

Au niveau anatomique, le cœur est divisé en deux parties, le cœur droit et le cœur gauche, par une paroi épaisse appelée septum. Chaque partie est divisée en deux cavités, l'oreillette et le ventricule, elles-mêmes liées par une valve : la valve mitrale du côté gauche et la valve tricuspide à droite (Figure 1).



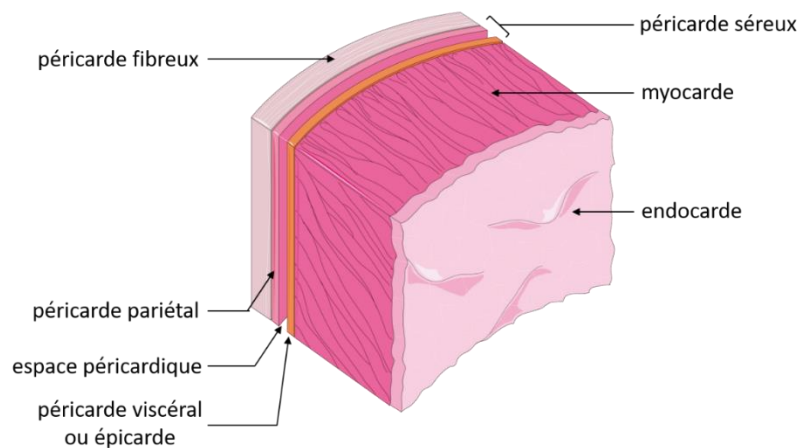
**Figure 1** : Représentation schématique de l'anatomie du cœur.

Le sang appauvri en oxygène arrive dans le cœur dans l'oreillette droite (OD) par l'intermédiaire des veines caves supérieures et inférieures, puis il est éjecté dans le ventricule droit (VD) et dirigé vers les poumons par l'intermédiaire des artères pulmonaires. Par passage dans les poumons, le sang sera oxygéné et déchargé en CO<sub>2</sub>, puis il sera dirigé vers l'oreillette gauche (OG) par les veines pulmonaires. Il sera ensuite conduit dans le ventricule gauche (VG) puis il sera dirigé vers tout l'organisme en passant par l'aorte. L'approvisionnement du cœur

lui-même en sang oxygéné est assuré par les artères coronaires, alimentées par l'aorte. Bien que totalement symétriques, le cœur gauche est plus volumineux et plus puissant car assurant l'oxygénation de l'ensemble de l'organisme.

La séparation du sang oxygéné et du sang non oxygéné est assurée par le septum. De plus, les valves auriculo-ventriculaires (mitrales et tricuspides), situées entre les ventricules et les oreillettes, ainsi que les valves sigmoïdes (pulmonaires et aortiques), situées à la sortie des ventricules, empêchent le reflux de sang et assurent une circulation unidirectionnelle.

Au niveau histologique, la paroi cardiaque est composée de trois tuniques : le péricarde, le myocarde et l'endocarde, possédant chacune leur fonction propre (Figure 2).



**Figure 2** : Représentation schématique des trois tuniques cardiaques.

Le péricarde est une paroi mince constituant la tunique externe du cœur. Il est constitué de deux parties : une partie superficielle, le péricarde fibreux ainsi qu'une partie profonde, le péricarde séreux. Le péricarde fibreux est un tissu conjonctif enveloppant le péricarde séreux et reliant le cœur aux organes avoisinants tels que les poumons. Le péricarde séreux est lui-même formé de deux feuillets : le péricarde viscéral également appelé épicarde, en contact avec le myocarde, et le péricarde pariétal. Entre ces deux feuillets se trouve un espace péricardique qui consiste en une cavité virtuelle contenant 50 à 75 mL de liquide, permettant de faciliter les mouvements du cœur.

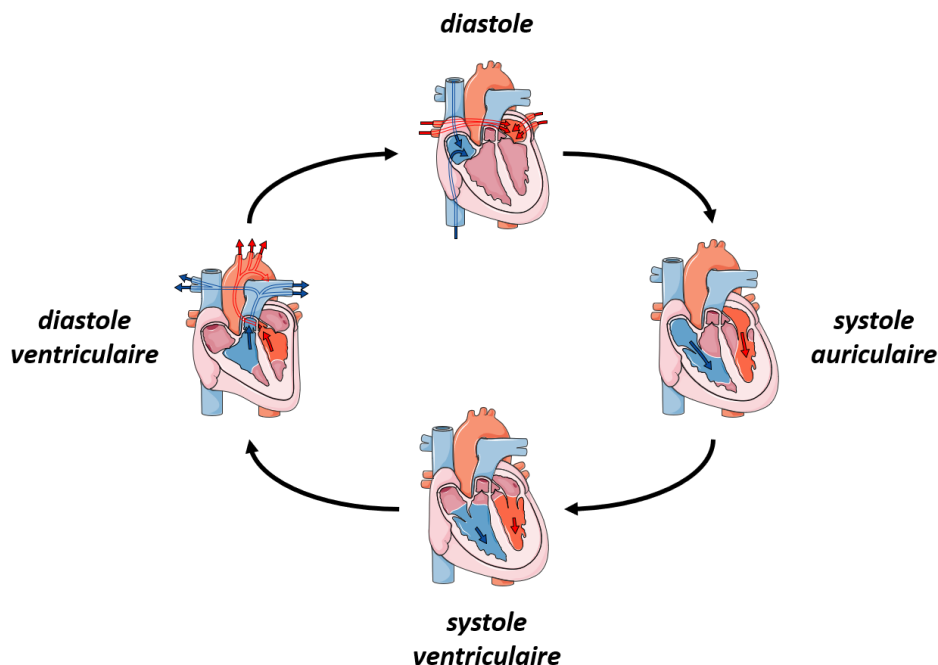
Le myocarde constitue la partie musculaire du cœur. Il est composé d'un muscle strié, sensible aux stimulations hormonales et neuronales et possédant la capacité de se contracter de manière autonome et régulière. Ce muscle strié est composé de 30 à 40% de cellules musculaires striées cardiaques appelées cardiomyocytes, qui représentent 70 à 80% du volume

du cœur (Brutsaert 2003; P. Zhou and Pu 2016). Par ailleurs, le myocarde est également formé de cellules non cardiomyocytaires dont plus de 60% de cellules endothéliales, de cellules mésenchymateuses telles que les fibroblastes (moins de 20%) ou les cellules musculaires lisses (6%) et environ 10% de cellules immunitaires (Pinto et al. 2016). Le contenu en cardiomyocytes reste constant avec l'âge chez l'Homme. Cependant, le nombre de cellules endothéliales et mésenchymateuses augmente avec l'âge (Bergmann et al. 2015).

Enfin, l'endocarde constitue la tunique interne du cœur tapissant la face interne des ventricules et oreillettes. Il est principalement composé de cellules endothéliales tapissant les parois internes du cœur et les vaisseaux et impliquées dans la régulation de la contraction cardiaque par activation hormonale endocrine des cardiomyocytes. Elles sont séparées du myocarde par une couche sous-endocardique composée de tissu conjonctif, de cellules nodales et de cellules cardionectrices de Purkinje.

### 1.2) La révolution cardiaque

La révolution cardiaque, ou cycle cardiaque, consiste en l'ensemble des évènements permettant le fonctionnement du cœur et se décrit selon trois phases : la systole auriculaire, la systole ventriculaire et la diastole ventriculaire (Figure 3).



**Figure 3** : Représentation schématique de la révolution cardiaque.



Le cycle cardiaque débute par le remplissage des oreillettes droite et gauche respectivement par les veines caves et pulmonaires, puis les oreillettes se contractent et éjectent le sang vers les ventricules droit et gauche à travers les valves auriculo-ventriculaires lors de la systole auriculaire.

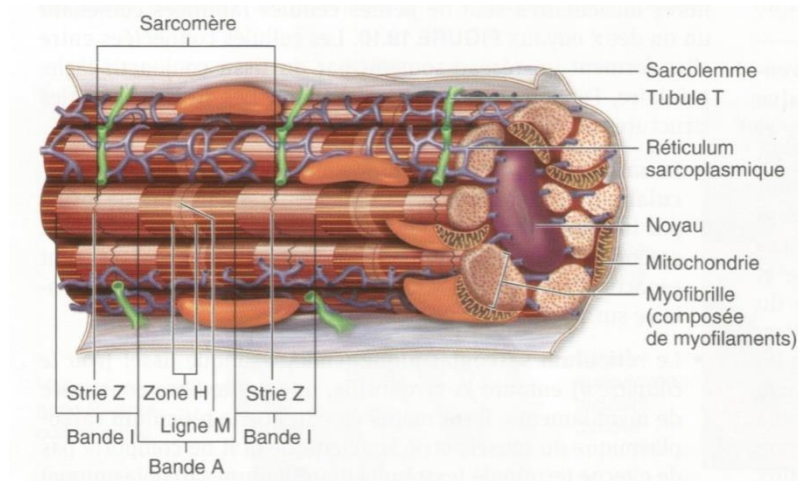
Les ventricules se contractent ensuite lors de la systole ventriculaire, permettant d'éjecter le sang vers les poumons par l'artère pulmonaire dans le VD ainsi que vers les organes par l'aorte dans le VG. La systole ventriculaire se déroule en deux phases. La première est la contraction isovolumétrique : elle correspond à la fermeture des valves auriculo-ventriculaires, entraînant une augmentation de la pression intra-ventriculaire et l'ouverture des valves sigmoïdes. La seconde phase correspond à la contraction isotonique, également appelée phase d'éjection. Il s'agit de la contraction des ventricules, permettant l'expulsion du sang vers le système circulatoire. La pression artérielle devient alors supérieure à la pression intra-ventriculaire et les valves sigmoïdes se referment.

Enfin, la diastole permet la relaxation de l'ensemble du cœur. Elle se déroule également en deux étapes. Lors de la relaxation isométrique, la pression auriculaire devient supérieure à la pression intra-ventriculaire, ce qui entraîne l'ouverture des valves auriculo-ventriculaires. Puis les oreillettes se remplissent de sang arrivant par les veines caves et pulmonaires lors de la seconde étape, permettant le déroulement d'un nouveau cycle cardiaque.

### ***1.3) Protéines contractiles***

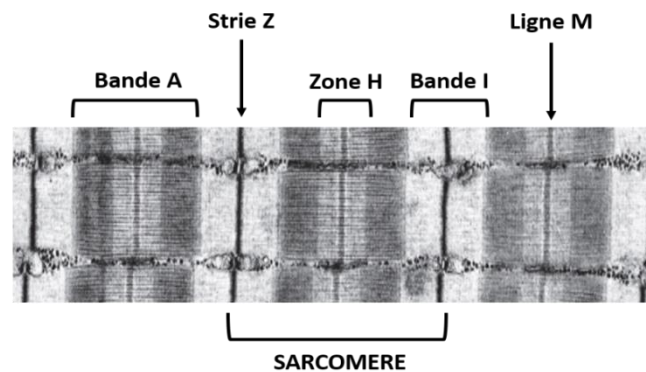
Le tissu musculaire cardiaque se caractérise par sa capacité à se contracter rythmiquement de façon spontanée grâce aux cellules contractiles appelées cardiomyocytes. Ces dernières sont connectées entre elles afin de former un réseau tridimensionnel complexe.

Au niveau structural, les cardiomyocytes sont des cellules de forme cylindriques. Elles sont composées de différentes structures appelées myofibrilles entourées d'une membrane plasmique appelée sarcolemme (Figure 4).



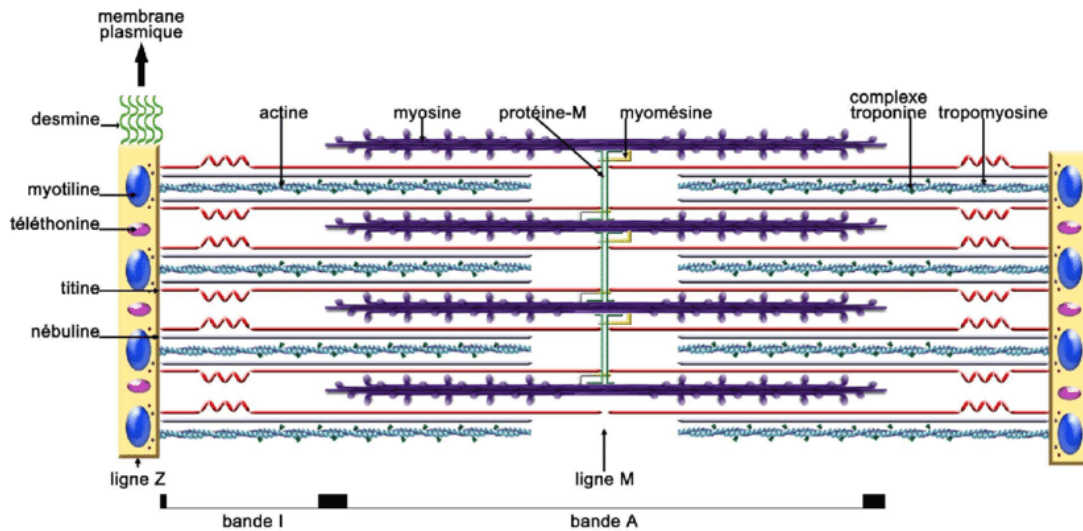
**Figure 4** : Vue longitudinale de la portion d'un cardiomyocyte.

Les myofibrilles sont disposées de manière parallèle dans les cardiomyocytes et s'étendent sur toute la longueur de la cellule. Elles sont formées de la répétition de sarcomères, constituant l'unité de base contractile du myocarde. On distingue différentes bandes à l'intérieur du sarcomère et visibles en microscopie électronique : la bande A (anisotropique), contenant elle-même la zone H (*Hensen*) et la ligne M (*Mittlemembrane*). Les bandes A sont entourées de bandes I (isotropiques) au milieu desquelles se trouve une strie Z (*Zwischenscheibe*). Le sarcomère s'étend entre deux stries Z (Figure 5).



**Figure 5** : Visualisation des sarcomères en microscopie électronique.

La bande A est principalement composée des ponts actine-myosine responsables de la contraction, ainsi que de protéines contractiles interagissant avec l'actine et la myosine telles que la myoméline, les troponines et la tropomyosine (Figure 6).



**Figure 6** : Représentation schématique de la composition protéique du sarcomère.

La bande A se compose des filaments épais formés par la myosine et des filaments fins formés par l'actine, les troponines et les tropomyosines. L'actine est polymérisée sous la forme d'une double hélice sur laquelle viennent se fixer les troponines qui sont impliquées dans la liaison au calcium nécessaire à la contraction cardiaque. La myosine est quant à elle impliquée dans l'hydrolyse de l'ATP indispensable à la contraction musculaire. Il s'agit d'un hexamère formé de deux chaînes lourdes et quatre chaînes légères.

La bande I est formée de l'alpha-actinine, de la desmine, de la protéine C et de la titine. Ces protéines permettent de lier le sarcomère à d'autres structures cellulaires. Ainsi, l'alpha-actinine est reliée à l'actine et aux bandes A tandis que la titine lie les stries Z et la ligne M de la bande A à l'intérieur du sarcomère. La desmine permet quant à elle de lier le sarcomère aux organelles telles que les mitochondries, le noyau ou le réticulum endoplasmique.

La zone H constitue la partie de bande A formée par le filament épais et la ligne M, correspondant à la liaison entre deux filaments épais.

La ligne Z forme enfin la liaison entre les filaments fins.

## 2) L'insuffisance cardiaque

### 2.1) Définition

L'insuffisance cardiaque (IC) se définit comme une incapacité du cœur à jouer son rôle de pompe et à assurer un débit sanguin suffisant pour assurer les besoins métaboliques de l'organisme à l'effort ou au repos (Kemp & Conte, 2012). L'IC est associée à une diminution du nombre et de la fonction des cardiomyocytes faisant suite à divers événements tels qu'un IDM, une hypertension artérielle ou encore un diabète (Kemp & Conte, 2012). Elle est caractérisée par des symptômes typiques tels que l'essoufflement, une tolérance réduite à l'exercice ou une fatigue qui s'accompagnent de signes comme une augmentation de la pression de la veine jugulaire ou des œdèmes périphériques (Ponikowski et al., 2016).

On distingue trois catégories d'IC selon la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) mesurée au moment du diagnostic : l'IC à FEVG préservée (supérieure à 50%), l'IC à FEVG moyenne (entre 40% et 49%) et l'IC à FEVG réduite (inférieure à 40%) (Ponikowski et al., 2016).

L'IC peut également être classée en fonction de sa sévérité en quatre catégories selon la *New York Heart Association* (NYHA) (Table 1).

**Table 1** : Classification de l'IC selon les critères de la NYHA.

Classification	Caractéristiques
<b>Stade I</b>	<i>Pas de symptômes</i> Pas de limitation à l'activité physique ordinaire
<b>Stade II</b>	<i>Symptômes d'IC en cas d'exercice physique important</i> Limitation modeste de l'activité physique - confort au repos - une activité physique ordinaire entraîne de la fatigue, des palpitations et de l'essoufflement
<b>Stade III</b>	<i>Symptômes d'IC en cas d'exercice physique modéré</i> Limitation importante de l'activité physique - confort au repos - une activité physique plus faible que d'ordinaire entraîne de la fatigue, des palpitation et de l'essoufflement
<b>Stade IV</b>	<i>Symptômes d'IC au repos</i> Incapacité de mener une activité physique sans inconfort

L'IC peut enfin être classée selon la zone du myocarde impactée (Kemp & Conte, 2012). D'une part, l'IC peut être associée à une dysfonction du VG qui peut être systolique (avec une altération de la contraction et de l'éjection du ventricule) ou diastolique (avec une altération de la relaxation et du remplissage du ventricule). D'autre part, l'IC peut être associée à une dysfonction du VD, généralement consécutive à une défaillance du VG.

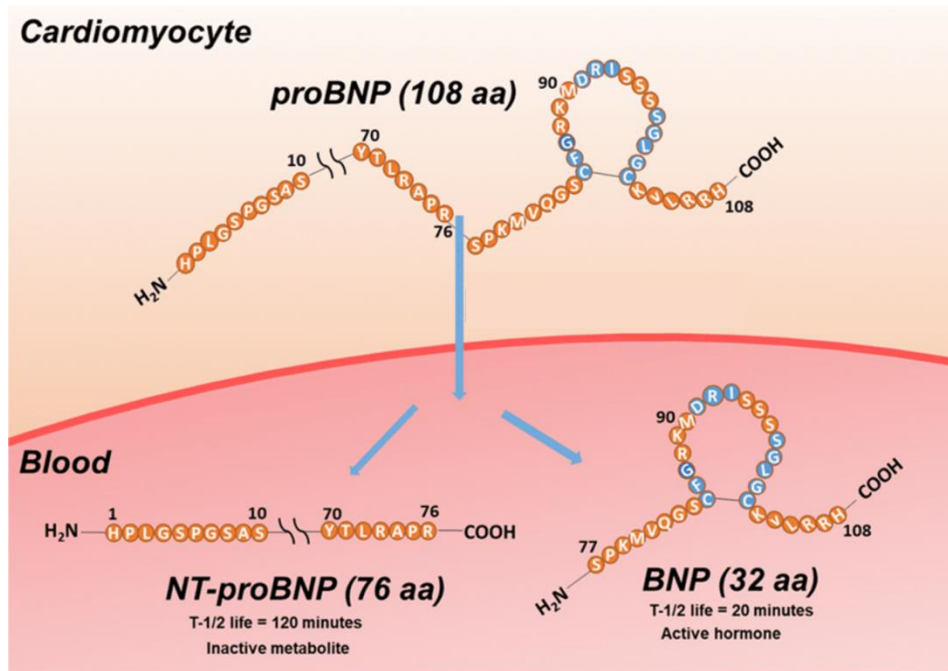
## ***2.2) Dépistage et biomarqueurs***

Les symptômes de l'IC tels que l'essoufflement, la diminution de la tolérance à l'exercice ou encore la fatigue sont similaires à d'autres pathologies cardiovasculaires et ne permettent pas de diagnostiquer l'IC à eux seuls. Certains signes tels que l'élévation de la pression de la veine jugulaire, le reflux hépatojugulaire, le rythme de « galop » ou le déplacement de l'impulsion apicale constituent des symptômes plus spécifiques de l'IC mais sont plus difficiles à détecter et peu reproductibles (Ponikowski et al., 2016).

En pratique clinique, le diagnostic de l'IC repose plus particulièrement sur l'utilisation des techniques d'imageries et le dosage de biomarqueurs circulants.

L'échocardiographie est la technique d'imagerie la plus largement utilisée pour le diagnostic de l'IC. Elle apporte des informations immédiates sur les fonctions systoliques et diastoliques des ventricules, le volume des chambres cardiaques, l'épaisseur de la paroi ventriculaire ou encore l'hypertension pulmonaire. L'échocardiographie constitue une méthode de premier choix et peut être associée à d'autres techniques tel que l'ECG, qui n'est pas suffisant à lui seul pour diagnostiquer une IC mais permet de détecter des irrégularités lors d'un suivi régulier (Ponikowski et al., 2016).

Les principaux biomarqueurs actuellement utilisés sont les peptides natriurétiques BNP (*Brain Natriuretic Peptide*) et NT-proBNP (*N-terminal pro Brain Natriuretic Peptide*). En réponse à un stress, les cardiomyocytes synthétisent le proBNP, un peptide de 108 acides aminés. Ce dernier est clivé en BNP de 32 acides aminés et en NT-proBNP de 76 acides aminés, qui seront tous les deux libérés dans le sang à concentrations équivalentes (Wang et al., 2020) (Figure 7).



**Figure 7 :** Représentation schématique de la biosynthèse du BNP et du NT-proBNP.

Lorsque le BNP est sécrété dans le sang, il interagit avec les récepteurs des protéines natriurétiques et active les cascades de signalisation dépendantes des GPCR ainsi que le système rénine-angiotensine-aldostérone afin de réduire la surcharge de volume ou de pression (Wang et al., 2020).

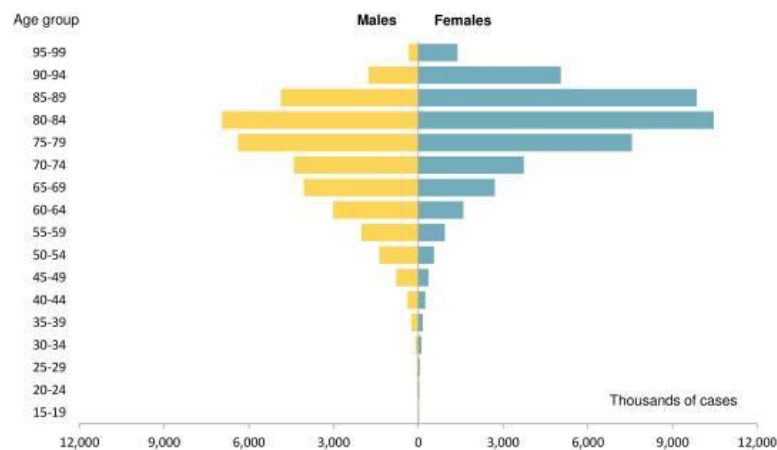
L'expression de ces deux peptides est augmentée chez les patients IC suite aux dysfonctions systoliques et/ou diastoliques. Le dosage du BNP et du NT-proBNP est ainsi recommandé, particulièrement pour les patients dont l'échocardiographie n'a pas montré une anomalie importante (Wang et al., 2020). Cependant, le dosage des peptides natriurétiques ne permet pas le diagnostic d'un IC à lui seul. Une augmentation du taux de BNP est également observée dans d'autres cas comme chez les patients âgés ou chez les patients présentant une insuffisance rénale. De plus, les niveaux de peptides natriurétiques sont particulièrement bas chez les patients obèses (Ponikowski et al., 2016).

De nos jours, la recherche de nouveaux biomarqueurs plus spécifiques et sensibles tels que les microARN (miRNA), les longs ARN non codants (lncRNA) ou encore les protéines impliquées dans la régulation des événements cellulaires associés aux maladies cardiovasculaires comme les désacétylases sirtuines ou les protéines de l'inflammation, constitue un axe de recherche majeur (Wang et al., 2020).

### 2.3) Épidémiologie

De nos jours, l'IC représente un enjeu de santé publique majeure. Sa prévalence est de 1 à 2% de la population adulte dans les pays développés et de plus de 10% des personnes âgées de 70 ans ou plus (Ponikowski et al., 2016). En France, on estime qu'un million de personnes seraient touchées par l'IC et chaque année, près de 150 000 hospitalisations et 70 000 décès seraient liés à l'IC. Cette prévalence est en constante augmentation du fait du vieillissement de la population (Farré et al., 2017).

La prévalence de l'IC est notamment associée à l'âge, au sexe, aux conditions de vie et à la pression sanguine. L'IC touche de manière plus importante les hommes que les femmes avant l'âge de 75 ans, puis la tendance s'inverse après 75 ans (Farré et al., 2017) (Figure 8).

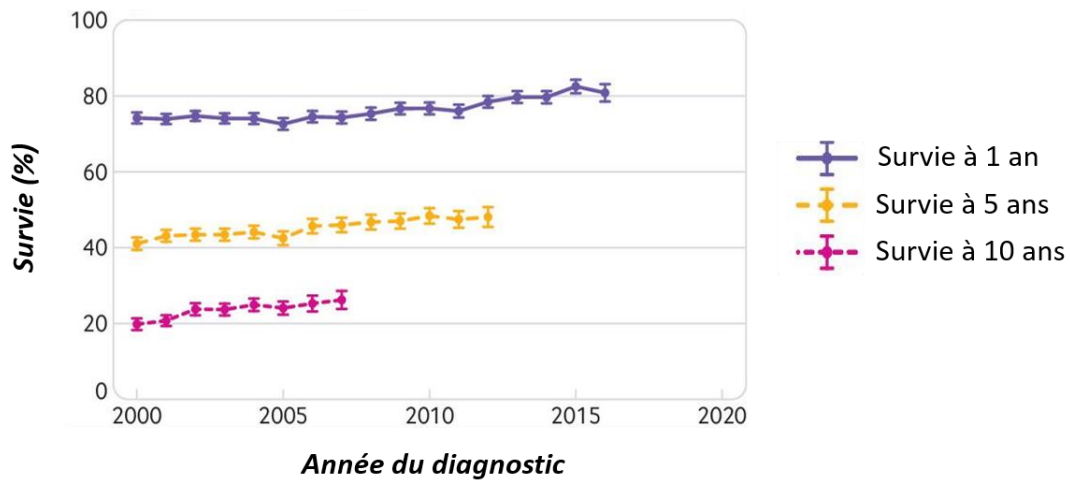


**Figure 8** : Distribution de l'IC selon l'âge et le sexe (Farré et al., 2017).

Cette différence pourrait s'expliquer par des facteurs de risque différents entre les deux sexes et notamment par un rôle cardioprotecteur des œstrogènes chez les femmes pré-ménopausées ou une augmentation de certains facteurs de risque chez les hommes tels que la pression artérielle, les niveaux de CRP (*C reactive protein*) et de NT-proBNP (*N-terminal pro Brain Natriuretic Factor*) (Magnussen et al., 2019).

En dépit d'une meilleure prise en charge des patients, l'IC reste associée à un pronostic faible. Une étude récente a ainsi montré que le taux de survie est de 81% à un an, de 52% à 5 ans et descend à 30% à 10 ans (Taylor et al., 2017) (Figure 9).





**Figure 9 :** Taux de survie à 1, 5 et 10 ans des patients diagnostiqués pour une IC (d'après Taylor et al., 2017).

La survenue de l'IC est associée à de nombreux facteurs de risques similaires à ceux associés aux maladies cardiovasculaires tels que la sédentarité, l'obésité, le diabète, une alimentation trop riche en sel ou l'excès de consommation de boissons alcoolisées.

De plus, de nombreuses pathologies peuvent être à l'origine du développement d'une IC, telles que l'hypertension artérielle, les cardiomyopathies, les maladies des valves cardiaques ou encore l'infarctus du myocarde (IDM). A ce propos, l'IDM constitue le facteur de risque le plus important puisque 30% des patients environ développent une IC dans les 7 à 8 ans après un IDM (Hellermann et al., 2003). De plus, le suivi à long terme des patients des études REVE et REVE-2 a également montré que le risque de développer une IC est toujours fortement associée au RVG malgré l'amélioration des traitements (Bauters et al., 2017). D'autres pathologies telles que l'hypertension artérielle, les cardiomyopathies ou encore les maladies des valves cardiaques sont également associées au risque de développer une IC. Dans le cadre de ce manuscrit, l'IDM en tant qu'origine de l'IC vous sera présenté plus en détails.

### 3) L'infarctus du myocarde

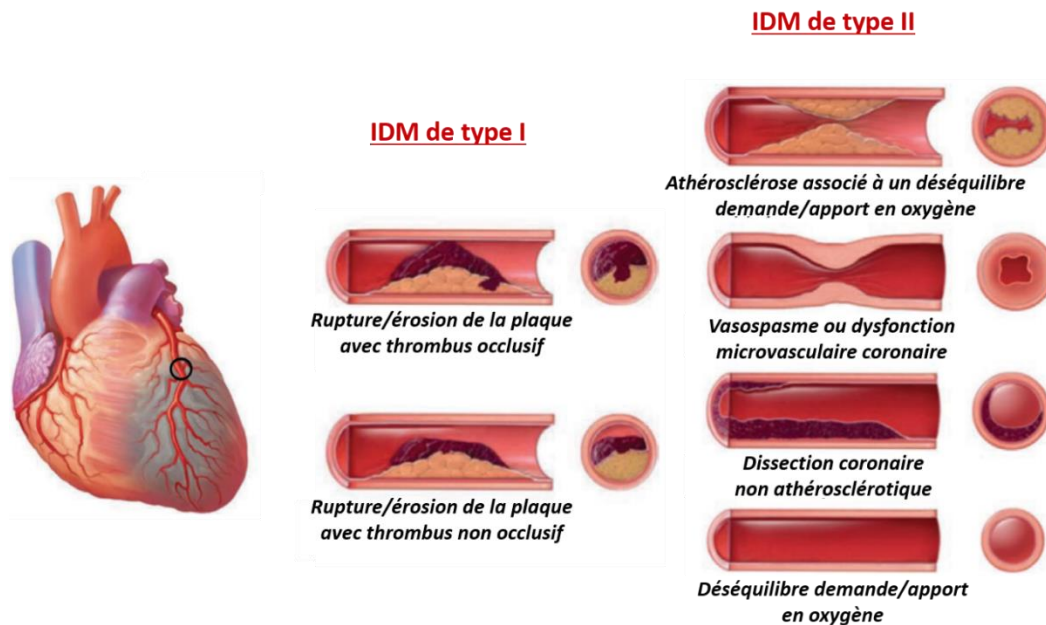
#### 3.1) Définition

L'IDM se définit comme une nécrose plus ou moins importante d'une partie du myocarde consécutive à une ischémie prolongée, correspondant à une diminution de l'apport sanguin en oxygène des artères coronaires qui irriguent le cœur (Mendis et al. 2011; Thygesen et al. 2018). La définition universelle de l'IDM, revue pour la quatrième et dernière fois en



2018, donne plus de précisions sur les critères nécessaires au diagnostic d'un IDM. Ce dernier ne peut être posé que dans le cas de la détection d'une augmentation ou d'une diminution du taux de troponines cardiaques au-dessus du 99<sup>ème</sup> percentile de la limite supérieure de référence, associée au minimum à l'un des critères suivants : un symptôme d'ischémie myocardique (douleur thoracique), des modifications significatives de l'électrocardiogramme suite à l'ischémie, l'apparition d'ondes Q pathologiques, la mise en évidence par imagerie de la perte d'une partie du myocarde viable ou d'une anomalie de la contractilité cohérente avec l'ischémie ou encore l'identification d'un thrombus coronaire par angiographie ou autopsie (Thygesen et al. 2018).

La classification clinique des IDM se divise en trois catégories : les IDM de type I, de type II ou de type III (Thygesen et al. 2018) (Figure 10).



**Figure 10** : Classification de l'IDM selon de l'état des artères coronaires (d'après Thygesen et al. 2018).

L'IDM de type I, qui est le plus répandu, est un IDM dit spontané. Il fait suite à une complication aiguë de l'athérosclérose coronaire. Il s'agit de la rupture ou de l'érosion d'une plaque d'athérome, formée principalement de lipides sous la forme de LDL (*Low Density Lipoproteins*). Ces derniers pénètrent et s'accumulent dans l'intima des artères telles que les artères coronaires. Ils seront alors oxydés et ne pourront plus être dégradés, ce qui entraînera leur accumulation dans les macrophages ainsi qu'une réaction inflammatoire chronique. Les cellules musculaires lisses migrent alors vers l'intima des artères pour former une chape fibreuse dont l'épaisseur est à l'origine de la plaque d'athérome. La formation d'un thrombus

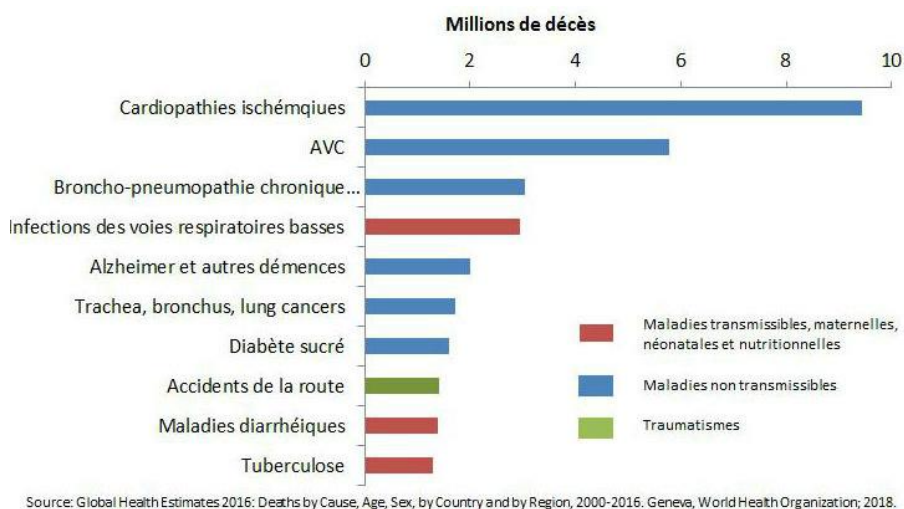
occlusif fait suite à la rupture de la plaque et à la mise en contact du sang circulant avec le sous-endothélium pro-thrombogène et mène ainsi à l'ischémie du myocarde.

L'IDM de type II est un IDM secondaire. Il fait suite à un déséquilibre entre la demande et l'apport en oxygène du cœur. Les origines de ce déséquilibre peuvent être variées, telles qu'une anémie, un saignement gastrointestinal aigu ou encore une tachycardie associée à une ischémie du myocarde.

Enfin, l'IDM de type III est un IDM suivi du décès du patient rapidement après l'apparition des premiers signes tels que la fibrillation ventriculaire ou l'ischémie du myocarde et pour lequel le dosage de biomarqueurs n'a pu être réalisé avant le décès.

### 3.2) Epidémiologie

Selon les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les cardiopathies ischémiques représentent la première cause de mortalité dans le monde devant les accidents vasculaires cérébraux et sont responsables de 9,4 millions de décès dans le monde en 2016 (Figure 11).



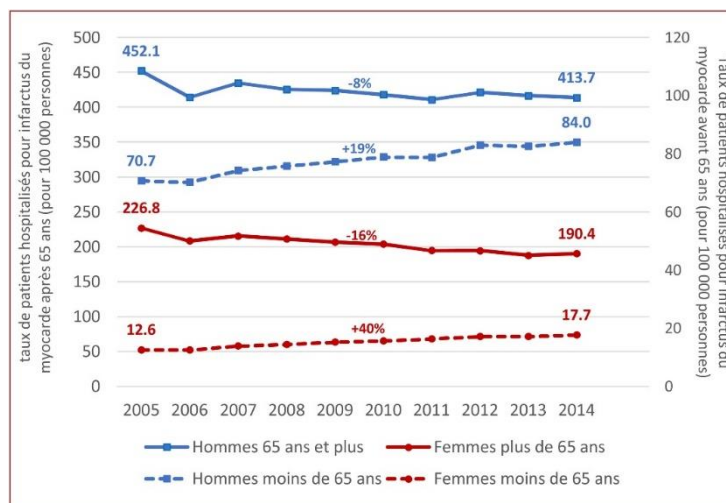
**Figure 11** : Répartition des dix principales causes de décès dans la population mondiale en 2016 (données de l'OMS).

En France, les maladies cardiovasculaires représentent la deuxième cause de décès après les cancers et sont responsables de 150 000 morts par an, soit 400 décès par jour. L'IDM touche en moyenne 80 000 personnes par an en France. Le taux de mortalité associé à l'IDM a diminué au fil des années, passant d'une mortalité à 30 jours de 10,2% en 1995 à 2,1% en 2015 (données de l'INSERM). Cette diminution s'explique par les progrès thérapeutiques mais également par

l'amélioration de la vitesse de prise en charge des patients et de nos jours, la mortalité associée à l'IDM s'explique par le développement de pathologies en découlant telles que les troubles du rythme, le remodelage cardiaque et l'insuffisance cardiaque.

De manière intéressante, les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité chez les femmes et la deuxième cause de mortalité chez les hommes en France. En 2014, 60 701 patients ont été touchés par un IDM dont 19 314 femmes (soit 31,3%) et 41 387 hommes (soit 68,7%) (Gabet et al. 2019). L'âge moyen des patients étaient plus élevé chez les femmes que chez les hommes, respectivement de 74,6 ans et 65,1 ans. De plus, la létalité hospitalière suite à un IDM était environ deux fois plus élevée chez les femmes (10,3%) que chez les hommes (5,3%) (Gabet et al. 2019).

Bien que l'incidence des cardiopathies ischémiques soit inférieure chez les femmes avant la ménopause par comparaison aux hommes, le taux de femmes hospitalisées pour un IDM avant 65 ans a augmenté de manière importante ces dernières années (Figure 12). Cette augmentation s'explique notamment par une exposition plus importante des femmes à certains facteurs de risques dont le tabac, l'obésité et la sédentarité (Gabet et al. 2019).



**Figure 12** : Evolution des patients hospitalisés pour un IDM entre 2005 et 2014 par sexe et classe d'âge en France (d'après Gabet et al. 2019).

### 3.3) Facteurs de risques

Un facteur de risque consiste en une situation majorant le risque de survenue d'une maladie. A l'image de la majorité des maladies cardiovasculaires, l'IDM est une pathologie multifactorielle associée à des facteurs de risque aussi bien génétiques qu'environnementaux.

Ces facteurs de risques, communs aux principales pathologies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose et aux accidents vasculaires cérébraux, sont regroupés sous le terme de facteurs de risques cardiovasculaires (Table 2).

**Table 2** : Les facteurs de risques cardiovasculaires (HAS, 2018).

Facteurs de risque CV	Définition du critère
<b>Âge</b>	Homme $\geq$ 45 ans ; femme $\geq$ 55 ans
<b>Tabagisme</b>	Tabagisme actif ou sevrage inférieur à 1 an
<b>Pré-diabète</b>	Glycémie à jeun $>$ 110 mg/dL ( $>$ 6 mmol/L) et $<$ 126 mg/dL ( $<$ 7 mmol/L) (à jeun depuis au moins 8 heures)
<b>Hypertension artérielle</b>	Pression artérielle (PA) systolique $\geq$ 140 mm Hg et/ou PA diastolique $\geq$ 90 mmHg, confirmée(s) par des mesures réalisées en deux occasions séparées ou par un traitement antihypertenseur
<b>Dyslipidémie</b>	LDL cholestérol $\geq$ 130 mg/dL (3,37 mmol/L) ou HDL $<$ 40 mg/dL (1,04 mmol/L) ou un traitement hypolipidémies Si seul le cholestérol total est disponible $\geq$ 200 mg/dL (5,18 mmol/L)
<b>Obésité</b>	IMC $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup> et/ou périmètre abdominal $>$ 102 cm pour un homme ou $>$ 88 cm pour une femme
<b>Histoire familiale</b>	IDM ; revascularisation coronaire ou mort subite avant 50 ans chez un parent 1 <sup>er</sup> degré
<b>Mode de vie</b>	Physiquement inactif et/ou sédentaire

On distingue notamment les facteurs de risques réversibles des facteurs de risques non réversibles (Mendis et al. 2011).

Les facteurs de risques réversibles sont nombreux et principalement liés à l'environnement. Il s'agit plus particulièrement du tabagisme, de la sédentarité, de l'obésité, du stress, de la consommation excessive d'alcool, de l'hypertension artérielle, des dyslipidémies ou encore du diabète de type II (Dujardin and Cambou 2005). Ces facteurs de risques sont modifiables et représentent 80% du risque de développer une maladie cardiovasculaire, expliquant l'importance des campagnes de prévention pour réduire ces facteurs (Poulter 2003).

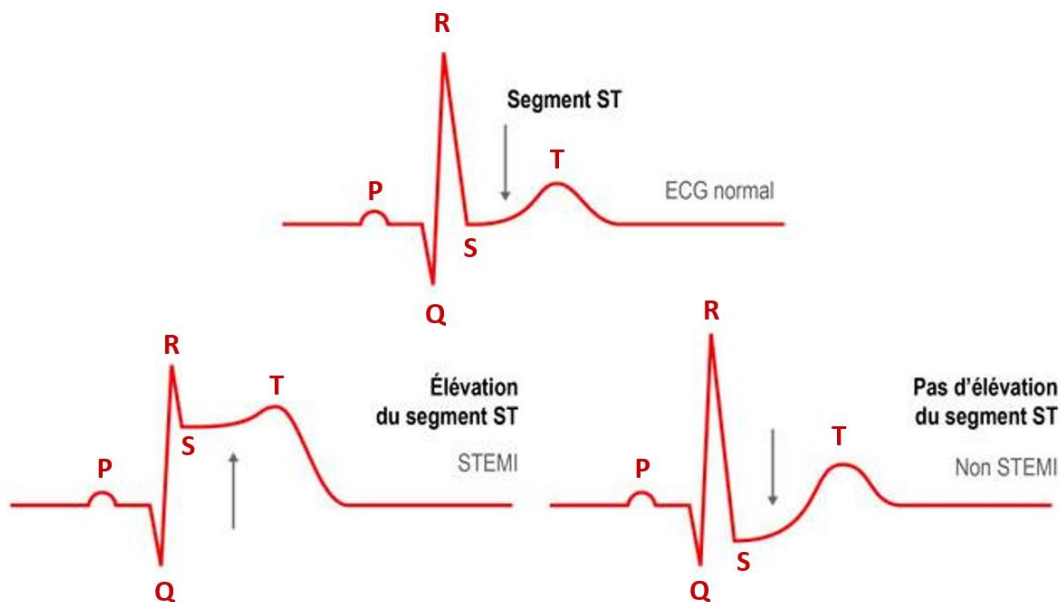
Les facteurs de risques irréversibles comprennent le sexe, l'âge ou l'hérédité cardiovasculaire (Mendis et al. 2011).

### **3.4) Dépistage et biomarqueurs**

Au niveau clinique, l'IDM est associé à plusieurs signes d'alerte tels que l'apparition d'une douleur thoracique irradiant dans le bras gauche, le dos et la mâchoire, pouvant

s'accompagner de vertiges et de nausées. Certains signes annonciateurs sont retrouvés plus fréquemment chez la femme : une fatigue ou faiblesse inattendue, une anxiété, une douleur entre les omoplates ou encore une sensation de compression au niveau de la poitrine.

En pratique, différentes techniques d'imagerie médicale permettent le diagnostic de l'IDM. La plus couramment utilisée est l'électrocardiogramme (ECG), permettant d'évaluer la structure et la fonction cardiaque immédiatement après l'apparition des symptômes (Thygesen et al. 2018). Il permet notamment de mettre en évidence un trouble de la repolarisation de type sus-décalage du segment ST associé à un IDM dit STEMI pour lequel l'artère coronaire est totalement obstruée, différent de l'IDM dit non STEMI, pour lequel l'artère coronaire n'est que partiellement obstruée et ne présentant pas de sus-décalage du segment ST en ECG (Figure 13).



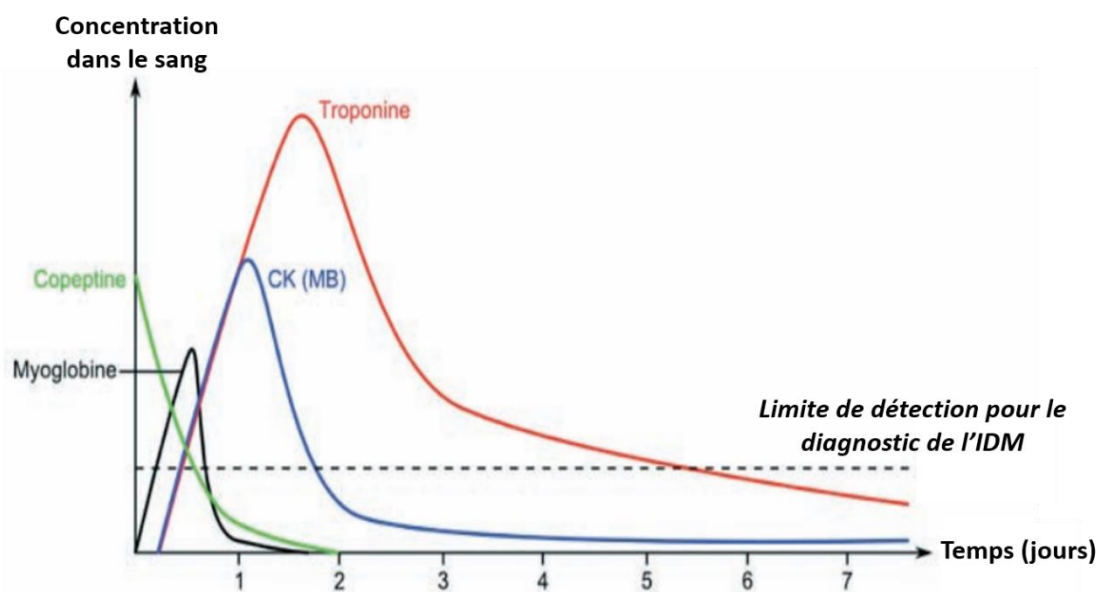
**Figure 13** : Troubles de l'ECG observés lors de l'IDM.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) peut également être utilisée mais ne l'est que rarement car il s'agit d'une technique coûteuse qui n'est pas disponible dans tous les centres hospitaliers.

L'utilisation des techniques d'imagerie n'est cependant pas toujours suffisante à elle seule, notamment chez les patients peu échogènes, et le dosage de biomarqueurs s'avère alors nécessaire. De nos jours, les principaux biomarqueurs utilisés pour le diagnostic de l'IDM sont les troponines cardiaques (cTn), l'isoforme cardiaque de la créatine kinase (CK-MB) et la

myoglobine, qui sont produits lors de la nécrose des cardiomyocytes et reflètent donc la souffrance du myocarde (Reddy, Khaliq, and Henning 2015; Thygesen et al. 2018).

En pratique clinique, les cTn constituent un marqueur de choix pour la détection de l'IDM, le dosage de la myoglobine et de la CK-MB étant considéré comme moins spécifique et moins sensible (Thygesen et al. 2018; Wang et al. 2020). On distingue trois isoformes particulières des cTn : les isoformes cTnT et cTnI sont exclusivement exprimés dans le muscle cardiaque tandis que l'isoforme cTnC est également exprimé dans le muscle squelettique. Les cTn présentent également l'avantage d'être détectables plus longtemps (jusqu'à 6 jours) dans le plasma des patients (Figure 14).



**Figure 14** : Cinétique des marqueurs sanguins d'ischémie.

Cependant, bien que le dosage des cTn soit aujourd'hui considéré comme le plus spécifique et le plus sensible des marqueurs de l'IDM et présente l'avantage d'être proportionnel à la taille de la zone infarctée, ils ne sont pas détectables de manière précoce (Park et al. 2017). La recherche de nouveaux biomarqueurs précoces, pouvant être utilisés de manière complémentaire à l'ECG et permettant un meilleur diagnostic et une meilleure stratification des risques s'avère donc nécessaire (Wang et al. 2020).



## 4) Le remodelage ventriculaire gauche

### 4.1) Définition

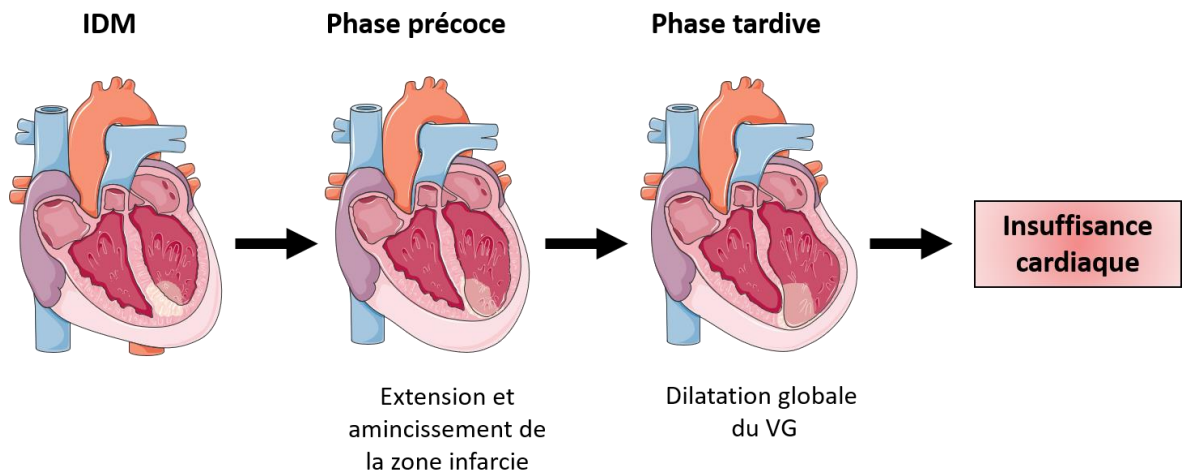
Le remodelage désigne une dynamique biologique qui se développe au sein d'un tissu ou d'un organe et qui conduit à des modifications de sa fonction à travers des mécanismes adaptatifs (Gaertner et al. 2004).

En conditions physiologiques, un remodelage cardiaque est observé chez les sportifs de haut niveau et chez les femmes enceintes. Dans ces cas, le remodelage assure une augmentation du travail cardiaque permettant de répondre aux besoins croissants de l'organisme en oxygène et permettant l'augmentation de la perfusion des organes nécessaire dans ces conditions (Sainte-Marie et al. 2015; Schüttler et al. 2019). Le remodelage constitue dans ce cas une réponse adaptative du cœur et exerce une fonction compensatoire, permettant de maintenir une fonction cardiaque normale.

Suite à un stress ou stimuli pathophysiologique tels que l'hypertension artérielle, l'ischémie reperfusion, ou encore l'IDM, le remodelage constitue dans un premier une adaptation permettant le maintien de la fonction cardiaque mais devient à terme délétère et mène à des dysfonctions progressives et irréversibles du cœur (Sainte-Marie et al. 2015). Le remodelage cardiaque est alors étroitement lié à l'IC.

Particulièrement, le remodelage ventriculaire gauche (RVG) post-IDM consiste en des modifications de structure et de fonction du VG du cœur en réponse à l'amputation d'une partie de ses capacités contractiles induite par l'IDM (Tham et al. 2015). Le RVG débute très précocement suite à la phase aiguë de l'IDM. Il s'agit d'un phénomène continu et évolutif pouvant être schématiquement divisé en deux phases dites précoce et tardive (St. John Sutton and Sharpe 2000) (Figure 15).

La phase précoce apparaît quelques heures à quelques jours après l'IDM. Elle est caractérisée par un amincissement de la paroi cellulaire ainsi qu'une expansion de la zone infarctée. Elle s'accompagne également d'une réponse inflammatoire au cours de laquelle les polynucléaires neutrophiles et les macrophages envahissent la zone infarctée pour phagocyter les myocytes nécrosés dans les premiers jours suivant l'infarctus (Gaertner et al. 2004).



**Figure 15** : Représentation schématique des différentes phases du RVG.

Puis la réparation fibrotique de la zone nécrosée se met en place : les cardiomyocytes nécrosés sont totalement phagocytés et laissent place aux myofibroblastes, qui seront eux-mêmes responsables de la synthèse de collagène formant la cicatrice fibreuse et rendant la contraction du VG moins efficace (St. John Sutton and Sharpe 2000; Gajarsa and Kloner 2011).

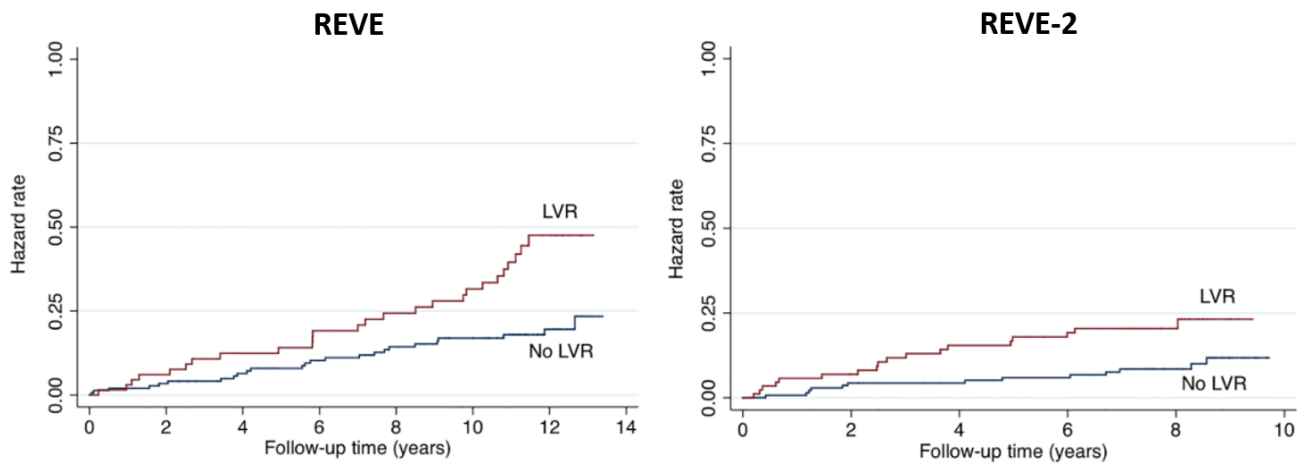
La phase tardive apparaît plusieurs mois à plusieurs années après l'IDM. Elle est associée à une dilatation globale du VG provoquée par une hypertrophie des cardiomyocytes de la zone non infarctée qui présentent en moyenne une augmentation de 70% de leur aire, ainsi qu'à une augmentation de la prolifération des fibroblastes. L'ensemble de ces altérations conduit à une altération des capacités contractiles du VG (St. John Sutton and Sharpe 2000; Gajarsa and Kloner 2011).

#### **4.2) Epidémiologie**

Les études REVE (REmodelage VEntriculaire) et REVE-2 ont montré que 30% des patients développent un RVG suite à un IDM massif (Savoie et al. 2006; Fertin et al. 2010). Ce RVG est un important facteur de mortalité post-IDM. Le suivi à long terme des patients des études REVE et REVE-2 a ainsi récemment montré que les patients ayant développé un RVG présentent un taux de mortalité pour cause cardiovasculaire plus élevé que les patients n'ayant



pas développé de RVG, malgré la prescription large des meilleurs traitement connus à l'heure actuelle (Bauters et al. 2017) (Figure 16).



**Figures 16 :** Courbes de Kaplan-Meier pour le décès pour cause cardiovasculaire ou pour l'hospitalisation pour IC pour les études REVE et REVE-2 (d'après Bauters et al. 2017).

De nombreux facteurs influencent la prévalence et le développement du RVG. Les principaux sont la taille et la localisation de l'IDM, l'épaisseur de la zone infarctée ou encore la composition en collagène de la cicatrice fibreuse.

Le risque de développer un RVG est également associé aux facteurs de risques cardiovasculaires classiques tels que l'âge, le sexe ou l'obésité, qui sont eux-mêmes associés au poids du VG qui constitue l'un des facteurs déterminants pour le RVG (Gjesdal, Bluemke, and Lima 2011).

### 4.3) Dépistage

Les principales techniques d'imagerie utilisées pour le dépistage du RVG sont l'échocardiographie, l'électrocardiographie et l'IRM cardiaque (Gjesdal, Bluemke, and Lima 2011).

**Table 3** : Comparaison des différentes méthodes d'évaluation de la masse du VG (d'après Gjesdal, Bluemke, and Lima 2011).

Paramètre	Echocardiographie	Electrocardiographie	IRM
Coût	Intermédiaire	Faible	Elevé
Disponibilité	Elevée	Elevée	Limitée
Temps	Intermédiaire	Faible	Elevé
Reproductivité	Intermédiaire	Elevée	Elevée
Sensibilité	Intermédiaire	Faible	Elevée
Spécificité	Intermédiaire	Elevée	Elevée
Précision	Elevée	Faible	Elevée
Standardisation	Intermédiaire	Elevée	Intermédiaire

L'échocardiographie constitue une option de choix pour le dépistage du RVG car elle présente les avantages d'être largement disponible, faiblement couteuse et simple d'utilisation. Elle permet notamment l'évaluation de plusieurs paramètres tels que le poids du VG, l'épaisseur pariétale du VG, les volumes ventriculaires télésystoliques et télédiastoliques ou encore la fraction d'éjection du VG. Récemment, la mesure des paramètres associés à l'OG tels que sa fraction de vidange ou l'index volumique se sont révélés être de bons prédicteurs échocardiographiques pour le dépistage des maladies cardiovasculaires (Von Jeinsen et al. 2020).

L'IRM est cependant considérée comme la meilleure technique d'imagerie pour le dépistage du RVG car étant particulièrement reproductible tout en mesurant des paramètres semblables à l'échocardiographie, mais elle est cependant moins disponible et plus couteuse (Gjesdal, Bluemke, and Lima 2011).

#### ***4.4 Mécanismes physiopathologiques***

Le remodelage cardiaque post-IDM se caractérise par des modifications physiologiques et moléculaires touchant les différents types cellulaires du cœur, cardiomyocytaire ou non, et participant aux effets pathologiques. On distingue ainsi une réexpression des gènes fœtaux, une mort des cardiomyocytes et la formation d'une cicatrice fibreuse au niveau de la zone infarctée et une hypertrophie compensatoire des cardiomyocytes de la zone saine.

#### 4.4.1) Réexpression des gènes fœtaux

Les changements moléculaires observés lors de l'hypertrophie cardiaque au cours du RVG sont similaires à ceux observés au cours du développement cardiaque embryonnaire (Dirkx, Da Costa Martins, and De Windt 2013). Ainsi, le développement de l'hypertrophie est associé à une réexpression du programme fœtal, consistant en la réexpression des gènes impliqués dans le développement cardiaque embryonnaire (Arai et al. 1993).

Cette réexpression concerne particulièrement les gènes de l'isoforme alpha et beta de la chaîne lourde de la myosine, respectivement appelée  $\alpha$ -MHC et  $\beta$ -MHC, des peptides natriurétiques ou encore des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique ou les fonctions mitochondriales (Razeghi et al. 2001).

On observe ainsi une diminution de l' $\alpha$ -MHC ainsi qu'une augmentation de la  $\beta$ -MHC qui entraînerait une diminution de la vitesse de contraction du VG (Bernardo et al. 2010). De plus, l'expression de la forme squelettique de l'alpha-actine à la place de la forme cardiaque pourrait avoir un effet délétère sur la fonction cardiaque (Taegtmeyer, Sen, and Vela 2010). On observe enfin une augmentation de l'expression de l' "*Atrial Natriuretic Peptide*" (ANP) et du "*Brain Natriuretic Peptide*" (BNP), dont le rôle principal au niveau du cœur est d'inhiber l'hypertrophie. Enfin, l'ANP et le BNP possèdent également une action vasodilatatrice en inhibant le système rénine-angiotensine-aldostérone, ce qui entraîne une diminution de la pression artérielle (Taegtmeyer, Sen, and Vela 2010).

#### 4.4.2) Mort des cardiomyocytes de la zone infarctée

En conditions physiologiques, les cardiomyocytes possèdent une capacité de régénération très limitée et un taux de mort cellulaire faible (Tham et al., 2015). Au cours de l'IDM et du RVG, trois mécanismes sont impliqués dans la mort des cardiomyocytes : la nécrose, l'apoptose et l'autophagie.

Pendant l'IDM, l'ischémie induite sur le myocarde induit une mort cellulaire des cardiomyocytes par nécrose, caractérisée par une perte de l'intégrité membranaire, un gonflement des organelles et des cellules et une réponse inflammatoire par la libération du contenu intracellulaire (Burchfield et al., 2013). Cette nécrose entraîne une diminution significative des capacités contractiles du myocarde, menant au RVG.

Au cours du RVG, la mort progressive des cardiomyocytes par apoptose et autophagie participe à la progression des dysfonctions cardiaques et au développement de l'IC.

L'apoptose est caractérisée par un rétrécissement cellulaire, une fragmentation cellulaire en corps apoptotiques denses et une phagocytose de ces corps apoptotiques sans induction de réponse inflammatoire (Burchfield et al., 2013). On distingue deux voies d'activation de l'apoptose : la voie intrinsèque ou voie mitochondriale induite par divers stimuli tels que la privation en facteurs de croissance, le stress oxydatif ou encore l'hypoxie, ainsi que la voie extrinsèque déclenchée par l'interaction de ligands de mort cellulaire tels que le TNF (*Tumor Necrosis Factor*) sur des récepteurs spécifiques dits de mort cellulaire (Marín-García, 2016).

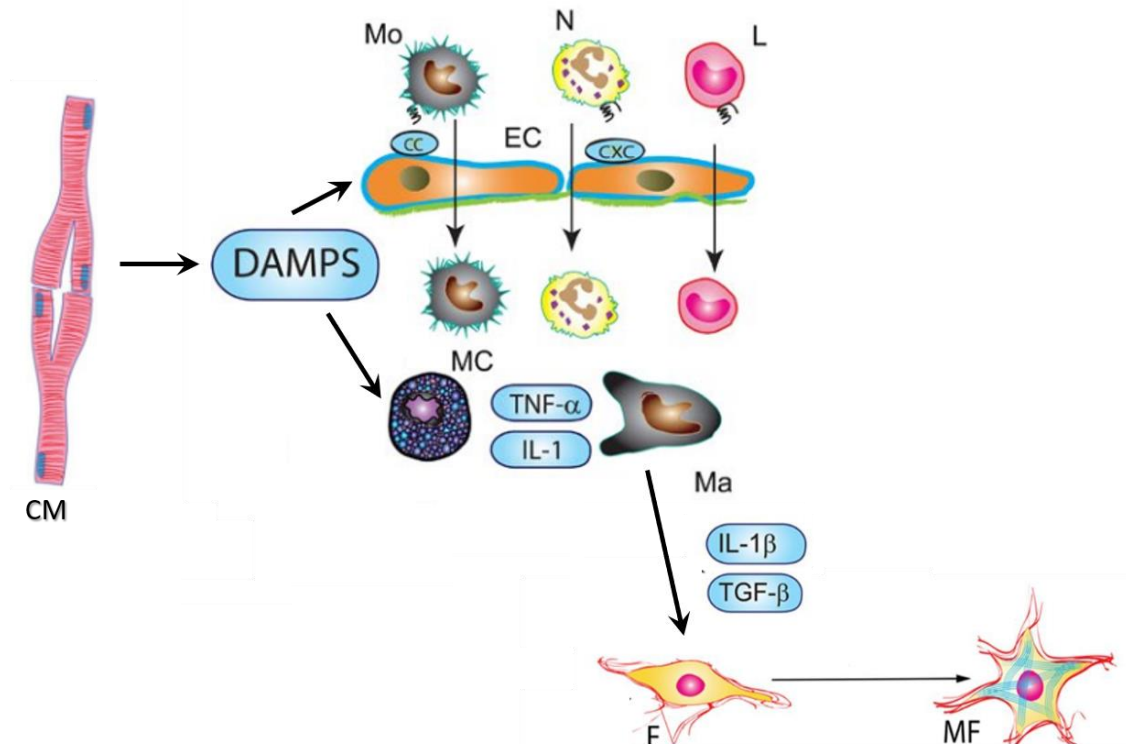
L'autophagie est quant à elle activée afin de protéger les cardiomyocytes de l'accumulation de protéines ubiquitinylées (Tham et al., 2015). Il s'agit d'un mécanisme cytoprotecteur permettant d'éliminer les organelles endommagées et les protéines mal-conformées par l'intermédiaire de la voie lysosomale qui se déclenche en conditions de stress telle que la privation en nutriments (Burchfield et al., 2013; Tham et al., 2015).

Suite à l'IDM, les cellules stressées ou ayant débuté un processus de mort cellulaire tel que précédemment décrit peuvent relarguer des signaux DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns), qui vont permettre le déclenchement de la réponse inflammatoire et l'activation des fibroblastes pour la formation de la cicatrice fibreuse.

#### **4.4.3) Formation de la cicatrice fibreuse**

Le stress induit par l'IDM entraîne une activation du système immunitaire inné ainsi qu'une réponse inflammatoire du tissu lésé. La réponse inflammatoire consécutive à une ischémie myocardique peut être divisée en trois phases : une phase d'inflammation aiguë, une phase de guérison et une phase d'inflammation chronique (Riehle and Bauersachs 2019).

La phase inflammatoire aiguë débute avec la nécrose des cardiomyocytes, qui vont relarguer des alarmines appelées DAMPS (*Danger-Associated Molecular Patterns*) tels que l'interleukine 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), les protéines de choc thermique HSP (*Heat Shock Protein*) ou encore HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*) pour activer les cellules immunitaires (Figure 17).



**Figure 17** : Représentation schématique de la réponse inflammatoire post-IDM (d'après Chen and Frangogiannis 2017; Prabhu and Frangogiannis 2016).

CM : cardiomyocyte ; DAMPS : *Danger Associated Molecular Patterns* ; EC : cellules endothéliales ; F : fibroblaste ; L : lymphocyte ; Ma : macrophage ; MC : mastocyte ; MF : myofibroblaste ; Mo : monocyte ; N : neutrophiles.

Les DAMPS sont ensuite reconnues par les récepteurs TLR (*Toll-Like Receptor*), ce qui va promouvoir l'activation du facteur NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor  $\kappa$ B*). L'activation de NF- $\kappa$ B entraîne la formation de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) ou l'IL-1 $\beta$ , de chémokines et de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales vasculaires. Cette sécrétion entraîne le recrutement de leucocytes et de macrophages qui secréteront des enzymes protéolytiques afin de digérer le tissu endommagé. Puis les macrophages diminueront leur production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  et augmenteront la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques tels que l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (*Tumor Growth Factor  $\beta$* ) (Prabhu and Frangogiannis 2016; Riehle and Bauersachs 2019) (Figure 17).

C'est alors que débute la phase de guérison, pendant laquelle les fibroblastes avoisinant la zone nécrosée s'activent et prolifèrent. Les réponses fibrogénique et angiogénique sont activées, permettant la formation de la cicatrice fibreuse (Prabhu and Frangogiannis 2016; Riehle and Bauersachs 2019).

Enfin, la phase d'inflammation chronique se met en place lorsque l'inflammation persiste. Elle conduit alors à une augmentation du remodelage pathologique ainsi qu'à une diminution des fonctions cardiaques caractérisée par une détérioration de la contraction ainsi qu'une augmentation de la fibrose et de l'apoptose au niveau du myocarde (Tham et al. 2015; Riehle and Bauersachs 2019).

La réponse inflammatoire et le processus de fibrose observé suite à l'IDM s'accompagne d'une dégradation de la matrice extracellulaire de la zone infarctée, participant à la formation de la cicatrice fibreuse. En conditions physiologiques, la matrice extracellulaire (MEC) est principalement composée de collagène fibrillaire, d'élastine, de protéoglycanes et de protéines telles que la laminine et la fibronectine (Fedak et al. 2005). Elle forme un réseau tri-dimensionnel permettant le maintien de l'intégrité de la structure cardiaque (Li, Zhao, and Kong 2018). Suite à l'IDM, la dégradation de la MEC contribue à l'expansion de la zone infarctée et stimule l'activation de la réponse inflammatoire (Spinale 2007; Prabhu and Frangogiannis 2016). La dégradation des composants de la MEC est assurée par les métalloprotéinases de la matrice (MMP) dont l'activité est inhibée par les TIMP (*Tissue Inhibitors of MetalloProteinase*) (Li, Zhao, and Kong 2018). La sécrétion des MMP par les fibroblastes permet le maintien d'un équilibre entre la production de collagène et sa dégradation dans le cœur.

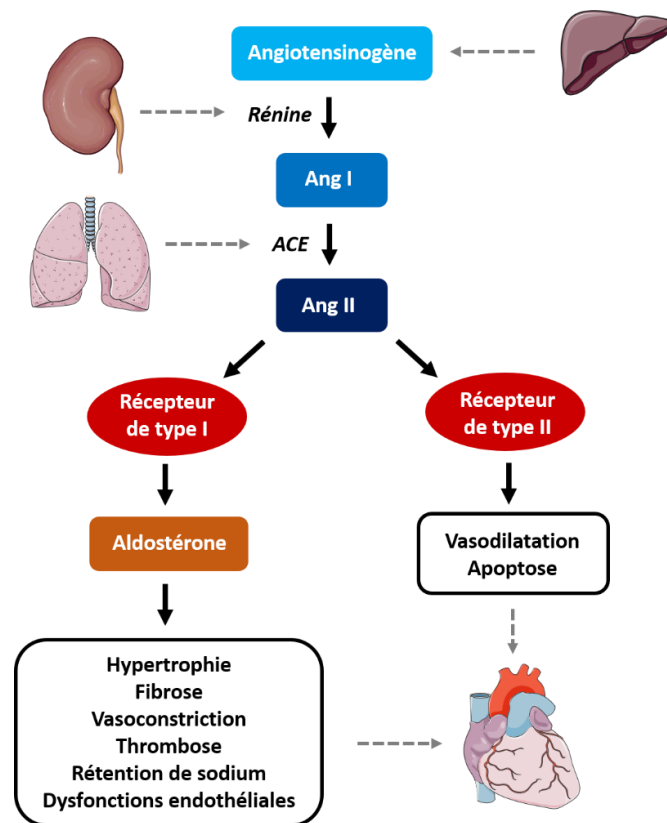
Sous l'action de certains facteurs de la réponse inflammatoire, l'expression des MMP et plus particulièrement des MMP 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13 et 14 augmente au cours du RVG, tandis que l'expression des TIMP est diminuée (Li, Zhao, and Kong 2018). La perte de cet équilibre induit la prolifération des fibroblastes cardiaques et leur différenciation en myofibroblastes, responsable de la synthèse de collagène constituant la cicatrice fibreuse, favorisant le développement du RVG et l'installation d'une IC (Tham et al. 2015).

#### **4.4.4) Hypertrophie des cardiomyocytes**

De nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans le processus d'hypertrophie mis en place au cours du RVG. Particulièrement, les voies de signalisation associées aux récepteurs des protéines G (GPCR) jouent un rôle central dans l'hypertrophie cardiaque. Suite

à un stimulus pathologique comme une surcharge de pression, des facteurs neurohormonaux sont libérés et permettent l'activation des voies de signalisations associées aux GPCR. Ainsi, le relargage d'angiotensine II (Ang II), d'endothéline et de catécholamines permettra d'activer respectivement les récepteurs à l'Ang II, les récepteurs à l'endothéline et les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénergiques, favorisant le remodelage du myocarde (Bernardo et al. 2010).

L'axe rénine-angiotensine-aldostérone a été particulièrement étudié dans le développement du RVG suite à un IDM (Figure 18).



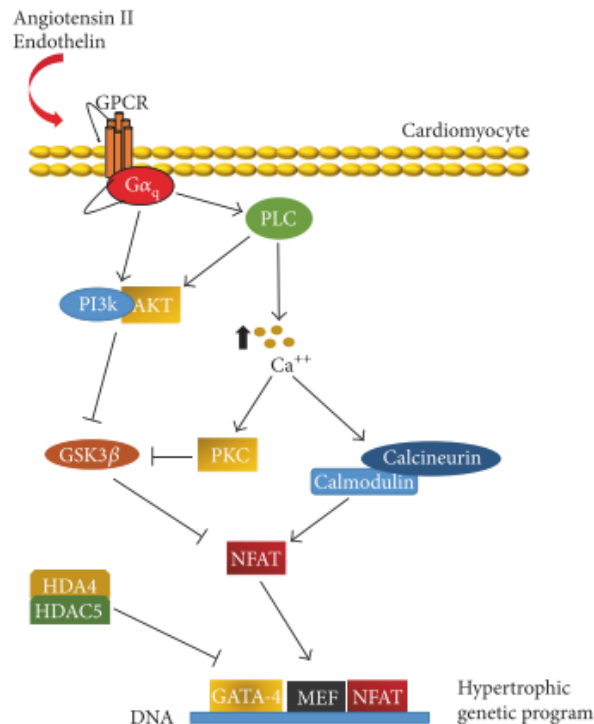
**Figure 18** : Le système rénine-angiotensine-aldostérone

ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine ; Ang I et II : angiotensine I et II.

Produite par le foie, l'Ang I est formée à partir de l'angiotensinogène sous l'influence de la rénine, une protéase produite dans les cellules juxtaglomérulaires du rein. Puis l'Ang I est convertie en Ang II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), retrouvée au niveau de la vasculature pulmonaire et des artères coronaires. La fixation de l'Ang II sur le récepteur à l'Ang de type I entraîne enfin la formation d'aldostérone. L'Ang II et l'aldostérone ont un effet direct sur le cœur en entraînant entre autres une hypertrophie, une fibrose ou encore une vasoconstriction. L'Ang II peut également se fixer sur le récepteur à l'Ang II de type II, qui présentera des effets inverses à celui de type I. Une augmentation du taux de récepteurs à l'Ang

II de type I est observée chez les patients suite à un IDM, augmentant ainsi le risque de développer un remodelage cardiaque (Gajarsa and Kloner 2011).

L'endothéline 1 est la forme majoritaire dans le cœur et possède le plus fort pouvoir vasoconstricteur connu à ce jour. Son interaction avec des GPCR spécifiques, les récepteurs A et B à l'endothéline, induit l'activation de la phospholipase C (PLC) menant à l'hypertrophie par activation de la voie PI3K/Akt (Figure 19).



**Figure 19** : Voie de signalisation hypertrophique activée par l'endothéline (d'après Schirone et al. 2017).

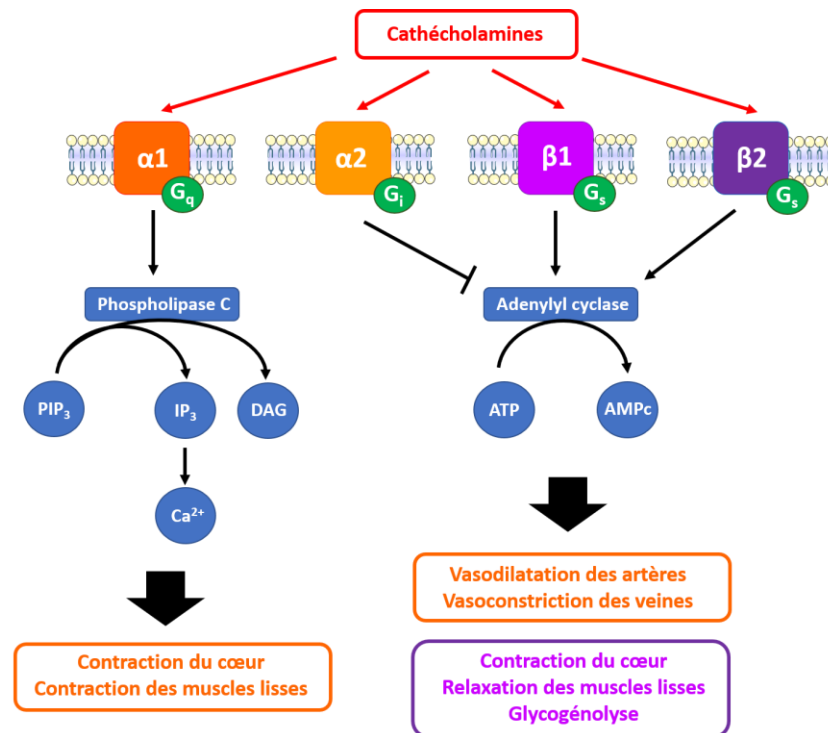
GSK3β : *glycogen synthase kinase 3 bêta* ; GPCR : *G Protein Coupled Receptor* ; HDAC 4 et 5 : histone désacétylase 4 et 5 ; MEF : *myocyte enhancement factor* ; NFAT : *nuclear factor of activated T cells* ; PI3K : phosphoinositide-3-kinase ; PKC : protéine kinase C ; PLC : phospholipase C.

D'autre part, l'augmentation du calcium intracellulaire déclenchera l'activation de la voie hypertrophique dépendante de la calcineurine et de la calmoduline (Bernardo et al. 2010; Schirone et al. 2017) (Figure 19).

Enfin, les cathécholamines tels que l'adrénaline ou la norépinéphrine activent les récepteurs adrénergiques dont on distingue deux familles : les récepteurs α-adrénergiques et les récepteurs β-adrénergiques, représentés respectivement à 10% et 90% dans le cœur humain (Baker 2014). La cascade classiquement activée par les récepteurs β-adrénergiques fait intervenir les petites protéines G, menant à l'activation de l'adénylate cyclase, à la formation



d'AMP cyclique et à l'activation de la protéine kinase A. La signalisation  $\beta$ -adrénergique présente ainsi des effets hypertrophiques et fibrotiques (Yang et al. 2014). Cette même voie est inhibée par l'activation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, tandis que l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques assure l'activation des voies de signalisation médiée par la PLC (Baker 2014) (Figure 20).



**Figure 20** : Voies de signalisation adrénérergiques.

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique ; ATP : adénosine triphosphate ; DAG ; diacylglycerol ; IP3 : inositol triphosphate ; PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate.

Le système rénine-angiotensine-aldostérone et la signalisation  $\beta$ -adrénergique sont au cœur des thérapies actuellement utilisées pour l'IC qui utilisent notamment des inhibiteurs de l'ACE ou encore des  $\beta$ -bloquants (Schirone et al. 2017).

L'hypertrophie des cardiomyocytes est associée à une augmentation des organites intracellulaires dont les mitochondries. De plus, le processus hypertrophique est également associé à une synthèse de nouvelles protéines ainsi qu'à une augmentation de la charge de travail, nécessitant une utilisation accrue de l'énergie, principalement produite au niveau des mitochondries. Le remodelage est ainsi associé à une modification du métabolisme énergétique entraînant une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive*

*Oxygen Species* – ROS). Les modifications concernant les mitochondries sont présentées plus en détails dans le chapitre suivant.

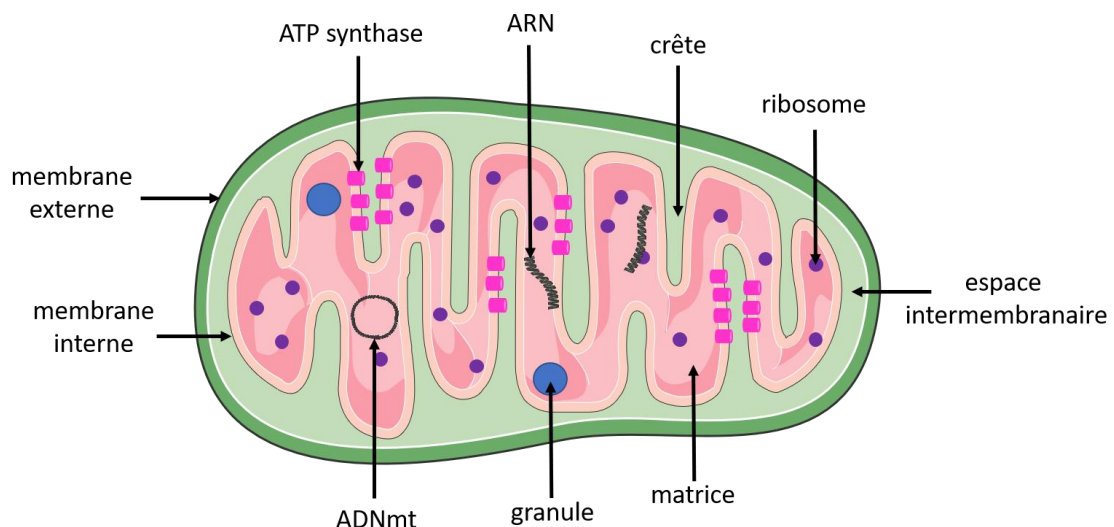
## II) La mitochondrie

### 1) Structure et composition

#### 1.1) Structure

Les mitochondries sont de petites organelles intracellulaires considérées comme les « centrales énergétiques » des cellules car ayant pour fonction de fournir l'énergie nécessaire aux réactions enzymatiques de la cellule. Il s'agit d'organelles présentes dans tous les types cellulaires de l'organisme hormis les globules rouges, et dont la forme et le nombre varient selon le type cellulaire. On peut ainsi les retrouver sous forme globuleuse ou sous forme filamentaire à hauteur de 1000 à 3000 mitochondries par cellule. Leur taille est de l'ordre du micromètre.

L'utilisation de la microscopie électronique a permis l'étude de la structure des mitochondries de manière précise (Freya and Mannellab 2000). Il s'agit d'organelles possédant deux membranes, une membrane interne et une membrane externe, au milieu desquelles on distingue l'espace intermembranaire. L'intérieur de la mitochondrie, délimité par la membrane interne, est nommé matrice mitochondriale (Figure 21).



**Figure 21** : Représentation schématique de la structure mitochondriale.

ADN mt : acide désoxyribonucléique mitochondrial ; ARN : acide ribonucléique ; ATP : adénosine triphosphate.

La membrane externe constitue la barrière entre la mitochondrie et le cytoplasme. Il s'agit d'une bicouche lipidique semblable à la membrane plasmique, formée de 50 à 60% de protéines et de 40 à 50% de lipides. Les protéines majeures de la membrane externe sont les porines : elles possèdent un pore permettant le passage d'ions et de molécules du cytoplasme vers la mitochondrie.

La membrane interne consiste également en une bicouche lipidique mais dont l'organisation est très différente de la membrane externe. Elle est majoritairement formée de 80% de protéines dont la plupart sont impliquées dans la chaîne respiratoire ou dans le transport de molécules, et à 20% de lipides, majoritairement sous la forme de cardiolipines. La membrane interne présente des invaginations ou replis très complexes qui se projettent dans la matrice que l'on appelle crêtes mitochondriales : la surface de la membrane interne présente ainsi une surface trois à cinq fois plus importante que la membrane externe.

L'espace intermembranaire constitue quant à lui un espace dense dans lequel on retrouve majoritairement des protons  $H^+$ , dont le rôle est primordial dans la phosphorylation oxydative, ainsi que des cytochromes C, qui sont impliqués dans l'apoptose.

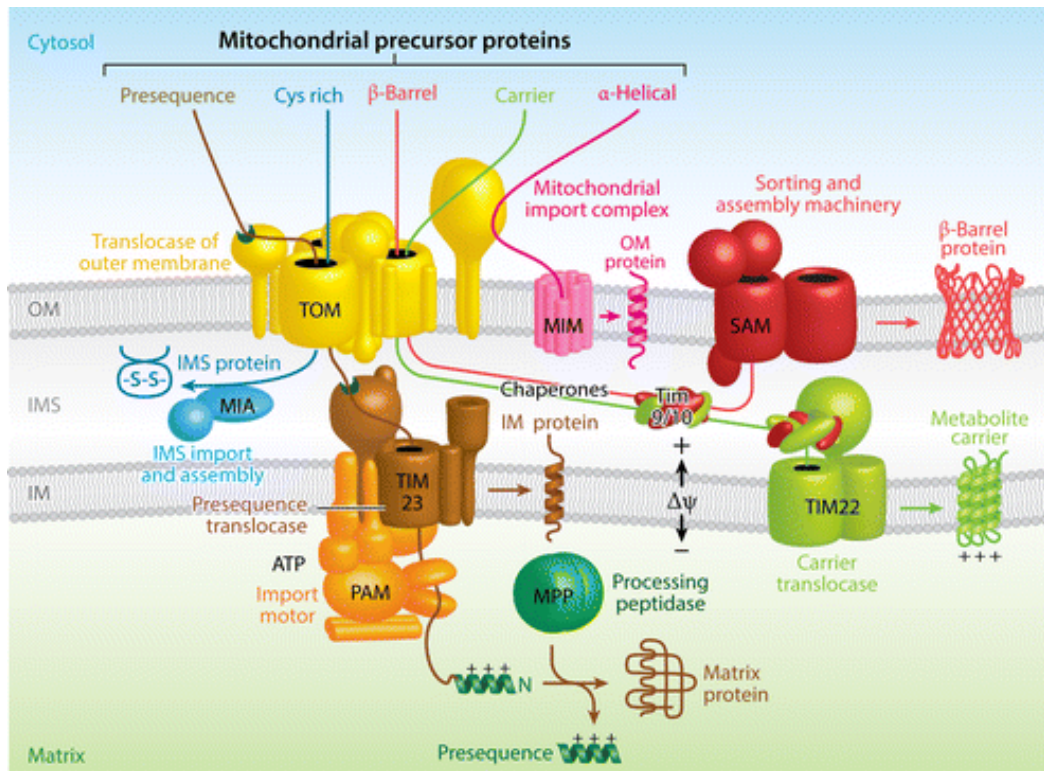
Enfin, la matrice représente la partie la plus interne de la mitochondrie dont les bords sont délimités par la membrane interne. Elle contient notamment l'ADN mitochondrial (ADNmt), l'ARN messager (ARNm) et l'ARN de transfert (ARNt), des ribosomes ainsi que de nombreuses enzymes impliquées dans la phosphorylation oxydative et la production d'énergie.

## ***1.2) Le génome mitochondrial***

Les mitochondries possèdent leur propre génome circulaire possédant 37 gènes codant pour 13 protéines impliquées dans la chaîne respiratoire mitochondriale, 22 ARNt et 2 ARN codant les ribosomes mitochondriaux (Rimbaud, Garnier, and Ventura-Clapier 2009; Friedman and Nunnari 2014). On considère ainsi que seules 1% des protéines mitochondriales sont produites et formées dans la mitochondrie, tandis que 99% des protéines sont codées par le génome nucléaire puis importées ensuite dans les mitochondries (Chacinska et al. 2009).

### 1.3) Import de protéines cytosoliques

A ce jour, cinq voies de signalisation connues permettent l'import des protéines cytosoliques vers les différents compartiments de la mitochondrie. Le complexe TOM (*Translocase of the Outer Membrane*) constitue le point d'entrée d'environ 90% des protéines importées dans la mitochondrie (Grevel, Pfanner, and Becker 2019) (Figure 22).



**Figure 22** : Représentation schématique des cinq voies d'adressage des protéines cytosoliques à la mitochondrie (Wiedemann and Pfanner 2017).

ATP : adénosine triphosphate ; Cys : cystéine ; IM : *inner membrane* ; IMS : *intermembrane space* ; MIA : *mitochondrial intermembrane space assembly* ; MIM : *mitochondrial import complex* ; MPP : *mitochondrial processing peptidase* ; OM : *outer membrane* ; PAM : *presequence associated motor* ; SAM : *sorting and assembly machinery* ; TIM : *translocase of the inner membrane* ; TOM : *translocase of the outer membrane*.

La voie classique d'import des protéines dans la mitochondrie est la voie dite « des préséquences », qui concerne les précurseurs protéiques possédant une séquence de destination à la mitochondrie en position N-terminale. Ces protéines entrent dans la mitochondrie par l'intermédiaire du complexe TOM. Puis le précurseur protéique est dirigé vers le complexe TIM23 (*Translocase of the Inner Membrane*). La protéine est alors soit adressée à la membrane mitochondriale interne, soit dirigée vers la matrice mitochondriale par l'intermédiaire du complexe PAM (*Presequence Associated Motor*). La préséquence localisée en position N-

terminale est alors clivée par le complexe MMP (*Mitochondrial Processing Peptidase*) et la protéine adoptera sa confirmation tridimensionnelle (Wiedemann and Pfanner 2017; Chacinska et al. 2009).

Les autres voies d'adressage à la mitochondrie concernent les précurseurs protéiques possédant une séquence d'adressage à l'intérieur de la séquence protéique et non pas une préséquence clivable (Wiedemann and Pfanner 2017; Chacinska et al. 2009). Il s'agit des protéines de transport hydrophobes, des protéines riches en cystéines ainsi que des protéines à structure en tonneau  $\beta$  et possédant de nombreux segments en hélice  $\alpha$  (Wiedemann and Pfanner 2017).

Les protéines de transport hydrophobes entrent dans la mitochondrie par l'intermédiaire du complexe TOM puis sont prises en charge par des petites protéines TIM chaperonnes dans l'espace intermembranaire. Elles sont alors amenées au complexe TIM22 puis seront intégrées dans la membrane mitochondriale interne où elles interviendront dans le transport de métabolites (Wiedemann and Pfanner 2017).

De la même manière, les précurseurs protéiques à structure en tonneau  $\beta$  entrent dans la mitochondrie par le complexe TOM puis sont pris en charge par les petites protéines TIM chaperonnes dans l'espace intermembranaire. Elles sont ensuite dirigées vers le complexe SAM (*Sorting and Assembly Machinery*) localisé dans la membrane mitochondriale externe puis insérées dans cette même membrane (Wiedemann and Pfanner 2017).

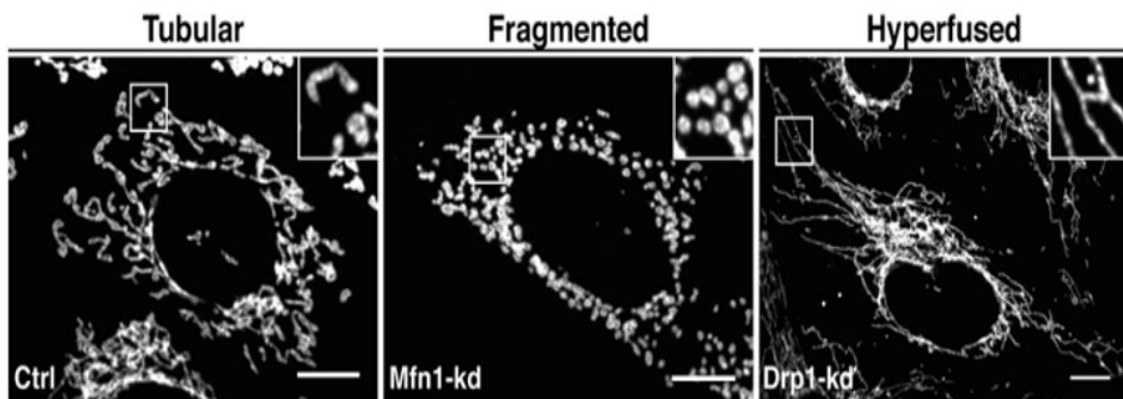
Les protéines à séquence riche en cystéine sont également importées dans la mitochondrie en passant par le complexe TOM puis elles sont prises en charge dans l'espace intermembranaire par la MIA (*Mitochondrial Intermembrane space Assembly*) qui assure la formation des ponts disulfures et la mise en confirmation de ces protéines dans l'espace intermembranaire (Wiedemann and Pfanner 2017).

Enfin, les précurseurs protéiques des protéines à hélice  $\alpha$  sont reconnus par le complexe TOM et sont importés dans la membrane mitochondriale externe par le complexe MIM (*Mitochondrial IMport complex*) (Wiedemann and Pfanner 2017).

## 2) Dynamique mitochondriale

### 2.1) Le contrôle de la qualité mitochondriale

Les mitochondries sont des organelles dynamiques dans la cellule dont la morphologie, la taille et le nombre dépend de la balance existante entre les deux procédés de biogénèse mitochondriale : la fusion et la fission. Visuellement, cette balance se caractérise par l'observation d'un réseau mitochondrial avec différents degrés d'élongation et de fragmentation : un réseau tubulaire peut ainsi devenir fragmenté en cas d'augmentation de la fission mitochondriale ou hyperfusionné en cas d'augmentation de la fusion (Tilokani et al. 2018) (Figure 23).

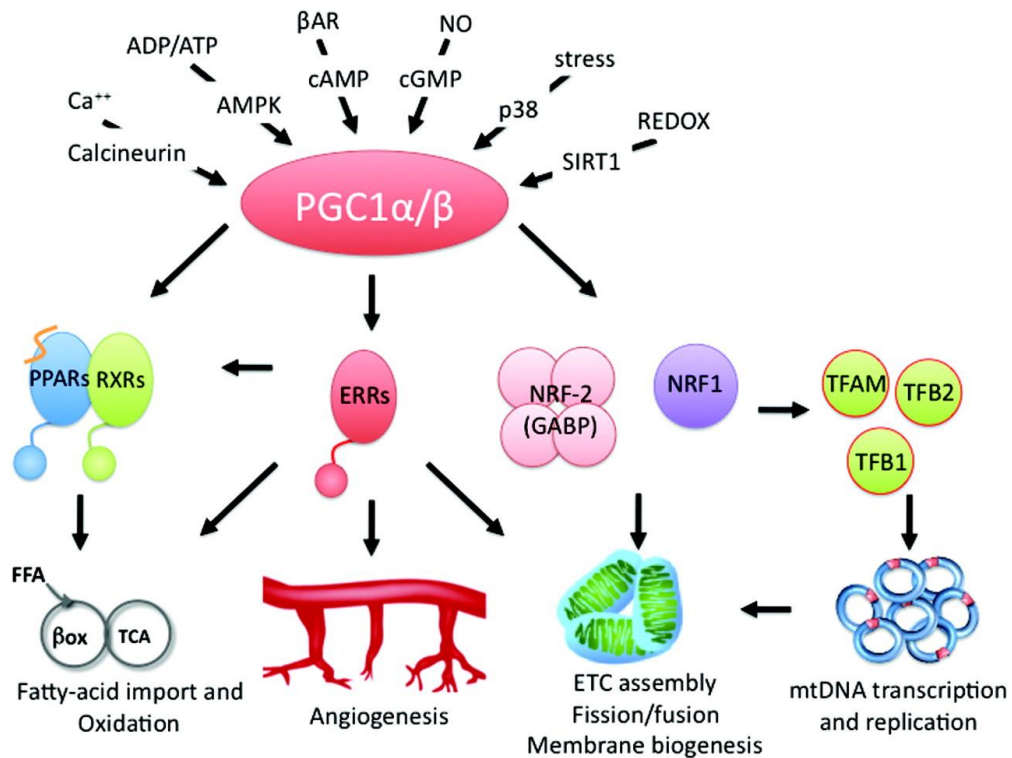


**Figure 23** : Visualisation de la morphologie du réseau mitochondrial en microscopie confocale après marquage de la protéine TOM20 (Tilokani et al. 2018).

Ctrl : contrôle ; DRP1-kd : *Dynamin Related Protein 1* ; Mfn1 : Mitofusine 1 ; kd : *knockdown*.

La protéine PGC1- $\alpha$  (*Proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 alpha*), possédant un rôle de co-activateur transcriptionnel et permettant l'expression des protéines impliquées dans les processus de fusion, de fission et de mitophagie mais également dans le métabolisme mitochondrial, joue un rôle central dans la biogénèse mitochondriale. La protéine PGC1- $\alpha$  est activée par divers stimuli tels que la signalisation  $\beta$ -adrénergique, le calcium, le stress oxydant ou encore le monoxyde d'azote. Son activité est également régulée par des modifications post-traductionnelles : elle est activée par phosphorylation par les protéines AMPK (*AMP-activated kinase*), p38 ou encore Akt. Elle peut également être acétylée par la protéine GCN5L1 (*GCN5 Family Protein 1*) puis activée par désacétylation par la désacétylase SIRT1 (sirtuine 1) (Rowe, Jiang, and Arany 2010; Andres et al. 2014) (Figure 24).





**Figure 24 :** Réseau transcriptionnel et régulation de la protéine PGC1- $\alpha$  (Rowe, Jiang, and Arany 2010).

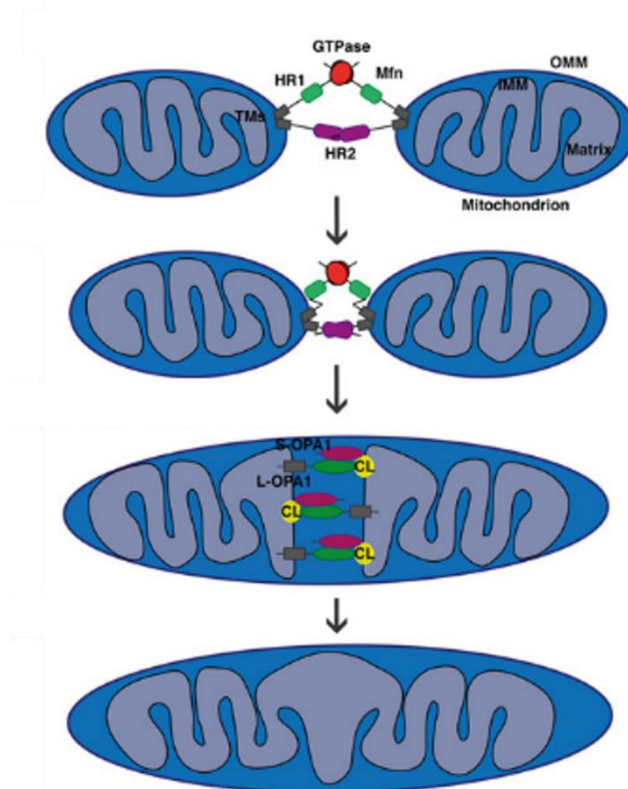
$\beta$ AR :  $\beta$ -adrénergique ; ADP : adénosine diphosphate ; AMPK : *AMP activated kinase* ; ATP : adénosine triphosphate, Ca : calcium ; cAMP : AMP cyclique, cGMP : GMP cyclique ; ERR : *estrogen-related receptor* ; FFA : *free fatty acid* ; GABP : *GA binding protein* ; NO : *nitric oxid* ; Nrf : *nuclear respiratory factor* ; PPAR : *peroxisome proliferator activated receptor* ; RXR : *retinoid X receptor* ; SIRT1 : sirtuine 1 ; TCA : *tricarboxylic acid* ; TFAM : *mitochondrial transcription factor A* ; TFB : *transcription factor B*.

La protéine PGC1- $\alpha$  contrôle l'expression des protéines Nrf1 et 2 (*Nuclear Respiratory Factor 1 et 2*), qui vont eux-mêmes promouvoir l'expression des protéines mitochondriales impliquées dans la régulation de la biogenèse mitochondriale, l'assemblage de la chaîne respiratoire, le stress oxydant ou encore l'expression de la protéine TFAM impliquée dans la transcription et la régulation du génome mitochondrial (Bayeva, Gheorghide, and Ardehali 2013; Andres et al. 2014) (Figure 24). La protéine PGC1- $\alpha$  est également responsable de l'activation des protéines ERR (*Estrogenes Related Receptor*), PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) et RXR (*Retinoid X Receptor*), activant respectivement l'angiogenèse ainsi que l'import et l'oxydation des acides gras (Rowe, Jiang, and Arany 2010). Enfin, la balance entre la biogenèse et l'élimination des mitochondries déficientes par mitophagie permet le maintien de l'homéostasie mitochondriale au sein de la cellule (Andres et al. 2014).



## 2.2) Fusion

Le mécanisme de fusion consiste en l'union de deux mitochondries mères en une seule et même mitochondrie fille. Il se déroule en deux étapes : la fusion des membranes mitochondriales externes, assurée par les protéines mitofusines (Mfn), ainsi que la fusion des membranes mitochondriales internes, assurée par la protéine OPA1 (*Optic Atrophy 1*) et les cardiolipines (Liesa, Palacín, and Zorzano 2009; Giacomello et al. 2020) (Figure 25).



**Figure 25** : Représentation schématique du mécanisme de fusion mitochondriale (Tilokani et al. 2018).

CL : cardiolipines ; GTP : guanosine triphosphate ; HR1 et 2 : *Heptad Repeat* 1 et 2 ; IMM : *Inner Mitochondrial Membrane* ; L-OPA1 : *Long Optic Atrophy 1* ; OMM : *Outer Mitochondrial Membrane* ; S-OPA1 : *Short Optic Atrophy 1* ; TM : *transmembrane domain*.

Le mécanisme de fusion est initié par les protéines mitofusines (Mfn) 1 et 2, des protéines GTPase localisées dans la membrane mitochondriale externe. Elle sont composées d'un domaine transmembranaire, permettant leur ancrage dans la membrane mitochondriale externe ainsi que deux domaines HR (*Heptad Repeat*) 1 et 2 et un domaine à activité GTPase localisés dans le cytosol (Liesa, Palacín, and Zorzano 2009; Tilokani et al. 2018). Dans un premier temps, les domaines HR2 des Mfn localisés sur deux mitochondries opposées

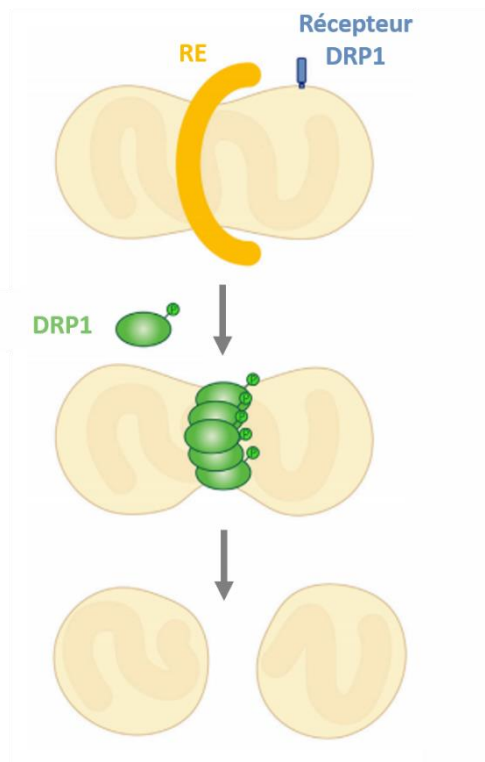
interagissent entre eux. Puis l'hydrolyse du GTP par le domaine GTPase entraîne un changement conformationnel des Mfn, permettant le rapprochement des membranes mitochondriales externes des mitochondries entrées dans le processus de fusion. L'hydrolyse du GTP ou l'oligomérisation dépendante du GTP assurerait la fusion des membranes, mais les mécanismes impliquant le GTP lors de la fusion des membranes restent à ce jour mal connus. La protéine Mfn2 est particulièrement impliquée dans la reconnaissance des mitochondries tandis que Mfn1 possède un rôle prépondérant dans la fusion des membranes externes mais également internes de par son interaction avec OPA1 (Liesa, Palacín, and Zorzano 2009; Tilokani et al. 2018).

Suite à la fusion des membranes mitochondriales externes, la protéine OPA1 et les cardiolipines assurent la fusion des membranes mitochondriales internes. La protéine OPA1 est également une protéine GTPase composée d'un domaine transmembranaire, assurant son ancrage à la membrane mitochondriale interne, ainsi que de deux sites localisés dans l'espace intermembranaire. Il s'agit de sites de clivage protéolytique qui seront clivés par des métalloprotéases afin de former deux fragments de haut poids moléculaire L-OPA1 (*Long OPA1*) et trois fragments de bas poids moléculaires S-OPA1 (*Short OPA1*) (Tilokani et al. 2018; Giacomello et al. 2020). La fusion des membranes mitochondriales internes est initiée par le contact entre les cardiolipines de la première mitochondrie et la protéine OPA1 de la seconde. De nouveau, la fusion entre les membranes internes est assurée par l'hydrolyse du GTP, mais les mécanismes impliqués dans cette fusion restent encore mal connus.

### ***2.3) Fission***

La fission correspond à la formation de deux mitochondries filles à partir d'une mitochondrie mère. De nouveau, ce mécanisme se déroule en plusieurs étapes afin de procéder à la constriction de la mitochondrie ainsi qu'à la fission de la membrane mitochondriale interne et externe, mais tous les mécanismes impliqués ne sont pas encore connus à ce jour.

Dans un premier temps, la fission mitochondriale est initiée par le réticulum endoplasmique qui entoure la mitochondrie afin de procéder à une pré-constriction de la mitochondrie et de diminuer significativement son diamètre (Tilokani et al. 2018) (Figure 26).



**Figure 26** : Représentation schématique du mécanisme de fission mitochondriale (Chen and Chan 2017).

DRP1 : *Dynamin-Related Protein 1* ; RE : réticulum endoplasmique.

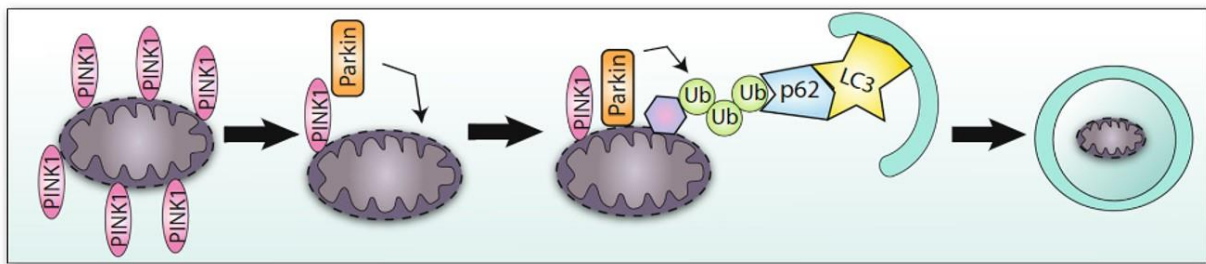
La fission est principalement prise en charge par la protéine DRP1 (*Dynamin-Related Protein 1*). Il s'agit d'une protéine GTPase cytosolique recrutée à la membrane mitochondriale externe par des récepteurs protéiques tels que FIS1 (*Mitochondrial Fission 1 Protein*), MFF (*Mitochondrial Fission Factor*), MiD49 (*Mitochondrial Dynamic protein of 49 kDa*) et MiD51 (*Mitochondrial Dynamic protein of 51 kDa*) (Chan 2012; Giacomello et al. 2020). La liaison de DRP1 à ses récepteurs s'accompagne d'une liaison de DRP1 au GTP, entraînant la formation d'un polymère linéaire de DRP1 autour de la mitochondrie formant un anneau de constriction. Puis l'hydrolyse du GTP entraîne la fission des membranes et la séparation des deux mitochondries filles (Tilokani et al. 2018).

## 2.4) Mitophagie

La mitophagie consiste en la dégradation ciblée des mitochondries par autophagosome et permet le maintien de la population mitochondriale en conditions basales et en conditions de stress (Andres et al., 2014 ; Shires and Gustafsson, 2015.)

On distingue deux types de voies menant à la mitophagie : la voie dépendante des protéines PINK1 (*PTEN Induced Kinase 1*) et Parkin, ainsi que la voie médiée par les récepteurs de la mitophagie (Morales et al., 2019 ; Shires and Gustafsson, 2015.)

La voie dépendant des protéines PINK1 et Parkin est la voie la plus étudiée. Elle est déclenchée en cas de diminution du potentiel mitochondrial (Gottlieb & Thomas, 2017) (Figure 27).

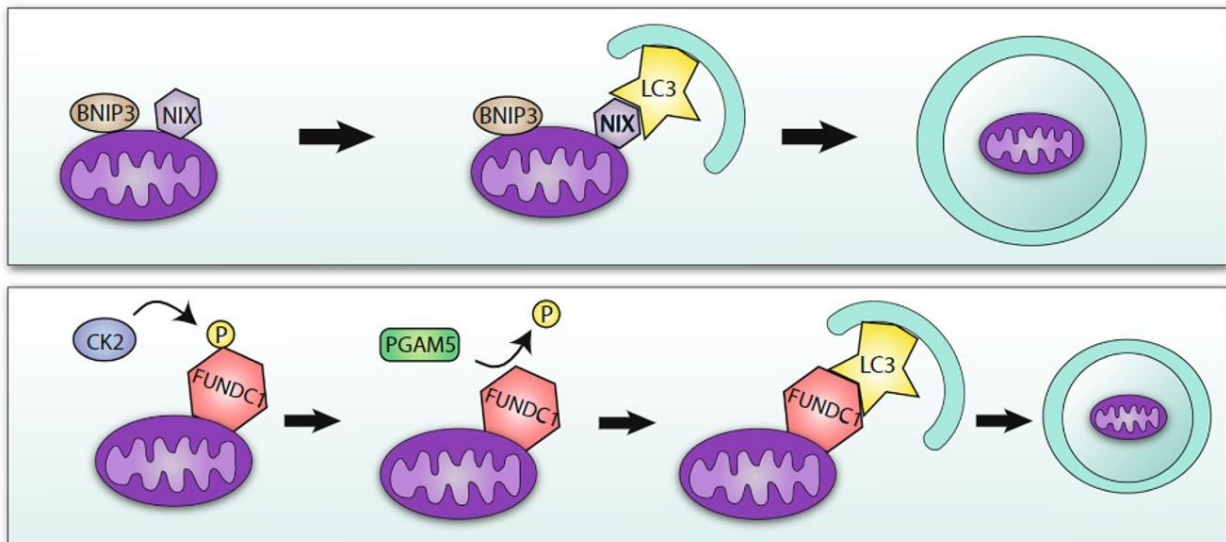


**Figure 27** : Représentation schématique de la voie de mitophagie dépendante des protéines PINK1 et Parkin (Shires and Gustafsson, 2015).

LC3 : *Light Chain 3* ; PINK1 : *PTEN Induced Kinase 1* ; Ub : ubiquitinylée.

La protéine PINK1 est une protéine cytosolique importée dans la matrice mitochondriale en conditions physiologiques. En cas de diminution du potentiel mitochondrial, l'importation de PINK1 dans la matrice s'arrête et la protéine reste bloquée au niveau de la membrane mitochondriale externe. L'accumulation de PINK1 entraîne le recrutement de la protéine Parkin, possédant une activité E3 ubiquitine ligase. Parkin assure alors l'ubiquitinylation des protéines dysfonctionnelles de la membrane externe mitochondriale. Cette poly-ubiquitinylation permet le recrutement de la protéine p62, jouant un rôle d'adaptateur pour la protéine LC3 présente à la surface de l'autophagosome. Puis la mitochondrie est englobée par l'autophagosome qui fusionnera ensuite avec le lysosome pour éliminer la mitochondrie dysfonctionnelle (Gottlieb et al., 2011; Shires and Gustafsson, 2015 ; Morales et al., 2019).

La mitophagie peut également être réalisée selon la voie dépendante des récepteurs de la mitophagie. A ce jour, trois protéines sont connues pour être des récepteurs de la mitophagie : BNIP3 (*Bcl2 Interacting Protein 3*), NIX et FUNDC1 (*FUN14 Domain Containing 1*) (Morales et al., 2019) (Figure 27).



**Figure 27** : Représentation schématique des voies de mitophagie dépendantes des récepteurs de la mitophagie (Shires and Gustafsson, 2015).

BNIP3 : *Bcl2 Interacting Protein* ; CK2 : Caséine Kinase 2 ; FUNDC1 : *FUN14 Domain Containing 1* ; LC3 : *Light Chain 3* ; P : phosphorylé ; PGAM5 : *PGAM Family Member 5*.

La première voie fait intervenir les protéines BNIP3 et NIX, localisées sur la membrane mitochondriale externe. Ces deux protéines possèderaient un motif LIR (*LC3-Interacting Region*) permettant le recrutement direct de LC3 et de l'autophagosome et l'élimination de la mitochondrie après fusion avec le lysosome. Cependant, la manière dont les protéine BNIP3 et NIX sont activées pour déclencher l'autophagie reste encore mal connue (Shires and Gustafsson, 2015 ; Morales et al., 2019).

La seconde voie dépend de la protéine FUNDC1, également localisée dans la membrane mitochondriale externe. En conditions physiologiques, la protéine FUNDC1 est inactivée par phosphorylation par la protéine CK2 (caséine kinase 2) et ne peut plus interagir avec LC3. En cas de stress hypoxique, FUNDC1 est déphosphorylée par la protéine PGAM (*PGAM Family Member*), permettant l'interaction avec LC3 et entraînant l'élimination de la mitochondrie par l'autophagosome (Shires and Gustafsson 2015; Morales et al. 2019).

## 2.5) La dynamique mitochondriale dans le cœur

De manière générale, les mitochondries présentent une structure et une fonction tissu-spécifique : les cellules quiescentes présentent des mitochondries fragmentées, tandis que les cellules actives métaboliquement présentent des mitochondries organisées en réseaux (Piquereau et al. 2013). Les cardiomyocytes font cependant règle d'exception : ils présentent la

spécificité d'être des cellules actives métaboliquement mais présentant un réseau de mitochondries fragmenté. Cette fragmentation s'explique notamment par la localisation des mitochondries dans les cardiomyocytes : ces cellules présentent un grand nombre de myofilaments et un cytosquelette rigide, limitant les mouvements mitochondriaux à l'intérieur des cardiomyocytes. Il est ainsi très compliqué d'observer des variations de taille et de forme des mitochondries dans les cardiomyocytes (Dorn 2015).

De nombreuses pathologies cardiaques présentent cependant des anomalies morphologiques des mitochondries : elles sont par exemple plus nombreuses et plus petites en taille dans l'IC. Cette modification suggère une fragmentation du réseau mitochondrial ainsi qu'une perte de la balance existante entre la fusion et la fission dans l'IC (Piquereau et al. 2013). Dans ce sens, on observe notamment une diminution de l'expression de la protéine OPA1 ou encore une diminution de l'expression de Mfn2 associée à une augmentation de l'expression de Fis1 chez les rats IC (Piquereau et al. 2013).

De manière générale, les modifications de la morphologie et de la biogenèse mitochondriale observées lors de l'hypertrophie ou de l'IC semblent être associées aux besoins en énergie des cardiomyocytes. La protéine PGC1- $\alpha$  semble jouer un rôle prépondérant dans ce domaine. On observe ainsi une diminution de l'expression de PGC1- $\alpha$  associée à une augmentation des besoins en énergie pendant l'hypertrophie, alors que son expression est diminuée lors de la progression de la pathologie vers l'IC (Rosca, Tandler, and Hoppel 2012; Siasos et al. 2018).

Enfin, le rôle de la mitophagie dans l'hypertrophie, le remodelage cardiaque et l'IC semble être dépendant du stress induit sur les cardiomyocytes : une ischémie prolongée ou un haut niveau de stress cardiaque induisent des dommages conséquents sur les mitochondries. Ainsi, suite à un stress, la mitophagie permet l'élimination des mitochondries endommagées et dysfonctionnelles, afin d'empêcher le développement d'un stress oxydant qui induirait lui-même l'apoptose des cellules et le développement de l'IC (Morales et al. 2019).

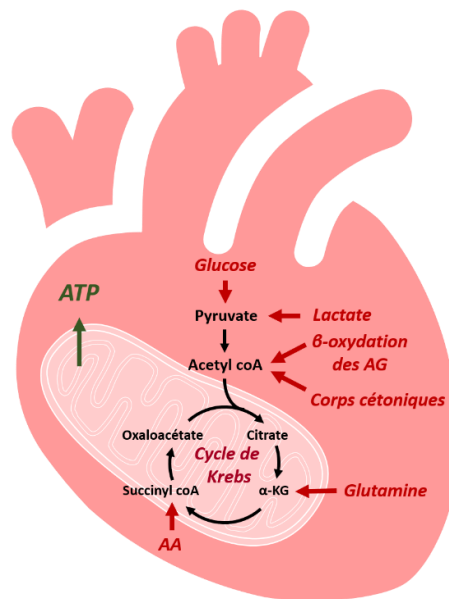
### 3) Fonctions mitochondriales

#### 3.1) La production d'énergie

##### 3.1.1) Métabolisme énergétique

Chaque jour, le cœur consomme environ 6 kg d'énergie sous forme d'ATP (Scolletta and Biagioli 2010). Cependant, le cœur ne possède que de faibles réserves en ATP. La grande majorité de l'énergie est donc produite par les mitochondries, qui représentent environ 25% du volume des cardiomyocytes (Sabbah 2016).

En conditions physiologiques, 70 à 90% de l'ATP nécessaire au cœur est produit à partir de la  $\beta$ -oxydation des acides gras, tandis que 10 à 30% de l'énergie est produite à partir de la glycolyse et en plus faible proportion à partir des corps cétoniques, de certains acides aminés et de l'oxydation du lactate (Doenst, Dung Nguyen, and Dale Abel 2013) (Figure 28).

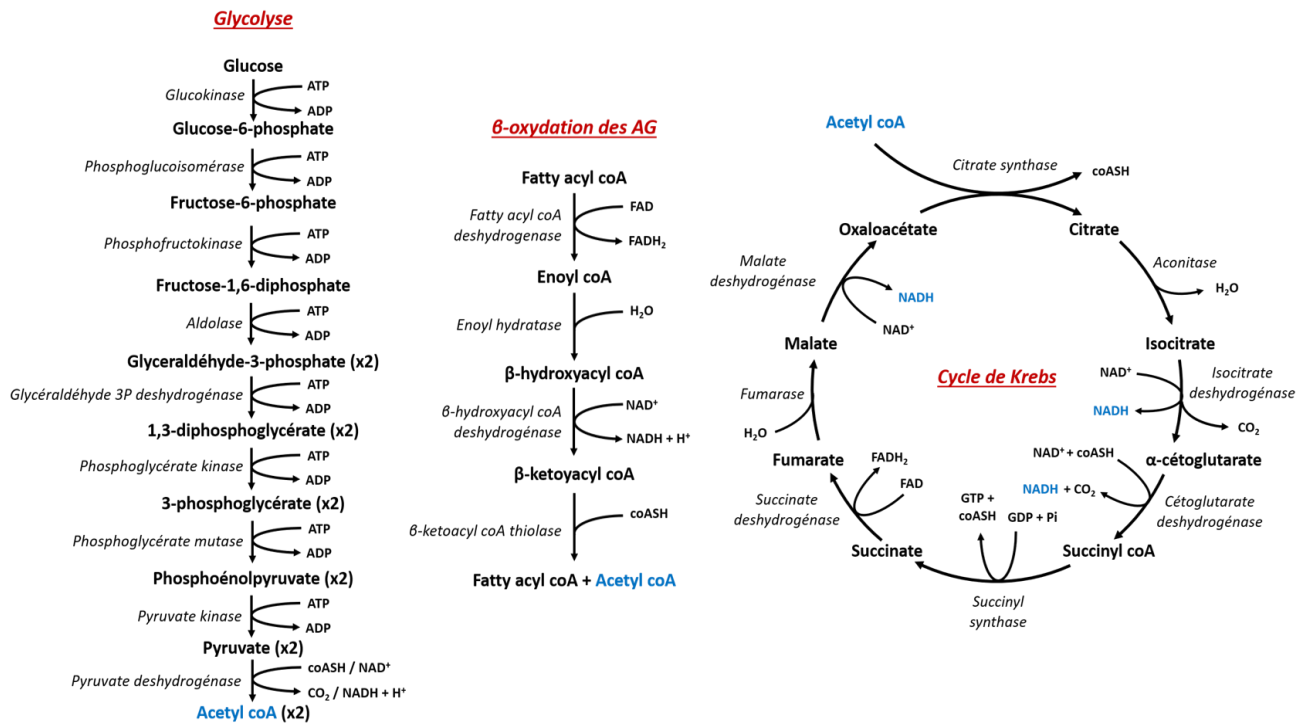


**Figure 28** : les voies de signalisations impliquées dans la production d'ATP dans le cœur.  $\alpha$ -KG : alpha cétooglutarate ; AA : acides aminés ; AG : acides gras ; Acetyl coA : acetyl coenzyme A ; ATP : adénosine triphosphate.

L'alimentation constitue la première source d'acide gras et de glucose, qui seront ensuite respectivement utilisés lors de la  $\beta$ -oxydation et la glycolyse afin de former un métabolite intermédiaire, l'acétyl coenzyme A (acetyl coA) (Scolletta and Biagioli 2010). Ce dernier sera



lui-même engagé dans le cycle de Krebs afin de former du NADH nécessaire à la formation de l'ATP au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 29).



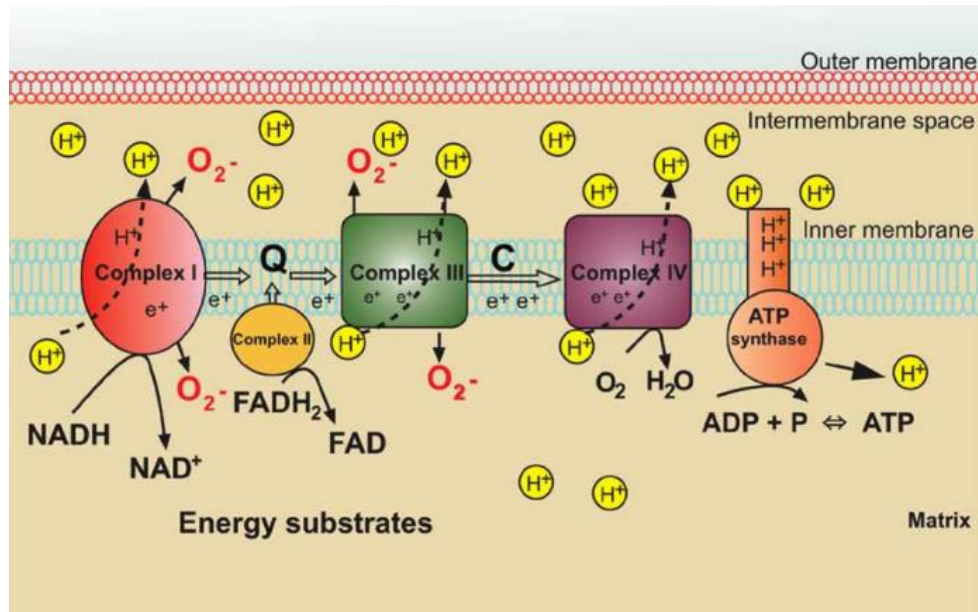
**Figure 29 :** Voies de la glycolyse, de la β-oxydation des acides gras et du cycle de Krebs. ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone ; coA : coenzyme A ; FAD : flavine adénine dinucléotide ; GDP : guanosine diphosphate ; GTP : guanosine triphosphate ; H<sub>2</sub>O : eau ; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide ; Pi : phosphate inositol.

### 3.1.2) La chaîne respiratoire mitochondriale

La majorité de l'ATP est générée dans la mitochondrie au niveau de la chaîne respiratoire par la phosphorylation oxydative. Le NADH et le FADH formés lors du cycle de Krebs permettent de fournir les électrons nécessaires à la phosphorylation oxydative en permettant une série de réactions d'oxydo-réduction le long de la chaîne respiratoire également appelée chaîne de transport des électrons.

La chaîne respiratoire mitochondriale est localisée au niveau de la membrane mitochondriale interne et est formée de cinq complexes : les complexes I, II, III, IV et V (formé par l'ATP synthase), et de deux navettes, le coenzyme Q et le cytochrome C (Schwarz et al. 2014; Hassanpour, Dehghani, and Karami 2018) (Figure 30).





**Figure 30 :** Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale et réactions impliquées (Andrews 2010).

ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; C : cytochrome C ; e<sup>-</sup> : électron ; FAD : flavine adénine dinucléotide ; H<sup>+</sup> : proton ; H<sub>2</sub>O : eau ; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide ; O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anion superoxyde ; P : phosphate inositol ; Q : coenzyme Q ; TCA : tricarboxylic acid.

Le complexe I possède une activité NADH déshydrogénase permettant le transport de quatre protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire par le passage d'un électron apporté par le NADH. Cet électron sera ensuite dirigé vers le complexe III par l'intermédiaire de la navette coenzyme Q.

Le complexe II est formé par la succinate déshydrogénase, une protéine du cycle de Krebs responsable de l'oxydation du FADH<sub>2</sub> et permettant le transfert d'un électron vers le complexe III par l'intermédiaire du coenzyme Q.

Le complexe III est le complexe coenzyme Q réductase cytochrome C oxydoréductase. Il permet le passage des électrons depuis le coenzyme Q vers la navette cytochrome C ainsi que le transfert de protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire.

Puis les électrons sont amenés vers le complexe IV possédant une activité cytochrome C oxydase. De même, le complexe IV permettra le transfert de protons vers l'espace intermembranaire.

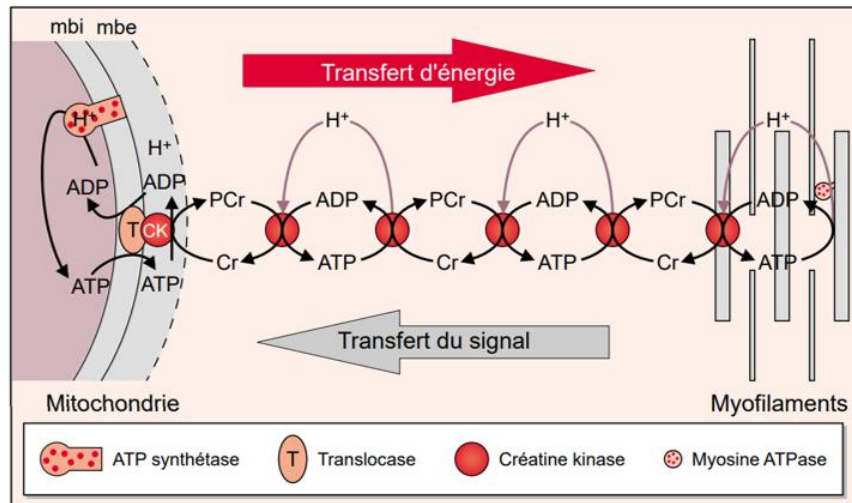
A terme, cette série de réactions d'oxydo-réduction permet la formation d'un gradient de protons avec une forte concentration de protons dans l'espace intermembranaire. Ces derniers seront alors conduits au complexe V formé par l'ATP synthase, où la phosphorylation de l'ADP permettra la synthèse d'ATP, qui sera ensuite hydrolysé pour fournir de l'énergie.

L'ADP entrant dans la matrice mitochondriale et l'ATP sortant vers le cytoplasme sont échangés par l'intermédiaire des transporteurs ANT (Adénine Nucléotide Transporteur), qui consistent en des protéines formées de six hélices alpha transmembranaires. Les ANT, dont on distingue quatre isoformes chez l'Homme, constituent les protéines les plus abondantes de la membrane mitochondriale interne. La vitesse de transport de l'ADP depuis le cytoplasme vers la matrice mitochondriale est lente et conditionne la vitesse de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les ANT fonctionnent sous la forme d'antiport et permettent ainsi l'entrée de 3 molécules d'ADP dans la matrice mitochondriale pour la sortie de quatre molécules d'ATP vers le cytoplasme.

Le transfert de protons dans l'espace intermembranaire, associé au transfert des électrons par les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire, permet la création d'un gradient électrochimique. Ce gradient est utilisé comme force proto-motrice pour fabriquer l'ATP au niveau du complexe V selon un procédé appelé couplage mitochondrial. En conditions physiologiques, une partie de ces protons retourne dans la matrice mitochondriale par l'intermédiaire des protéines UCP (*Uncoupling Proteins*). On parle alors de découplage, qui concerne environ 20 à 30% de l'énergie cellulaire (Schwarz et al. 2014; Hassanpour, Dehghani, and Karami 2018).

### **3.1.3) La navette créatine kinase**

Dans le cas des cardiomyocytes et dans le contexte de la contraction cardiaque, l'ATP formé au cours de la phosphorylation oxydative doit ensuite être transféré aux myofilaments afin de permettre la contraction. Ce transfert est assuré par la navette créatine kinase (Figure 31).



**Figure 31** : La navette créatine kinase (Ventura-Clapier 1998).

ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; Cr : créatine ; H<sup>+</sup> : proton ; PCr : phosphocréatine.

Au niveau de la membrane mitochondriale externe, la créatine s'associe avec l'ATP afin de former la phosphocréatine, qui sera transférée dans le cytosol. Le transfert d'énergie est ainsi réalisé par l'intermédiaire des créatines kinases cytosoliques jusqu'au myofilament, où la contraction entraîne une augmentation de l'ADP. Cette ADP sera lui-même phosphorylé par la créatine kinase puis emmené vers la mitochondrie afin de stimuler la respiration et la formation d'énergie (Ventura-Clapier et al. 2010).

### 3.1.4) Métabolisme énergétique dans le coeur

Le cœur constitue l'un des organes les plus oxydatifs de l'organisme et utilise près de 11% de la consommation d'oxygène pour générer l'ATP qui lui est nécessaire par la phosphorylation oxydative. Le cœur ne dispose en effet que de faible réserve d'ATP, de l'ordre de 8 nM, alors que sa contraction utilise environ 1 mM d'ATP par seconde. Afin de produire en quantité suffisante l'ATP nécessaire à la contraction cardiaque, le cœur présente une grande flexibilité métabolique et des capacités d'adaptation conséquentes. En conditions physiologique, les sources de production d'ATP peuvent ainsi varier selon l'état d'activité ou suite à la prise des repas. Tandis que le métabolisme des AG reste la voie privilégiée de production de l'ATP, le cœur peut s'adapter à l'utilisation presque exclusive des glucides comme source de production d'énergie en période post-prandiale ou encore à l'utilisation du

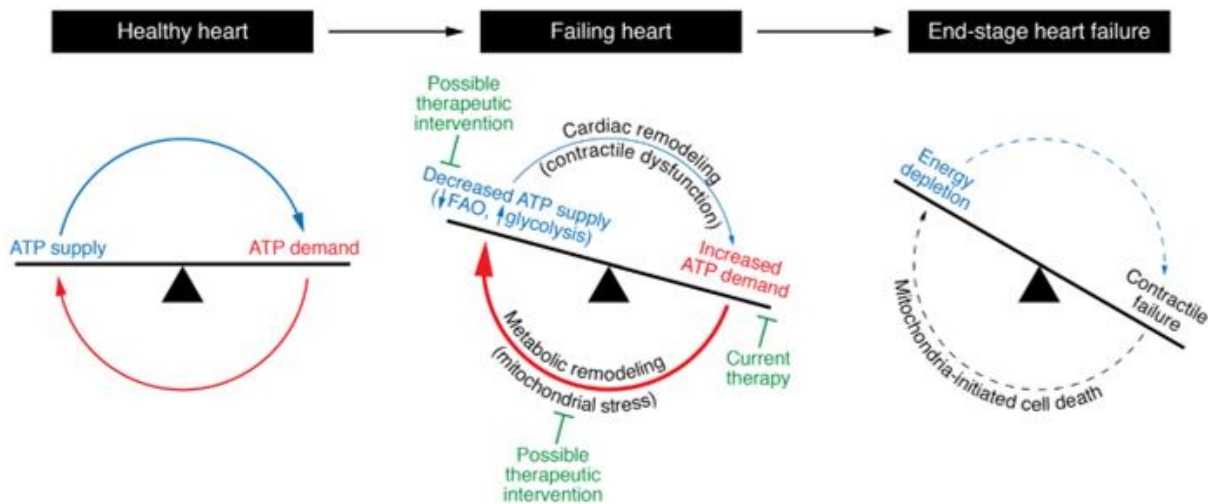
lactate pendant l'exercice. Cette flexibilité métabolique est également retrouvée en conditions pathologiques.

Lors de l'ischémie, l'interruption de l'apport d'oxygène favorise l'utilisation de la glycolyse anaérobie pour former l'ATP à partir des stocks de glycogènes présents dans l'organisme et de leur dégradation en lactate. Cependant, cette voie ne produit que de faibles quantités d'ATP par comparaison à la glycolyse aérobie et le cœur ne possède que de faibles réserves de glycogène qui est donc rapidement épuisé en cas d'ischémie sévère.

De façon similaire, le processus de remodelage est également associé à une modification de la source de production d'énergie. De plus, la diminution de la taille et l'augmentation du nombre de mitochondries ainsi que la diminution de l'expression des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale observés dans le RVG sont également associés à une diminution de la formation d'énergie et une altération du métabolisme oxydatif, conduisant à la diminution de la production d'ATP (Doenst, Dung Nguyen, and Dale Abel 2013). La diminution du métabolisme énergétique s'accompagne d'un *shift* métabolique, caractérisé par l'utilisation privilégiée de la glycolyse au lieu de la  $\beta$ -oxydation des acides gras.

En effet, bien que la quantité d'ATP produite par la  $\beta$ -oxydation des acides gras soit supérieure à la glycolyse, les acides gras constituent un substrat plus coûteux en oxygène. La  $\beta$ -oxydation des acides gras consomme ainsi 12% d'oxygène supplémentaire par comparaison à la glycolyse pour la formation d'une molécule d'ATP. Afin de continuer à produire la quantité suffisante d'ATP malgré la diminution de l'apport en oxygène, l'utilisation de la glycolyse aérobie est alors privilégiée, ce qui induit une réduction de 40% de la consommation en oxygène (Scolletta and Biagioli 2010).

De manière contradictoire, la diminution de la production d'énergie est associée à un besoin accru du besoin d'énergie induite par l'hypertrophie et s'expliquant notamment par la charge de travail, la stimulation neurohormonale, l'augmentation des organites intracellulaires ou encore la synthèse de protéines nécessaires au processus hypertrophique, conduisant à une perturbation de l'homéostasie entre la demande et la production en énergie. Le *shift* métabolique observé pendant le remodelage, bien que compensatoire dans un premier temps et permettant d'assurer la contractilité, conduit alors à une perte de l'équilibre entre la production et la demande d'ATP dans le cœur, favorisant l'évolution délétère du remodelage vers l'IC (B. Zhou and Tian 2018) (Figure 32).



**Figure 32 :** Evolution de la balance production/demande en énergie pendant le développement de l'IC (B. Zhou and Tian 2018).

ATP : adénosine triphosphate ; FAO : *fatty acids oxydation*.

Enfin des altérations importantes de la navette créatine-kinase ont été décrites dans les cardiomyopathies ou l'IC. On observe ainsi une diminution de l'activité de la navette créatine kinase qui se traduit par une augmentation de la créatine kinase cytosolique ainsi qu'une diminution de la créatine kinase mitochondriale et une diminution globale du flux de la créatine kinase (Ventura-Clapier 1998).

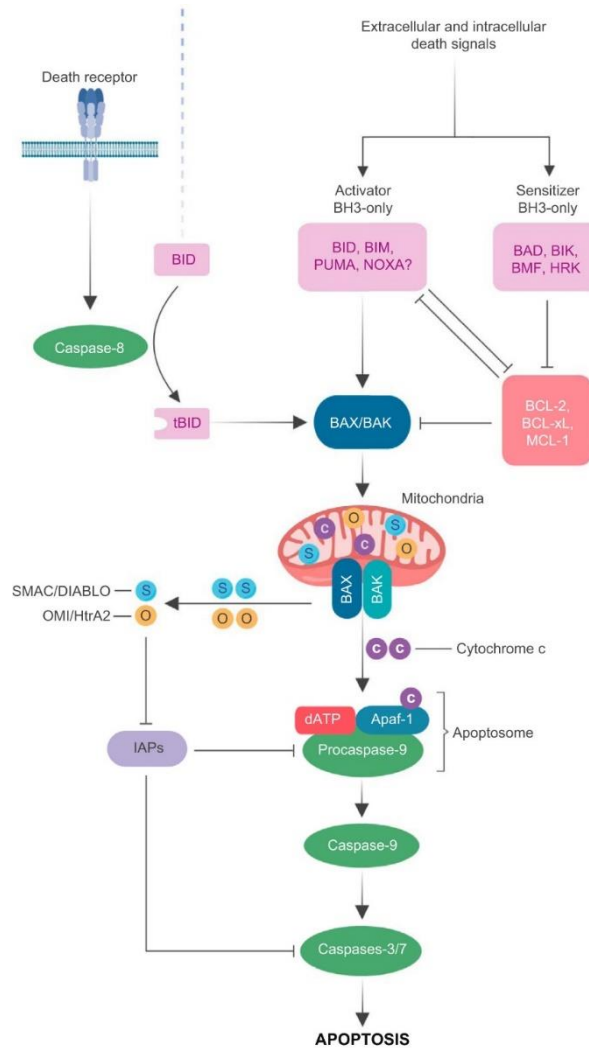
### 3.2) La mort cellulaire

#### 3.2.1) Voie mitochondriale de l'apoptose

La mort cellulaire par apoptose peut suivre deux voies différentes : la voie extrinsèque ou voie des récepteurs cellulaires, ainsi que la voie intrinsèque ou voie mitochondriale. La voie mitochondriale de mort cellulaire peut être activée par divers stimulus tels que l'hypoxie, l'ischémie/reperfusion, le stress oxydant, les dommages à l'ADN ou l'augmentation des concentrations cytoplasmiques ou mitochondriales en calcium (Del et al. 2019).

La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe constitue l'élément central de la voie mitochondriale de l'apoptose en permettant la libération du cytochrome C et l'activation des protéines caspases. Ce processus est régulé par les protéines de la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), qui peuvent être réparties en 3 sous-familles selon leur fonction et leurs domaines BH (*Bcl-2 Homology*) : les protéines « pro-survie » dont font partie Bcl-2, son isoforme long BCL-xL (*Bcl-2-like 1 long isoform*) ou encore MCL-1 (*Myeloid Cell Leukemia*

1), les protéines pro-apoptotiques à multidomaines telles que BAX (*Bcl-2 Associated X protein*) et BAK (*Bcl-2 Antagonist Killer 1*) et enfin les protéines pro-apoptotiques dites *BH3-only*, elles-mêmes divisées en activateurs avec BID (*Bcl-2 Interacting Domain death agonist*), BIM (*Bcl-2 Interacting Mediator of cell death*), PUMA (*p53 Upregulated Mediator of Apoptosis*) et NOXA (*phorbol-12-miristate-13-acetate-induced protein 1*) ou sensibilisateurs avec BAD (*Bcl-2 Agonist of cell Death*), BIK (*Bcl-2 Interacting Killer*), BMF (*Bcl-2 Modifying Factor*) et HRK (Harakiri) (Castanier and Arnoult 2010; Del et al. 2019) (Figure 34).



**Figure 34** : La voie mitochondriale de l'apoptose (Del et al. 2019).

BAD : *Bcl-2 Agonist of cell Death* ; BAK : *Bcl-2 Antagonist Killer 1* ; BAX : *Bcl-2 Associated X protein* ; BCL-2 : *B-cell lymphoma 2* ; BCL-XL : *Bcl-2-like 1 long isoform* ; BH3 : *Bcl-2 Homology 3* ; BID : *Bcl-2 Interacting Domain death agonist* ; BIK : *Bcl-2 Interacting Killer* ; BMF : *Bcl-2 modifying factor* ; dATP : désoxyadénosine triphosphate ; DIABLO : *Direct Inhibitor of Apoptosis Binding protein with Low PI* ; HRK : *Harakiri* ; HtrA2 : *High Temperature Requirement protein 2* ; IAPs : *Inhibitors of Apoptosis* ; MCL-1 : *Myeloid Cell Leukemia 1* ; NOXA : *phorbol-12-miristate-13-acetate-induced protein 1* ; PUMA : *p53 Upregulated Mediator of Apoptosis* ; SMAC : *Second Mitochondria-derived Activator of Caspase*.

L'ensemble de ces protéines est impliqué dans la régulation de la voie mitochondriale de l'apoptose selon différentes voies. Dans un premier cas, le signal apoptotique induit l'activation de la voie des protéines *BH3-only* activatrices qui induisent directement l'activation des protéines BAX et BAK. Dans un second cas, le signal apoptotique active les protéines *BH3-only* sensibilisatrices qui inhibent l'activité des protéines anti-apoptotiques et permettent indirectement l'activation des protéines BAX et BAK (Figure 34).

L'activation de la protéine BAX entraîne sa translocation à la mitochondrie sous forme d'oligomère où elle rencontre la protéine BAK qui reste quant à elle localisée au niveau de la membrane mitochondriale mais subit des changements de conformation au cours de l'apoptose (Wang and Youle 2009). L'hétéro-oligomérisation de BAX et BAK au niveau de la membrane externe mitochondriale entraîne la perméabilisation de cette dernière et la libération des facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome C, les facteurs SMAC/DIABLO (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis Binding protein with Low PI*) ou OMI/Htr2 (*High Temperature Requirement protein 2*) dans le cytosol. Le cytochrome C libéré peut ensuite s'associer à la protéine Apaf-1, permettant le recrutement et l'activation de la caspase 9. La protéine caspase 9 induira elle-même le recrutement et l'activation des caspases 3 et 7 et finalement l'apoptose de la cellule (Figure 34) (Castanier and Arnoult 2010; Del et al. 2019).

La voie extrinsèque et la voie intrinsèque de l'apoptose sont également liées l'une à l'autre par l'intermédiaire de la caspase 8. Cette protéine est activée par liaison d'un ligand à un récepteur de mort cellulaire, puis elle active la protéine BID qui sera alors capable de se lier à BAX et de l'activer, engageant ainsi la voie mitochondriale de l'apoptose (Figure 34) (Del et al. 2019).

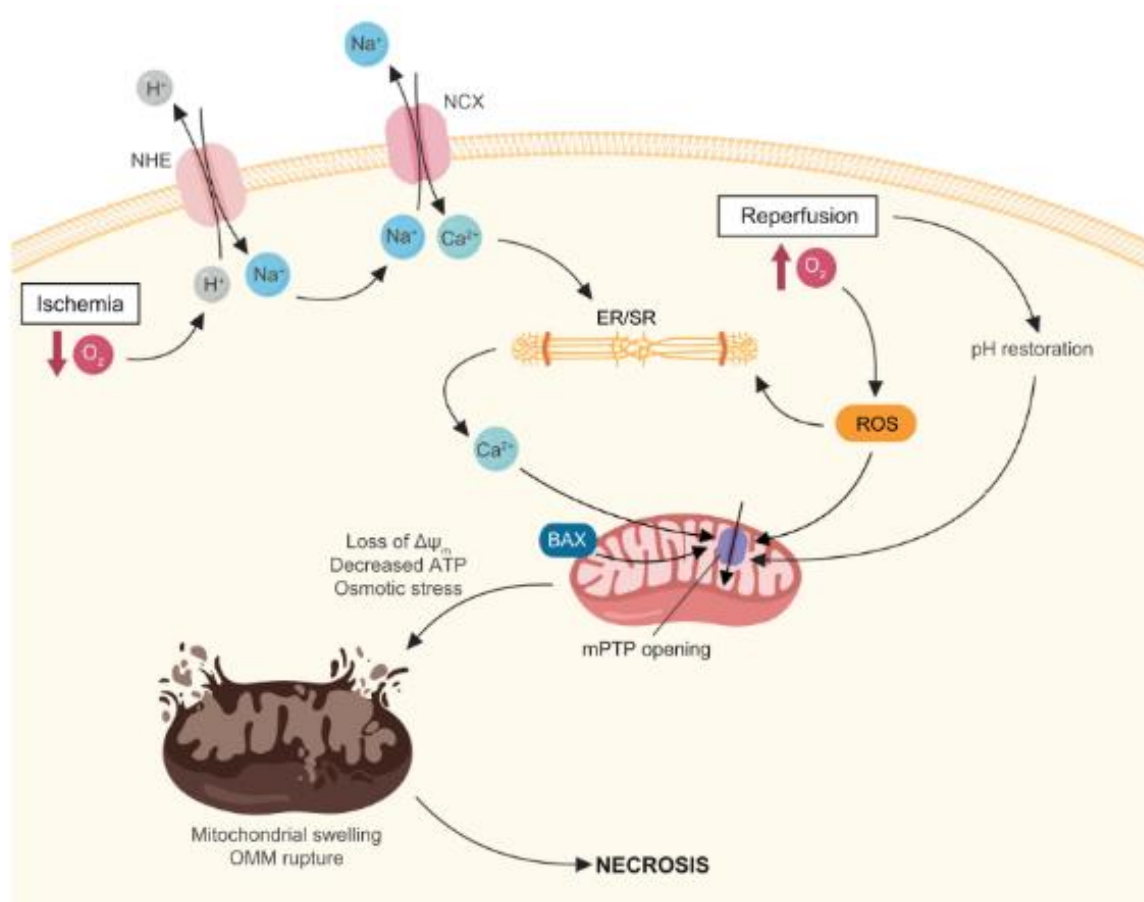
### 3.2.2) Voie mitochondriale de la nécrose.

La voie mitochondriale de la mort cellulaire par nécrose est moins connue que celle par apoptose. Elle se caractérise par l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP – *Mitochondrial Permeability Transition Pore*) au niveau de la membrane mitochondriale interne (Del et al. 2019).



Le MPTP consiste en un canal d'environ 2,3 nm de diamètre et de 1,5 kDa traversant les membranes mitochondriales externes et internes. Bien que la composition exacte du MPTP soit mal connue, sa formation semble impliquer la protéine ANT et le transporteur de phosphate mitochondrial Pic (*Phosphate Carrier*) au niveau de la membrane mitochondriale interne, la protéine VDAC (*Voltage-Dependant Anion Channel*) au niveau de la membrane mitochondriale externe ainsi que la cyclophiline D dans la matrice mitochondriale (Halestrap 2009; Webster 2012; Del et al. 2019). De récentes études suggèrent également un rôle des composants F1-F0 de l'ATP synthase dans la formation et l'ouverture du MPTP (Del et al. 2019).

L'ouverture du MPTP est principalement induite en conditions d'ischémie/reperfusion et de surcharge en calcium intracellulaire (Figure 35).



**Figure 35** : La voie mitochondriale de la nécrose (Del et al. 2019).

$\Delta\Psi_m$  : potentiel membranaire ; ATP : adénosine triphosphate ; BAX : *Bcl-2 Associated X protein* ;  $Ca^{2+}$  : calcium ; ER : réticulum endoplasmique ;  $H^+$  : proton ; mPTP : *mitochondrial permeability transition pore* ;  $Na^+$  : sodium ;  $O_2$  : dioxygène ; NCX : *Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger* ; NHE : *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger* ; OMM : *outer mitochondrial membrane* ; ROS : *reactive oxygen species* ; SR : réticulum sarcoplasmique.



En conditions d'ischémie, la diminution de la production d'ATP conduit à l'utilisation de la glycolyse anaérobie comme source d'énergie et à une diminution du pH. L'augmentation de la concentration cytosolique en protons favorise les échanges de sodium et de protons par l'intermédiaire de l'échangeur NHE ( $Na^+/H^+$  exchanger) ainsi que les échanges de calcium et de protons via l'échangeur NCX ( $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger) au niveau de la membrane plasmique. Ces échanges résultent en une augmentation de la concentration en calcium cytosolique, qui conduira ensuite à une augmentation de calcium par le réticulum endoplasmique et sarcoplasmique et à une surcharge cytosolique en calcium. Ce calcium sera dirigé vers la matrice mitochondriale par l'intermédiaire du MCU (*Mitochondrial Calcium Uniporter*) et sera ressenti par la protéine BAX, également impliquée dans la mort cellulaire par apoptose. La reperfusion entraîne l'ouverture du MPTP afin de neutraliser l'acidose cellulaire induite par l'ischémie. L'ouverture du MPTP entraîne une perte du potentiel membranaire mitochondrial, une perte d'ATP, la formation de ROS et un gonflement des mitochondries par entrée du contenu cytosolique, conduisant à la nécrose de la cellule (Murphy and Steenbergen 2008; Del et al. 2019).

### 3.2.3) Mort cellulaire mitochondriale dans le cœur.

De nombreuses pathologies cardiaques sont associées à la mort cellulaire régulée (apoptose) ou non régulée (nécrose), mais l'IDM et l'IC ont été particulièrement étudiés dans ce domaine.

Au cours de l'IDM, l'ischémie induite sur le cœur entraîne une mort cellulaire importante des cellules cardiomyocytaires et non cardiomyocytaires. La mort cellulaire constitue ainsi un événement central durant l'IDM. Bien que les stratégies de reperfusion permettent de réduire la taille de la zone infarctée, elles sont néanmoins associées à la mort cellulaire par nécrose par l'augmentation du calcium intracellulaire. La reperfusion est alors responsable de la moitié des dommages présentés par le myocarde (Del et al. 2019).

La mort cellulaire au cours de l'IC a été plus particulièrement étudiée dans le cas d'IC à fraction d'éjection préservée. Les techniques actuelles permettant l'étude de la mort cellulaire telles que la technique TUNEL ou l'expression des caspases permettent majoritairement l'étude de la mort cellulaire par apoptose. On observe ainsi une augmentation de la mort cellulaire par apoptose dans le cœur IC par comparaison au cœur sain chez l'Homme. Cependant, il est à

noter que la proportion de cellules touchées reste peu élevée. Bien que centrale dans l'IDM, la mort cellulaire semble donc être un procédé parmi les autres dans l'IC (Del et al. 2019).

Bien que les pathologies cardiovasculaires mettent en jeu de nombreux processus cellulaires, la mort cellulaire joue un rôle critique dans leur développement et les stratégies thérapeutiques visant à réguler la mort cellulaire montrent des résultats intéressants sur de nombreux modèles animaux. Cependant, il est encore difficile de savoir si les protéines impliquées dans la mort cellulaire peuvent également être impliquées dans d'autres processus physiologiques. La toxicité de ces stratégies thérapeutiques reste donc à évaluer (Orogo and Gustafsson 2013).

De nombreuses études ont enfin montré un lien étroit entre la production de ROS et la mort cellulaire dans les pathologies cardiaques. La production de ROS associée aux lésions cardiaques entraîne alors le déclenchement de différents types de mort cellulaires tels que la nécrose ou l'apoptose précédemment décrite, mais également de la mort cellulaire par ferroptose, consécutive à la peroxydation lipidique, ou en encore la nécroptose, faisant suite après l'activation des protéines RIP kinases (*Receptor Interacting Protein kinases*) (T. Xu et al. 2019). Bien que non détaillées ici, ces morts cellulaires sont consécutives à une augmentation de la production des ROS et l'installation d'un stress oxydant, faisant l'objet du chapitre suivant.

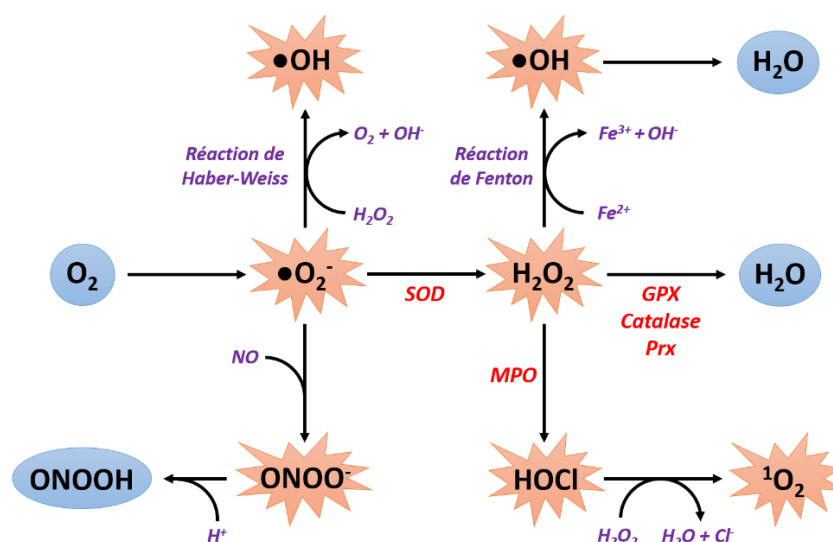
## III) Le stress oxydant

### 3) Définition

Le stress oxydant est défini comme un excès d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* – ROS) au sein de l'organisme, faisant suite à une perte de la balance existante entre la production de ROS et leur détoxification par les défenses anti-oxydantes, et menant à une dérégulation de la signalisation redox et à des dommages moléculaires (Haleng et al. 2007; Tsutsui, Kinugawa, and Matsushima 2011; Sies 2015).

Le terme de ROS désigne des espèces chimiques hautement réactives produites à partir de l'oxygène. Elles comprennent les radicaux libres qui sont des espèces chimiques possédant un électron non apparié, tels que les anions superoxydes ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) ou le radical hydroxyle ( $\bullet\text{OH}$ ), ainsi que les espèces non radicalaires qui sont capables de générer des radicaux libres et qui possèdent une toxicité importante comme le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Le dioxygène ( $\text{O}_2$ ) constitue le point de départ de la formation des ROS : en captant un électron, il entraîne la formation des anions superoxydes. Ces derniers constituent les ROS les plus abondants dans les cellules et sont à l'origine de la formation de tous les autres types de ROS (Zorov, Juhaszova, and Sollott 2014) (Figure 36).



**Figure 36** : Réactions de formation et de détoxification des ROS et acteurs impliqués.

$^1\text{O}_2$  : oxygène singulet ;  $\text{Cl}^-$  : ion chlorure ;  $\text{Fe}^{2+}$  : ion fer II ;  $\text{Fe}^{3+}$  : ion fer III ; GPX : glutathion peroxidase ;  $\text{H}^+$  : proton ;  $\text{H}_2\text{O}$  : eau ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  : peroxyde d'hydrogène ;  $\text{HOCl}$  : acide hypochloreux ; MPO : myéloperoxidases ;  $\text{NO}$  : oxyde nitrique ;  $\text{O}_2$  : dioxygène ;  $\bullet\text{O}_2^-$  : anion superoxyde ;  $\bullet\text{OH}$  : radical hydroxyle ;  $\text{ONOO}^-$  : peroxyde nitreux ;  $\text{ONOOH}$  : acide peroxyde nitreux ; Prx : peroxyrédoxines ; SOD : superoxyde dismutases.

Les anions superoxydes formés peuvent ensuite interagir avec l'oxyde nitrique (NO) pour former le peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) ou être convertis en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par l'action des enzymes superoxyde dismutase (SOD). Les anions superoxydes peuvent également interagir avec le peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Haber-Weiss pour conduire à la production du radical hydroxyle (Tsutsui, Kinugawa, and Matsushima 2011) (Figure 36).

Le peroxyde d'hydrogène peut conduire d'une part à la production de radical hydroxyle selon la réaction de Fenton en présence d'ions ferreux, d'autre part à la formation d'acide hypochloreux (HOCl) par l'action des myéloperoxydases. L'acide hypochloreux peut enfin interagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Haleng et al. 2007) (Figure 36).

Enfin, le peroxyde d'hydrogène est finalement détoxifié sous forme d'eau après action des enzymes glutathion peroxydase (GPX), catalase et peroxyrédoxines (Prx). Le peroxynitrite est quant à lui détoxifié en acide peroxynitreux (ONOOH) après captation d'un proton (Seddon, Looi, and Shah 2007; Haleng et al. 2007) (Figure 36).

En conditions physiologiques, la production des ROS est équivalente à leur détoxification. Cette production est aiguë et transitoire et les ROS formés auront un rôle de seconds messagers dans la cellule. Ils entraînent des modifications réversibles de l'activité des protéines telles que les facteurs de transcription, les protéines kinases ou encore les protéines phosphatases (Carrière et al. 2006).

En cas de stress oxydant, le système anti-oxydant n'est plus capable d'assurer efficacement la détoxification des ROS : la production de ROS devient alors chronique et ces derniers s'accumulent au sein de la cellule. Les ROS sont alors responsables de la peroxydation des lipides (entraînant une altération des membranes), de l'oxydation de l'ADN (responsable de mutations) ou encore de l'oxydation massive et irréversible des protéines (entraînant une perte de fonction) (Carrière et al. 2006; Seddon, Looi, and Shah 2007).

La toxicité des espèces radicalaires dépend de leur demi-vie (plus elle est courte, plus le ROS est instable et est susceptible d'attaquer des molécules) ainsi que de leur lieu de production (moins le ROS diffuse, plus il attaque de manière aspécifique les molécules aux alentours).

La toxicité des ROS non radicalaires dépend de la nature même de la molécule ainsi que de sa capacité à générer des espèces radicalaires.

Ainsi, le radical hydroxyl constitue le ROS radicalaire le plus instable et dont la toxicité est la plus forte (Zorov, Juhaszova, and Sollott 2014). De plus, bien que non radicalaire, le

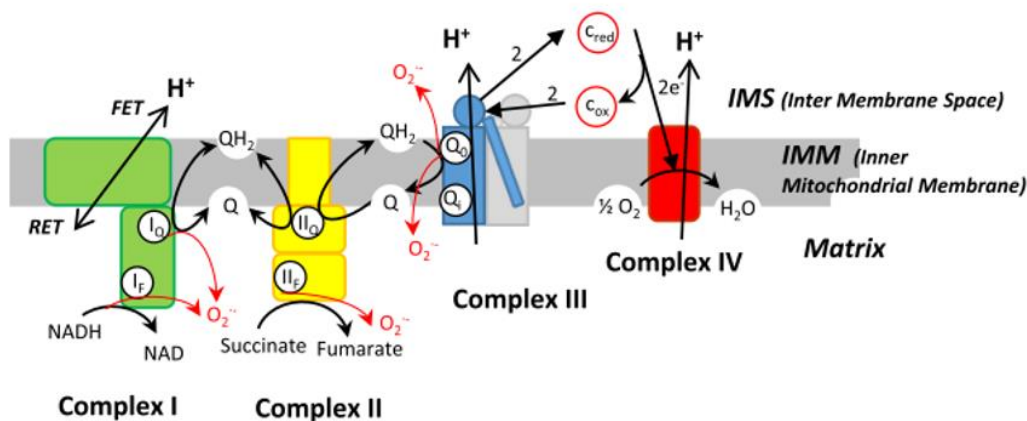
peroxyde d'hydrogène possède une toxicité importante et peut conduire à la formation de radicaux d'autant plus toxiques comme le radical hydroxyle.

Différents facteurs environnementaux tels que l'exposition aux rayons ultraviolets, aux radiations, le tabagisme ou la consommation excessive d'alcool favorisent la production des ROS et contribuent à l'apparition de nombreuses pathologies comme les cancers ou les maladies cardiovasculaires (Haleng et al. 2007).

## 4) Principales sources de production des ROS

### 2.1) La chaîne respiratoire mitochondriale

Les mitochondries, et plus particulièrement la chaîne respiratoire mitochondriale, représentent la principale source de ROS dans la cellule. Au cours de la respiration, les électrons sont transportés le long de la chaîne respiratoire jusqu'au complexe IV, où ils seront acceptés par l'oxygène qui sera ensuite réduit en eau. On estime que de 2% à 6% de cet oxygène échappe à la réaction de réduction et se trouve à l'origine de la production d'anions superoxydes (Haleng et al. 2007; Zorov, Juhaszova, and Sollott 2014) (Figure 37).



**Figures 37** : Sites possibles de production des anions superoxydes au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale (Mazat, Devin, and Ransac 2020).

•  $O_2^-$  : anion superoxyde ;  $I_F$  : flavin site of complex I ;  $I_Q$  : ubiquinone reducing site of complex I ;  $II_F$  : flavin site of complex II ;  $II_Q$  : ubiquinone reducing site of complex II ;  $C_{ox}$  : cytochrome C oxydé ;  $C_{red}$  : cytochrome C réduit ;  $e^-$  : électron ; FET : forward electron transport ;  $H^+$  : proton ;  $H_2O$  : eau ;  $O_2$  : dioxygène ; Q : coenzyme Q ;  $Q_0$  : site  $Q_0$  du complexe III ;  $Q_i$  : site  $Q_i$  du complexe III ;  $QH_2$  : ubiquinol ; RET : reverse electron transport.

L'utilisation des inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale tels que la roténone et l'antimycine, ainsi que les substrats pour les différents complexes tels que le pyruvate ou le

succinate, ont permis l'étude de la génération des ROS par la chaîne respiratoire et l'identification des complexes impliqués. A ce jour, les complexes I, II et III ont été identifiés comme sites de production des anions superoxydes (Scialò, Fernández-Ayala, and Sanz 2017; Mazat, Devin, and Ransac 2020) (Figure 37).

### **2.1.1) Le complexe I**

Au niveau du complexe I, la formation des anions superoxydes peut s'effectuer par le flux inverse d'électrons (*reverse electron transport* – RET). En présence d'une forte quantité de substrat pour le complexe II (succinate), on observe une augmentation du taux de coenzyme Q réduit ainsi qu'une augmentation de la force protomotrice. Ces modifications conduisent à la formation d'un flux inverse d'électrons, qui remontent depuis le complexe II vers le complexe I au niveau de son site I<sub>Q</sub> (*ubiquinone reducing site of complex I*). Ces électrons en flux inverse participent alors à la formation d'anions superoxydes (Carrière et al. 2006; Mazat, Devin, and Ransac 2020) (Figure 37).

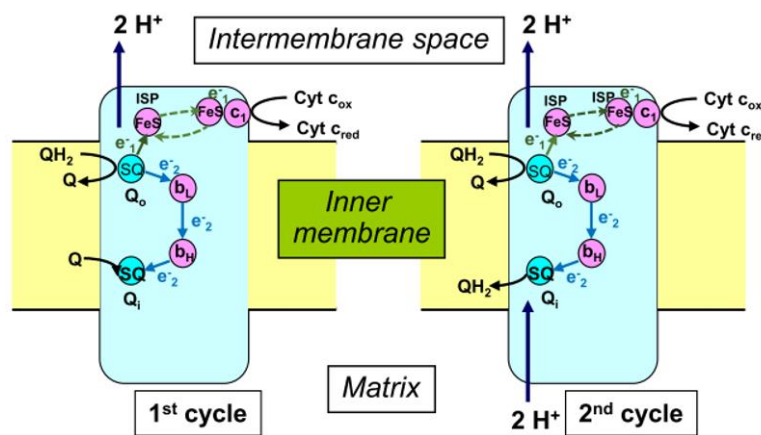
Les anions superoxydes peuvent également être formés lors du transport des électrons à travers le complexe I (*forward electron transport* – FET). En présence de substrat pour le complexe I (glutamate ou pyruvate combiné au malate) et en conditions d'inhibition du complexe I<sub>Q</sub> par la roténone, on observe une accumulation de NADH ainsi qu'une réduction excessive du site I<sub>F</sub> (*flavine site of complex I*) du complexe I, menant également à la formation d'anions superoxydes (Scialò, Fernández-Ayala, and Sanz 2017) (Figure 37).

### **2.1.2) Le complexe II**

Le complexe II de la chaîne respiratoire, et plus particulièrement le site II<sub>F</sub> (*flavine site of complex II*), serait également à l'origine de la formation d'anions superoxydes. En conditions physiologiques, la proportion d'anions superoxydes produite par le complexe II est relativement faible : elle est plus particulièrement observée en conditions d'inhibition des complexes I et III, respectivement par la roténone et l'antimycine, en présence d'un fort taux de succinate. Ce dernier apporte les électrons nécessaires à la réduction du coenzyme Q en ubiquinol, qui s'accumule alors dans l'espace inter-membranaire, bloquant le passage d'électron et favorisant la formation d'anions superoxydes. Cette production est également augmentée en cas de mutations présentes au niveau du complexe II (Zorov, Juhaszova, and Sollott 2014; Mazat, Devin, and Ransac 2020) (Figure 37).

### 2.1.3) Le complexe III

Le site  $Q_0$  du complexe III de la chaîne respiratoire possède la plus grande capacité de production de ROS. Particulièrement, le semiquinone (SQ) formé au cours du cycle Q semble être à l'origine de la formation des anions superoxydes. L'utilisation de l'antimycine, inhibiteur du site  $Q_i$  du cycle Q, a notamment permis l'identification du complexe III comme étant producteur d'anions superoxydes (Carrière et al. 2006; Mazat, Devin, and Ransac 2020) (Figure 38).



**Figure 38** : Représentation schématique du cycle Q du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale (Mazat, Devin, and Ransac 2020).

$b_H$  : hème  $b_H$  ;  $b_L$  : hème  $b_L$  ;  $c_1$  : cytochrome  $c_1$  ;  $Cyt c_{ox}$  : cytochrome C oxydé ;  $Cyt c_{red}$  : cytochrome C réduit ;  $e^-$  : électron ; FeS : sulfure de fer ;  $H^+$  : proton ; Q : coenzyme Q / ubiquinone ;  $Q_0$  : site  $Q_0$  du complexe III ;  $QH_2$  : ubiquinol ; SQ : semiquinone.

Le cycle Q permet la réoxydation successive des deux fonctions du coenzyme Q, également appelé ubiquinone. Au début du cycle, la réduction de l'ubiquinol ( $QH_2$ ) en ubiquinone entraîne la perte de deux électrons et la formation du semiquinone. Ce dernier transfère ensuite un premier électron au niveau du centre FeS (sulfure de fer) de la protéine ISP (*Iron Sulphur Protein*), afin de réduire le cytochrome  $c_1$ , qui cède ensuite lui-même un électron au cytochrome  $c$ , entraînant sa réduction. Dans le même temps, le semiquinone transfère un second électron vers l'hème  $b_L$  possédant un potentiel faible. Cet électron sera ensuite dirigé vers l'hème  $b_H$ , possédant un potentiel plus important, puis vers le site  $Q_i$  où il permettra la réduction d'une seconde molécule d'ubiquinone.

Ce cycle Q est ensuite répété une seconde fois afin permettre la réduction complète du semiquinone présent au site  $Q_i$  du complexe III et la formation d'une nouvelle molécule d'ubiquinol (Zorov, Juhaszova, and Sollott 2014; Mazat, Devin, and Ransac 2020).

Récemment, trois scénarios pouvant expliquer la formation d'anions superoxydes par le complexe III ont été décrits. Chacun de ces scénarios propose un défaut de transfert d'électron au cours du cycle Q, le laissant alors libre de réagir avec le dioxygène pour former l'anion superoxyde (Mazat, Devin, and Ransac 2020).

Dans le premier, la protéine ISP quitte le site  $Q_0$  et réduit le cytochrome c1 avant que le second électron ne soit transmis à l'hème  $b_L$ .

Dans le deuxième, la protéine ISP quitte le site  $Q_0$  après le transfert du second électron depuis l'hème  $b_L$  vers l'hème  $b_H$ .

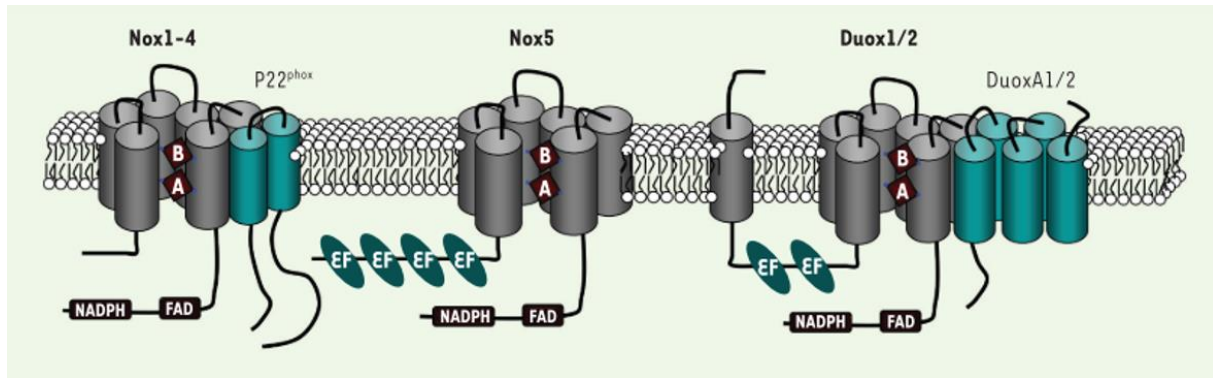
Enfin, le troisième scénario est celui d'un « court-circuit » au cours duquel l'hème  $b_L$  réduit ne transfère pas son électron vers l'hème  $b_H$  mais plutôt vers le site  $Q_0$  en prenant la direction inverse.

## 2.2) Les NADPH oxydases

Les NADPH oxydases (NOX) constituent une famille de complexes enzymatiques membranaires dont la fonction première est la production de ROS : elles catalysent la réaction de réduction monoélectrique du dioxygène en anion superoxyde en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électron (Migdal and Serres 2011). On distingue deux types principaux de NOX : les NOX à six domaines transmembranaires, dénommés NOX1 à NOX5, ainsi que les NOX à sept domaines transmembranaires, nommés DUOX1 et 2 (*dual oxidase 1 et 2*).

L'ensemble des NOX possède une structure commune formée d'un noyau flavocytochrome, également appelé domaine Nox. Ce noyau comprend six domaines transmembranaires en hélice  $\alpha$  connectés entre eux par cinq boucles et fixant deux hèmes A et B (par quatre histidines présentes sur les domaines 3 et 5), ainsi qu'un domaine cytoplasmique déshydrogénase constituant le domaine catalytique des NOX et possédant quatre sites de fixation du NADPH et deux sites de fixation du FAD. Le complexe NOX5 possède, en plus de ce noyau, des motifs riches en *EF hands* en position amino-terminale, permettant la fixation du calcium. Enfin, les DUOX1 et 2 possède la même structure que NOX5 à laquelle s'ajoute un passage transmembranaire supplémentaire en position amino-terminale ainsi qu'une séquence homologue à celle des peroxydases (Chuong Nguyen et al. 2015) (Figure 39).





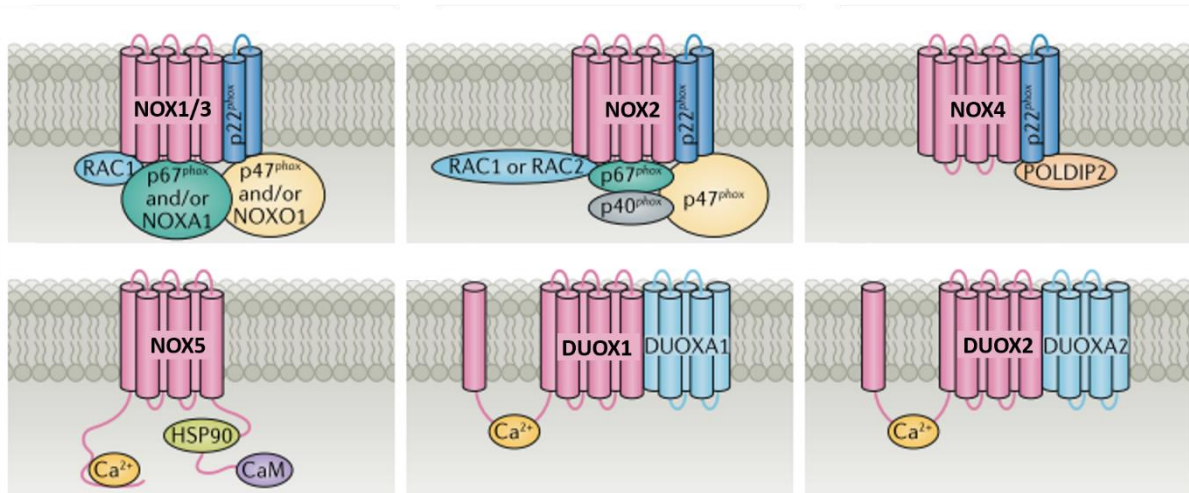
**Figure 39** : Représentation schématique de la structure des complexes NOX et DUOX (Chuong Nguyen et al. 2015).

A : hème A ; B : hème B ; EF : *EF hands* ; FAD : flavine adénine dinucléotide ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; NOX : NADPH oxydase ; DUOX : *dual oxidase*.

Les structures des NOX1 à 4 sont stabilisées par la liaison de la sous-unité P22<sup>phox</sup> au domaine Nox, tandis que les DUOX sont stabilisées par liaison de Nox avec les activateurs DuoxA1 et 2. Le complexe NOX5 forme quant à lui une entité unique ne possédant uniquement qu'un domaine catalytique (Chuong Nguyen et al. 2015; Zhang et al. 2020) (Figure 39). Le complexe NOX2 est le premier complexe NOX à avoir été découvert : sa structure ainsi que son activation ont été particulièrement étudiées et sont à ce jour les mieux connues. La structure des autres NOX ainsi que celles des DUOX a été déduite selon leur degré d'homologie avec NOX2.

L'activation des NOX nécessite l'intervention de différents acteurs protéiques. En conditions physiologiques, les domaines Nox2 et P22<sup>phox</sup> de NOX2 sont localisés au niveau de la membrane cellulaire et sont inactifs. L'activation de NOX2 nécessite l'association des sous-unités cytosoliques P67<sup>phox</sup>, P47<sup>p<sup>phox</sup></sup>, P40<sup>phox</sup> et de la protéine RAC 1 ou 2 au flavocytochrome. Puis la phosphorylation de P47<sup>phox</sup> permet sa liaison avec P22<sup>phox</sup> au niveau de sa région riche en proline, tandis que l'activation de la protéine RAC permet l'amplification de l'activation de NOX2 (Murdoch et al. 2006; Y. Zhang et al. 2020) (Figure 40).

Les mécanismes d'activation des complexes NOX1 et 3 sont proches de ceux de NOX2. Mais contrairement à ce dernier, ils possèdent une activité constitutive faible à l'état basal (Chuong Nguyen et al. 2015; Zhang et al. 2020). L'activation cytosolique est réalisée par la protéine RAC 1 ainsi que par la sous-unité P47<sup>phox</sup> qui peut être associée ou remplacée par la sous-unité Noxo1. De même, la sous-unité P60<sup>phox</sup> peut également être associée ou remplacée par la sous-unité Noxa1 (Murdoch et al. 2006; Y. Zhang et al. 2020) (Figure 40).



**Figure 40** : Mécanismes d'activation des NOX et DUOX et acteurs impliqués (d'après Zhang et al. 2020).

Ca<sup>2+</sup> : ion calcium ; CaM : calmoduline ; DUOX : *dual oxidase* ; HSP90 : *heat shock protein of 90 kDa* ; NOX : *NADPH oxidase* ; POLDIP2 : *polymerase  $\delta$ -interacting protein 2*.

L'activation de NOX4 est constitutive et ne nécessite pas de régulation par des sous-unités cytosoliques (Murdoch et al. 2006; Chuong Nguyen et al. 2015). Cependant, son activité enzymatique est augmentée par liaison de la protéine POLDIP2 (*polymerase  $\delta$ -interacting protein 2*) avec le domaine P22<sup>phox</sup> (Y. Zhang et al. 2020) (Figure 40).

L'activation de NOX5 dépend quant à elle de la fixation du calcium au niveau de son domaine *EF-hands*. La fixation du calcium entraîne ainsi un changement de conformation de NOX5, permettant l'interaction des domaines N-terminal et C-terminal de NOX5 et conduisant à son activation (Chuong Nguyen et al. 2015; Y. Zhang et al. 2020) (Figure 40).

De manière similaire, l'activation de DUOX1 et 2 est dépendante de la fixation du calcium sur le domaine *EF-hands* ainsi que la phosphorylation des domaines DuoxA1 et 2 (Chuong Nguyen et al. 2015) (Figure 40).

L'isoforme NOX2 a d'abord été détectée dans les cellules phagocytaires où elle joue un rôle primordial dans la défense face aux pathogènes. Puis les NOX ont ensuite été détectées dans les cellules non-phagocytaires et de manière tissu-spécifique dans l'organisme (Chuong Nguyen et al. 2015). L'isoforme NOX3 est exclusivement exprimé dans l'oreille interne, tandis que les isoformes DUOX1 et 2 sont particulièrement retrouvés dans la thyroïde, l'épithélium pulmonaire et le colon. Seules les NOX1, 2, 4 et 5 sont notamment exprimées dans le système cardiovasculaire. A l'intérieur même du système cardiovasculaire, les NOX possèdent également des localisations et expressions subcellulaires différentes (Zhang et al. 2020) (Figure 41).

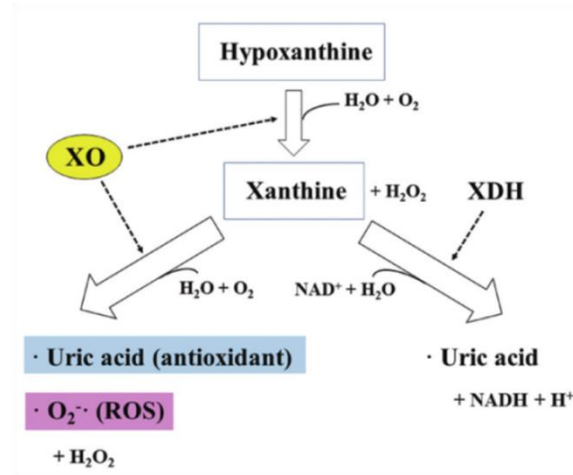
**Table 4** : Expression tissulaire et subcellulaire des isoformes NOX et DUOX.

Isoforme	Expression tissulaire préférentielle	Expression cardiovasculaire
<b>NOX1</b>	- Epithélium pulmonaire - Colon - Cellules musculaires lisses	- Cellules musculaires lisses - Cellules endothéliales - Cardiomyocytes
<b>NOX2</b>	- Cellules phagocytaires - Lignée myéloïde - Neurones - Cellules souches embryonnaires	- Cellules endothéliales - Fibroblastes - Cardiomyocytes
<b>NOX3</b>	- Oreille interne	Non exprimé
<b>NOX4</b>	- Rein - Pancréas - Ostéoclastes - Chondrocytes	- Cellules endothéliales - Cellules musculaires lisses - Fibroblastes - Cardiomyocytes
<b>NOX5</b>	- Tissus lymphoïdes	- Cellules endothéliales - Cellules musculaires lisses - Cardiomyocytes
<b>DUOX1/2</b>	- Thyroïde - Epithélium pulmonaire - Colon	Non exprimé

### 2.3) Les xanthines oxydoréductases

Les xanthines oxydoréductases sont des enzymes impliquées dans la dégradation de la purine et le métabolisme de l'acide urique, en convertissant l'hypoxanthine en xanthine puis la xanthine en acide urique. Elles existent sous deux formes séparées mais interconvertibles entre elles : la xanthine déshydrogénase (XDH) et la xanthine oxydase (XOD) (George and Struthers 2009). Ces deux formes diffèrent par leur affinité pour l'accepteur d'électrons : la XDH favorise le NAD<sup>+</sup> en tant qu'accepteur d'électrons, tandis la XOD utilise davantage le dioxygène (Wu et al. 2018) (Figure 41).

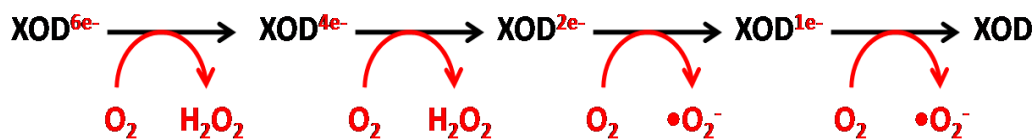
Au niveau structural, les xanthines oxydoréductases sont des homodimères pour lesquels chaque monomère est formé de trois sous-unités associées à un co-facteur spécifique. Chaque monomère est ainsi formé d'un domaine N-terminal possédant un centre Fe-S, un domaine C-terminal possédant un site de liaison avec le molybdopterin (Mo-Co) ainsi qu'un domaine intermédiaire possédant un site de liaison avec le FAD et relié avec les domaine N-terminal et le domaine C-terminal par un peptide (Berry and Hare 2004).



**Figure 41** : Schéma représentatif de la génération des ROS par la xanthine oxydase (Noma, Kihara, and Higashi 2017).

$H^+$  : proton ;  $H_2O$  : eau ;  $H_2O_2$  : peroxyde d'hydrogène ; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide ;  $O_2$  : dioxygène ;  $\bullet O_2^-$  : anions superoxydes ; ROS : *reactive oxygen species* ; XDH : xanthine déshydrogénase ; XO : xanthine oxydase.

Au niveau fonctionnel, la formation de l'acide urique à partir de la xanthine nécessite une réduction de la XOD par acceptation de deux électrons au niveau de son centre Mo-Co. La XOD complètement réduite possède six électrons : ces derniers sont alors transférés en quatre étapes au dioxygène lors de la réoxydation du XOD, menant à la formation de ROS. Au cours des deux premières étapes, la XOD perd deux électrons qui seront transmis au dioxygène, conduisant à la formation de peroxyde d'hydrogène. Dans les deux étapes suivantes, la XOD perd un électron, conduisant à la formation d'anions superoxydes. Finalement, la réoxydation de la XOD conduira à la formation de deux molécules de peroxyde d'hydrogène et de deux anions superoxydes (Berry and Hare 2004; George and Struthers 2009) (Figure 42).



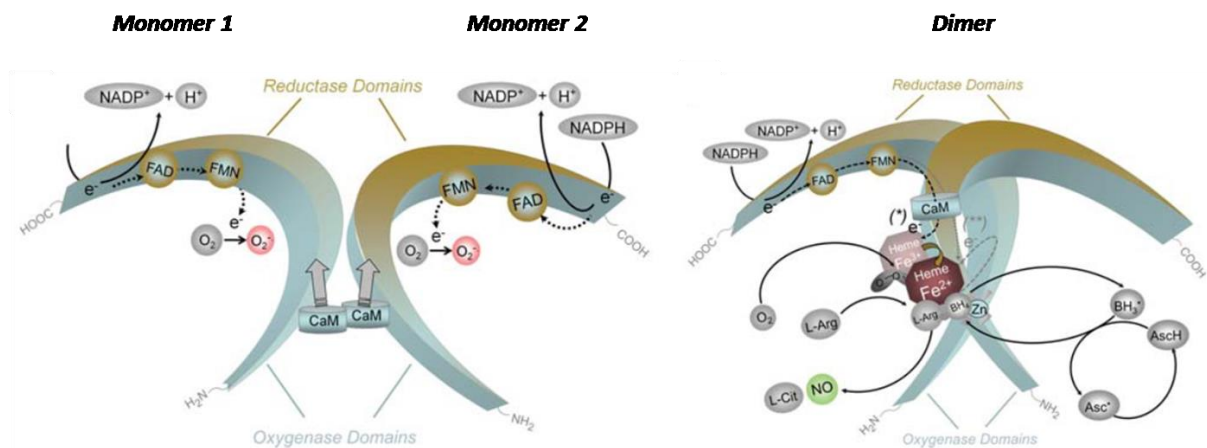
**Figure 42** : Réactions de réoxydation de la XOR menant à la formation de ROS.  
 $e^-$  : électron ;  $H_2O_2$  : peroxyde d'hydrogène ;  $O_2$  : dioxygène ;  $\bullet O_2^-$  : anions superoxydes ; XOD : xanthine oxydase.

## 2.4) Les NO synthases

Les NO synthases (NOS) sont des enzymes responsables de la synthèse d'oxyde nitrique (NO) à partir de la L-arginine en présence de co-facteurs et d'oxygène. Elles sont capables de

produire deux types de ROS : les anions superoxydes et l'oxyde nitrique. A ce jour, trois catégories de NOS ont été identifiées : les NOS de type I ou NOS neuronaux (NOS1 ou nNOS), les NOS de type II ou NOS inducibles (NOS2 ou iNOS) ainsi que les NOS de type III ou NOS endothéliaux (NOS3 ou eNOS). Les isoformes NOS1 et NOS3 sont constitutivement exprimées dans le cœur, plus particulièrement dans le muscle strié et les cellules endothéliales, et possèdent une activité dépendante du calcium. L'isoforme NOS2 possède une activité indépendante du calcium. Elle n'est pas constitutivement exprimée dans le cœur sain mais elle s'exprime en conditions pathologiques telles que l'inflammation (Loyer, Heymes, and Samuel 2008; Umar and Van Der Laarse 2010).

L'ensemble des NOS utilise la L-arginine en tant que substrat, ainsi que l'oxygène et le NADPH en tant que co-substrats. Les NOS sous forme de monomères sont inactives : elles deviennent actives sous la forme de dimères en s'associant grâce à un hème ferreux (Förstermann and Sessa 2012) (Figure 43).



**Figure 43** : Structure et mécanisme catalytique des NOS (Förstermann and Sessa 2012).

Asc : ascorbate ; AcsH : acide ascorbique ;  $BH_3^+$  : trihydrobioptérine ;  $BH_4$  : tetrahydrobioptérine ; CaM : calmoduline ; COOH : acide carboxylique ;  $e^-$  : électron ; FAD : flavine adénine dinucléotide ;  $Fe^{2+}$  : ion fer II ;  $Fe^{3+}$  : ion fer III ; FMN : flavine mononucléotide ;  $H^+$  : proton ; L-Arg : L-Arginine ; L-Cit : L-citrulline ; NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ;  $NH_2$  : amine ; NO : oxyde nitrique ;  $O_2$  : dioxygène ;  $\bullet O_2^-$  : anion superoxyde ; Zn : zinc.

Sous la forme de monomère, les NOS ne peuvent pas interagir avec leur substrat L-Arginine et leur co-facteur tétrahydrobioptérine ( $BH_4$ ). Les domaines réductase interagissent alors avec la calmoduline (CaM) pour déclencher le transfert d'électrons depuis le NADPH vers le FAD, puis du FAD vers le FMN (flavine mononucléotide). Les électrons sont ensuite transférés du FMN au dioxygène, entraînant la formation d'anions superoxydes (Figure 37).

En présence d'un hème ferreux, les NOS forment un dimère fonctionnel. Le recrutement de la CaM nécessite alors de fortes concentrations en calcium pour les NOS1 et 3, tandis que la forte affinité de la CaM pour son site de liaison chez les NOS2 ne nécessite pas de forte concentration en calcium. On retrouve enfin un ion zinc à l'interface du dimère, permettant la liaison de la L-arginine et du co-facteur BH<sub>4</sub> au dimère.

Dans la forme dimérique active, de manière similaire à la forme monomérique, les électrons sont d'abord transférés du NADPH vers le FAD puis le FMN. Les électrons du FMN sont ensuite transférés vers la CaM au lieu du dioxygène, puis vers l'hème ferreux auquel se lie le dioxygène. En présence d'une quantité suffisante de substrat et de BH<sub>4</sub>, le NO et la L-citrulline sont alors formés (Förstermann and Sessa 2012).

En conditions physiologiques, le NO est une molécule cytoprotectrice : elle possède une action vasodilatatrice et permet l'inhibition de l'activation et de l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles et possède des effets protecteurs contre l'ischémie reperfusion et l'IC (Loyer, Heymes, and Samuel 2008; Tsutsui, Kinugawa, and Matsushima 2011). Cet effet protecteur s'explique notamment par la stimulation de la guanylyl cyclase, entraînant une diminution du taux de calcium intracellulaire et une diminution du stress oxydant (Tsutsui, Kinugawa, and Matsushima 2011). Le NO n'est donc pas lui-même toxique pour l'organisme. Cependant, lorsque le NO et les anions superoxydes sont produits simultanément et dans un périmètre limité, ils peuvent entrer en contact et former du peroxynitrite, qui possède quant à lui une toxicité importante pour l'organisme (Tsutsui, Kinugawa, and Matsushima 2011).

## ***2.5) Autres sources de ROS***

D'autres voies enzymatiques peuvent également être responsables en moindre mesure de la formation des ROS.

Le métabolisme de l'acide arachidonique, issu de la conversion des phospholipides membranaires par la phospholipase A2 par la voie des cyclo-oxygénase et des lipoxygénases, est ainsi associé à la production d'anions superoxydes.

Le cytochrome P450 peut également être à l'origine de la production de ROS.

Des stimuli exogènes comme l'irradiation, ou encore des agents toxiques tels que l'amiante ou le tétrachlorure, peuvent également induire un stress oxydant.



Enfin, certaines thérapies comme les xénobiotiques ou les anticancéreux tels que les anthracyclines peuvent également induire un stress oxydant qui peut soit se révéler être toxique ou au contraire participer à l'effet thérapeutique.

### 3) Systèmes anti-oxydants

#### 3.1) Principaux systèmes de défense enzymatiques

##### 3.1.1) Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloprotéines constituant le premier maillon de la chaîne de détoxification : elles catalysent la réaction de dismutation des anions superoxydes en peroxydes d'hydrogène (Figure 44). Il s'agit de l'enzyme anti-oxydante la plus efficace de l'organisme : en détoxifiant les anions superoxydes, elle inhibe leur réaction avec le NO et empêche la formation de peroxynitrite. Cependant, l'action des SOD doit être couplée à l'action d'enzymes anti-oxydantes capables de dégrader le peroxyde d'hydrogène, lui même toxique, afin qu'il ne s'accumule pas dans la cellule.



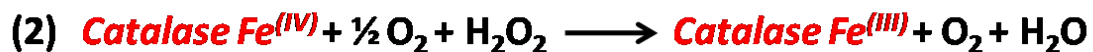
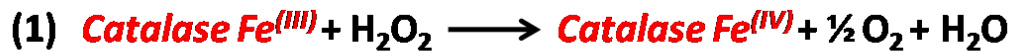
**Figure 44** : Mécanisme réactionnel des SOD.

H<sub>2</sub> : dihydrogène ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène ; O<sub>2</sub> : dioxygène ; •O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anion superoxyde ; SOD : superoxyde dismutase.

On distingue trois isoformes de SOD, possédant des localisations différentes: l'isoforme SOD1 possède une localisation cytosolique, SOD2 est localisée principalement dans les mitochondries et SOD3 est une protéine extracellulaire sécrétée par les cellules musculaires lisses (Haleng et al. 2007). Ces isoformes nécessitent également des co-facteurs métalliques et une dimérisation différente pour leur activité : le dimère SOD1 et le tétramère SOD3 nécessitent une liaison au cuivre (Cu) et au zinc (Zn) d'où leurs noms de Cu-ZnSOD, tandis que le tétramère SOD2, également appelée MnSOD, utilise le manganèse (Mn) en tant que co-facteur.

### 3.1.2) La catalase

La catalase est une enzyme catalysant la détoxification du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et en eau. Il s'agit d'une protéine héminique : les catalases se présentent sous la forme de tétramères pour lequel chaque sous-unité présente un site actif sous la forme d'un hème. La catalase permet la détoxification de deux peroxydes d'hydrogène selon un mécanisme réactionnel qui se déroule en deux étapes (Figure 45).



**Figure 45** : Mécanisme réactionnel de la catalase.  
 H<sub>2</sub>O : eau; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène ; O<sub>2</sub> : dioxygène.

La catalase possède une fonction dépendante de la concentration en peroxyde d'hydrogène : en cas de forte concentration en peroxyde d'hydrogène, elle possède son activité catalytique de détoxification précédemment décrite ; en cas de faible concentration en peroxyde d'hydrogène, elle possède une activité peroxydase et réalise une réaction de peroxydation de différents substrats tels que les fonctions alcools ou l'acide ascorbique (Sepasi Tehrani and Moosavi-Movahedi 2018). Au sein de la cellule, la catalase est localisée dans le peroxisome et en moindre mesure dans le cytosol (Sepasi Tehrani and Moosavi-Movahedi 2018).

### 3.1.3) Les peroxyrédoxines

Les peroxyrédoxines (Prx) sont des enzymes capables de réduire les fonctions peroxydes (R-OO-R') de certaines molécules dont le peroxyde d'hydrogène et le peroxydinitrite. Chez l'Homme, on distingue six isoformes différentes des Prx, possédant des localisations subcellulaires différentes, ainsi que des sous-types différents selon l'origine des résidus cystéine (Cys ou C) nécessaires à leur activité (Detienne et al. 2018) (Table 5).

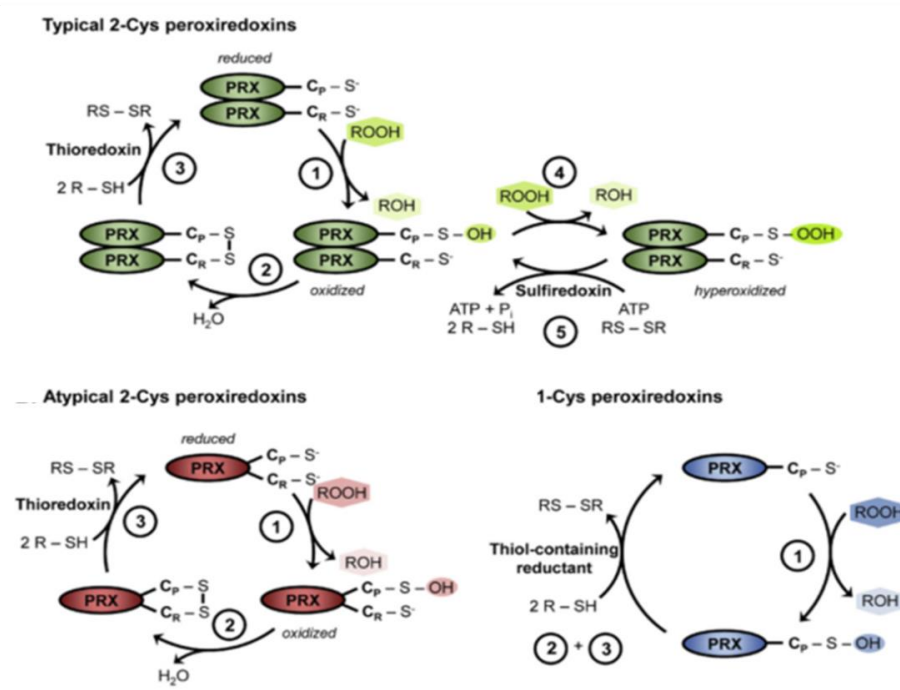


**Table 5** : Sous-types et localisations subcellulaires des isoformes Prx (Detienne et al. 2018).

Isoforme	Sous-type	Localisation
Prx1	2-Cys typique	Cytoplasme
Prx2	2-Cys typique	Cytoplasme
Prx3	2-Cys typique	Mitochondries
Prx4	2-Cys typique	Cytoplasme Réticulum endoplasmique Extracellulaire (sécritée)
Prx5	2-Cys atypique	Cytoplasme Mitochondries Peroxisomes
Prx6	1-Cys	Mitochondries

L'activité catalytique des Prx leur est conférée par un motif PxxxTxxC présent au sein du domaine catalytique et appelée motif C<sub>P</sub>-loop. Le résidu cystéine (C<sub>P</sub>) de ce motif possède une fonction thiol (R-SH) essentielle à l'activité des Prx, tandis que les résidus thréonine (T) et proline (P) permettent le maintien du résidu C<sub>P</sub> sous la forme active (Detienne et al. 2018).

Les Prx possèdent un cycle catalytique en trois étapes : la peroxydation, la résolution et le recyclage (Detienne et al. 2018) (Figure 46).

**Figure 46** : Cycle catalytique des Prx (Detienne et al. 2018).

1 : étape de peroxydation ; 2 : étape de résolution ; 3 : étape de recyclage ; 4 : étape d'hydroxydation ; 5 : étape de sauvetage ; ATP : adénosine triphosphate ; C<sub>P</sub> : cystéine peroxydatique ; C<sub>R</sub> : résidu cystéine ; Cys : cystéine ; H<sub>2</sub>O : eau ; Pi : phosphate inorganique ; Prx : peroxyredoxine.

Au cours de la peroxydation, le résidu  $C_P$  est oxydé : il attaque la fonction peroxyde de la molécule cible pour former une fonction alcool (-OH) ou de l'eau (Figure 46).

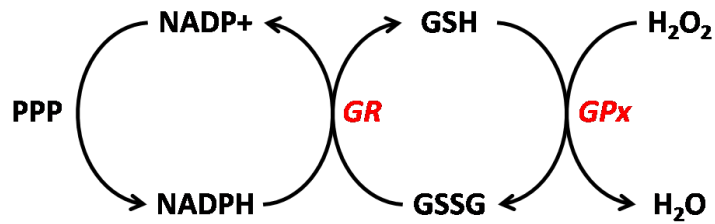
Durant l'étape de résolution, le résidu  $C_P$  agit avec un nouveau résidu cystéine  $C_R$  afin de former un pont disulfure intermédiaire (Figure 46). On distingue ainsi trois sous-types de Prx selon l'origine du résidu  $C_R$  : les 2-Cys typiques, les 2-Cys atypiques et les 1-Cys. Les Prx 2-Cys typiques fonctionnent en homodimères : les résidus  $C_P$  et  $C_R$  proviennent alors chacun de l'un de monomères. Les Prx 2-Cys atypiques possèdent leurs résidus  $C_P$  et  $C_R$  sur la même protéine. Enfin, les Prx 1-Cys ne possèdent que le résidu  $C_P$  et nécessitent une seconde molécule possédant une fonction thiol pour l'étape de résolution.

La dernière étape est celle du recyclage : le pont disulfure intermédiaire formé lors de l'étape de résolution est réduit, permettant la restauration de la forme active des Prx qui pourront de nouveau agir avec de nouvelles fonctions hydroxydes (Figure 46). De nouveau, le réducteur utilisé varie selon le sous-type de Prx : la thioredoxine sera favorisée pour les Prx 2-Cys typiques et atypiques, tandis que les Prx 1-Cys utilisent préférentiellement le glutathion en tant que réducteur.

Suite à l'étape de peroxydation, certaines Prx oxydées peuvent subir une peroxydation par une nouvelle fonction peroxyde au cours de l'étape d'hyperoxydation, qui entre en compétition avec la résolution (Figure 46). Cette hyperoxydation conduit à la formation d'une Prx hyperoxydée et d'une fonction acide sulfinique (-OOH). Cette dernière est ensuite réduite lors de l'étape de sauvetage par un réducteur de l'acide sulfinique tel que la sulfiredoxine. La Prx revient alors en son état normal d'oxydation et peut poursuivre son cycle catalytique en étape de recyclage (Detienne et al. 2018) (Figure 46).

#### **3.1.4) Les glutathion peroxydases**

Les glutathion peroxydases (GPx) sont des sélénoprotéines tétramériques localisées dans le cytoplasme et les mitochondries. Elles sont responsables de la détoxification du peroxyde d'hydrogène en eau et de l'élimination des résidus peroxydes des lipides en utilisant les capacités réductrices du couple glutathion/glutathion disulfure (GSH/GSSG) (Figure 47).



**Figure 47** : Mécanisme de détoxification du peroxyde d'hydrogène par la GPx.  
 GPx : glutathion peroxydase ; GR : glutathion réductase ; GSSG : glutathion disulfure ; GSH : glutathion ; H<sub>2</sub>O : eau ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène ; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide ; PPP : *pentose phosphate pathway*.

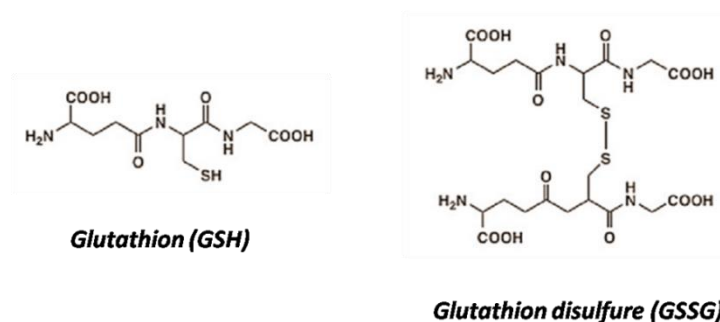
Ce système de réactions en chaîne ne fonctionne uniquement si le GSSG est continuellement réduit en GSH par la glutathion réductase (GR). Cette dernière est elle-même active en présence de NADPH, lui-même généré par couplage métabolique avec la voie des pentose phosphate (Kalyanaraman 2013).

### 3.2) Principaux systèmes de défense non enzymatiques

#### 3.2.1) Le glutathion et les composés à groupements thiols

De manière générale, la plupart des protéines contenant des groupements thiols possèdent des propriétés réductrices et peuvent facilement piéger les ROS.

Le glutathion est le thiol intracellulaire majoritaire dans les cellules, dans lesquelles il est présent essentiellement sous la forme réduite. Il s'agit d'un tripeptide contenant un résidu Cys qui, sous forme réduite, possède une action anti-oxydante. L'albumine est considérée comme son équivalent plasmatique (Haleng et al. 2007) (Figure 48).



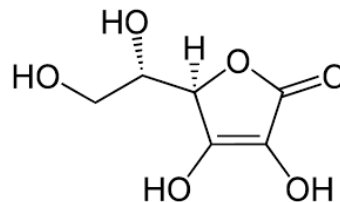
**Figure 48** : Structure du GSH et du GSSG.

Les propriétés anti-oxydantes du glutathion sont nombreuses : il est co-facteur de la GPx, chélateur des métaux de transition et régénérateur final des vitamines C et E (Haleng et

al. 2007). Il peut également interagir avec le radical hydroxyle ou avec les fonctions peroxydes pour former un radical thiol ( $GS\bullet$ ), pouvant se recombinaison en GSSG et ainsi stopper les réactions radicalaires en chaîne. Enfin, le ratio GSH/GSSG est considéré comme un très bon marqueur du stress oxydant et plus particulièrement de la peroxydation lipidique (Haleng et al. 2007).

### 3.2.2) La vitamine C

La vitamine C, également appelée acide ascorbique (Figure 49), est considérée comme l'anti-oxydant hydrosoluble le plus efficace dans le plasma humain.



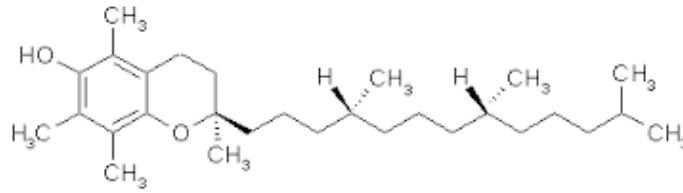
**Figure 49** : Structure de la vitamine C.

A l'inverse de la plupart des mammifères, l'Homme n'est pas capable de synthétiser la vitamine C : son apport est donc principalement réalisé par une alimentation riche en fruits (Haleng et al. 2007).

La vitamine C peut interagir rapidement avec les anions superoxydes ou le radical hydroxyle pour former la radical ascorbate. Ce dernier est peu réactif vis-à-vis des constituants cellulaires et peut être régénéré en ascorbate par le NADPH en présence de thiorédoxine réductase ou de glutathion. Ses capacités de régénération lui permettent ainsi de participer à l'arrêt des réactions radicalaires en chaîne (Kalyanaraman 2013).

### 3.2.3) La vitamine E

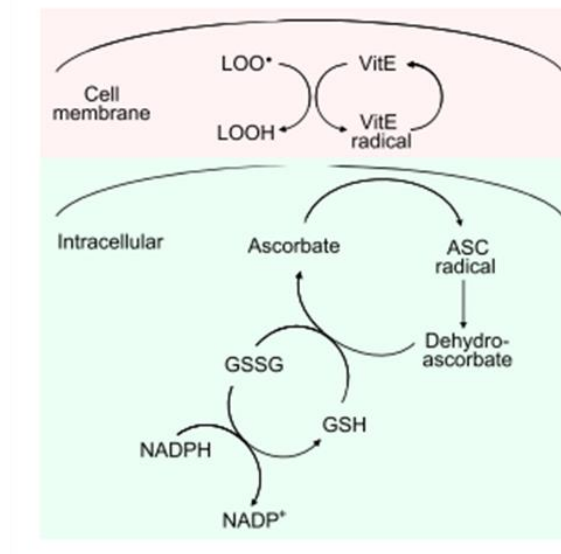
Le terme de vitamine E regroupe l'ensemble des isomères tocophérols, majoritairement représentée par l' $\alpha$ -tocophérol. Elle est majoritairement importée par l'alimentation, particulièrement par les huiles, les noix et les noisettes (Haleng et al. 2007) (Figure 50).



**Figure 50** : Structure de la vitamine E.

Le caractère lipophile de la vitamine E ainsi que sa localisation au niveau de la membrane cellulaire lui confèrent une action anti-oxydante puissante en empêchant la peroxydation lipidique. Il interagit avec les radicaux peroxydes pour former le radical tocophéroxyde, qui peut être ensuite régénéré par l'ascorbate qui devient alors lui-même radicalaire.

De par leurs capacités régénératrices respectives, leurs localisations subcellulaires et leurs caractères lipophiles ou hydrophiles, on observe un *cross-talk* entre les mécanismes anti-oxydants non-enzymatiques impliquant le GSH, la vitamine C et la vitamine E (Figure 51).



**Figure 51** : *Cross-talk* entre la vitamine E, la vitamine C et le GSH (Kalyanaraman 2013). ASC radical : radical ascorbyle ; GSH ; glutathion ; GSSG : glutathion disulfure ; LOO• : radical peroxyde ; LOOH : fonction peroxyde ; NADP : nicotinamide adénine dinucléotide ; VitE : vitamine E .

### 3.2.4) Autres systèmes de défense non enzymatiques

Apportés par l'alimentation, et plus particulièrement par les fruits et les légumes, les caroténoïdes possèdent également un effet anti-oxydant. Leur chef de file, la  $\beta$ -carotène, possède un rôle photoprotecteur et est capable de piéger l'oxygène singlet. Cependant, bien

que bénéfique à concentration physiologique, ce dernier peut devenir délétère en doses pharmacologiques, particulièrement chez les fumeurs (Kalyanaraman 2013).

Le coenzyme Q ou ubiquinone, impliqué dans la chaîne respiratoire mitochondriale, possède un effet protecteur en inhibant la peroxydation lipidique. Son caractère lipophile lui permet de s'insérer dans les membranes et d'agir en synergie avec la vitamine E (Haleng et al. 2007).

L'acide urique, produit final du catabolisme des purines, possède une forte réactivité avec les radicaux libres et est présent en quantité élevée dans le plasma avant son élimination par voie rénale. Il piège l'oxygène singulet, les radicaux peroxy et le peroxy-nitrite (Haleng et al. 2007).

Enfin, par leurs rôles de co-facteurs pour les enzymes anti-oxydantes, les oligoéléments possèdent également un effet défensif face au stress oxydant. On distingue particulièrement le cuivre, le zinc ou le manganèse, co-facteurs des SOD, mais également le sélénium, co-facteur de la GPx (Haleng et al. 2007).

#### **4) Le stress oxydant dans le coeur.**

La production de ROS est un phénomène naturel et continu participant à la signalisation et à la fonction cellulaire en conditions physiologiques : au sein du système cardiovasculaire, les ROS permettent notamment l'adaptation du cœur et des vaisseaux en conditions de déséquilibre de la balance redox. Ils interviennent également dans la modulation de l'activité de certains facteurs de transcription ou encore dans les processus de mort cellulaire et de phagocytose. En conditions physiologique, on observe une modulation du stress oxydant avec l'âge. Le vieillissement est ainsi associé à une augmentation des marqueurs oxydant et à des modifications des macromolécules (peroxydation des lipides et oxydation des protéines), des dommages à l'ADN ou encore à une modification de la perméabilité membranaire : ces éléments favorisent ainsi l'implication des ROS dans le vieillissement (Barouki 2006). Les ROS possèdent cependant un rôle délétère dans certaines conditions pathologiques dont l'athérosclérose, l'hypertrophie, les situations d'ischémie-reperfusion ou encore l'IC. Le stress oxydant semble donc être une étiologie commune dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires.

L'implication du stress oxydant au cours de l'ischémie et dans le développement du remodelage et de l'IC ont été particulièrement étudiés. Au cours de l'ischémie, on observe

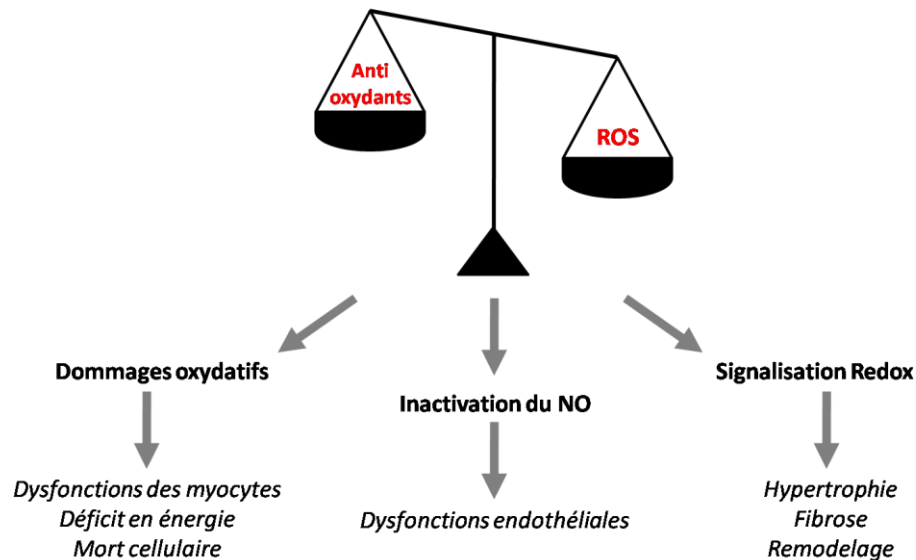
principalement une diminution de la production de ROS s'expliquant par l'arrêt de l'apport en oxygène. Seule une quantité relativement faible de ROS est produite à partir de l'oxygène résiduel et présent dans l'organisme avant l'ischémie. L'utilisation de la glycolyse anaérobie pour la production d'ATP entraîne une acidose cellulaire et une diminution du potentiel membranaire mitochondrial (Bugger and Pfeil 2020). Cependant, au moment de la reperfusion, l'apport conséquent d'oxygène au cœur entraîne une augmentation brutale de la formation de ROS au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale principalement et qui s'étale sur quelques heures à quelques jours. Cette augmentation entraîne alors la nécrose des cardiomyocytes touchés par l'ischémie, une élimination des mitochondries dysfonctionnelles par mitophagie et la formation de nouvelles mitochondries par augmentation du processus de fission (Bugger and Pfeil 2020).

Au cours du remodelage cardiaque, l'hypertrophie des cardiomyocytes de la zone saine, associée à la nécrose des cardiomyocytes touchés par l'ischémie et la formation d'une fibrose cicatricielle, entraîne un shift métabolique permettant de maintenir la formation d'ATP nécessaire à la contraction cardiaque. Ce shift s'accompagne d'un stress oxydant moins brutale mais chronique, entraînant l'oxydation des protéines et la peroxydation des lipides qui, associé aux différents mécanismes pathophysiologiques précédemment évoqués, participe à la perte de contractilité du cœur et à l'installation de l'IC (Bugger and Pfeil 2020).

D'un point de vue expérimental, on observe des dysfonctionnements des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, associés à une diminution de la respiration mitochondriale dans la zone non-infarciée du myocarde, dans des modèles *in vivo* de rats et de souris pour lesquels un IDM a été induit par ligature de l'artère coronaire gauche ou encore dans un modèle de sténose aortique chronique chez le cochon (Bugger and Pfeil 2020a). Ces perturbations de la chaîne respiratoire mitochondriale sont associées à une augmentation du stress oxydant et de la production de ROS, entraînant l'activation de nombreuses protéines kinases et de facteurs de transcription impliqués dans la signalisation hypertrophique (Rababa'h et al. 2018).

Dans l'IC, l'augmentation du stress oxydant est associée à de nombreux effets pathophysiologiques (Figure 52). Chez les patients IC, on observe notamment une augmentation de l'activité des NOX ainsi qu'une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, entraînant une augmentation de la production d'anions superoxydes. De plus, le découplage des eNOS participe au développement de l'IC au niveau vasculaire et myocardique. Enfin, l'augmentation du catabolisme de la purine entraîne une

augmentation de la concentration en acide urique circulant, conduisant à l'hypoxie du tissu, l'apoptose des cellules et l'augmentation de l'activité de la xanthine oxydase (Münzel et al. 2017). On observe ainsi une pluralité de l'origine des ROS dans le processus physiopathologique de l'IC.



**Figure 52** : Principaux effets pathophysiologiques du stress oxydant dans l'IC (Seddon, Looi, and Shah 2007).  
 NO :oxide nitrique ; ROS : *reactive oxygen species*.

Face au rôle prépondérant du stress oxydant dans le développement des pathologies cardiovasculaires, l'utilisation de molécules anti-oxydantes ouvre des perspectives thérapeutiques intéressantes. Cependant, de nombreux essais cliniques ont cependant montré que l'utilisation de tels traitements étaient largement dépendante du mode de vie du patient et de son régime alimentaire (riche ou pauvre en anti-oxydants) ainsi que de son taux de stress oxydant initial.

Plusieurs études ont ainsi utilisé la vitamine C et E en tant que traitements anti-oxydants. Ces études ont montré des effets prometteurs *in vivo* chez le rat mais les essais cliniques réalisés chez l'homme n'ont cependant pas été concluants et ont montré la nécessité de cibler des mécanismes précis impliqués dans la formation du stress oxydant (Dietl and Maack 2017). Ainsi, les molécules actuellement testées chez l'homme ou l'animal ont pour but de cibler spécifiquement la mitochondrie, principal lieu de formation des ROS : tel est le cas de la MitoQuinone, *scavenger* de ROS mitochondriaux ou encore le SS-31, diminuant la production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (Ajith 2014; Dietl and Maack 2017). D'autres molécules anti-oxydantes ont pour but de mimer l'activité des protéines anti-



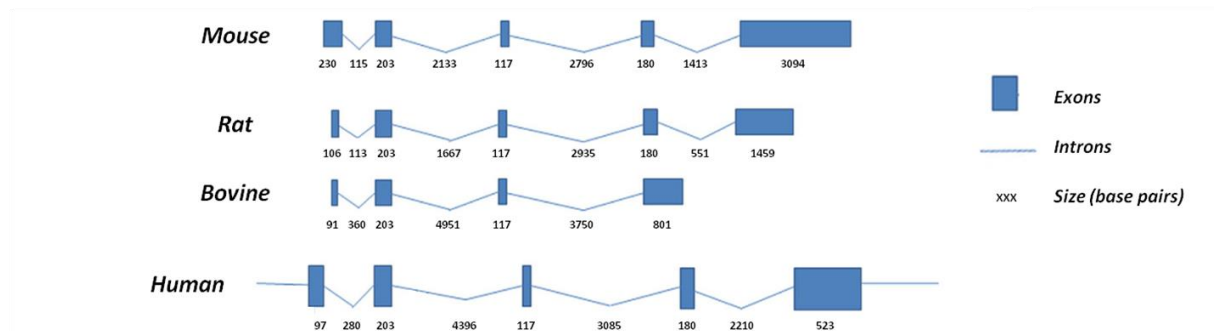
oxydantes : c'est le cas du TEMPOL, mimétique des SOD et *scavenger* du NO ou encore du EUK-134 et du EUK-8, mimétiques des protéines SOD qui sont considérées comme les premiers acteurs intervenant dans la détoxification des ROS car détoxifiant les anions superoxydes, premiers ROS formés à partir du dioxygène. Le chapitre suivant détaillera plus précisément la superoxyde dismutase 2 (SOD2), l'isoforme mitochondrial des SOD.

## IV) La superoxyde dismutase 2

### 1) Structure et fonction

#### 1.1) Le gène *sod2*

La protéine SOD2 est une protéine mitochondriale codée par l'ADN nucléaire. Le gène codant pour la protéine SOD2 est localisé sur le chromosome 6 et est composé de 4 introns et de 5 exons (Figure 53).



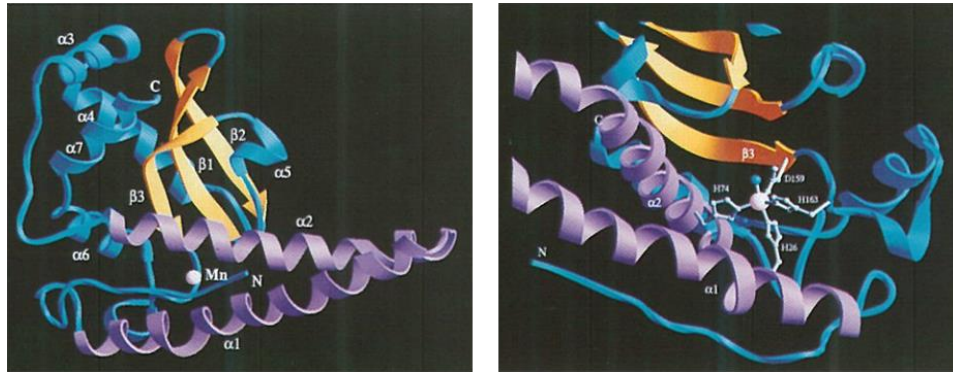
**Figure 53** : Organisation du gène *sod2* chez la souris, le rat, le bovin et l'humain (Miao and St. Clair 2009).

La séquence génomique de *sod2* a été caractérisée chez l'homme, le rat, la souris et les boeufs. Elle est particulièrement conservée et présente plus de 90% d'homologie au niveau des séquences codantes entre les différentes espèces. Elle présente en revanche peu de similitudes avec les séquences génomiques de ses homologues *sod1* et *sod3* (Zelko, Mariani, and Folz 2002; Miao and St. Clair 2009).

#### 1.2) La protéine SOD2

Chez les eucaryotes, la protéine SOD2 fonctionnelle se présente sous la forme d'un tétramère. Chez l'homme, chaque monomère est formé de 223 acides aminés. Ils sont formés en partie N-terminale de deux hélices alpha formant une structure en épingle à cheveux. La partie C-terminale est composée de domaines  $\alpha/\beta$  et contient 3 feuillets  $\beta$  antiparallèles et 5 hélices  $\alpha$  (Figure 54). Le site de liaison au Mn, cofacteur nécessaire à l'activité de SOD2, est localisé entre les hélices  $\alpha$  du domaine N-terminal et les feuillets  $\beta$  du domaine C-terminal. Le

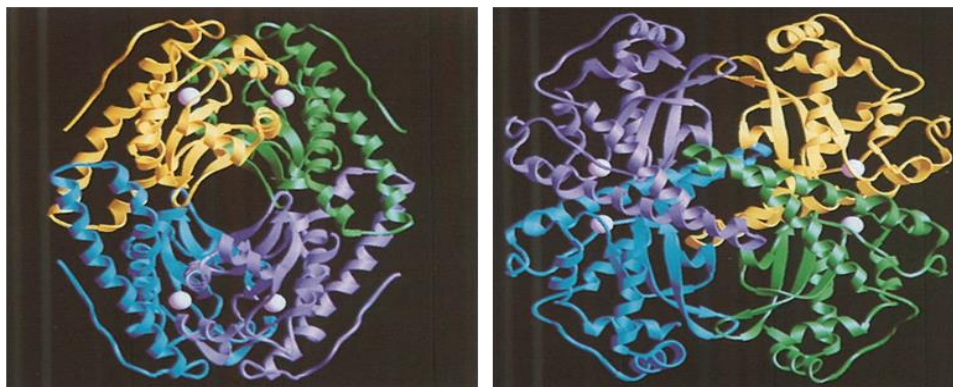
site actif de liaison au Mn est ainsi formé de deux résidus histidine du domaine N-terminal (His-26 et His-74) ainsi que d'un résidu histidine (His-163) et un résidu aspartate (Asp-159) du domaine C-terminal (Figure 54) (Borgstahl et al. 1992; Perry et al. 2010).



**Figure 54** : Structure de la sous-unité monomérique de SOD2 chez l'homme et géométrie de son site de liaison au Mn (Borgstahl et al. 1992).

$\alpha$  : hélice alpha ;  $\beta$  : feuillet béta ; C : C-terminal ; D159 : aspartate 159 ; H26 : histidine 26 ; H74 : histidine 74 ; H163 : histidine 163 ; Mn : manganèse ; N : N-terminal.

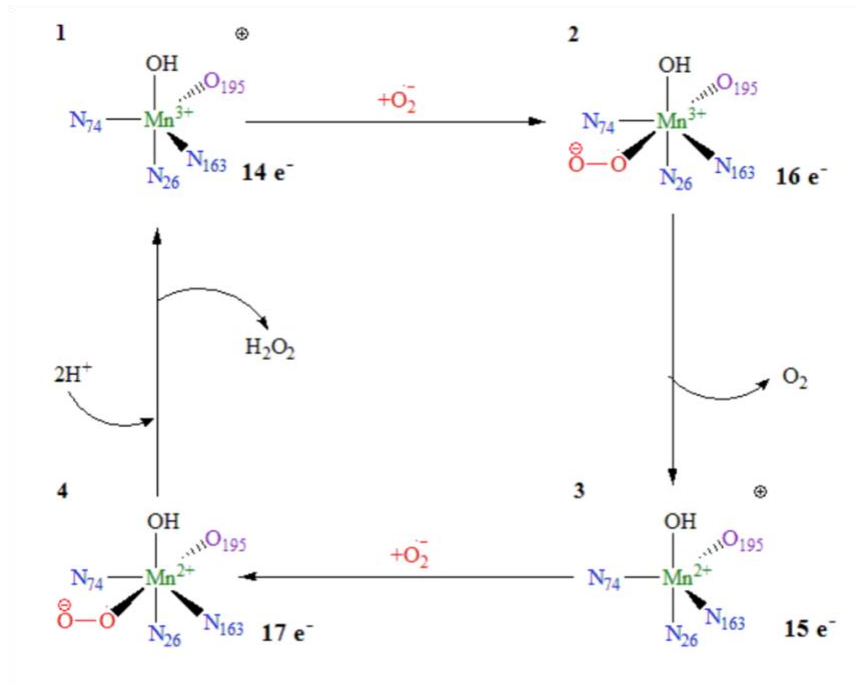
Ces monomères s'associent d'abord en dimère et de façon symétrique au niveau des sites actifs de liaison au Mn, qui constituent l'interface dimérique. Ces dimères s'associent eux-mêmes entre eux de façon symétrique pour former un homotétramère (Figure 55), constituant la forme fonctionnelle de la protéine SOD2 et assurant la stabilité des sites actifs de la protéine (Borgstahl et al. 1992).



**Figure 55** : Structure homotétramérique de la protéine SOD2 chez l'homme (Borgstahl et al. 1992).

### 1.3) Mécanisme d'action de SOD2

La détoxification des anions superoxydes par la protéine SOD2 est associée à une modification de l'état d'oxydation du Mn présent au niveau des sites actifs et se réalise en quatre étapes (Figure 56).



**Figure 56 :** Mécanismes de détoxification des anions superoxydes par le site actif de la protéine SOD2 (d'après Azadmanesh and Borgstahl 2018).

$e^-$  : électron ;  $H^+$  : proton ;  $H_2O_2$  : peroxyde d'hydrogène ;  $Mn^{2+}$  : manganèse II ;  $Mn^{3+}$  : manganèse III ;  $N_{26}$  : résidu azote de l'histidine 26 ;  $N_{74}$  : résidu azote de l'histidine 74 ;  $N_{163}$  : résidu azote de l'histidine 163 ; O : oxygène ;  $O_2$  : dioxygène ;  $O_2^-$  : anion superoxyde ;  $O_{195}$  : résidu oxygène de l'aspartate 195 ; OH : anion hydroxyle ;

Au cours de la réaction de détoxification, l'anion superoxyde mitochondrial s'associe au Mn présent sous la forme  $Mn^{3+}$  (manganèse III) au niveau du site actif de la protéine et lui cède un électron, permettant son passage sous la forme  $Mn^{2+}$  (manganèse II) et la libération de dioxygène  $O_2$ . L'ion  $Mn^{2+}$  s'associe ensuite à un nouvel anion superoxyde et lui cède un électron, conduisant à la formation de l'ion  $Mn^{3+}$  et à la production de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  après réaction avec deux ions hydrogène  $H^+$  (Borgstahl et al. 1992; Azadmanesh and Borgstahl 2018).

Bien que protectrice face au stress oxydant, la protéine SOD2 peut avoir des rôles contradictoires, notamment dans le cas du cancer du sein : alors que SOD2 possède une fonction

anti-tumorale dans les stades précoces de développement de la tumeur, elle devient oncogène lorsque la tumeur devient agressive et progresse vers un stade métastatique en entraînant l'accumulation de peroxyde d'hydrogène dans les cellules (Miriyyala et al. 2012).

Enfin, secondairement à son rôle de détoxification, la protéine SOD2 peut également influencer l'expression de facteurs de transcriptions tels que HIF-1 (*Hypoxia Induced Factor - 1*), NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor- $\kappa$ B*), p53 ou encore AP-1 (*Activator Protein 1*) et peut affecter la stabilité de l'ADN (Miriyyala et al. 2012).

#### ***1.4) Rôle de SOD2 dans le coeur***

De par leur rôle de détoxifiant, les protéines SOD sont impliquées dans de nombreuses voies de régulation sensibles à l'état rédox de la cellule telles que l'hypertrophie cellulaire, l'inflammation, le remodelage de la matrice extracellulaire ou encore l'angiogenèse (Fukai and Ushio-Fukai 2011).

Particulièrement riche en mitochondries, le cœur constitue l'un des organes pour lesquels la protéine SOD2 est la plus exprimée chez l'adulte, avec le rein et les glandes surrénales. La protéine SOD2 possède une fonction essentielle dans le maintien de la fonction mitochondriale : la délétion totale de SOD2 chez la souris est ainsi associée à une mortalité qui peut être embryonnaire ou néonatale selon le fond génétique utilisé, suite au développement d'une cardiomyopathie dilatée, l'accumulation de lipides dans le foie ou encore une neurodégénération (T. Shimizu et al. 2010; Oyama et al. 2017). Afin d'étudier les effets de la délétion de SOD2 *in vivo*, des modèles de souris KO tissu-spécifiques ont été développés : les souris présentant une délétion spécifique de SOD2 dans le cœur et le muscle développent ainsi une cardiomyopathie plus lente et plus tardive. Elles atteignent l'adolescence et meurent à l'âge de quatre mois suite au développement d'une IC (I. Shimizu and Minamino 2016; Oyama et al. 2017).

*A contrario*, la surexpression de SOD2 dans le cœur de souris transgéniques est associée à une amélioration de la fonction cardiaque caractérisée par une amélioration du flux sanguin dans le myocarde et une meilleure efficacité de la bioénergétique mitochondriale (Zhang et al. 2017). De plus, la surexpression de SOD2 est associée à une protection face à la fibrose dans le

cœur mais également face au stress oxydant et à la mort cellulaire par apoptose dans le cœur, le foie, le cerveau ou encore le muscle squelettique (Zhang et al. 2017).

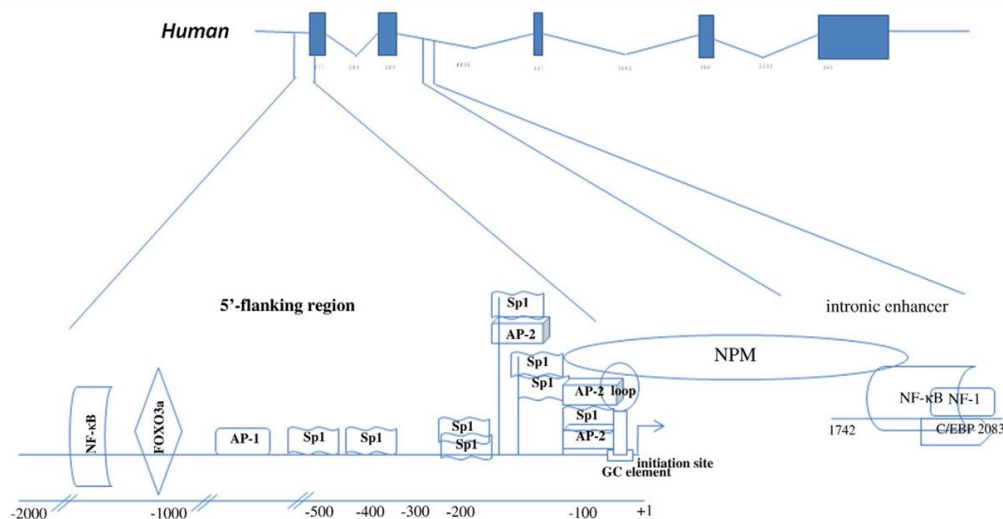
## 2) Régulation transcriptionnelle

La régulation transcriptionnelle des gènes de la famille *sod* est hautement régulée par les conditions intra et/ou extra-cellulaires.

Ainsi, de nombreux stimuli provoquant un stress cellulaire induisent l'expression de SOD2 : il s'agit notamment des radiations ionisantes, des interférons  $\gamma$ , des cytokines pro-inflammatoires ou encore des lipopolysaccharides (Zelko, Mariani, and Folz 2002).

La majorité des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la transcription de *sod2* sont communs à tous les isoformes des *sod* tels que NF- $\kappa$ B, AP-1 et 2, Sp1 (*Specificity Protein 1*) et C/EBP (*CAAT/Enhancer Binding Protein*) (Miao and St. Clair 2009), tandis que le facteur de transcription FOXO3a ne régule la transcription de l'isoforme *sod2* uniquement.

La région flanquante en extrémité 5' du gène *sod2* possède de nombreux sites de fixation pour les facteurs de transcription plus particulièrement pour les facteurs NF- $\kappa$ B, FOXO3a, Sp1, AP-1 et AP-2 (*Activator Protein 2*) (Zelko, Mariani, and Folz 2002; Miao and St. Clair 2009).



**Figure 57** : Facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la transcription de *sod2* chez l'homme (Miao and St. Clair 2009).

AP-1/2 : activator protein 1/2 ; C/EBP : CCAAT/enhancer-binding protein ; FOXO3a : forkhead box O3a ; NF-1 : nuclear factor 1 ; NF- $\kappa$ B : nuclear factor kappa B ; NPM : nucleophosmin ; Sp1 : specificity protein 1.

Les facteurs de transcription de la famille du NF- $\kappa$ B constituent des facteurs sensibles au statut redox de la cellule et qui sont induits en réponse à un stimulus considéré comme

dangereux pour la cellule. Suite à un stress et à l'augmentation du taux d'ARMm de *sod2*, le facteur NF- $\kappa$ B permet de déclencher l'expression de la protéine SOD2. D'autres facteurs de la famille NF- $\kappa$ B peuvent cependant montrer un effet inverse : la protéine p53 est ainsi associée à une inhibition de l'expression de la protéine SOD2.

L'induction de SOD2 par la protéine FOXO3a permet de protéger les cellules quiescentes du stress oxydant. L'activité de la protéine FOXO3a est elle-même régulée par modification post-traductionnelle : ainsi, sa phosphorylation par la protéine Akt ou son acétylation par la protéine P300 entraînent son inactivation et par conséquent une diminution de la transcription de la protéine SOD2.

La région flanquante en 5' de *sod2* possède de nombreux sites de fixation pour le facteur de transcription Sp1, une protéine en structure dite en doigt de zinc. Elle se lie à l'ADN en partie C-terminale et après trois domaines consécutifs en doigts de zinc. Le facteur de transcription Sp1 est essentiel à l'expression constitutive et induite de SOD2. Ces facteurs agissent en synergie : la fixation de plusieurs protéines Sp1 est nécessaire à l'expression de SOD2.

Le facteur de transcription AP-1 consiste en un homo ou hétérodimère composé de protéines appartenant à la famille de c-jun, c-fos ou Fra. Ce facteur de transcription peut à la fois activer la transcription de la protéine SOD2 ou être elle-même activée par une modulation de l'expression de SOD2. Ainsi, une forte expression de SOD2 est associée à une faible expression du facteur AP1 tandis qu'une déficience du gène *sod2 in vivo* permet d'induire l'expression de la protéine AP1.

Enfin, la famille des facteurs de transcription AP-2 est composée de cinq protéines notées  $\alpha$  à  $\epsilon$  et régulant négativement l'expression de la protéine SOD2 en empêchant sa transcription par le facteur Sp1.

La région flanquante en 5' du gène *sod2* possède également une structure en boucle d'ARN simple brin. Cette structure permet l'interaction avec les protéines de liaison à l'ARN et plus particulièrement avec la protéine NPM (nucléophosmine). Cette dernière interagit alors avec les facteurs de transcription Sp1 de la région flanquante ainsi qu'avec le facteur de transcription NF- $\kappa$ B localisé au niveau de l'amplificateur intronique dans le deuxième intron de *sod2*.

Le deuxième intron du gène *sod2* possède en effet des sites de fixation pour les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B ainsi que pour le complexe C/EBP. Ces facteurs sont exprimés en réponse à une stimulation par les cytokines et agissent en synergie pour induire l'expression de

SOD2. Les protéines de la famille C/EBP sont fonctionnelles sous la forme d'homo- ou d'hétéro-dimères formés avec un second membre de la même famille ou avec un second facteur de transcription.

La protéine SOD2 fait enfin l'objet d'une régulation transcriptionnelle par les microARN (miR), petites séquences d'ARN non codant régulant l'expression de gènes. En s'hybridant avec la séquence d'ARN d'un gène cible, les miR entraînent la dégradation ou l'inhibition transcriptionnelle de ce gène. Il a été montré que *sod2* fait l'objet d'une régulation par divers miR en conditions de stress ou en conditions pathologiques. Ainsi, le miR-509-5p, dont l'expression est diminuée dans le tissu de patients présentant un cancer du sein, est associée à une augmentation de l'expression de SOD2 et à une diminution de la survie (Song et al. 2017). De plus, les miR-335 et miR-34a contribuent au vieillissement rénal en inhibant notamment l'expression de SOD2 et les voies de détoxification enzymatiques mitochondriales dans les cellules mésangiales (Bai et al. 2011). Enfin, les miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p sont associés à un RVG post-IDM important chez les patients issus de la cohorte REVE-2 et constituent, avec leur cible SOD2, de potentiels biomarqueurs du RVG post-IDM (Dubois-Deruy et al. 2017).

### 3) Modifications post-traductionnelles

#### 3.1) La phosphorylation

##### 3.1.1) Généralités

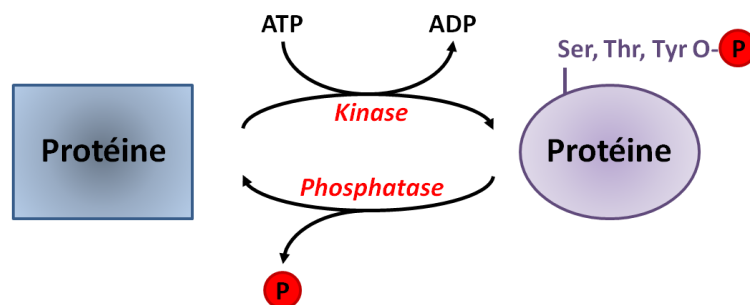
Découverte en 1959, la phosphorylation constitue la modification post-traductionnelle la plus étudiée et la plus retrouvée sur les protéines: il s'agit de l'ajout d'un groupement phosphate sur un résidu sérine (Ser), thréonine (Thr) ou tyrosine (Tyr) d'une protéine. Cette modification joue un rôle central dans la régulation de nombreuses voies de signalisation et processus cellulaires ainsi que dans la régulation du métabolisme (Humphrey et al. 2015; Verdin and Ott 2015). De par la charge négative du groupement phosphate, la phosphorylation entraîne un changement de charge globale de la protéine, associée à une modification de la conformation, de la localisation, de l'interactome ou encore de la fonction de la protéine, la



phosphorylation pouvant être associée à une augmentation ou une inhibition de l'activité d'une protéine (Nestler and Greengard 1999; Humphrey et al. 2015)

### 3.1.2) Mécanismes et acteurs impliqués

Cette modification est réalisée de manière enzymatique à l'aide de protéines kinases, qui catalysent le transfert d'un groupement phosphate en position terminale de l'ATP sur un résidu Ser, Thr ou Tyr de la protéine cible, à hauteur de 84%, 15% et 1% respectivement (Victorino, Luiz Mencialha, and Panis 2014; Humphrey et al. 2015) (Figure 58).



**Figure 58** : Mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation des protéines.  
ADP: Adénosine diphosphate ; ATP: adénosine triphosphate ; O: oxygène; P: groupement phosphate ; Ser: serine ; Thr: thréonine ; Tyr: tyrosine.

On distingue de manière générale deux catégories de protéines kinases selon leur spécificité de substrats : les Ser/Thr kinases, qui transfèrent le groupement phosphate sur les résidus Ser et/ou Thr des protéines cibles, ainsi que les Tyr kinases, responsables de la phosphorylation sur les résidus Tyr des protéines (Nestler and Greengard 1999).

Cette modification dynamique est réversible : la phosphorylation est ainsi éliminée par des enzymes spécifiques, les protéines phosphatases, classées de nouveau selon leur spécificité de substrat : on distingue ainsi les Ser/Thr phosphatases et le Tyr phosphatases (Humphrey et al. 2015).

### **3.1.3) Rôle de la phosphorylation dans le cœur**

La phosphorylation constitue la principale modification post-traductionnelle régulant la contraction et le métabolisme myocardique. Elle concerne des protéines à fonctions diverses telles que les protéines sarcomériques, les canaux échangeurs d'ions, les récepteurs membranaires ou encore les protéines myofibrillaires (Rapundalo 1998). L'IC a ainsi été associée à une diminution de la phosphorylation des protéines du myofilament, altérant l'efficacité de la contraction cardiaque (Walker, Fullerton, and Buttrick 2013).

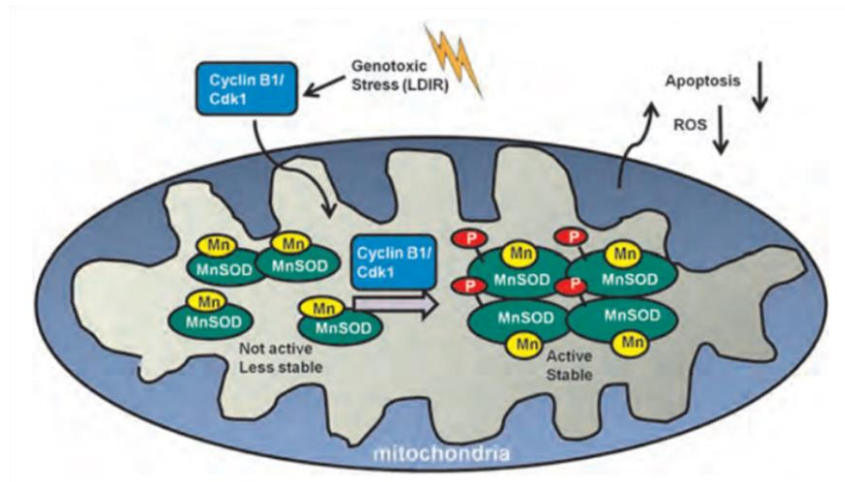
L'un des exemples les plus probants de l'importance de la phosphorylation dans le cœur reste sans doute l'implication des protéines kinases CamKII (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependant kinase II*) et PKA (protéine kinase A) dans la contraction par la phosphorylation des canaux et transporteur impliqués dans le couplage excitation-contraction (Sequeira and Maack 2018).

On observe également une augmentation de la phosphorylation des protéines impliquées dans la contraction cardiaque dans l'IC. Des études réalisées au laboratoire sur un modèle de rats IC pour lesquels un IDM a été induit par ligature de l'artère coronaire gauche ont notamment montré une diminution du taux de troponine T (TnT) phosphorylée en Ser 208 (Dubois et al. 2011) ou encore une augmentation du taux de desmine phosphorylée (Bouvet et al. 2016), participant au développement du remodelage cardiaque.

De nombreuses pathologies cardiovasculaires affichent également des troubles de la phosphorylation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, des récepteurs appartenant à la famille des GPCR et dont les protéines kinases GRK (GPCR kinase) régulent la signalisation. On observe notamment une augmentation du taux de la protéine GRK2, la GRK la plus abondante dans le cœur, dans le cas de l'IC (Hata and Koch 2003).

### **3.1.4) Phosphorylation de SOD2**

Des études ont montré que l'exposition à de faibles doses de radiations ionisantes entraînaient une phosphorylation de la Ser 106 de la protéine SOD2, favorisant la stabilité et la conformation tétramérique de la protéine et augmentant son activité (Figure 59) (Candas et al. 2013; Jin et al. 2015).



**Figure 59** : Représentation schématique du mécanisme de régulation de la protéine SOD2 par phosphorylation de la Ser 106 (Candas et al. 2013).

Cdk1: *Cyclin dependant kinase 1*; LDIR : *Low-Dose Ionizing Radiations* ; Mn: manganèse ; MnSOD: Manganèse Superoxyde Dismutase ; ROS: *Reactive Oxygen Species*.

La phosphorylation de SOD2 pourrait être assurée par le complexe cycline B1/Cdk1 (*Cyclin dependant kinase 1*) (Candas et al. 2013) ou par le complexe cycline D1/Cdk4 (*Cyclin dependant kinase 4*) (Jin et al. 2015), qui seraient transloqués du cytoplasme vers la mitochondrie suite à une exposition à de faibles doses de radiations ionisantes. L'augmentation de l'activité de SOD2 engendrée par la phosphorylation favoriserait à terme la phosphorylation oxydative et l'homéostasie mitochondriale (Jin et al. 2015).

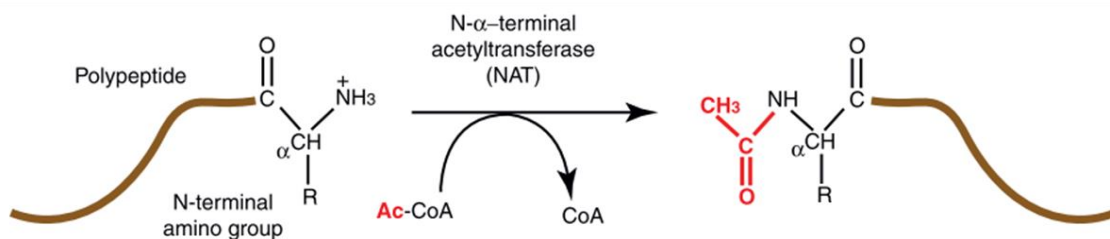
### 3.2) L'acétylation

#### 3.2.1) Généralités

Découverte en 1964 sur les histones, l'étude approfondie de l'acétylation des protéines n'a réellement débutée que 30 ans plus tard avec la découverte de l'acétylation de la protéine p53 dans les années 1990s (Verdin and Ott 2015; Narita, Weinert, and Choudhary 2019). Il s'agit du transfert d'un groupement acetyl provenant d'un acetyl CoA sur un site spécifique d'une chaîne polypeptidique. Elle peut se présenter sous deux formes différentes : l'acétylation des chaînes polypeptidiques en position N-terminale ou l'acétylation des résidus lysine (Lys) des protéines, faisant intervenir des acteurs moléculaires différents (Drazic et al. 2016).

### 3.2.2) L'acétylation N-terminale

L'acétylation N-terminale consiste au transfert d'un groupement acetyl depuis une molécule d'acetyl CoA vers le premier acide aminé en position N-terminale d'une chaîne polypeptidique. Cette réaction irréversible est catalysée par des enzymes appelées NAT (*N-terminal acetyltransferase*) (Figure 60) (Starheim, Gevaert, and Arnesen 2012; Drazic et al. 2016).



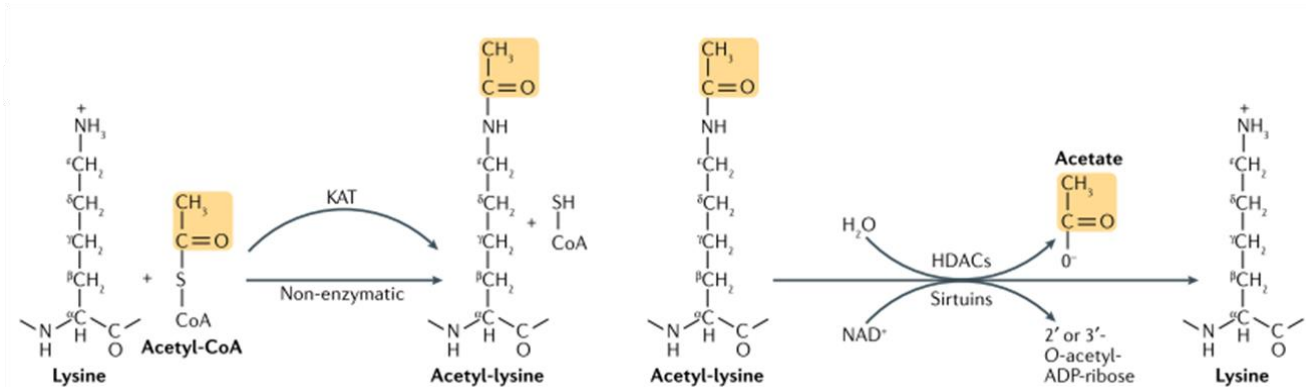
**Figure 60** : Représentation schématique de la réaction d'acétylation N-terminale des polypeptides (Starheim, Gevaert, and Arnesen 2012).  
Ac-CoA : Acetyl Coenzyme A ; CoA : Coenzyme A; NATs : *N-terminal acetyltransferases*.

L'acétylation N-terminale concerne 80 à 90% des protéines de la fraction soluble chez l'homme. Au niveau moléculaire, l'acétylation N-terminale participe notamment à la mise en conformation des protéines, à leurs localisations subcellulaires, leurs interactions ou encore à leur dégradation. Cependant, son rôle au niveau cellulaire ainsi que sa régulation restent à ce jour mal connus (Starheim, Gevaert, and Arnesen 2012; Drazic et al. 2016).

### 3.2.3) L'acétylation des résidus lysine

L'acétylation des lysines constitue certainement l'une des modifications post-traductionnelles des protéines la plus importante après la phosphorylation : il s'agit du transfert d'un groupement acetyl provenant d'une molécule d'Acetyl CoA sur un résidu lysine d'une chaîne polypeptidique. Bien qu'elle ait d'abord été observée sur les histones, participant à la régulation épigénétique de l'ADN, cette modification réversible fait intervenir différents acteurs moléculaires : elle est réalisée par les enzymes lysines acetyltransférase (KAT) et peut

être éliminée par différents types de lysines désacétylases (KDAC) : les histones désacétylases (HDAC) ou les sirtuines (SIRT) (Figure 61) (Humphrey et al. 2015).



**Figure 61** : Mécanismes d'acétylation et de désacétylation enzymatique des résidus lysines et acteurs impliqués (Narita, Weinert, and Choudhary 2019).  
HDACs : histones désacétylases ; KAT : lysine acétyltransferase

Le nombre exact de protéines KAT n'est pas connu à ce jour. On considère entre 17 et 22 le nombre de KAT dite « classiques » : elles sont majoritairement localisées dans le noyau et sont capables d'acétyler les histones comme les autres protéines. Elle sont réparties en trois familles : la famille GNAT, la famille de P300/CBP et la famille MYST (Table 4) (Humphrey et al. 2015; Narita, Weinert, and Choudhary 2019).

**Table 5** : Tableau récapitulatif des protéines KATs (Drazic et al. 2016).

Family	HAT/KAT	New name	Subcellular localization	Representative substrates
GNAT	HAT1	KAT1	Nucleus	H2A, H4
GNAT	GCN5 (GCN5L2)	KAT2A	Nucleus	H3, CEBPB
GNAT	PCAF	KAT2B	Nucleus	H3, H4, ACLY
p300/CBP	CBP	KAT3A	Nucleus/Cytoplasm	H2A, H2B, H3, H4, NCOA, FOXO1
p300/CBP	P300	KAT3B	Nucleus/Cytoplasm	H3, FOXO1, HDAC1, SIRT2, ALX1
	TAF1 (TAFII250)	KAT4	Nucleus	H3, H4
MYST	TIP60/PLIP	KAT5	Nucleus/Cytoplasm	H2A, H4, FOXP3
MYST	MOZ/MYST3	KAT6A	Nucleus	H3, H4, p53, RUNX2
MYST	MORF/MYST4	KAT6B	Nucleus	H3, RUNX2
MYST	HBO1/MYST2	KAT7	Nucleus	H4
MYST	MOF/MYST1	KAT8	Nucleus	H4, p53
GNAT	ELP3	KAT9	Nucleus/Cytoplasm	H3, H4, $\alpha$ -tubulin
	TFIIIC90 (GTF3C4)	KAT12	Nucleus	H3
	SRC-1 (NCOA1)	KAT13A	Nucleus	H3, H4
	SRC-3 (TRAM1, NCOA3, ACTR)	KAT13B	Nucleus/Cytoplasm	H3, H4
	SRC-2 (TIF2, GRIP1, bHLHe75, NCOA2, P160)	KAT13C	Nucleus	H3, H4
	CLOCK	KAT13D	Nucleus/Cytoplasm	ARNTL/BMAL1, NR3C1/GR
	ATF-2 (CREB2, CREBP1)		Nucleus/Cytoplasm	H2B, H4
GNAT	ATAT1		Cytoplasm/Membrane	$\alpha$ -tubulin
	ACAT1		Mitochondria	PDP
	NAT10		Nucleus	Histones, $\alpha$ -tubulin
	GCN5L1 (BLOC1S1)		Mitochondria	ATP5A1, NDUFA9

Un nombre croissant de protéines ne possédant pas d'activité catalytique lysine acétyltransferase, mais cependant capable de transférer un motif acetyl sur des résidus lysines spécifiques, est également mis en évidence : on distingue par exemple la protéine cytoplasmique TAT1 ( *$\alpha$ -tubulin N-acetyltransferase 1*), la protéine mitochondriale GCN5L1

(*general control of amino acid synthesis 5 like 1*) ou encore les protéines ESCO1 et 2 (*establishment of sister chromatin N-acetyl transferase 1 et 2*). Leur spécificité de substrats ainsi que leur mécanisme d'action restent cependant mal connus à ce jour (Narita, Weinert, and Choudhary 2019).

La désacétylation des résidus lysines est prise en charge par les enzymes lysine désacétylases, réparties en deux catégories : les HDAC, dont l'activité est dépendante du  $Zn^{2+}$ , ainsi que les SIRT, dont l'activité est dépendante du  $NAD^+$  (Table 5) (Narita, Weinert, and Choudhary 2019).

**Table 5** : Tableau récapitulatif des protéines KDACs (Drazic et al. 2016).

Class	Member	Catalytic mechanism	Subcellular localization	Representative substrates
I	HDAC 1	$Zn^{2+}$ dependent	Nucleus	H2A, H2B, H3, H4, RelA, AR
I	HDAC2	$Zn^{2+}$ dependent	Nucleus	H2A, H2B, H3, H4, TSHZ3
I	HDAC3	$Zn^{2+}$ dependent	Nucleus	H2A, H2B, H3, H4, NF- $\kappa$ B, PCAF, STAT1, RelA
I	HDAC8	$Zn^{2+}$ dependent	Nucleus/Cytoplasm	H2A, H2B, H3, H4, p53, ER $\alpha$
II	HDAC4	$Zn^{2+}$ dependent	Nucleus/Cytoplasm	H2A, H2B, H3, H4, HIF1 $\alpha$ , p53, DNAB8
II	HDAC5	$Zn^{2+}$ dependent	Nucleus/Cytoplasm	GATA-2, GCMa
II	HDAC6	$Zn^{2+}$ dependent	primarily Cytoplasm	Cortactin, $\alpha$ -tubulin, HSP90
II	HDAC7	$Zn^{2+}$ dependent	Nucleus/Cytoplasm	PLAG1
II	HDAC9	$Zn^{2+}$ dependent	Nucleus/Cytoplasm	ATDC
II	HDAC10	$Zn^{2+}$ dependent	primarily Cytoplasm	HSP70, PP1
III	SIRT1	$NAD^+$ dependent	Nucleus	P53, FOXO1, HSF1, KAT7, CBP
III	SIRT2	$NAD^+$ dependent	Cytoplasm	$\alpha$ -tubulin
III	SIRT3	$NAD^+$ dependent	Mitochondria	GDH, Ku70, MRLP10, AceCS2
III	SIRT4	$NAD^+$ dependent	Mitochondria	GLUD1
III	SIRT5	$NAD^+$ dependent	Mitochondria	CPS1, cytochrome c
III	SIRT6	$NAD^+$ dependent	Nucleus	H3K56ac, RBBP8
III	SIRT7	$NAD^+$ dependent	Nucleolus	H3K18ac, PAF53
IV	HDAC11	$Zn^{2+}$ dependent	primarily Nucleus	H2A, H2B, H3, H4

Traditionnellement nommées HDAC au moment de leur découverte pour leur rôle dans la désacétylation des histones, ces désacétylases sont capable d'interagir avec tout type de protéine dont les résidus lysines sont acétylés. Les HDAC sont elles-mêmes réparties en trois classes différentes selon leur localisation subcellulaire : les HDAC de classe I et IV sont localisées dans le noyau tandis que les HDAC de type II sont localisées dans le noyau et le cytoplasme. Ces dernières sont de nouveau subdivisées en classe IIa et IIb pour lesquelles la localisation est respectivement fixe ou peut être modulée selon l'état d'activité de la protéine, l'activation de la signalisation conduisant à leur translocation depuis le noyau vers le cytoplasme. Les HDAC de classe I et II affichent enfin une forte homologie au niveau de leur domaine catalytique (Humphrey et al. 2015; Narita, Weinert, and Choudhary 2019).

La seconde catégorie de KDAC est représentée par les KDAC de classe III formée par la famille des protéines SIRT. On en dénombre sept à ce jour chez les mammifères, présentant une forte homologie de leur domaine catalytique.

De par la diversité de leur activité et de leur fonction (Table 6), les protéines SIRT ont été largement étudiées au cours des dernières années. Certaines d'entre elles ne possèdent pas ou peu d'activité désacétylase et sont impliqués dans la régulation d'autres types d'acylation (Table 6) (Singh et al. 2018).

**Table 6 :** Tableau récapitulatif de l'activité et des fonctions des protéines SIRT (d'après Singh et al. 2018)

SIRT	Activités	Fonctions
<i>SIRT1</i>	Desacetylase	Réparation de l'ADN Métabolisme du glucose Sécrétion de l'insuline Différenciation Neuroprotection Protection vasculaire
<i>SIRT2</i>	Desacetylase	Contrôle du cycle cellulaire Développement et fonctionnalité du tissu adipeux
<i>SIRT3</i>	Desacetylase	Régulation du métabolisme mitochondrial Production d'ATP
<i>SIRT4</i>	ADP ribosyl-transferase	Sécrétion de l'insuline Régulation du métabolisme mitochondrial Réparation de l'ADN
<i>SIRT5</i>	Deacetylase Demalonylase Desuccinylase	Cycle de l'urée
<i>SIRT6</i>	Desacetylase ADP ribosyl-transferase	Réparation de l'ADN Protection des télomères Stabilité du génome Homéostasie du cholestérol Régulation de la glycolyse et de la glyconéogenèse
<i>SIRT7</i>	Deacetylase	Régulation de la transcription de l'ARN Régulation du cycle cellulaire Cardioprotection

Les SIRT possèdent des localisations subcellulaires différentes et traditionnellement nucléaire pour les SIRT1, 6 et 7, cytoplasmique pour SIRT2 et mitochondriale pour les SIRT3, 4 et 5 (Table 5). Cette localisation peut cependant différer selon le type cellulaire ou tissulaire mais également selon l'état d'activité de la protéine : ainsi, l'activation de la protéine SIRT1 entraîne sa translocation depuis le cytoplasme vers le noyau (Tanno et al. 2010), tandis que l'activation de la protéine SIRT3 entraîne sa translocation depuis le noyau vers les mitochondries (Scher, Vaquero, and Reinberg 2007). Parmi les SIRT mitochondriales, la protéine SIRT3 est celle présentant la plus forte activité désacétylase par comparaison aux SIRT4 et 5.

### **3.2.4) L'acétylation non enzymatique**

L'acétylation non enzymatique des protéines a d'abord été observée *in vitro* en présence d'une forte concentration en Acetyl CoA dans les cellules. Cependant, l'étude de l'acétylation non enzymatique a vite été ralentie suite à la découverte des protéines KAT (Narita, Weinert, and Choudhary 2019). Les premiers phénomènes d'acétylation non enzymatique *in vivo* ont été observés plus de quarante ans plus tard chez la levure puis chez les mammifères, des études réalisées sur le foie de souris ont montré que l'acétylation non enzymatique des protéines est principalement retrouvée dans les mitochondries et serait majoritairement due à l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation des AG, conduisant à une augmentation de la production d'Acetyl CoA nécessaire à l'acétylation des protéines (Pougovkina et al. 2014).

### **3.2.5) Rôle de l'acétylation dans le cœur**

L'acétylation est associée à de nombreuses pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension, les cardiomyopathies diabétiques, les arythmies ou encore l'IC (Y. Wang et al. 2014). Cette acétylation est observée suite à des dérégulations pouvant toucher les KATs comme les HDAC (Y. Wang et al. 2014).

Cette acétylation concerne d'une part les protéines histones, dont l'acétylation régule l'état de compaction de la chromatine et favorise la transcription.

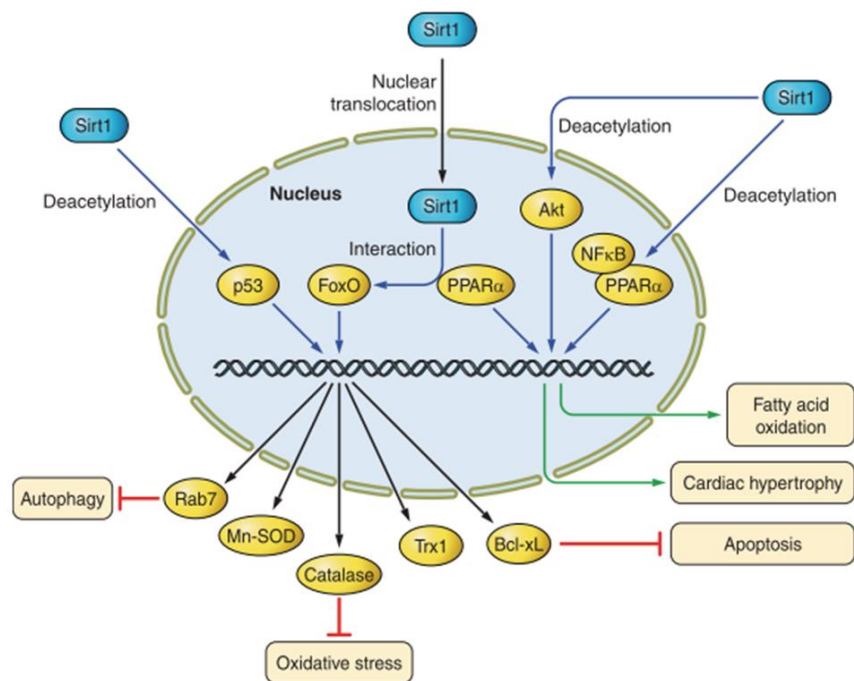
D'autre part, suite à la découverte de l'extension de l'acétylation aux protéines non-histones, l'étude de l'acétylome a mis en évidence l'implication de cette modification post-traductionnelles dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques. L'acétylation est associée à divers processus cellulaires pathologiques tels que l'inflammation, l'apoptose, le stress oxydant ou la fibrose ainsi qu'à de nombreuses pathologies cardiovasculaires qui y sont associées telles que l'hypertension, les cardiomyopathies diabétiques, les arythmies ou encore l'IC (Wang et al. 2014). Cette acétylation concerne à la fois les histones mais également les autres protéines : l'étude de l'acétylome dans le cœur a particulièrement mis en évidence l'importance de l'acétylation des protéines mitochondriales. On observe ainsi une augmentation du taux d'acétylation des protéines mitochondriales dans le cœur IC (Davidson et al. 2020). L'acétylation concerne plus de 60% des protéines mitochondriales et semble jouer un rôle de



régulateur métabolique en ciblant majoritairement les protéines mitochondriales impliquées dans le métabolisme (Parodi-Rullán, Chapa-Dubocq, and Javadov 2018; Zuurbier et al. 2020). De par la forte abondance de l'Acetyl CoA dans la matrice mitochondriale, l'acétylation non enzymatique des protéines semble être majoritaire dans la mitochondrie, bien que l'implication des enzymes ACAT1 et GCN5L1 ne puisse pas être négligée.

Face à la modulation de l'acétylome observé dans les pathologies cardiovasculaires, les protéines SIRT, particulièrement les SIRT1, 3 et 6, ont été largement étudiées ces dernières années.

La protéine SIRT1 est particulièrement connue pour son rôle contre le vieillissement (Figure 62).



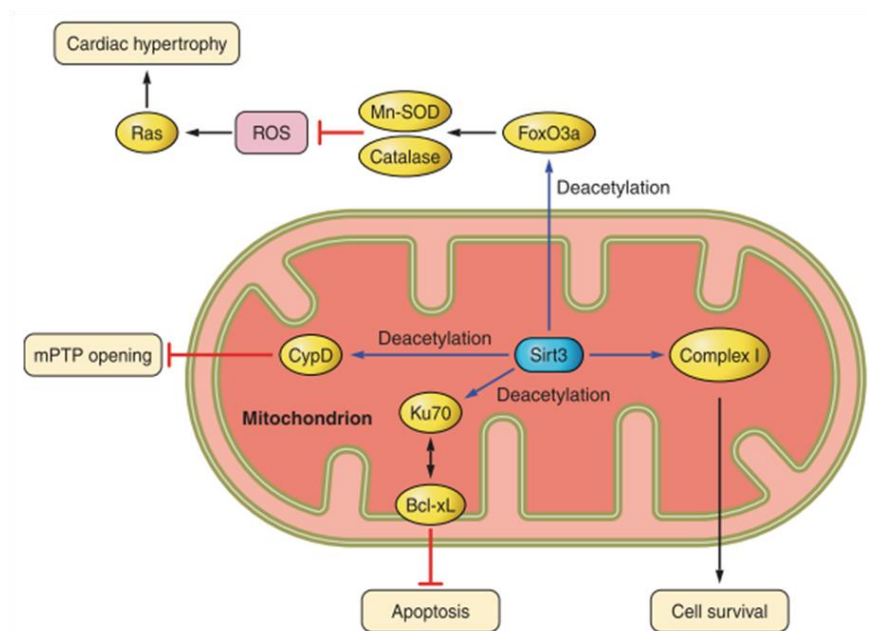
**Figure 62** : Voies de signalisation impliquant SIRT1 dans le cœur (Matsushima and Sadoshima 2015).

Akt : protéine kinase B; Bcl-x1 : *B-cell lymphoma extra large* ; FOXO : *Forkhead box O* ; MnSOD : *manganese superoxide dismutase* ; NF-κB : *nuclear factor κB* ; p53 : *tumor protein 53* ; PPARα : *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* ; Rab7 : *Ras related protein 7* ; Sirt1 : *sirtuin 1* ; Trx1 : *thioredoxine 1*.

Dans le noyau, la protéine SIRT1 peut notamment interagir avec les protéines p53 et FOXO3A pour favoriser la transcription des protéines anti-oxydantes, anti-apoptotiques et en régulant l'autophagie. Par l'intermédiaire des protéines PPARα, Akt et NF-KB, SIRT1 favorise également l'oxydation des AG et module l'hypertrophie des cardiomyocytes. Ainsi, SIRT1

possède un rôle protecteur face à l'hypertrophie induite par un traitement à la PE. Cet effet anti-hypertrophique est cependant annulé lorsque l'expression de PPAR $\alpha$  est diminuée.

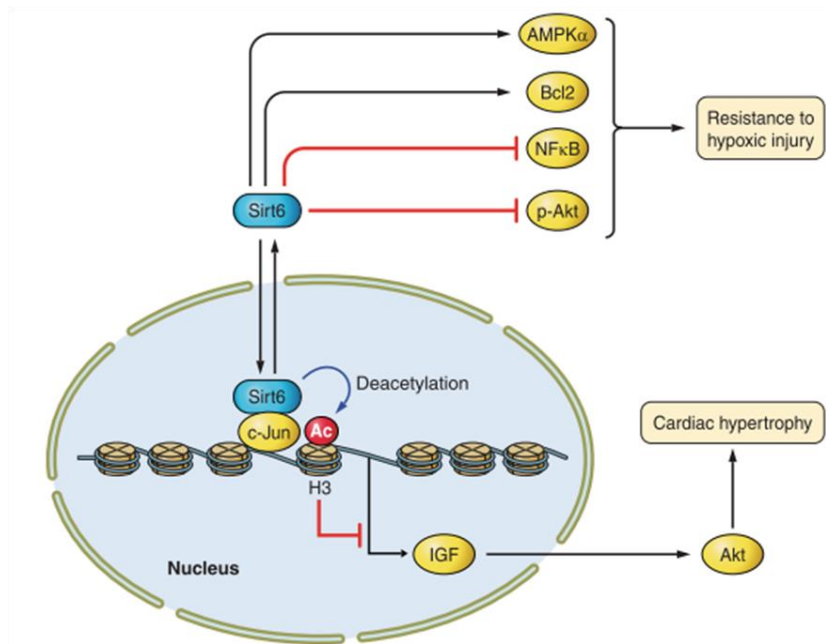
De par sa localisation mitochondriale, la protéine SIRT3 est la principale désacétylase impliquée dans la désacétylation des protéines mitochondriales dans le cœur. De nombreuses études ont notamment montré son effet cardioprotecteur, anti-hypertrophique, et favorisant la dynamique et le métabolisme mitochondrial dans le cœur. (Parodi-Rullán, Chapa-Dubocq, and Javadov 2018). La protéine SIRT3 est notamment impliquée dans l'activation des protéines anti-oxydantes par la désacétylation de la protéine FOXO3a. Elle favorise également la survie cellulaire et inhibe l'apoptose et l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (Figure 63) (Matsushima and Sadoshima 2015).



**Figure 63** : Voies de signalisation impliquant SIRT3 dans le cœur (Matsushima and Sadoshima 2015).

Bcl-xl : *B cell lymphoma extra large* ; CypD : cyclophiline D ; FoxO3a : *Forkhead box O3a* ; MnSOD : *manganese superoxide dismutase* ; mPTP : *mitochondrial permeability transition pore* ; Sirt3 : *sirtuin 3*.

Enfin, la protéine SIRT6 peut également être impliquée dans la régulation de la signalisation cardiaque, particulièrement par son rôle dans la désacétylation de l'histone H3 et la modulation de l'hypertrophie cardiaque et la résistance à l'hypoxie (Figure 64).



**Figure 64** : Voies de signalisation impliquant SIRT6 dans le cœur (Matsushima and Sadoshima 2015).

Ac : acétylé ; Akt : *protein kinase B* ; AMPK : *AMP activated protein kinase* ; Bcl 2 : *B-cell lymphoma 2* ; H3 : histone 3 ; IGF : *insulin growth factor* ; NF-κB : *nuclear factor κB* ; p-Akt : *protein Akt phosphorylée* ; Sirt6 : *sirtuin 6*.

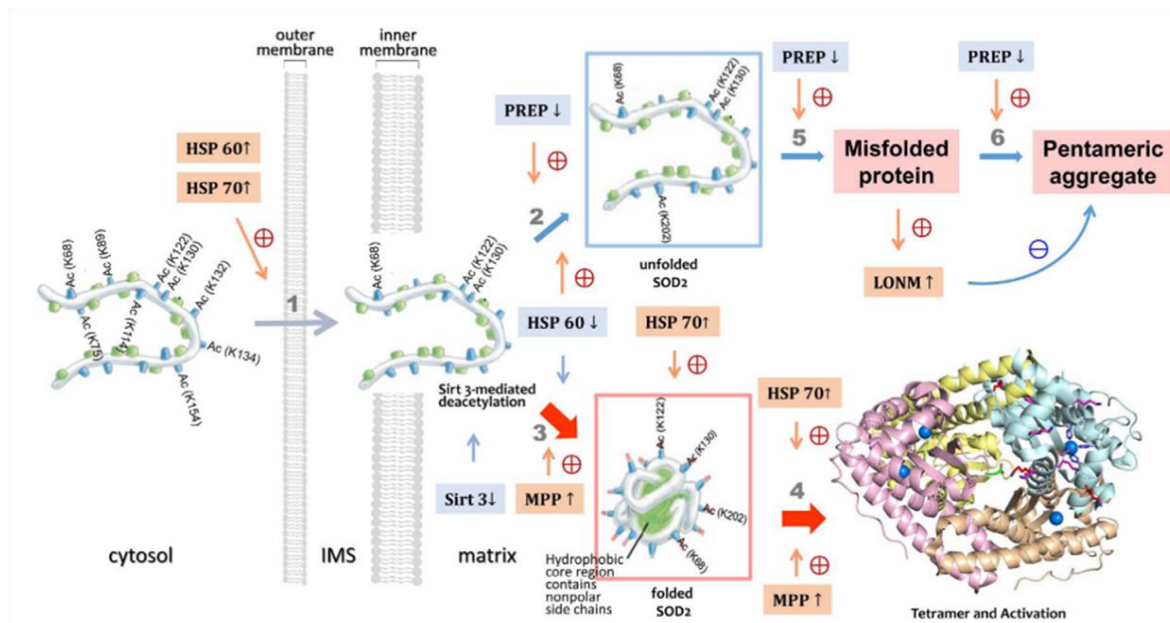
De par l'importance des protéines SIRT dans la régulation des voies de signalisation dans le cœur, l'utilisation des molécules activatrices des SIRT se révèle être une perspective thérapeutique intéressante, notamment contre les effets du vieillissement. On observe en effet diminution du taux de NAD<sup>+</sup> produit dans l'organisme avec l'âge, menant à une diminution de l'activité des SIRT et à une augmentation de l'acétylation des protéines et des facteurs de transcription, qui contribuent aux dysfonctions mitochondriales et aux dommages oxydatifs observés avec l'âge. L'activation des SIRT permettrait alors de contrer certaines voies de signalisation impliquées dans le processus de vieillissement. Cependant, les activateurs les mieux connus à ce jour tels que le resveratrol ne montrent pas de spécificité d'action bien définie (Zuurbier et al. 2020).

### 3.2.6) Acétylation de SOD2

L'acétylation constitue la principale modification post-traductionnelle régulant l'activité de SOD2. Une analyse en spectrométrie de masse réalisée sur des échantillons de

cœurs de souris transgéniques pour SOD2 (SOD2 Tg) a permis de mettre en évidence la présence de dix sites d'acétylation *in vivo* que sont les résidus lysine 68, 75, 89, 114, 122, 130, 132, 134, 154 et 202 (Zhang et al. 2017). De plus, dans un modèle d'acétylation chimique *in vitro*, les résidus lysine 25, 53, 164, 194 et 202 ont été identifiés comme potentiels sites d'acétylation de la protéine SOD2 (Lu et al. 2015).

D'une part, l'acétylation permet de réguler la localisation de la protéine SOD2. Il a en effet été montré dans un modèle les souris SOD2-Tg que la localisation et la conformation de la protéine SOD2 était dépendante de son état d'acétylation et des sites impliqués (Zhang et al. 2017) (Figure 65).



**Figure 65** : Représentation schématique de l'import mitochondrial de la protéine SOD2 selon son statut d'acétylation (Zhang et al. 2017).

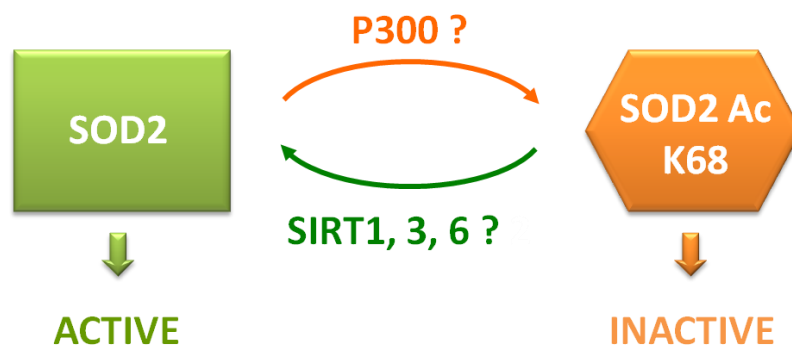
IMS: intermembrane space; HSP 60/70: heat shock protein 60/70; MPP: matrice processing peptidase ; PREP : presequence protease ; Sirt3 : sirtuine 3.

Dans le cytosol, le monomère SOD2 se retrouve sous la forme non conformée et acétylée sur neuf résidus lysine. A l'aide des protéines HSP60 et HSP70, le monomère SOD2 est transloqué dans la mitochondrie, où six résidus lysine seront désacétylés par la protéine SIRT3 au niveau de la membrane mitochondriale interne. Dans la mitochondrie, le monomère SOD2 est alors majoritairement pris en charge par la protéine MPP qui clivera la séquence d'adressage mitochondriale et permettra le repliement correct du monomère SOD2 puis sa tétramérisation et son activation. Plus rarement, lorsque l'expression des protéines HSP70 et PREP est faible, le monomère SOD2 n'est pas correctement replié. On assiste alors à la

formation d'agrégats pentamériques de SOD2 dans la mitochondrie ou à la dégradation sélective des monomères mal conformés après activation de la protéase LONM (Zhang et al. 2017).

Il a ainsi été montré que l'acétylation de la protéine SOD2 est associée à une diminution de son activité (Chen et al. 2011; Cheung et al. 2015; Lu et al. 2015). Des études réalisées sur le modèle cellulaire HEK293T ont en effet montré que la mutation des résidus lysine 68 et 122 en résidus glutamine, mimant l'état acétylé de la protéine car présentant la même structure et la même charge, était associée à une augmentation de la production des anions superoxyde mitochondriaux de 61% pour la lysine 68 et de 21% pour la lysine 122, faisant de la lysine 68 le premier site d'acétylation régulant l'activité de SOD2 (Lu et al. 2015). L'implication des résidus lysine 68 et 122 dans la régulation de l'activité de SOD2 s'explique également par leur localisation centrale dans la protéine, à proximité du site actif de liaison du co-facteur manganèse (Y. Chen et al. 2011).

La régulation de l'acétylation de SOD2 en lysine 68 serait réalisée de manière enzymatique et ferait intervenir l'acétylase P300 et les désacétylases SIRT1, 3 et/ou 6 (Figure 66).



**Figure 66** : Schéma récapitulatif de la régulation de l'acétylation de la protéine SOD2 et des acteurs enzymatiques pouvant être impliqués.

SOD2 : superoxyde dismutase 2 ; SOD2 Ac K68 : forme acétylée de SOD2 en lysine 68 ;  
SIRT1/3/6 : sirtuines 1/3/6.

Plusieurs études ont montré une régulation de l'acétylation ou la désacétylation de la protéine SOD2 par les SIRT1 et 6. Il a en effet été montré dans un modèle *in vivo* de hamsters présentant une dystrophie musculaire que le resveratrol permettrait d'activer la protéine SIRT1 en entraînant sa translocation du cytoplasme au noyau. La protéine SIRT1 serait alors capable

de désacétyler la protéine P300 qui perd sa stabilité et est dégradée par le protéasome. L'ensemble de ces événements est associée à une activation de la protéine SOD2 et une détoxification des ROS (Tanno et al. 2010; Kuno, Tanno, and Horio 2015).

De façon similaire à SIRT1, la protéine SIRT6 est capable de réguler l'activité de la protéine P300 par désacétylation pour protéger les NCM de l'hypertrophie induite par un traitement à la phényléphrine (PE) (Shen et al. 2016). De plus, il a été montré que la protéine SIRT6 est également capable d'activer la protéine Nrf2 dans le cas de cardiomyopathies diabétiques. L'activation de Nrf2 lui permet ensuite de jouer son rôle de facteur de transcription pour différentes protéines anti-oxydantes dont SOD2 (Kasai et al. 2020). Enfin, une étude réalisée sur un modèle de rats présentant un trouble dépressif majeur a montré que l'utilisation du phencyclone hydrochloride, utilisé comme traitement anti-dépresseur dans cette étude, est associée à une augmentation de l'activité de SIRT6, entraînant la désacétylation et l'activation de la protéine SOD2, précédemment acétylée par le complexe P300/CBP (Li et al. 2018).

Enfin, la protéine SIRT3 semble être directement impliquée dans la désacétylation de la protéine SOD2 dans divers contextes pathologiques. L'implication de SIRT3 dans la désacétylation et l'activation de SOD2 a notamment été observée dans le modèle cellulaire H9c2 dans lequel un stress oxydant a été induit par traitement à la doxorubicine (Cheung et al. 2015), en conditions de privation en nutriments dans le modèle cellulaire HEK293T (Chen et al. 2011) ou encore dans l'hypertension induite par traitement à l'Ang II chez la souris (Dikalova et al. 2017). La désacétylation de SOD2 par SIRT3 permettrait ainsi l'inhibition du stress oxydant mais interviendrait également dans la régulation de la dynamique mitochondriale en diminuant la fragmentation mitochondriale observée après une ischémie induite chez la souris par ligature de l'artère carotide commune (Klimova et al. 2020).

Si l'implication des SIRT dans la désacétylation de SOD2 semble être bien décrite dans la littérature, de nombreux points restent à ce jour à élucider. D'une part, si l'implication des SIRT1, 3 et 6 semble être bien établie, l'ensemble des études réalisées jusqu'à ce jour se sont attachées à étudier le rôle de chacun des isoformes SIRT indépendamment, sans étudier l'éventualité d'une régulation interne entre les différents isoformes SIRT au niveau cellulaire. D'autre part, les différentes isoformes des SIRT peuvent présenter des localisations subcellulaires diverses, identique ou non à SOD2 et à sa forme acétylée. Ainsi, la protéine SIRT est principalement décrite pour être mitochondriale tandis que la localisation nucléaire est à ce jour la plus décrite pour les isoformes SIRT1 et 6. De plus, nous avons vu précédemment que

l'état d'acétylation de la protéine SOD2 peut déterminer sa localisation subcellulaire. Or l'interaction des SIRT avec SOD2 n'a jamais clairement été identifiée. Enfin, la spécificité d'action des SIRT reste encore en suspens : les différents isoformes sont-ils capables de désacétyler l'ensemble des résidus lysine de SOD2 ou possèdent-ils une spécificité de substrat ? Dans ce cas, l'ensemble des SIRT sont-elles réellement impliquées dans l'activation de SOD2 ou plus simplement dans la détermination de sa localisation ? Autant de questions qui restent en suspens à ce jour.

Enfin, peu de données à ce jour sont disponibles concernant l'acétylation de SOD2. Cette dernière pourrait être tantôt liée à une simple augmentation de l'Acetyl CoA intracellulaire ou nécessiter l'action d'acetyl transférase spécifique. La protéine P300 reste la seule acetyl transférase décrite comme pouvant intervenir dans l'acétylation de SOD2. Cependant, son mode d'action reste totalement à étudier et à ce jour, peu d'étude se sont étendues sur ce sujet.

# *Objectifs*





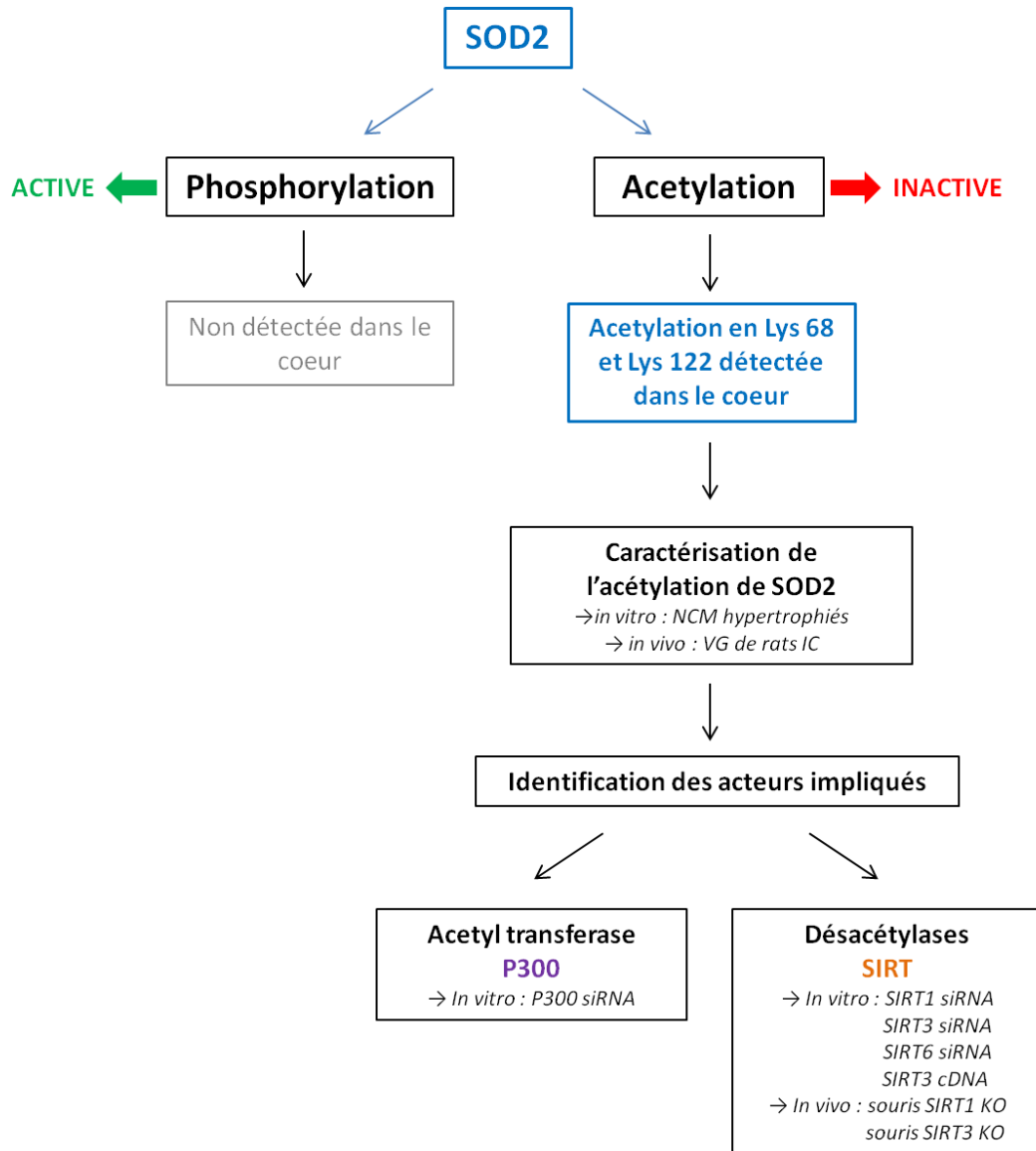
## Objectifs

L'objectif de ma thèse consistait en l'identification des modifications post-traductionnelles de la protéine SOD2 dans le cœur, dans le but de mieux comprendre les mécanismes de régulation de SOD2 dans le contexte physiopathologique du RVG post-IDM et de l'IC. Je me suis plus particulièrement concentrée sur deux modifications post-traductionnelles précédemment décrites pour SOD2 : la phosphorylation et l'acétylation.

Dans un premier temps, j'ai cherché à mettre en évidence l'existence des formes phosphorylée et acétylée de SOD2 dans le cœur. Malgré l'utilisation de différentes techniques telles que le western blot, l'immunoprécipitation ou les gels Phos-TAG, je ne suis pas parvenue à détecter de forme phosphorylée de SOD2 dans le cœur. Je dispose cependant des outils permettant l'étude des formes acétylées de SOD2 en Lys 68 et en Lys 122 et je suis parvenue à détecter ces formes acétylées de SOD2 dans les échantillons disponibles au laboratoire.

Il est connu que l'acétylation de la protéine SOD2 entraîne son inactivation et l'empêche de jouer son rôle de détoxification des anions superoxydes. De plus, nous savons que le RVG post-IDM et l'IC sont associés à un stress oxydant, contribuant aux effets délétères et au développement de l'IC. Il nous semblait donc intéressant d'étudier la régulation du stress oxydant par la protéine SOD2 dans le cœur. Mon projet de thèse s'est donc plus particulièrement concentré sur l'étude de l'acétylation de SOD2 dans le cœur (Figure 67).

Mon premier objectif consistait en l'étude de la régulation de l'acétylation de SOD2 dans le cœur avec l'identification des acteurs impliqués. Pour cela, j'ai mis en place un modèle de cardiomyocytes isolés de rats néonataux (NCM – *neonatal cardiomyocytes*) hypertrophiés par traitement à l'isoprénaline (Iso) et développant un stress oxydant pour caractériser l'expression de SOD2 et déterminer les mécanismes de régulation de cette protéine dans ce modèle. Ce modèle m'a permis d'identifier les acteurs moléculaires responsables des réactions d'acétylation et de désacétylation de SOD2. A partir des données bibliographiques, je me suis concentrée sur le rôle des protéines SIRT1, 3 et 6 dans la désacétylation. J'ai également utilisé des modèles *in vitro* (transfections de NCM) et *in vivo* (souris KO) de modulation de l'expression des SIRT afin de confirmer ou d'infirmer l'implication de ces protéines dans la régulation de l'acétylation de SOD2 (Figure 67).



**Figure 67** : Stratégie de recherche de l'étude des modifications post-traductionnelles de la protéine SOD2 dans le cœur.

cDNA : ADN complémentaire ; IC : insuffisance cardiaque ; KO : *knock out* ; Lys : lysine ; NCM : *neonatal cardiomyocytes* ; siRNA ; *silencing RNA* ; SIRT : sirtuine ; SOD2 : superoxyde dismutase 2 ; VG : ventricule gauche.

Les protéines précédemment identifiées ont ensuite été étudiées dans un modèle expérimental de rats IC afin de confirmer les résultats précédemment obtenus dans un modèle présentant une physiopathologie plus complexe.

Par ailleurs, j'ai inhibée l'expression de l'acetyl transferase P300 dans les NCM afin de déterminer si cette protéine était impliquée dans la régulation de la réaction d'acétylation de SOD2.

## *Objectifs*

Le but de ces travaux consistait ainsi à mieux comprendre les mécanismes de régulation de SOD2 et du stress oxydant dans les mécanismes physiopathologiques du RVG et de l'IC. Ils nous ont permis d'identifier le rôle prépondérant du maintien de l'activité de la protéine mitochondriale SOD2 ainsi que de son interaction avec la désacétylase mitochondriale SIRT3 pour la prise en charge du stress oxydant, ainsi que d'identifier de nouvelles cibles dans la prise en charge de l'hypertrophie cardiomyocytaire.

Afin de contrer le stress oxydant mitochondrial induit par le traitement à l'isoprénaline dans les NCM et l'hypertrophie qui lui est associé, j'ai ensuite utilisé deux molécules anti-oxydantes mimant l'activité SOD (le EUK 134) ou détoxifiant le stress oxydant mitochondrial (la MitoQ). Mon second objectif consistait en l'étude de l'impact de deux traitements anti-oxydants sur le phénotype cardiaque et d'identifier si ces effets passaient par une déacétylation/activation de SOD2.

Dans le but d'identifier les mécanismes cellulaires impactés par l'utilisation du EUK 134 et de la MitoQ, j'ai d'abord caractérisé les effets de ces traitements sur l'hypertrophie, le stress oxydant, ainsi que sur l'acétylation de SOD2 médiée par SIRT3 dans les NCM prétraités par anti-oxydants précédemment au traitement à l'isoprénaline.

Suite à l'identification des effets bénéfiques et/ou délétères du EUK 134 et de la MitoQ, je me suis ensuite concentrée sur l'impact de ces deux traitements sur le métabolisme mitochondrial et la mitophagie.

J'ai ensuite initié l'étude de l'impact du prétraitement au EUK 134 sur les cardiomyocytes isolés de rats adultes (*ACM – adult cardiomyocytes*), présentant un métabolisme différent des NCM et physiologiquement plus pertinent.

J'ai enfin initié l'utilisation du EUK 134 en post-traitement dans les NCM hypertrophiés dans le but de tester son potentiel thérapeutique, qui sera également étudié dans le modèle expérimental de rats IC.

L'objectif de ces travaux était d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes d'actions des traitements anti-oxydants dans l'hypertrophie cardiaque et l'IC.



# *Matériel et méthodes*

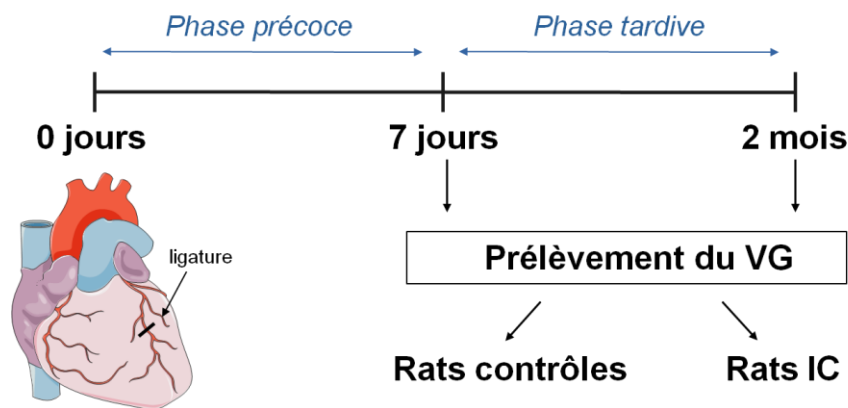


## I) Modèles animaux

### 1) VG de rats IC

Le modèle expérimental d'IC est réalisé en collaboration avec l'unité INSERM U1096 (Rouen) du Pr Vincent Richard. Dans ce modèle, un IDM est induit par ligature de l'artère coronaire descendante gauche chez le rat Wistar mâle âgé de 10 semaines, selon le protocole établi par Mulder *et al.* en 1997 (Figure 68). Les animaux témoins subissent la même procédure chirurgicale hormis pour la ligature de l'artère coronaire. Préalablement à la chirurgie, les rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de sodium méthohexital (50 mg/kg). Afin d'abolir toute sensation de douleur, une injection de intrapéritonéale de xylazine (5 mg/kg) est également réalisée préalablement à l'acte chirurgical.

Après 7 jours ou 2 mois de ligature, les paramètres hémodynamiques et échocardiographiques des animaux sont mesurés après anesthésie des rats par le sodium méthohexital (50 mg/kg) injecté en intrapéritonéal. Puis les rats sont euthanasiés par injection intrapéritonéale d'une dose excessive de sodium pentobarbital (500 mg/kg) et les cœurs des rats témoins et IC sont prélevés et disséqués de manière à conserver le VG et éliminer les zones nécrosées (Figure 68). Les protéines sont ensuite extraites du VG selon la méthode décrite ci-après.



**Figure 68** : Modèle d'IC post-IDM chez le rat.



## 2) Souris SIRT1 KO

Les échantillons issus de souris SIRT1 KO (Prola et al. 2017) ont été obtenus par collaboration avec l'unité INSERM UMR-S1180 (Châtenay Malabry) et le Dr Anne Garnier.

Un vecteur contenant l'exon 4 de SIRT1 floxée et une cassette de résistance au G418 est créée puis insérée par électroporation dans les cellules souches embryonnaires 129Sv. Les cellules souches correctement ciblées sont sélectionnées par le G418 puis injectées dans des blastocystes C57BL/6J. Les chimères mâles formées sont ensuite croisées à des femelles C57BL/6J exprimant la recombinaison Flp. Les souris hétérozygotes issues du croisement sont ensuite elles-mêmes croisées à des souris C57BL/6J pour obtenir des animaux homozygotes présentant la délétion de l'exon 4 de SIRT1.

Les souris précédemment obtenues sont de nouveau croisées à des souris C57BL/6J UBC-Cre-ER<sup>T2</sup> puis la recombinaison Cre-Lox est induite à l'âge de 2 mois par injection intrapéritonéale de tamoxifène (25 mg/kg par jour pendant 4 jours), un activateur spécifique de la recombinaison Cre-ER<sup>T2</sup>. Puis les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale, les cœurs sont prélevés et les protéines extraites du tissu cardiaque.

## 3) Souris SIRT3 KO

Les échantillons issus de souris SIRT3 KO (129-Sirt3<sup>tm1.1Fwa</sup>/J, Jackson Laboratory) ont été obtenus en collaboration avec le Pr Luc Bertrand (Institut de Recherche Expérimentale et Clinique (IREC), pôle de recherche cardiovasculaire (CARD), Bruxelles). Dans ce modèle, les exons 2 et 3 de la protéine SIRT3 ont été délétés par recombinaison Cre-Lox chez les souris C57BL/6J.

Un vecteur contenant une cassette de résistance à la néomycine et les exons 2 et 3 de SIRT3 floxés est d'abord construit. Ce vecteur est inséré par électroporation dans des cellules souches embryonnaires de la lignée 129Sv. Les cellules correctement ciblées sont sélectionnées par la néomycine puis injectées dans des blastocystes de lignée C57BL/6J. Les chimères mâles obtenues sont ensuite croisées à des femelles de lignée 129Sv, puis les souris hétérozygotes issues du croisement sont elles-mêmes croisées à des souris 129Sv Ella-Cre, entraînant l'élimination des exons floxés et de la cassette de résistance à la néomycine. Les souris hétérozygotes obtenues sont ensuite croisées pour former des animaux homozygotes.

Après 4 mois, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale, puis les cœurs sont récupérés afin de procéder à l'isolement des cardiomyocytes, suivie d'une extraction des protéines.

## **II) Culture cellulaire**

### **1) Modèles cellulaires**

#### ***1.1) Culture primaire de cardiomyocytes de rats néonataux.***

Les cardiomyocytes de rats néonataux (NCM – *Neonatal CardioMyocytes*) sont isolés à partir des ventricules de rats prélevés un à deux jours après la naissance. Après endormissement sur la glace, les rats sont décapités puis les cœurs prélevés et conservés sur la glace dans une solution saline équilibrée d'ADS 1X (20 mM HEPES, 120 mM NaCl, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5 mM glucose, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 6.2). Lorsque l'ensemble des cœurs a été prélevé, ces derniers sont lavés par deux bains successifs dans l'ADS 1X afin d'éliminer le sang. Les oreillettes sont ensuite éliminées et les ventricules cisailés en fins morceaux. Ils sont d'abord prédigérés dans une solution enzymatique contenant 0,04 % [m/v] de collagénase de type II (LS004174, Worthington) et de 0,05 % [m/v] de pancréatine (P3292, Sigma) pendant 8 min à 37°C sous agitation à 180 rotations par minute (rpm). Le surnageant est ensuite éliminé puis les ventricules sont digérés pendant 15 min à 37°C sous agitation à 180 rpm dans la solution enzymatique. A l'issue de la digestion, le surnageant est récupéré et 1 ml de serum de veau fetal (SVF) est ajouté pour arrêter l'action des enzymes. L'ensemble est centrifugé à 133 g pendant 1 min, puis le culot de cellules est resuspendu dans 4 ml de milieu de culture complet DMEM (*Dulbecco's modified eagles medium*) + M199 (*Medium 199*) (4:1 [v/v]) contenant 10 % [v/v] de sérum de cheval, 5 % [v/v] de SVF et 1 % [v/v] de pénicilline/streptomycine (P/S). Ces étapes sont répétées à 6 reprises, correspondant à la digestion maximale des ventricules. Les cellules isolées sont conservées à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub> durant le temps de l'isolement. Suite aux digestions successives, les suspensions cellulaires obtenues sont regroupées puis centrifugées pendant 7 min à 133g. Le surnageant est éliminé et les cellules resuspendues dans le milieu de culture complet.

## *Matériel et méthodes*

Le protocole d'isolement permet de récupérer deux types cellulaires : les cardiomyocytes et les fibroblastes. Afin de les séparer, la suspension de cellules est déposée sur un gradient de percoll (P4937, Sigma) (58,5 % [v/v] de percoll pour le gradient bas, 40,5 % [v/v] de percoll pour le gradient haut) puis une centrifugation de 30 min à 1600g est réalisée. A l'issue de la centrifugation, les fibroblastes, moins denses que les cardiomyocytes, resteront au dessus des deux gradients tandis que les cardiomyocytes seront regroupés entre les deux gradients. Les cardiomyocytes sont alors récupérés, dilués dans du milieu de culture complet puis dénombrés sur cellule de Malassez. Ils sont ensemencés à raison de 400 000 à 650 000 cellules par puits de plaque 6 puits pour les extractions protéiques et de 650 000 à 800 000 cellules sur lamelles de verre pour les expériences d'immunofluorescence dans des puits préalablement incubées avec du collagène 1X (C8919, Sigma) pendant 2h à 37°C. Les cellules sont maintenues en culture pendant sept jours à 37°C et dans une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub>.

### ***1.2) Culture primaire de cardiomyocytes de rats adultes.***

Les cardiomyocytes de rats adultes (ACM – *Adult CardioMyocytes*) sont isolés à partir de cœurs de rats Wistar à l'aide d'un appareil de perfusion de Langendorff. L'isolement des cardiomyocytes de rats adultes a été réalisé au sein du laboratoire du Pr Luc Bertrand (IREC, CARD, Bruxelles) suite à l'obtention d'une bourse de mobilité internationale de recherche auprès de l'I-SITE ULNE (Université Lille Nord Europe).

Brièvement, les rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de nembutal (1μl/g). Puis la cage thoracique est ouverte et le cœur est prélevé puis placé dans une solution de Krebs-Henseleit (10 % Krebs 10X, HEPES 10 mM, glucose 5,5 mM, pyruvate 2 mM, NaCl 25 mM, QSP eau milliQ). Les tissus gras entourant l'aorte sont éliminés puis le cœur est canulé par l'aorte sur le système de perfusion de Langendorff. Des massages lents sont réalisés sur le cœur afin d'éliminer les caillots sanguins, puis le cœur est lavé par perfusion de la solution de Krebs-Henseleit. Il est ensuite digéré dans une solution de Krebs-Henseleit contenant 0,1 % [m/v] de collagénase de type II et 0,5 % [m/v] de BSA (711454, Roche). La digestion enzymatique est réalisée en circuit fermé avec ajout de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub> 0,1 M) après 7 et 10 min de digestion et jusqu'à perte du goutte à goutte et apparition d'un flux constant de solution de digestion sortant du cœur.

## Matériel et méthodes

Ce dernier est alors récupéré dans une boîte de Pétri de 3 cm de diamètre contenant de la solution de digestion. Les oreillettes sont éliminées et le cœur cisailé en fins morceaux. L'ensemble est transféré dans un erlenmeyer contenant 10 mL de solution de Krebs-Henseleit, avec du  $\text{CaCl}_2$  0,2 mM et 1,25 % de BSA, puis agité manuellement pendant 10 min au bain marie à 37°C. Le reste de la solution (30 mL environ) est ensuite ajouté puis l'agitation est poursuivie pendant 4 min à 37°C au bain marie, avec ajout de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M toutes les minutes à 4 reprises. Suite à l'agitation, l'ensemble est transféré dans un tube et sédimenté pendant 5 min au bain marie à 37°C. Le surnageant est éliminé et le culot de cellules délicatement resuspendu dans 20 ml de solution de Krebs-Henseleit à concentration supérieure en  $\text{CaCl}_2$  (1 mM). L'ensemble est de nouveau sédimenté pendant 5 min au bain marie à 37°C. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot de cardiomyocytes délicatement resuspendu dans le milieu de culture complet MEM (*Minimum Essential Medium*, M4780, Sigma) contenant de l'HEPES 20 mM (H6147, Sigma), 2,5 % de SVF et 2 % de P/S et les cellulesensemencées en boîtes de Pétri de 3 cm de diamètre préalablement incubées avec 15  $\mu\text{g}$  de laminine (L2020, Sigma) diluée dans le milieu de culture dépourvu de sérum. La digestion d'un cœur permet ainsi l'ensemencement d'une vingtaine de boîte.

## 2) Traitements pharmacologiques

### 2.1) Stimulation pro-hypertrophique à l'isoprénaline

L'utilisation de l'isoprénaline permet d'induire une hypertrophie des cellules NCM et ACM par stimulation de la voie béta-adrénergique.

Avant traitement, les NCM sont mis en présence d'un milieu de culture dépourvu de sérum pendant 24h, puis les cellules sont traitées avec l'isoprénaline (1747, Tocris) à la concentration de 10  $\mu\text{M}$  pendant 24h ou 48h dans le milieu de culture dépourvu de sérum.

Deux heures après l'ensemencement, les ACM sont mis en présence d'un milieu de culture dépourvu de sérum pendant 24h, puis le milieu dépourvu de sérum est renouvelé. Après 1h, le traitement à l'isoprénaline est directement ajouté dans le milieu de culture pour les 48h

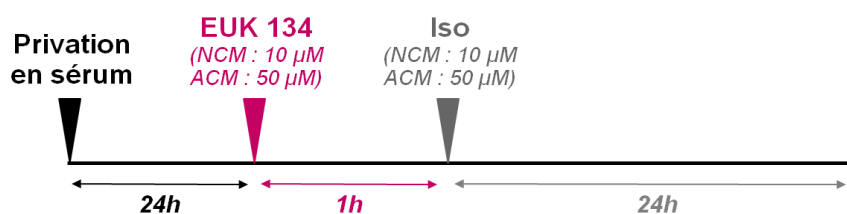
suivantes en quantité suffisante pour atteindre une concentration finale d'isoprénaline de 50  $\mu\text{M}$ .

## 2.2) Traitements anti-oxydants

### 2.2.1) Traitement au EUK 134

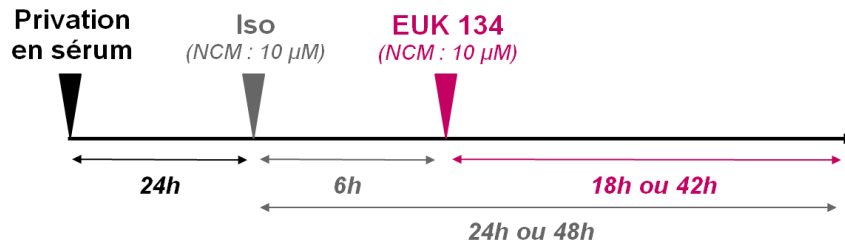
La molécule EUK 134 est une molécule anti-oxydante mimant l'activité des protéines SOD et catalase et assurant la détoxification des anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène. Il s'agit d'un dérivé manganèse-salen de faible poids moléculaire, ce qui lui assure une meilleure stabilité et biodisponibilité que les dérivés protéiques, et possédant une activité catalytique forte.

Afin de prévenir le stress oxydant induit par le traitement à l'isoprénaline, le EUK 134 a été utilisé de manière préventive sur les NCM et les ACM en pré-traitement précédemment au traitement à l'isoprénaline. Dans ce but, il a été incubé pendant 1h à la concentration de 10  $\mu\text{M}$  pour les NCM et à la concentration de 50  $\mu\text{M}$  pour les ACM dans le milieu de culture dépourvu de sérum. Les cellules ont été ensuite traitées à l'isoprénaline tel que décrit précédemment (Figure 69).



**Figure 69** : Représentation schématique des conditions d'utilisation du pré-traitement au EUK 134 dans les NCM et ACM hypertrophiés.  
 $\mu\text{M}$  : micromolaire ; ACM : *adult cardiomyocytes* ; Iso : isoprénaline ; NCM : *neonatal cardiomyocytes*.

Dans une visée thérapeutique, le EUK 134 a également été utilisé en post-traitement sur les NCM traités à l'isoprénaline. Dans ce cas, les cellules ont été traitées à l'isoprénaline tel que précédemment décrit et le EUK 134 à la concentration de 10  $\mu\text{M}$  a été ajouté au milieu de culture après 6h de traitement à l'isoprénaline (Figure 70).

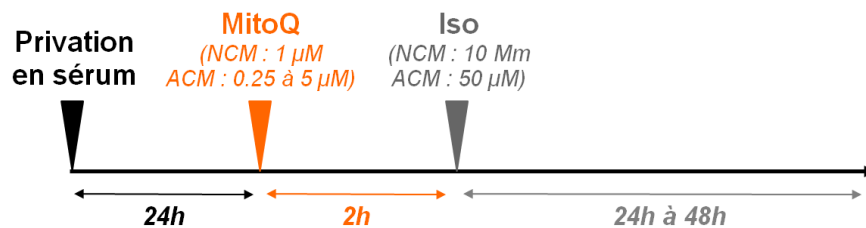


**Figure 70** : Représentation schématique des conditions d'utilisation du post-traitement au EUK 134 dans les NCM hypertrophiés.  
 μM : micromolaire ; Iso : isoprénaline ; NCM : *neonatal cardiomyocytes*.

### 2.2.2) Traitement à la MitoQuinone

La MitoQuinone (MitoQ) est une molécule anti-oxydante dérivée de l'ubiquinone et dirigée spécifiquement à la mitochondrie à l'aide d'une chaîne alkyl de 10 carbones liée à un cation lipophile triphénylphosphonium (TPP), et s'accumulant à la mitochondrie par utilisation du potentiel membranaire mitochondrial.

Après 24h de privation en sérum, les cellules sont pré-traitées à la MitoQ (10-1363, Focus Biomolecules) à la concentration de 1 μM pendant 2h dans un milieu dépourvu de sérum. Puis le milieu de culture est remplacé par du milieu frais et les cellules traitées à l'isoprénaline comme précédemment décrit (Figure 71).



**Figure 71** : Représentation schématique des conditions d'utilisation du pré-traitement à la MitoQ 134 dans les NCM et les ACM hypertrophiés.  
 μM : micromolaire ; ACM : *adult cardiomyocytes* ; Iso : isoprénaline ; NCM : *neonatal cardiomyocytes*.

### 3) Transfection des cellules

#### 3.1) Transfection de siRNA

L'expression des protéines SIRT1, SIRT3, SIRT6 et P300 a été inhibée dans les NCM à l'aide de siRNA (*silencing ribonucleic acid*), des petites séquences d'ARN non codants interagissant spécifiquement avec la séquence de la protéine cible pour la dégrader ou inhiber sa traduction. La transfection des cellules est réalisée 24h après leur ensemencement dans un milieu dépourvu de P/S afin de favoriser l'action de l'agent transfectant et l'entrée du siRNA. Les siRNA *Non Targeting* (NT siRNA) sont utilisés comme contrôle.

Dans un premier temps, les siRNA (Horizon Discovery) à la concentration de 20  $\mu$ M sont dilués à la concentration souhaitée (Table 7) dans 200  $\mu$ L de milieu OptiMEM (31985070, Gibco) par puits.

**Table 7** : Tableau récapitulatif des conditions de transfection des siRNA

siRNA	Référence	Concentration utilisée
NT	D-001810-10-20	20 nM / 100 nM
SIRT1	L-094699-02-0010	20 nM
SIRT3	L-084761-03-0010	20 nM
SIRT6	L-100413-02-0010	20 nM
P300	L-101658-02-0010	100 nm

En parallèle, 5  $\mu$ l d'agent transfectant Dharmafect (T-2001-03, Horizon Discovery) sont dilués dans 200  $\mu$ L de milieu OptiMEM pour chaque puits à transfecter. Les deux préparations sont incubées pendant 5 min à RT (*room temperature* – température ambiante), puis elles sont regroupées dans un même tube et incubées pendant 20 min à RT. Le milieu de culture dépourvu de P/S est ensuite ajouté à hauteur de 1,6 ml de milieu par puits, puis les cellules sont incubées avec les siRNA pendant 72h à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>.

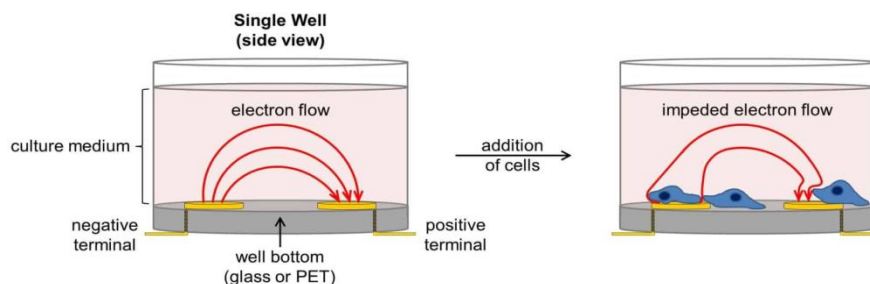
### 3.2) Transfection de plasmides

Afin d'induire une augmentation de l'expression de la protéine SIRT3, les NCM ont été transfectées par le plasmide pcMV6 dans lequel a été cloné la séquence nucléotidique de la protéine SIRT3 (RN203062, Origene). Le plasmide pcMV6 non cloné (PS100001, Origene) est utilisé en tant que contrôle.

La transfection des cellules est réalisée 24h après leur ensemencement dans un milieu de culture complet. Dans ce but, le plasmide (3 µg) est dilué dans 200 µL de milieu OptiMEM par puits à transfecter, puis 3 µl d'agent transfectant lipofectamine 2000 (11668019, Invitrogen) est ajouté. La préparation est incubée pendant 5 min à RT, puis 1,8 ml de milieu de culture complet est ajouté et les cellules sont incubées pendant 72h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

## 4) Analyse cellulaire en temps réel

Le suivi du comportement cellulaire en temps réel (RTCA – *Real Time Cell Analysis*) est réalisé à l'aide de la technologie iCELLingence (00380601000, Agilent Technologies). Dans ce but, les cellules sont ensemencées à hauteur de 40 000 cellules par puits dans des plaques de 8 puits dont le fond est tapissé à 80 % d'électrodes en or (00300600840, Agilent Technologies). La circulation d'un courant alternatif de faible voltage (20 mV) dans ce réseau d'électrodes permet le suivi en temps réel du comportement des cellules par mesure de l'impédance, correspondant à la résistance des cellules adhérentes au passage du courant (Figure 72). Ainsi, l'impédance dépendra de l'adhésion, de la prolifération ou encore de la morphologie des cellules en culture.



**Figure 72** : Représentation schématique du principe de mesure de l'impédance.



Les cellules sont maintenues à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub> et les valeurs d'impédances sont mesurées pour chaque puits toutes les 15 min pendant toute la durée de l'expérience. Elles sont reportées par le logiciel RTCA software Lite (ACEA) sous la forme d'un cell index (iCell) correspondant à l'équation  $iCell = (R_{cell} - R_m) / R_m$  où  $R_{cell}$  correspond à la résistance des cellules adhérentes à un temps donné et  $R_m$  à la résistance du milieu de culture seul.

## **5) Mesure de la respiration par la technique d'oxygraphie**

A la fin des traitements, les NCM sont incubées dans la trypsine pendant 10 min à 37°C, puis l'action de la trypsine est arrêtée par l'ajout de milieu de culture complet. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 7 min à 133g. Le surnageant est éliminé et les cellules resuspendues dans du milieu de culture complet puis comptées sur cellule de Malassez. Les cellules sont ensuite incubées dans l'oxygraphe (O2K, Oroboros Instrument) à 37°C et sous agitation. Après 15 min de stabilisation, permettant la mesure de la respiration au repos, l'ajout d'oligomycine A (inhibiteur de l'ATP synthase) à la concentration de 5 nM permet de mesurer la respiration correspondant à la fuite de protons. Puis le CCP (agent découplant) est ajouté à plusieurs reprises et à concentrations croissantes de 0.5 à 2.5 µM jusqu'à atteindre la consommation maximale en oxygène. Enfin, l'ajout d'antimycine A (inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale) à la concentration 2.5 µM permet de mesurer la respiration non mitochondriale dans les NCM.

## **III) Analyses biochimiques**

### **1) Extractions protéiques**

Dans le tissu cardiaque, les protéines sont extraites sur la glace à partir d'un fragment de VG d'environ 20 mg. Le tissu est placé dans un tube et broyé sur la glace à l'aide d'un disperseur (Ultra-Turrax) dans un volume de 500 µL de tampon RIPA 1X contenant des antiprotéases (11873580001, Roche), des antiphosphatases (*Phosphatase inhibitor cocktail 2*

(P5726, Sigma) et *Phosphatase inhibitor cocktail 3* (P0044, Sigma)) et 200 mM de sodium orthovanadate (S6508, Sigma). Les lysats obtenus sont ensuite incubés sur une roue à 4°C pendant 1h, puis une centrifugation de 15 min à 12 000 g et 4°C est réalisée. Le surnageant, contenant la fraction soluble et les protéines d'intérêt, est récupéré et les échantillons conservés à -20°C.

Les protéines issues des NCM sont extraites dans le tampon RIPA 2X précédemment décrit. A la fin des traitements, les puits sont lavés à 2 reprises par le PBS 1X, puis les cellules sont grattées sur la glace dans un volume de 40 µL de tampon RIPA 2X contenant des antiprotéases, des anti-phosphatases et du sodium orthovanadate. De nouveau, les lysats sont agités sur une roue pendant 1h à 4°C puis centrifugés pendant 15 min à 12 000g afin de récupérer les protéines solubles présentes dans le surnageant.

## **2) Fractionnement cytoplasme-noyaux**

Afin de séparer le cytoplasme des noyaux dans les NCM, un fractionnement subcellulaire est réalisé à l'aide du kit NE-PER (78833, Thermo Scientific). La réalisation de ce fractionnement nécessite une quantité minimale de 1,2 millions de cellules par condition,ensemencées en plaques 6 puits à raison de 400 000 cellules par puits.

A la fin des traitements, les cellules sont lavées à 2 reprises dans le PBS 1X puis incubées dans la trypsine pendant 20 min à 37°C. L'action de la trypsine est arrêtée par l'ajout de milieu de culture complet, puis les cellules sont transférées dans des tubes et centrifugées pendant 7 min à 133 g. Le surnageant est éliminé et les cellules lavées par resuspension dans le PBS 1X. Elles sont ensuite de nouveau précipitées par centrifugation pendant 7 min à 133g, puis le culot de cellules obtenu est resuspendu dans 50 µL de tampon d'extraction cytoplasmique I (CER I). Après 10 min d'incubation sur la glace, un volume de 5,5 µL de tampon d'extraction cytoplasmique II (CER II) est ajouté, puis une nouvelle incubation est réalisée sur la glace pendant 1 min, précédée et suivie par une agitation au vortex pendant 5 sec. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5 min à RT et à vitesse maximale sur une centrifugeuse de paillasse, puis le surnageant, contenant les protéines cytoplasmiques, est récupéré. Le culot est quant à lui resuspendu dans 30 µL de tampon d'extraction nucléaire (NER) puis vortexé pendant 10 sec et incubé sur la glace pendant 10 min. Ces étapes sont répétées pour une durée totale d'incubation de 40 min. Puis une dernière centrifugation de 10

min à RT et à vitesse maximale est réalisée et le surnageant, contenant les protéines nucléaires, est récupéré. Les échantillons sont conservés à -20°C.

### **3) Fractionnement cytoplasme-mitochondries**

Le fractionnement subcellulaire cytoplasme-mitochondries est réalisé selon la méthode décrite par Fazal *et al.* en 2017, à partir d'une quantité minimale de 2 millions de NCM par condition ensemencées en boîte de Pétri de 10 cm de diamètre ou à partir du VG de cœur de rat Wistar.

Afin de réaliser le fractionnement à partir des NCM, les cellules sont d'abord lavées à deux reprises dans le PBS 1X puis grattées sur la glace dans 750 µl de tampon H (0.3 M sucrose, 5 mM TES, 0.2 M EGTA). Puis 500 µl de tampon H contenant de 0.1% [m/v] de BSA est ajouté et les tubes agités par 7 retournements délicats.

Pour procéder au fractionnement sur tissu cardiaque, le cœur de rat Wistar est d'abord disséqué afin d'éliminer les oreillettes et le ventricule droit. Seul le VG est conservé : il est d'abord lavé dans le tampon H puis cisaillé en fins morceaux dans 5 ml de tampon H. Le tissu est ensuite broyé au disperseur (Ultra-turrax) dans le tampon H, puis 3 ml de tampon H contenant de la BSA sont ajoutés et les tubes délicatement agités par retournement à 7 reprises. Les étapes suivantes du protocole sont communes pour les NCM et le VG.

Les échantillons sont d'abord centrifugés pendant 10 min à 500g et 4°C. Le surnageant est récupéré et une nouvelle centrifugation de 10 min à 3000g et 4°C est réalisé. Le surnageant, correspondant à la fraction cytoplasmique, est récupéré et le culot, correspondant à la fraction mitochondriale, est resuspendu dans du tampon RIPA 2X. Après ajout de tampon RIPA 2X dans les fractions cytoplasmiques, les échantillons sont agités sur une roue pendant 1h à 4°C puis centrifugés pendant 15 min à 12 000 g et à 4°C. Le surnageant, contenant les protéines d'intérêt, est récupéré et les échantillons stockés à -20°C.

### **4) Dosage de protéines**

La concentration en protéines des échantillons est déterminée selon la méthode de Bradford, à l'aide d'une solution de réaction contenant 20 % [v/v] de réactif de dosage *BioRad Protein Assay* (5000001, BioRad) et 80 % d'eau milliQ dans laquelle est ajouté un volume

connu de l'échantillon à doser. Une gamme étalon à concentrations croissantes de BSA (0, 1, 2, 5, 10, 15 et 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) est réalisée. La gamme étalon et les échantillons sont déposés en triplicats sur une plaque 96 puits et l'absorbance est mesurée à 595 nm au lecteur de plaque PowerWave XS2 (Biotek). La concentration de l'échantillon est déterminée par report de la valeur d'absorbance sur la gamme étalon.

## 5) Western blot

Le western blot est une technique semi-quantitative permettant de mesurer l'expression d'une protéine cible au sein d'un mélange protéique. Il se décompose en plusieurs étapes que sont la séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE, le transfert des protéines sur une membrane poreuse, une immunodétection des protéines ciblées et la révélation du signal obtenu.

### 5.1) *Electrophorèse SDS-PAGE*

L'électrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) consiste en la séparation des différentes protéines présentes dans un échantillon en fonction de leur poids moléculaire. Dans ce but, la concentration en acrylamide du gel utilisé est choisie selon les poids moléculaires des protéines d'intérêt (Table 8).

**Table 8 :** Tailles des protéines séparées en électrophorèse SDS-PAGE selon le pourcentage d'acrylamide utilisé.

<b>Pourcentage d'acrylamide</b>	<b>Taille des protéines séparées</b>
<b>10 %</b>	20 à 70 kDa
<b>15 %</b>	10 à 40 kDa
<b>4-12 %</b>	10 à 120 kDa

Dans le cas d'un gel d'acrylamide à concentration constante, les échantillons sont dilués dans le tampon Laemmli (62,5 mM Tris HCl pH 6.8, 2 % [m/v] SDS, 25 % [v/v] glycérol,

## Matériel et méthodes

0,01 % bleu de bromophénol, 5 %  $\beta$ -mercaptoéthanol) puis dénaturés par chauffage pendant 10 min à 95°C. Ils sont ensuite déposés sur le gel d'acrylamide réalisé au préalable (Table 9) et placé dans une cuve de migration contenant du tampon de migration. La migration est réalisée à 90V dans le gel de concentration puis est augmentée à 120V dans le gel de résolution, jusqu'à la sortie du bleu de bromophénol du gel.

**Table 9** : Tableau récapitulatif de la composition des gels d'électrophorèse.

<b>Composition pour un gel</b>	<b>Gel de concentration</b>	<b>Gel de résolution</b>	
<b>Pourcentage d'acrylamide</b>	<b>4 %</b>	<b>10 %</b>	<b>15 %</b>
<i>Eau milliQ (mL)</i>	1,58	4,85	3,6
<i>Acrylamide/bisacrylamide 40 % (mL)</i>	0,25	2,5	3,75
<i>Tris HCl 1,5 mM pH 8,8 (mL)</i>		2,5	2,5
<i>Tris HCl 0,5 mM pH 6,8 (mL)</i>	0,63		
<i>SDS 10 % (<math>\mu</math>L)</i>	25	100	100
<i>APS 10X (<math>\mu</math>L)</i>	12,5	50	50
<i>Temed (<math>\mu</math>L)</i>	2,5	5	5

Dans le cas de gels à gradient de concentration (4-12%) en acrylamide (NuPAGE Novex 4-12%, NP0321, Invitrogen), les échantillons sont dilués dans 25% [v/v] de tampon LDS (NP0007, Invitrogen) et 10% [v/v] d'agent réducteur (NP0009, Invitrogen), puis chauffés pendant 10 min à 75°C. Ils sont ensuite déposés sur le gel pré-coulé préalablement placé dans une cuve contenant 500 ml de tampon de migration MES SDS 1X (NP0002, Invitrogen) à l'extérieur des gels et 200 ml de tampon MED SDS 1X contenant 500  $\mu$ L d'anti-oxydant (NP0005, Invitrogen) entre les deux gels. La migration des échantillons est réalisée à 200V constants jusqu'à la sortie du bleu.

### **5.2) Transfert des protéines sur membrane**

Lorsque la migration est terminée, les protéines séparées sur le gel de résolution sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,2  $\mu$ m de porosité (170-4158, BioRad) à l'aide du système Trans-Blot Turbo. Dans ce but, le gel de résolution est déposé sur une membrane de nitrocellulose. L'ensemble est entouré de papier Whatmann imbibé de tampon de transfert et placé dans une cassette prévue à cet effet. Le transfert est réalisé à 25V et 2.5A pendant 10 min. A la fin du transfert, la membrane est lavée à l'eau milliQ puis colorée au rouge Ponceau (ab146313, abcam) afin de vérifier l'homogénéité des dépôts ainsi que l'efficacité de

la migration et du transfert. La coloration au rouge Ponceau est ensuite éliminée par lavage au TBS-Tween (0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% [v/v] Tween) sous agitation et à RT.

### **5.3) Immunodétection**

Afin de bloquer les sites de fixation aspécifiques de l'anticorps primaire (Ac I) dirigé contre la protéine d'intérêt, la membrane est d'abord incubée pendant 1h à RT dans une solution de saturation diluée dans le TBS-Tween. Puis la membrane est incubée avec l'Ac I, détectant de manière spécifique la protéine d'intérêt, pendant une nuit à 4°C ou 3h à RT sous agitation dans une solution identique à la solution de saturation utilisée pour la plupart des cas et à la dilution souhaitée (Table 10).

Suite à l'incubation de l'Ac I, la membrane est lavée à trois reprises dans le TBS-Tween pendant 10 min à RT et sous agitation afin d'éliminer l'excédent d'Ac I. Puis l'anticorps secondaire (Ac II) (chèvre anti-souris, 115-035-003, Jackson Immuno Research ou chèvre anti-lapin, 111-035-003, Jackson Immuno Research), dirigé de manière spécifique contre l'espèce chez laquelle a été produite l'Ac I et couplé à la peroxidase de raifort (*HorseRadish Peroxidase*, HRP), est incubé pendant 1h à RT dans la solution de saturation et à la dilution nécessaire (Table 10). Cette incubation est de nouveau suivie de trois lavages de 10 min à RT et sous agitation dans le TBS-Tween.

Lorsque différents Ac sont successivement incubés sur une même membrane, une étape de déshybridation du couple Ac I/Ac II précédemment utilisé est alors nécessaire. Dans ce cas, la membrane est incubée pendant 10 min dans une solution de déshybridation (46430, Thermo Scientific). Elle est ensuite lavée à trois reprises dans le TBS-Tween pendant 10 min à RT et sous agitation avant de procéder à un nouvel immunomarquage.

**Table 10** : Conditions de western blot pour les différentes protéines étudiées.

Protéine	Masse moléculaire (kDa)	Fournisseur	Référence	Echantillons	Espèce	Solution de saturation	Dilution Ac I	Dilution Ac II
3-NitroTyrosine		Abcam	ab110282	VG rat	souris	BSA 5%	1/1000	1/10000
4-HNE		Abcam	ab46545	VG rat	lapin	BSA 5%	1/1000	1/5000
Acetyl lysine		Cell signaling	9441S	NCM	lapin	Lait 2%	1/1000	1/5000
Actine sarcomérique	42	Gibco	M0874	NCM	souris	Lait 5%	1/5000	1/10000
ATP synthase alpha	54	Invitrogen	A-21350	NCM	souris	Lait 5%	1/10000	1/20000
				VG rat				
Beclin	58	Cell signaling	3738S	NCM	rabbit	Lait 5%	1/1000	1/10000
Catalase	60	Sigma	C0979	NCM	souris	Lait 5%	1/1000	1/5000
				VG rat				
GAPDH	38	Santa Cruz	sc36502	VG rat	souris	Lait 5%	1/10000	1/20000
GAPDH	38	Santa Cruz	sc-365062	VG souris	lapin	Lait 5 %	1/10000	1/20000
H3 Ac K9	17	Cell signaling	9649S	NCM	lapin	Lait 5 %	1/2000	1/5000
Lamine B1	62	Abcam	ab133741	NCM	lapin	Lait 5%	1/1000	1/5000
LC3	17 / 14	Cell signaling	2775S	NCM	rabbit	Lait 5%	janv-00	1/10000
Parkin	52	Sigma	P6248	NCM	mouse	Lait 5%	1/1000	1/10000
Péroxyrédoxine 1	17	Abcam	ab59538	NCM	lapin	Lait 5%	1/2000	1/5000
				VG rat				
SIRT1	120	Abcam	ab110304	NCM	souris	Lait 5%	1/1000	1/5000
SIRT3	28	Cell signaling	5490S	NCM	lapin	Lait 5%	1/1000	1/5000
				VG rat				
				VG souris				
SIRT6	38	Abcam	ab191385	NCM	lapin	Lait 5%	1/1000	1/5000
				VG rat				
				VG souris				
SOD1	21	Proteintech	10269-1-AP	NCM	lapin	Lait 5%	1/2000	1/5000
				VG rat				
SOD2	27	Abcam	ab13533	NCM	lapin	Lait 5%	1/10000	1/20000
				VG rat				
				VG souris				
SOD2 Ac K68	27	Abcam	ab137037	NCM	lapin	Lait 5%	1/1000	1/5000
				VG rat				
				VG souris				
SOD2 Ac K122	27	Abcam	ab214675	NCM	lapin	Lait 5%	1/1000	1/5000
				VG rat				
				VG souris				
Ubiquitine		Thermo Fisher	PA1-187	NCM	lapin	BSA 5%	1/10000	1/10000

#### 5.4) Révélation et quantification du signal obtenu

Lorsque l'immunomarquage est terminé, la membrane est incubée pendant 5 min à RT et dans l'obscurité avec une solution d'ECL (*Enhancer of ChemiLuminescence*) (Clarity Western ECL substrate, BioRad). La HRP couplée à l'Ac II va alors catalyser la réaction menant à l'émission de fluorescence. Le signal obtenu est ensuite détecté à l'aide de la caméra ChemiDoc MP (BioRad) et quantifié à l'aide du logiciel Image Lab (Bio-Rad). Pour ce faire, l'intensité de la bande correspondant à la protéine d'intérêt est déterminée pour une aire connue, puis la valeur d'intensité obtenue est rapportée à celle obtenue pour la protéine normalisatrice (GAPDH ou actine sarcomérique). Les valeurs d'intensité sont exprimées en unité arbitraire (U.A.).

## IV) Mesure de la production de ROS

### 1) Fluorométrie

Afin de mesurer la production de ROS intracellulaires et de peroxyde d'hydrogène mitochondrial, les sondes H<sub>2</sub>DCFDA (C6827, Life) et MitoPY1 (4428, Tocris) ont été utilisées en spectroscopie de fluorescence. Dans ce but, les NCM sontensemencés à raison de 20 000 cellules par puits en plaque de 96 puits noires et placés dans un incubateur à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub> durant le temps de l'expérience. A l'issu des traitements, chaque puits est lavé à 2 reprises par le PBS 1X, puis les sondes H<sub>2</sub>DCFDA ou MitoPY1 sont incubées aux concentrations respectives de 10 µM ou de 50 µM pendant 30 min à 37°C. Les puits sont ensuite de nouveau lavés à 2 reprises dans le PBS 1X, puis 200 µl de PBS 1X sont ajoutés dans chaque puits. La lecture de l'absorbance est réalisée au lecteur de microplaque (Tecan) avec une longueur d'onde d'émission de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 520 nm.

### 2) Marquage par la sonde MitoSOX

La détection des anions superoxydes mitochondriaux a été réalisée à l'aide de la sonde *MitoSOX Red* (M36008, Invitrogen) en fluorescence. A l'issue des traitements, les cellules sont lavées deux fois dans le PBS 1X, puis la sonde est incubée à 37°C dans le milieu HBSS (SH30268, GE Life Sciences) à la concentration 10 µM pendant 10 min et à 37°. Suite à l'incubation des sondes, les cellules sont lavées à deux reprises dans le PBS 1X puis fixées dans le paraformaldéhyde (PFA, 43368, Alfa Aesar) à 4 % dans le PBS 1X pendant 10 min à RT et dans l'obscurité afin de ne pas altérer la fluorescence de la sonde. Après deux lavages aux PBS 1X, le Hoechst (33342, Invitrogen) est incubé pendant 10 min à RT et dans l'obscurité afin de colorer les noyaux en bleu. Puis deux derniers lavages dans le PBS 1X sont réalisés et les lamelles sont montées sur des lames en verre dans un milieu de montage contenant 90% de glycerol et 10% de PBS 10X. Les lames précédemment préparées sont analysées à l'aide d'un microscope confocal à fluorescence Zeiss LSM 710 équipé d'une diode UV ainsi que de trois lasers : un laser argon multi-raies à 458 nm, 477 nm, 488 nm et 514 nm et deux lasers hélium-néon à 543 nm et 633 nm. Les marquages sont visualisés à l'objectif x40 et l'acquisition des images est réalisée à l'aide du logiciel Zen (Zeiss) avec une résolution minimale de 1024x1024. Un minimum de 10 images et de 3 z-stacks par image sont réalisées pour chaque lame. Les



images sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Image J et d'une macro adaptée, permettant la quantification de l'intensité moyenne de fluorescence rouge par cellule pour trois *z-stacks* préalablement définies.

## V) Mesure du potentiel membranaire mitochondrial

La détection du potentiel membranaire mitochondrial a été réalisée à l'aide de la sonde JC1 en fluorescence. A l'issue des traitements, les cellules sont lavées deux fois dans le PBS 1X, puis les sondes fluorescentes sont incubées à 37°C dans le milieu HBSS (SH30268, GE Life Sciences) à la concentration de 10 µg/ml pendant 30 min avec la sonde JC1. Suite à l'incubation de la sonde, les cellules sont lavées à deux reprises dans le PBS 1X puis fixées dans le paraformaldéhyde (PFA, 43368, Alfa Aesar) à 4 % dans le PBS 1X pendant 10 min à RT et dans l'obscurité afin de ne pas altérer la fluorescence de la sonde. Après deux lavages aux PBS 1X, le Hoechst (33342, Invitrogen) est incubé pendant 10 min à RT et dans l'obscurité afin de colorer les noyaux en bleu. Puis deux derniers lavages dans le PBS 1X sont réalisés et les lamelles sont montées sur des lames en verre dans un milieu de montage contenant 90% de glycerol et 10% de PBS 10X. Les lames préparées sont analysées à l'aide du microscope confocal Zeiss LSM 710 tel que précédemment décrit.

## VI) Marquages fluorescents

### 1) Marquage des mitochondries

La détection des mitochondries a été réalisée à l'aide de la sonde *MitoTracker Deep Red* en fluorescence. A l'issue des traitements, les cellules sont lavées deux fois dans le PBS 1X, puis le *MitoTracker Deep Red* est incubé à la concentration de 1 µM pendant 30 min à 37°C dans le milieu HBSS. Les cellules sont ensuite lavées à deux reprises dans le PBS 1X. Le marquage des mitochondries peut être réalisé complémentirement au marquage par le MitoSOX précédemment décrit ou à l'immunofluorescence ou la PLA qui font l'objet d'une description détaillée ci-dessous.

## **2) Immunofluorescence**

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage permettant la détection spécifique d'une protéine par émission de fluorescence à l'aide d'un fluorochrome. Cette technique permet notamment la détermination de la localisation cellulaire ou subcellulaire d'une protéine, la détection de l'interaction entre plusieurs protéines ou la visualisation de la morphologie et de l'aire cellulaire par marquage des protéines du cytosquelette. Cette technique se divise en différentes étapes que sont la fixation des cellules sur lamelles, la perméabilisation des cellules et l'incubation des Ac nécessaires à l'expérimentation.

### ***2.1) Fixation de l'échantillon***

A l'issue des traitements, les cellules en culture préalablement ensemencées sur des lamelles de verres sont lavées à deux reprises dans le PBS 1X. Puis les cellules sont fixées sur la lamelle par incubation dans la PFA à 4 % dans le PBS 1X pendant 10 min à RT. Les cellules sont ensuite lavées à trois reprises dans le PBS 1X pendant 10 min et sous agitation à RT.

### ***2.2) Perméabilisation***

Suite à la fixation, les membranes cellulaires sont perméabilisées afin de favoriser l'entrée des Ac dans les cellules lors de l'étape d'hybridation. Dans ce but, les cellules sont incubées dans une solution de Triton (882905, Hopkin & Williams) 0,01 % [v/v] dans le PBS 1X pendant 10 min à RT, puis les cellules sont lavées à 3 reprises dans les PBS 1X pendant 10 min sous agitation à RT.

### ***2.3) Incubation des Ac***

Après la perméabilisation, les cellules sont incubées dans une solution de saturation de BSA 1 % [m/v] dans le PBS 1X pendant 30 min sous agitation à RT afin de bloquer les sites de fixation aspécifiques de l'Ac I. Puis l'Ac I est incubé dans la solution de saturation pendant une nuit à 4°C et sans agitation dans les conditions nécessaires à l'expérimentation (Table 11).

**Table 11** : Conditions d'immunofluorescence pour les différentes protéines étudiées.

Protéine ciblée	Ac I			Ac II			
	Fournisseur	Référence	Espèce	Fournisseur	Référence	Espèce	Fluorochrome
Alpha actinine	Sigma	A7811	souris	Invitrogen	A10037	âne anti-souris	Alexa Fluor 568
SIRT1	Cell signaling	9475S	lapin	Invitrogen	A11034	chèvre anti-lapin	Alexa Fluor 488
SIRT3	Gentex	GTX10692	lapin	Invitrogen	A11034	chèvre anti-lapin	Alexa Fluor 488
SIRT3	Santa Cruz	sc36515	souris	Invitrogen	A10037	âne anti-souris	Alexa Fluor 568
SIRT6	Abcam	ab191385	lapin	Invitrogen	A11034	chèvre anti-lapin	Alexa Fluor 488
SOD2	Abcam	ab13533	lapin	Invitrogen	A11034	chèvre anti-lapin	Alexa Fluor 488

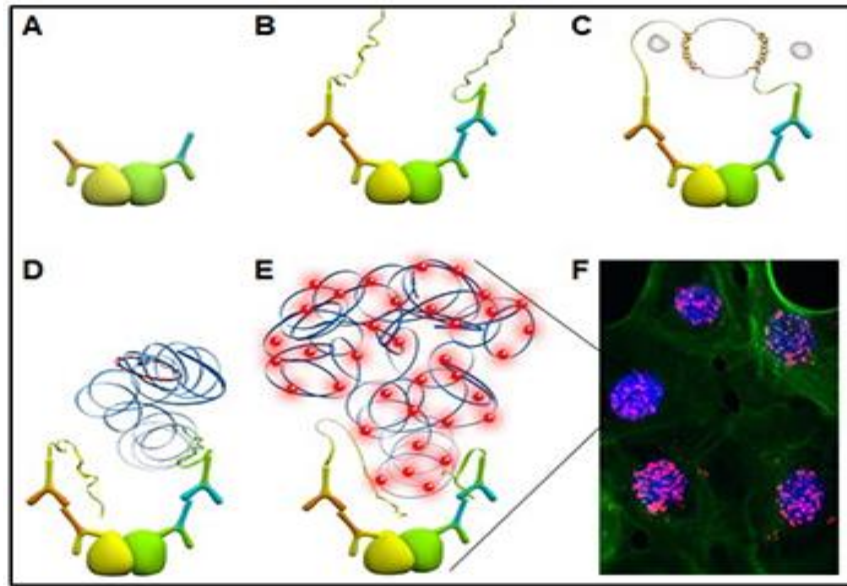
Le lendemain, les cellules sont lavées à trois reprises dans le PBS 1X pendant 10 min sous agitation à RT, puis l'Ac II couplé à un fluorochrome est incubé pendant 30 min à RT sous agitation. L'Ac II est choisi selon l'espèce du ou des Ac I utilisés (en évitant les réactions croisées entre les Ac) ainsi qu'en fonction de la longueur d'onde d'absorption et d'émission du fluorochrome (Table 11). Les cellules sont ensuite lavées à 3 reprises dans le PBS 1X pendant 10 min à RT sous agitation, puis le Hoechst est incubé pendant 10 min à RT sous agitation afin de marquer les noyaux des cellules en bleu. Trois derniers lavages de 10 min à RT et sous agitation sont réalisés puis les lamelles sont montées sur des lames de verre dans un milieu de montage contenant 90 % [v/v] de glycérol et 10 % [v/v] de PBS 10X.

## 2.4) Microscopie de fluorescence

Les marquages précédemment réalisés sont visualisés à l'aide du microscope Zeiss LSM 710 tel que précédemment décrit. La quantification de l'aire cellulaire, réalisée après marquage de l'alpha actinine, est réalisée à l'aide du logiciel Zen (Zeiss) et de l'outil de détermination manuelle du contour cellulaire. Pour chaque lame préparée, un minimum de dix images est réalisé à l'objectif x40.

## 3) « Proximity Ligation Assay »

La technique de *Proximity Ligation Assay* (PLA) permet la détection spécifique de l'interaction entre deux protéines : un signal fluorescent est émis lorsque la distance entre deux protéines est inférieure à 40 nm (Figure 74). Le marquage est réalisé selon les instructions du fournisseur à l'aide du kit Duolink (Sigma).



**Figure 74** : Représentation schématique du principe de l'expérience de PLA. A : hybridation des Ac I ; B : hybridation des sondes PLA ; C : ligation ; D et E : amplification ; F : exemple de signal détecté en microscopie confocale à fluorescence.

Brièvement, les cellules sont fixées et perméabilisées tel que décrit précédemment. Puis la saturation est réalisée dans la solution de saturation (*Duolink Blocking Solution*, DUO82007, Sigma) pendant 60 min à 37°C. Les Ac I, dirigés contre les protéines SOD2 (ab13533, abcam) et SIRT3 (sc36515, Santa Cruz) sont ensuite dilués au 1/50 [v/v] dans le tampon de dilution (*Duolink Antibody Diluent*, DUO82008, Sigma) et incubés pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les cellules sont lavées à 2 reprises dans le tampon de lavage A (0.15 M NaCl, 0.01 M Tris-Base, 0.05% [v/v] Tween, pH 7.4) pendant 5 min à RT. Puis elles sont incubées avec les Ac II couplés à des séquences nucléotidiques compatibles, appelés sondes PLA PLUS (anti-souris, DUO82004, Sigma) et PLA MINUS (anti-lapin, DUO82002, Sigma), diluées au 1/5 [v/v] dans le tampon de dilution pendant 1h à 37°C. Cette étape est suivie de deux lavages de 5 min dans le tampon de lavage A à RT.

Suite à l'incubation des sondes, l'étape de ligation permet l'hybridation des sondes nucléotidiques si ces dernières sont suffisamment proches (40 nm) l'une de l'autre et la formation de séquences double brins. Dans ce but, la ligase (DUO82027, Sigma) est diluée au 1/40 [v/v] dans le tampon de ligation 1X (*Duolink Dilution buffer 1X*, DUO82009, Sigma) puis incubée pendant 30 min à 37°C. Cette incubation est suivie de deux lavages de 5 min dans le tampon de lavage A à RT.

L'étape de ligation est suivie de l'étape d'amplification, au cours de laquelle la polymérase (DUO82028, Sigma) entraîne l'amplification du double brin précédemment formé par réaction PCR. Pour ce faire, la polymérase est diluée au 1/80 [v/v] dans le tampon d'amplification 1X (*Duolink Amplification buffer 1X*, DUO82010, Sigma) et incubée pendant 1h40 à 37°C. Ce tampon d'amplification contient des oligonucléotides fluorescents qui s'hybrident aux produits d'amplification afin de mettre en évidence la colocalisation des protéines étudiées sous la forme de points (punctas) fluorescents. Les lamelles sont ensuite lavées à 3 reprises dans le tampon de lavage B (0.1 M NaCl, 0.02 M Tris-Base, 0.2 M Tris-HCl, pH 7.5) pendant 10 min à RT et dont le premier contient le Hoechst afin de marquer les noyaux des cellules en bleu, puis à deux reprises dans l'eau milliQ avant d'être montées sur des lamelles de verre dans un milieu de montage contenant 90 % de glycérol et 10 % de PBS 10X. L'acquisition des images est réalisée à l'aide du microscope confocal Zeiss LSM 710 précédemment évoqué. Un minimum de cinq images en *z-stacks* est réalisé à l'objectif x40 pour chaque condition. Les images sont analysées à l'aide d'une macro Image J permettant le calcul de l'intensité moyenne par cellules ainsi que du nombre de spots observé par cellule.

La technique de PLA peut être couplée à l'utilisation de sondes fluorescentes résistantes à la perméabilisation (telle que la sonde *MitoTracker Deep Red*) ou à la technique d'immunomarquage afin de réaliser des contre-marquages en ajoutant des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes.

## V) Analyses statistiques

L'ensemble des données ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad version 7.0. Les résultats sont exprimés en médiane avec interquartiles. Les données ont été comparées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney pour les populations de petite taille (expériences de western blot) ou par le test paramétrique de Student pour les échantillons de taille supérieure (expériences de fluorescence). La significativité statistique a été acceptée pour les p-valeurs inférieures ou égales à 0,05.

# *Résultats*



*Partie 1 : Etude et identification des acteurs moléculaires impliqués dans la régulation de l'acétylation de SOD2 dans le cœur.*





## I) Données préliminaires

Afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de l'IC, une analyse protéomique a été réalisée pour comparer les protéomes des VG de rats contrôles et IC à 2 mois post-infarctus (Cieniewski-Bernard et al. 2008). Cette étude a permis la détection de 27 protéines différentiellement exprimées chez les rats IC à 2 mois post-IDM par comparaison aux rats contrôles. Ces dernières possèdent des fonctions diverses et sont notamment impliquées dans la structure cellulaire et la contraction, la réponse au stress ou encore le métabolisme cellulaire. Le laboratoire a ainsi montré une modulation de l'expression de plusieurs protéines impliquées dans la réponse anti-oxydante. Parmi elles, la protéine SOD2 constitue la seule protéine anti-oxydante pour laquelle une augmentation est observée dans le VG de rats IC à 2 mois post-IDM par comparaison aux rats contrôles, suggérant l'implication de cette protéine dans la régulation du stress oxydant dans le cœur.

Afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliquant la protéine SOD2, j'ai mis en place un modèle *in vitro* de cardiomyoblastes de rats H9c2 hypertrophiés par 24h et 48h de traitement à l'isoprénaline lors de mon stage de Licence 3 effectué au laboratoire. Les études réalisées sur ce modèle ont permis de mettre en évidence une augmentation de la production des anions superoxydes mitochondriaux après 24h de traitement à l'isoprénaline, associée à une augmentation de l'expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68 (SOD2 Ac K68) inactive, suggérant une inactivité de la protéine SOD2 à ce temps. De plus, une diminution de la production des anions superoxydes mitochondriaux associée à une augmentation de l'expression de SOD2 a été observée après 48h de traitement à l'isoprénaline (Dubois-Deruy et al. 2017). Ces résultats suggèrent une régulation temporelle de l'activité de SOD2 qui serait activée par désacétylation après 48h de traitement à l'isoprénaline afin de diminuer le stress oxydant.

Le premier objectif de ma thèse consistait à identifier les mécanismes impliqués dans la régulation de l'activité et de l'acétylation de SOD2 et à identifier les acteurs moléculaires impliqués dans cette régulation. Dans ce but, j'ai travaillé sur le modèle *in vitro* de NCM hypertrophiés par traitement à l'isoprénaline, plus pertinent physiologiquement car présentant la capacité de se contracter, dans lequel j'ai ensuite modulé l'expression des désacétylases SIRT

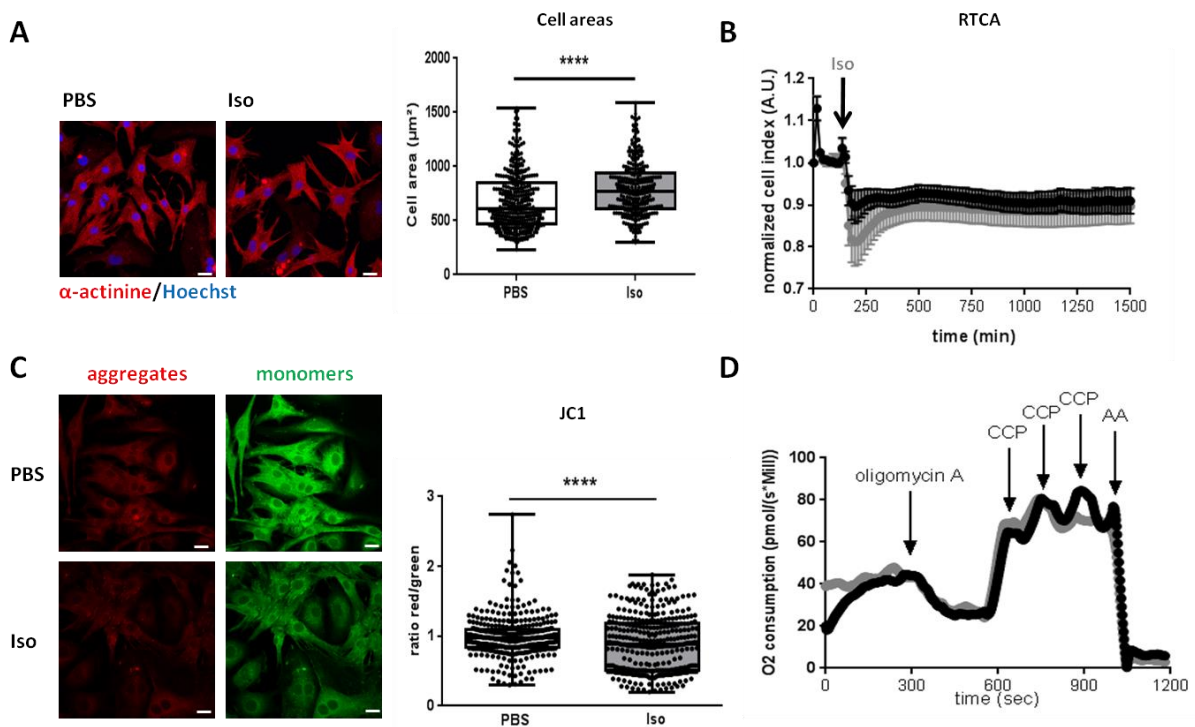
et de l'acetyl transferase P300. Puis j'ai travaillé sur des modèles *in vivo* de souris SIRT KO ainsi que sur un modèle *in vivo* d'IC chez le rat afin de confirmer mes résultats.

## II) Résultats

Ces résultats feront l'objet d'une publication actuellement en cours de rédaction.

### 1) Impact du traitement à l'isoprénaline dans les NCM.

Afin de caractériser le stress oxydant observé lors des processus de développement du RVG et de l'IC, j'ai mis en place un modèle *in vitro* de NCM hypertrophiés par traitement à l'isoprénaline à la concentration de 10  $\mu\text{M}$  pendant 24h, reflétant l'hypertrophie des cardiomyocytes observée lors du RVG. J'ai montré que le traitement à l'isoprénaline est associé à une augmentation significative de l'aire cellulaire de 20 % après 24h, validée par le marquage de l'alpha actinine en immunofluorescence (Figure 75A).



**Figure 75** : Impact du traitement à l'isoprénaline sur les NCM.

Marquage de l'alpha actinine (rouge) et des noyaux (Hoechst) (échelle : 20  $\mu\text{m}$ ) et quantification de l'aire cellulaire (A) ( $n=3$ , au moins 64 cellules quantifiées) des NCM après 24h de traitement à l'isoprénaline (Iso) (10  $\mu\text{M}$ ) (contrôle : PBS) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Student, \*\*\*\* $P<0.001$ ). Quantification de l'index cellulaire (B) des NCM traités à l'Iso (10  $\mu\text{M}$ , 24h) par utilisation de la technique RTCA. Quantification du potentiel membranaire mitochondrial (C) ( $n=3$ , au moins 366 cellules quantifiées) après marquage par la sonde JC1 dans les NCM traités à l'Iso (10  $\mu\text{M}$ , 24h) par comparaison aux NCM contrôles (PBS) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Student, \*\*\*\* $P<0.0001$ ). Quantification de la consommation en dioxygène des mitochondries (D) par utilisation de la technique d'oxymétrie dans les NCM traités à l'Iso par comparaison aux contrôles (PBS).

J'ai également observé le comportement en culture des NCM traités à l'isoprénaline ou non par utilisation de la technique d'analyse cellulaire en temps réel (*Real Time Cell Analysis* – RTCA), permettant de mesurer l'index cellulaire des cellules en culture. L'index cellulaire consiste en la mesure de l'impédance, c'est-à-dire la résistance des cellules adhérentes suite au passage d'un courant électrique, et dépendra de l'adhésion, la prolifération ou encore la morphologie cellulaire. Nous avons ainsi observé que le traitement à l'isoprénaline est associé à une chute brutale de l'index cellulaire, qui augmente ensuite progressivement et se stabilise après 6h de traitement à l'isoprénaline (Figure 75B). La chute de l'index cellulaire est beaucoup moins importante pour les NCM traités au PBS : il diminue faiblement suite au renouvellement du milieu puis reste stable durant toute la durée de l'expérience (Figure 75B). Ces résultats suggèrent que le traitement à l'isoprénaline est associé à un changement du comportement des NCM en culture.

Le tissu et les cellules cardiaques sont particulièrement riches en mitochondries, afin de fournir l'énergie nécessaire à la contraction. Par la suite, l'impact du traitement à l'isoprénaline sur les paramètres mitochondriaux a été étudié. Le potentiel membranaire a été mesuré par utilisation de la sonde JC1 en IF, formant des agrégats de couleur rouge en cas de fort potentiel membranaire ou des monomères de couleur verte en cas de potentiel faible. La diminution du ratio rouge/vert après quantification traduit ainsi une dépolarisation mitochondriale. J'ai observé une diminution significative du potentiel membranaire mitochondrial des NCM traités à l'isoprénaline par comparaison au PBS (Figure 75C), traduisant une dépolarisation de la membrane mitochondriale. De façon complémentaire, une diminution significative des niveaux d'ARN de Nrf2 et PGC1 alpha, impliqués dans la biogenèse mitochondriale ainsi que du niveau d'ARN de Fis1 et Mfn2, respectivement impliqués dans les processus de fission et de fusion mitochondriale, a été observée dans les NCM traités à l'isoprénaline (données non montrées), traduisant une altération de la biogenèse mitochondriale.

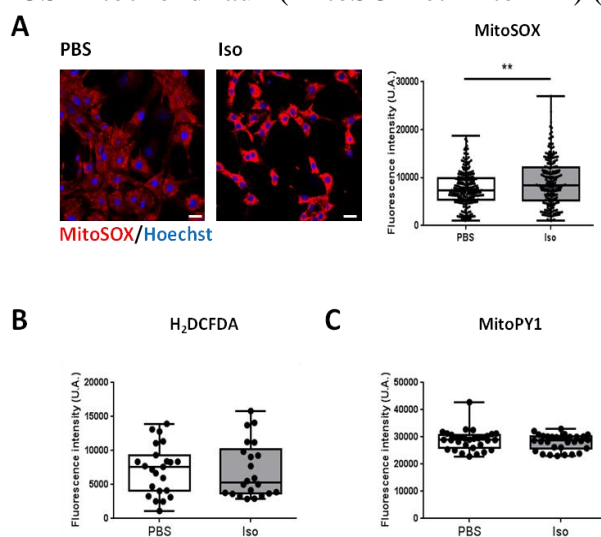
De plus, la respiration mitochondriale a été mesurée par utilisation de la technique d'oxygraphie qui permet de mesurer la consommation en dioxygène des cellules dans différentes conditions. La respiration est d'abord mesurée dans les cellules à l'état de repos. Puis l'injection d'oligomycine A, un inhibiteur de l'ATP synthase (complexe V de la chaîne respiratoire mitochondriale), permet de diminuer la consommation d'oxygène équivalente à la production d'ATP et de mesurer la consommation d'oxygène correspondant à la fuite de

protons. L'injection répétée de CCP, un agent découplant de la membrane mitochondriale interne, permet ensuite de mesurer la respiration maximale. Enfin, l'ajout d'antimycine A permet d'inhiber le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale et de mesurer la consommation d'oxygène non mitochondriale des cellules. Par utilisation de cette technique, nous n'avons pas observé de modulation de la respiration mitochondriale après 24h de traitement à l'isoprénaline par comparaison aux NCM contrôles (Figure 75D).

De manière intéressante, une modulation de la morphologie mitochondriale a été observée en microscopie électronique avec des mitochondries qui sont moins nombreuses mais plus longues, épaisses et larges dans les NCM traités à l'isoprénaline par comparaison au PBS (données non montrées). Ces résultats suggèrent que le traitement à l'isoprénaline entraîne une altération des mitochondries dans les NCM.

## 2) Caractérisation du stress oxydant et des enzymes anti-oxydantes dans les NCM hypertrophiés.

Par la suite, j'ai caractérisé le stress oxydant dans ce modèle. Dans ce but, j'ai utilisé plusieurs sondes fluorescentes reconnaissant de manière spécifiques les ROS intracellulaires (H<sub>2</sub>DCFDA) ou les ROS mitochondriaux (MitoSOX et MitoPY1) (Figure 76).



**Figure 76** : Caractérisation du stress oxydant dans les NCM hypertrophiés après 24h de traitement à l'isoprénaline.

Quantification de la production des anions superoxydes mitochondriaux (A) (n=3, 244 cellules quantifiées au minimum) par la sonde MitoSOX en fluorescence (médiane ± interquartiles, test de Student, \*\* $P < 0.01$ ) (échelle : 20  $\mu$ m), du taux de ROS intracellulaires (B) (n=3) par la sonde H<sub>2</sub>DCFDA et de la production de peroxyde d'hydrogène mitochondrial (C) (n=3) par la sonde MitoPY1 en

fluorométrie dans les NCM traités à l'isoprénaline (Iso) (10  $\mu$ M, 24h) (contrôle : PBS) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Mann-Whitney).

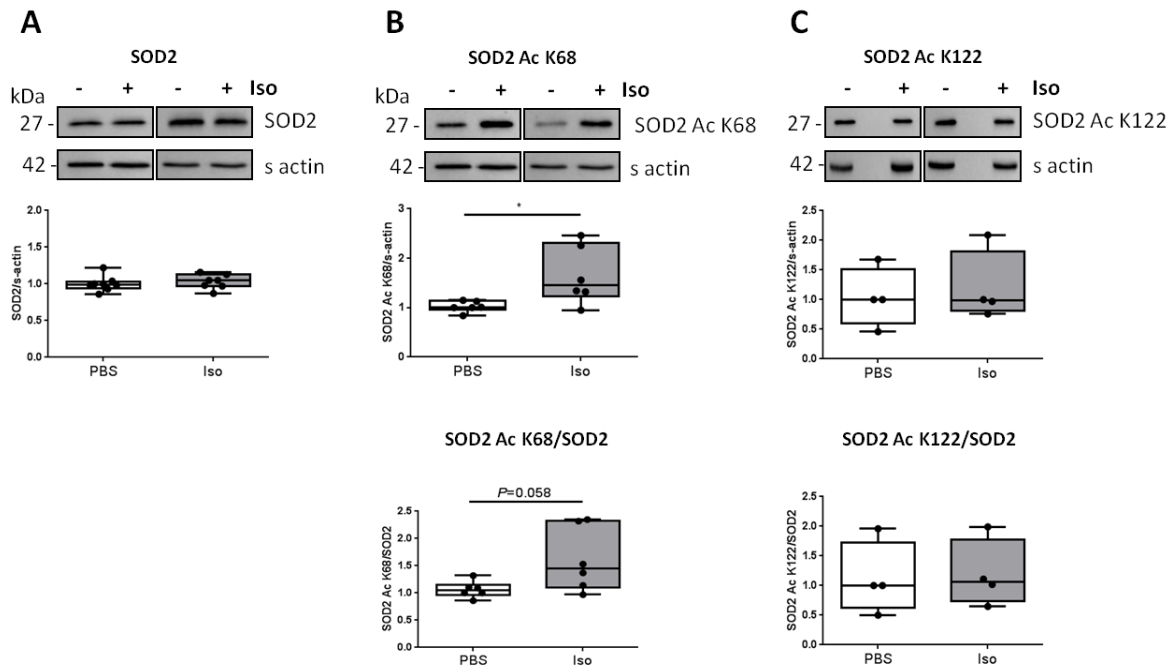
J'ai d'abord quantifié la production des anions superoxydes mitochondriaux à l'aide de la sonde MitoSOX en fluorescence et j'ai ainsi observé que le traitement à l'isoprénaline est associé à une augmentation significative de la production des anions superoxydes mitochondriaux après 24h dans les NCM (Figure 76A).

De plus, j'ai quantifié la production de peroxyde d'hydrogène mitochondrial à l'aide de la sonde MitoPY1, ainsi que le taux de ROS intracellulaires par utilisation de la sonde H<sub>2</sub>DCFDA en fluorométrie. Je n'ai pas observé de modulation significative de la production de peroxyde d'hydrogène mitochondrial (Figure 76C), ni du taux de ROS intracellulaires (Figure 76B) dans les NCM après 24h de traitement à l'isoprénaline par comparaison aux NCM contrôles. Ces résultats nous indiquent que le traitement à l'isoprénaline est associé à un stress oxydant qui s'installe particulièrement au niveau des mitochondries.

Par la suite, j'ai quantifié l'expression des enzymes anti-oxydantes dans les NCM hypertrophiés. Je me suis d'abord concentrée sur l'expression de la protéine SOD2, dont nous avons auparavant montré l'implication dans la régulation du stress oxydant dans le modèle de rats IC ainsi que dans les cardiomyoblastes H9c2 hypertrophiés.

Il a été montré que l'acétylation de la protéine SOD2 sur différentes Lys pouvait être associée à une diminution de son activité anti-oxydante ou une modification de sa conformation tridimensionnelle. A ce jour, je dispose de deux anticorps commerciaux permettant de détecter de manière spécifique l'acétylation de SOD2 en Lys 68 (SOD2 Ac K68) ou en Lys 122 (SOD2 Ac K122), toutes deux décrites comme étant associées à une inhibition de son activité anti-oxydante. J'ai donc quantifié l'expression de ces deux formes modifiées post-traductionnellement de la protéine SOD2.

Dans le modèle de NCM hypertrophiés, je n'ai pas observé de modulation de l'expression des formes totales (acétylées et non acétylées) de SOD2 après 24h de traitement à l'isoprénaline (Figure 77A).



**Figure 77** : Expression de SOD2 et de ses formes acétylées dans les NCM traités à l’isoprénaline.

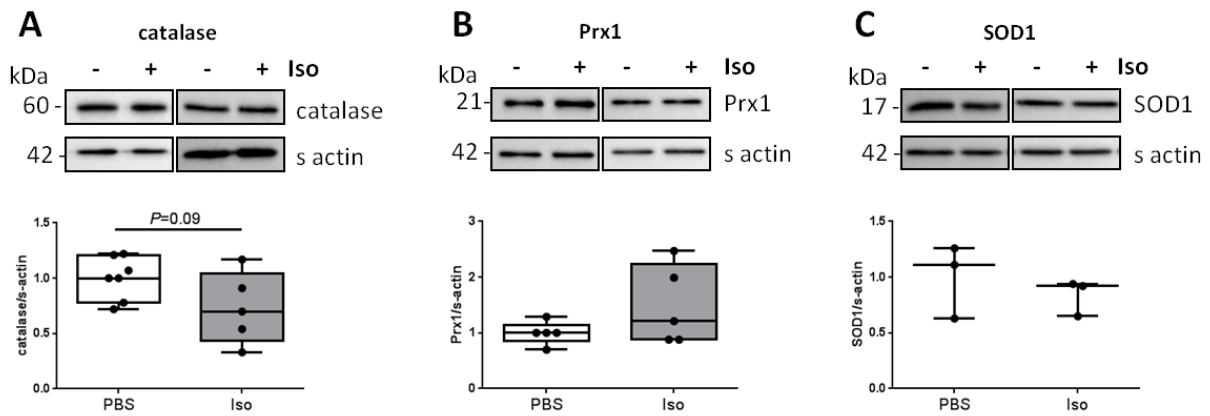
Quantification par western blot de l’expression de SOD2 (A) (n=4), de sa forme acétylée en Lys 68 (SOD2 Ac K68) (B) (n=4) et de sa forme acétylée en Lys 122 (SOD2 Ac K122) (C) (n=3) dans les NCM après 24h de traitement à l’isoprénaline (Iso) (10  $\mu$ M) par comparaison aux contrôles (PBS) (médiane  $\pm$  interquartiles ; test de Mann-Whitney, \* $P$ <0.05).

J’ai cependant observé une augmentation significative de l’expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68 après 24h de traitement à l’isoprénaline, et donc à une augmentation du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (Figure 77B). En revanche, l’expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 122 n’est pas modulée dans les NCM hypertrophiés (Figure 77C). Ces résultats suggèrent que la Lys 68 est le principal site d’acétylation de SOD2 régulant son activité dans les cardiomyocytes hypertrophiés.

J’ai également quantifié l’expression des protéines SOD1, catalysant la réaction de détoxification des anions superoxyde en peroxyde d’hydrogène dans le cytoplasme, ainsi que la catalase et Prx1, connues pour être localisées dans le cytoplasme et/ou les peroxisomes et catalysant la réaction de détoxification du peroxyde d’hydrogène en eau.

Nous n’avons pas observé de modulation significative de l’expression de SOD1, de la catalase et de Prx1 dans les NCM hypertrophiés après 24h de traitement à l’isoprénaline par rapport aux contrôles (Figure 78).





**Figure 78** : Expression des enzymes anti-oxydantes dans les NCM après 24h de traitement à l’isoprénaline.

Quantification par western blot de l’expression de la catalase (A) (n=4), de Prx1 (B) (n=4) et de SOD1 (C) (n=3) dans les NCM traités à l’isoprénaline (Iso) (10 μM, 24h) par comparaison aux cellules contrôles (PBS) (médiane ± interquartiles, test de Mann et Whitney)

L’ensemble de ces résultats confirme le rôle central de la protéine SOD2 dans la régulation du stress oxydant dans les NCM. L’inactivation de SOD2 par acétylation après 24h de traitement à l’isoprénaline dans les NCM, et son incapacité à détoxifier les anions superoxydes, se traduit par une augmentation du stress oxydant (et plus particulièrement de la production d’anions superoxydes) dans les mitochondries.

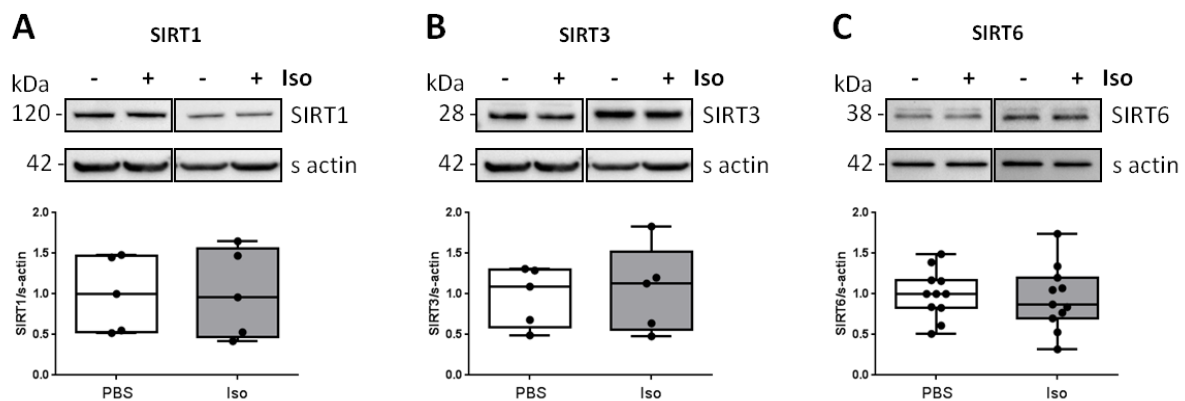
Il semble alors intéressant d’étudier les mécanismes impliqués dans la régulation de l’acétylation de la protéine SOD2 dans le cœur. En effet, je peux supposer que l’augmentation de l’expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68 observée dans les NCM hypertrophiés peut s’expliquer par une augmentation de l’acétylation et/ou à un défaut de désacétylation. Or il a été montré que la protéine acétyl transférase P300 pourrait être impliquée dans l’acétylation de SOD2, tandis que les désacétylases SIRT1, 3 et 6 pourraient être responsables de sa désacétylation. J’ai donc décidé d’étudier le rôle de ces protéines dans la régulation de l’acétylation de SOD2 dans le cœur.

### 3) Etude du rôle des désacétylases SIRT1, 3 et 6 dans la régulation de l'activité de SOD2.

#### 3.1) Expression des SIRT1, 3 et 6 dans les NCM.

Les SIRT constituent une famille de protéines possédant majoritairement une fonction désacétylase et impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que la protection face au vieillissement ou au stress oxydant. Dans ce contexte, il a été montré que les SIRT1, 3 et 6 pouvaient impacter l'expression ou l'activité de SOD2.

Dans un premier temps, j'ai quantifié l'expression de ces protéines dans le modèle de NCM hypertrophiés après 24h de traitement à l'isoprénaline mais n'ai pas observé de modulation significative de l'expression des SIRT1, 3 ou 6 dans les NCM hypertrophiés après 24h d'isoprénaline par comparaison aux cellules contrôles (Figure 79).

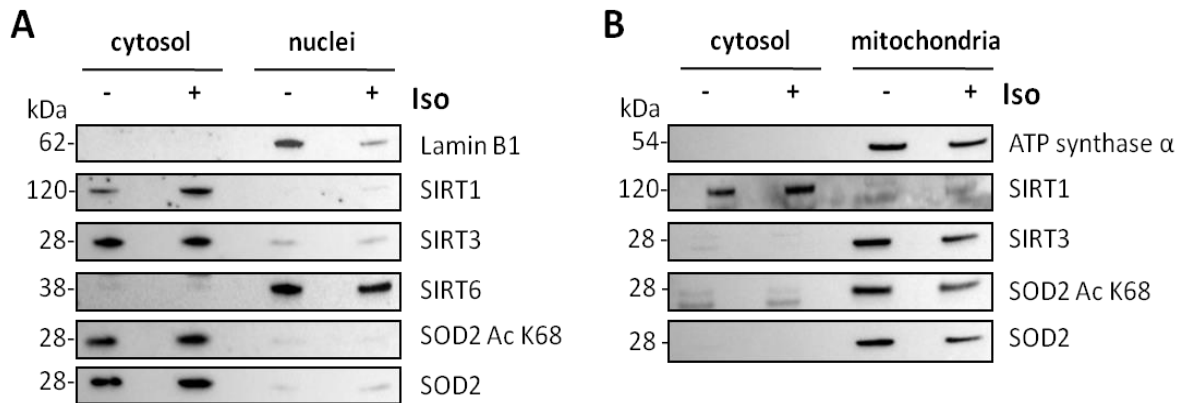


**Figure 79** : Expression des protéines SIRT1, 3 et 6 dans les NCM hypertrophiés. Quantification par western blot de l'expression des SIRT1 (A) (n=3), 3 (B) (n=3) et 6 (C) (n=4) dans les NCM après 24h de traitement à l'isoprénaline (Iso) (10  $\mu$ M) par comparaison aux NCM contrôles (PBS) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Mann-Whitney).

L'augmentation de l'acétylation de SOD2 ne semble pas pouvoir être expliquée par un défaut d'expression des protéines prenant en charge sa désacétylation. Je ne peux cependant pas écarter l'hypothèse d'une diminution de l'activité ou de l'interaction des SIRT avec la forme acétylée de SOD2 en Lys 68. En effet, les SIRT1, 3 et 6 possèdent des localisations subcellulaires différentes, pouvant refléter leur état d'activité. J'ai donc utilisé différentes méthodes pour déterminer les localisations subcellulaires des SIRT1, 3 et 6 dans les NCM hypertrophiés.

### 3.2) Localisation subcellulaire des SIRT et de SOD2 dans les NCM.

Dans un premier temps, j'ai réalisé des fractionnements subcellulaires cytoplasme-noyaux que j'ai validé par la présence de la lamine B1 dans les fractions nucléaires uniquement (Figure 80A) et grâce auxquels j'ai déterminé les localisations subcellulaires des protéines SIRT1, 3 et 6 ainsi que de SOD2 et de sa forme acétylée en Lys 68 dans les cardiomyocytes.



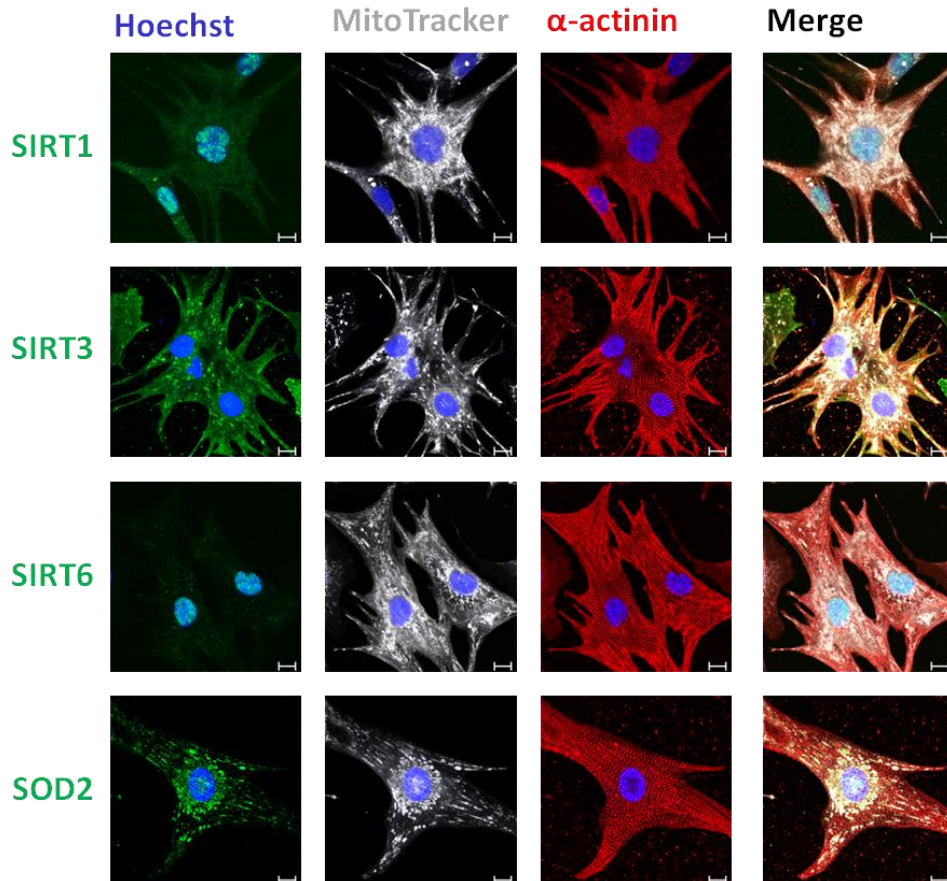
**Figure 80** : Détermination des localisations subcellulaires des protéines SOD2, SOD2 Ac K68, SIRT1, 3 et 6 dans les NCM par fractionnements subcellulaires.

Western blot des protéines SIRT1, 3 et 6, SOD2 et SOD2 Ac K68 dans les NCM hypertrophiés par 24h de traitement à l'isoprénaline (Iso) (contrôle : PBS) après fractionnement subcellulaire cytoplasme-noyaux (n=3) (A) ou cytoplasme-mitochondries (n=3) (B).

J'ai observé une localisation strictement nucléaire de la protéine SIRT6 dans les NCM hypertrophiés (Figure 80A) et une localisation cytoplasmique et nucléaire des protéines SIRT1 et 3, ainsi qu'une localisation cytoplasmique de SOD2 et de sa forme acétylée en Lys68 (Figure 80A).

Afin de préciser la localisation des protéines SOD2, SOD2 Ac K68, SIRT1 et SIRT3, j'ai réalisé des fractionnements cytoplasmes-mitochondries que j'ai validé par la présence de l'ATP synthase alpha exclusivement dans les fractions mitochondriales (Figure 80B). J'ai montré que les protéines SIRT3 et SOD2 sont localisées dans les mitochondries, tandis que la forme acétylée de SOD2 en Lys 68 est localisée dans les mitochondries mais également en faible quantité dans le cytoplasme (Figure 80B). De plus, le traitement à l'isoprénaline n'impacte pas les localisations subcellulaires de ces protéines.

De manière complémentaire, j'ai effectué des comarquages des protéines SIRT et SOD2 avec le Hoechst (détectant spécifiquement le noyau), le *MitoTracker Deep Red* (détectant spécifiquement les mitochondries) et l'alpha-actinine (marquage du cytosquelette confirmant la spécificité du marquage dans les NCM) après traitement à l'isoprénaline dans les NCM (Figure 81).



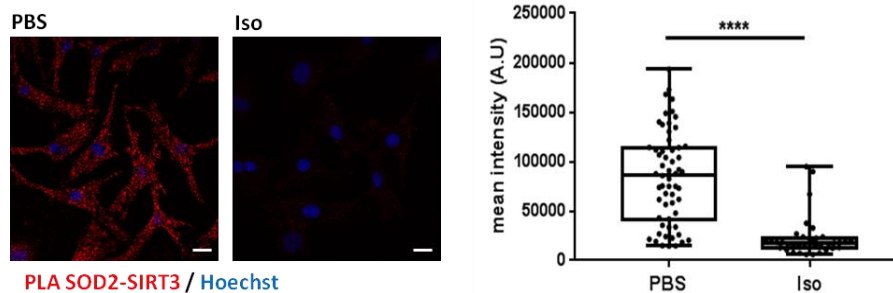
**Figure 81** : Détermination de la localisation subcellulaire des protéines SIRT1, 3, 6 et SOD2 dans les NCM hypertrophiés.

Images de co-marquage en fluorescence des protéines SIRT1, 3, 6 ou SOD2 (vert) avec les noyaux colorés par le Hoechst (bleu), les mitochondries marquées au *MitoTracker Deep Red* (gris) et le cytosquelette marqué par l'alpha actinine (rouge) dans les NCM hypertrophiés par 24h de traitement à l'isoprénaline (Iso) (10  $\mu$ M) (échelle : 20  $\mu$ m).

J'ai ainsi confirmé la localisation nucléaire de SIRT6 par colocalisation avec le Hoechst, et la localisation cytoplasmique et nucléaire de SIRT1 dans ce modèle par colocalisation respective avec l'alpha actinine et le Hoechst (Figure 81). De plus, j'ai confirmé la localisation mitochondriale de SOD2 et de SIRT3 par colocalisation avec le *MitoTracker Deep Red*, détectant de manière spécifique les mitochondries (Figure 81). Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus par fractionnement subcellulaires.

J'ai donc montré que les protéines SIRT1 et 6 possèdent des localisations cytoplasmiques et/ou nucléaires, différentes de la localisation mitochondriale stricte de SOD2 et majoritaire de sa forme acétylée en Lys 68. De plus, la protéine SIRT3 est localisée majoritairement dans les mitochondries, de façon similaire à SOD2 et sa forme acétylée en Lys 68, ce qui favorise leur interaction dans ce compartiment cellulaire. J'ai donc émis l'hypothèse que la protéine SIRT3 pourrait directement interagir avec la protéine SOD2 acétylée dans la mitochondrie pour la désacétyler. Afin de confirmer cette hypothèse, j'ai réalisé des expériences de PLA entre les protéines SOD2 et SIRT3 dans les NCM.

Les expériences de PLA réalisées ont permis l'observation de *punctas* (points) de fluorescence rouge dans les NCM, confirmant l'interaction des protéines SOD2 et SIRT3 dans ce modèle (Figure 82).



**Figure 82** : Validation de l'interaction entre SOD2 et SIRT3 par la technique de PLA.

Mise en évidence par PLA d'une colocalisation entre SOD2 et SIRT3 (rouge) et marquage des noyaux (bleu) dans les NCM non traitées (PBS) ou traitées à l'isoprénaline (Iso) (10  $\mu$ M) pendant 24h (échelle = 20  $\mu$ M) et quantification de l'intensité moyenne (n=3, 34 cellules quantifiées au minimum) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Student, \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

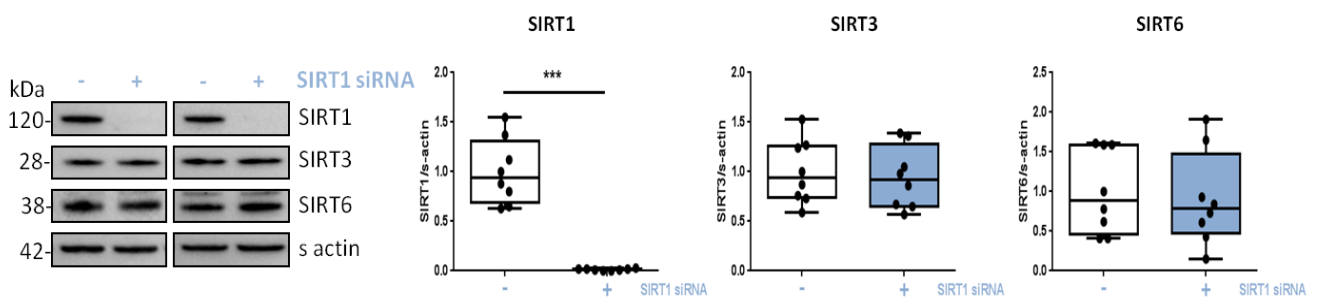
De manière intéressante, j'ai observé également une diminution de ces *punctas* de fluorescence dans les NCM après 24h de traitement à l'isoprénaline par comparaison aux cellules contrôles. Ces résultats suggèrent que le traitement à l'isoprénaline est associé à une diminution de l'interaction entre les protéines SOD2 et SIRT3. Il semble donc que la protéine SIRT3 soit la désacétylase responsable de la désacétylation de SOD2 dans le cœur, et que la diminution de son interaction avec la forme acétylée de SOD2 en Lys 68 inactive entraînerait une augmentation du stress oxydant sous la forme de production d'anions superoxydes mitochondriaux dans les NCM hypertrophiés.

Je ne peux cependant exclure une implication indirecte de SIRT1 et SIRT6 dans cette régulation, via des intermédiaires moléculaires. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai inhibé

l'expression des protéines SIRT1 et 6 dans les NCM, puis j'ai étudié l'impact de cette inhibition sur l'expression de SOD2 et de sa forme acétylée en Lys 68.

### 3.3) Impact de l'inhibition de l'expression de SIRT1 dans les NCM.

L'inhibition de l'expression de SIRT1 dans les NCM par utilisation de siRNA induit une inhibition totale de son expression par comparaison aux cellules transfectées avec le siRNA contrôle (NT siRNA), validant l'efficacité du siRNA SIRT1 (Figure 83).



**Figure 83** : Impact de l'inhibition de l'expression de SIRT1 sur l'expression des SIRT3 et 6 dans les NCM.

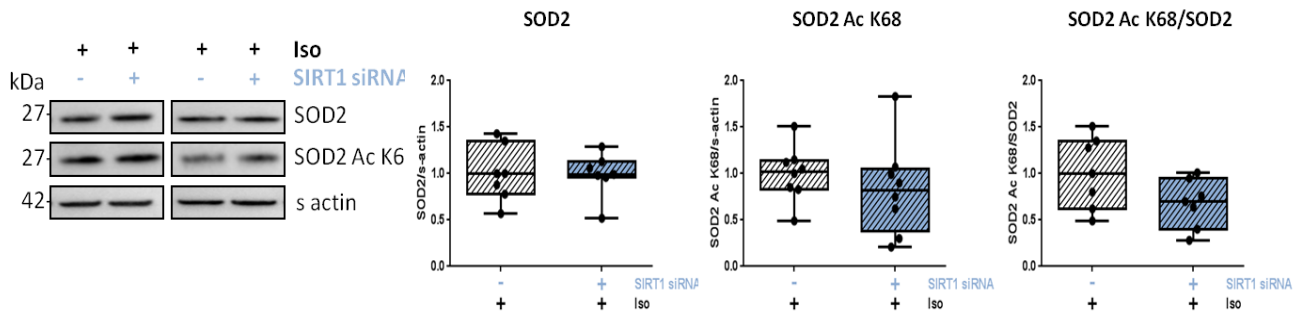
Validation de l'efficacité de l'inhibition de l'expression de SIRT1 (n=3) et quantification de l'expression des SIRT3 (n=3) et 6 (n=3) dans les NCM transfectées par un siRNA dirigé spécifiquement contre la protéine SIRT1 (SIRT1 siRNA) (72h, 20 nM) par comparaison aux cellules contrôles (siNT) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Mann-Whitney,  $**P < 0.01$ ).

Les protéines SIRT1, 3 et 6 possédant des fonctions similaires, je ne peux pas écarter l'hypothèse que l'inhibition de l'expression d'une SIRT, et donc la diminution de son activité, soit compensée par l'augmentation de l'expression de l'une ou plusieurs des autres isoformes. J'ai donc quantifié l'expression des SIRT3 et 6 dans ce modèle mais n'ai pas observé de modulation significative de l'expression des SIRT3 et 6 lorsque l'expression de SIRT1 est inhibée, écartant l'hypothèse d'une régulation par compensation (Figure 83).

J'ai ensuite quantifié l'expression de SOD2 et de sa forme acétylée en Lys 68 lorsque l'expression de SIRT1 est inhibée dans les NCM traités à l'isoprénaline pendant 24h, correspondant au temps où l'augmentation de l'expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68 a été précédemment observée et est associée au stress oxydant. Je n'ai pas observé de modulation significative de l'expression de SOD2 et de sa forme acétylée en Lys 68 dans les NCM hypertrophiés lorsque l'expression de SIRT1 est inhibée (Figure 84). Ces résultats nous



indiquent que la protéine SIRT1 ne semble pas être impliquée dans la régulation de l'acétylation de SOD2 dans le cœur.

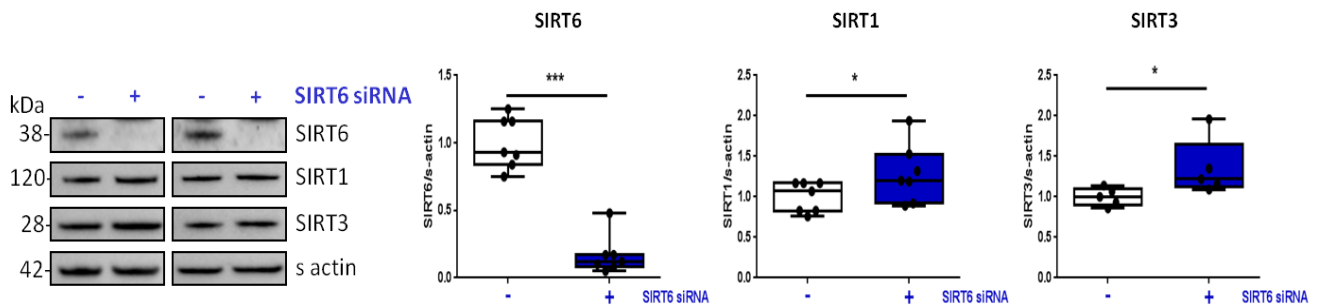


**Figure 84** : Impact de l'inhibition de l'expression de SIRT1 sur l'expression de SOD2 et de sa forme acétylée en Lys 68 dans les NCM hypertrophiés.

Quantification par western blot de l'expression de SOD2 (n=3), de sa forme acétylée en Lys 68 (n=3) et du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (n=3) dans les NCM pour lesquels l'expression des SIRT1 est inhibée par transfection de siRNA (SIRT1 siRNA) (72h, 20 nM) et traités à l'Iso (10 μM, 24h) par comparaison aux cellules traitées à l'isoprénaline (Iso) uniquement (médiane ± interquartiles, test de Mann-Whitney).

### 3.4) Impact de l'inhibition de l'expression de SIRT6 dans les NCM.

De façon similaire, j'ai inhibé l'expression de SIRT6 dans les NCM. La transfection par siRNA dirigé spécifiquement contre SIRT6 a permis d'inhiber totalement l'expression de SIRT6 dans les NCM (Figure 85).

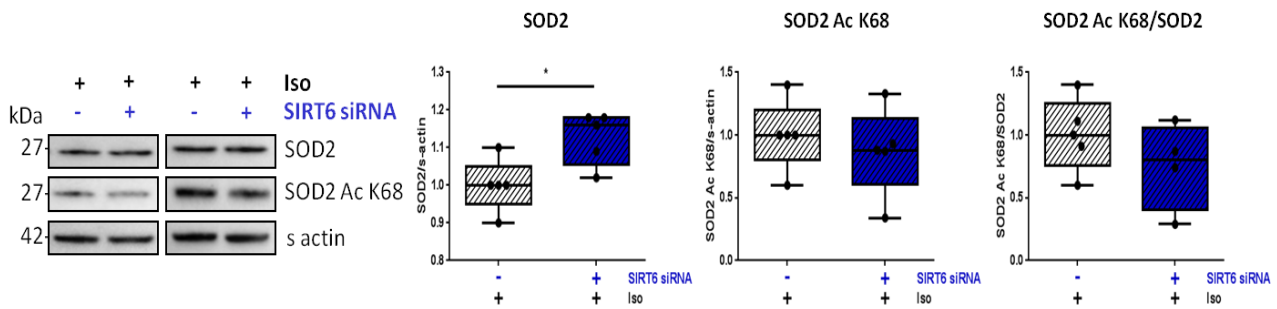


**Figure 85** : Impact de l'inhibition de l'expression de SIRT6 sur l'expression des SIRT1 et 3 dans les NCM.

Validation par western blot de l'efficacité de l'inhibition de l'expression de SIRT6 (n=3) et quantification de l'expression des SIRT1 (n=3) et 6 (n=3) dans les NCM pour lesquelles l'expression de SIRT6 a été inhibée par transfection par siRNA dirigé spécifiquement contre SIRT6 (SIRT6 siRNA) (72h, 20 nM) par comparaison aux NCM contrôles (NT siRNA) (médiane ± interquartiles, test de Mann-Whitney, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

J'ai montré que l'inhibition de l'expression de SIRT6 dans les NCM est compensée par une augmentation significative de l'expression de SIRT1 et 3 (Figure 85).

Par la suite, j'ai quantifié l'expression de SOD2 et de sa forme acétylée en Lys 68 dans les NCM hypertrophiés pour lesquels l'expression de SIRT6 est inhibée. J'ai ainsi observé une augmentation significative de l'expression de SOD2 (Figure 86) sans modulation significative de l'expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68, menant à une tendance à la diminution du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 après 24h de traitement à l'isoprénaline dans les NCM lorsque l'expression de SIRT6 est inhibée (Figure 86).



**Figure 86 :** Impact de l'inhibition de l'expression de SIRT6 sur l'expression de SOD2 et de sa forme acétylée en Lys 68 dans les NCM traités à l'isoprénaline.

Quantification par western blot de l'expression de SOD2 (n=3), de sa forme acétylée en Lys 68 (SOD2 Ac K68) (n=3) ainsi que du ration SOD2 Ac K68/SOD2 (n=3) dans les NCM traités à l'isoprénaline (Iso) (10 μM, 24h) et pour lesquels l'expression de SIRT6 a été inhibée par siRNA (SIRT6 siRNA) (72h, 20 nM) par comparaison aux cellules traitées à l'Iso uniquement (médiane ± interquartiles, test de Mann-Whitney, \*P<0.05).

Ces résultats suggèrent que SIRT6 n'est pas directement impliquée dans la régulation de l'acétylation de SOD2 dans les NCM mais elle pourrait l'être via des intermédiaires moléculaires possédant eux-mêmes un effet sur l'expression de SOD2. Ainsi, l'augmentation de l'expression de SOD2 observée dans ce modèle pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'expression de SIRT3 induite en réponse à l'inhibition de l'expression de SIRT6.

De par sa localisation mitochondriale similaire à SOD2 et à sa forme acétylée en Lys 68, ainsi que par son interaction avec SOD2 dans les NCM, la protéine SIRT3 semble être la désacétylase impliquée dans la régulation de SOD2. J'ai donc concentré mon étude sur cette protéine et ai étudié son rôle dans le stress oxydant et l'hypertrophie cardiaque.

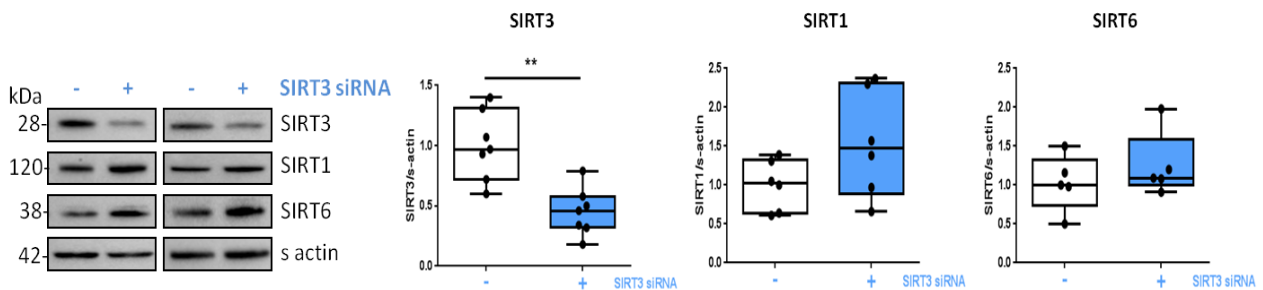
#### 4) Rôle de SIRT3 dans la régulation de l'acétylation de SOD2, du stress oxydant et de l'hypertrophie *in vitro* dans les NCM.



Dans le but de mieux comprendre l'implication de SIRT3 dans la régulation de l'acétylation de SOD2, ainsi que son impact sur le stress oxydant et l'hypertrophie dans le cœur, j'ai travaillé sur différents modèles de modulation de l'expression de SIRT3.

#### 4.1) Impact de l'inhibition de l'expression de SIRT3 dans les NCM traités à l'isoprénaline.

Dans un premier temps, j'ai inhibé l'expression de SIRT3 dans les NCM par transfection avec un siRNA dirigé spécifiquement contre la protéine SIRT3. Cette transfection a permis une inhibition de 70 % de l'expression de SIRT3 dans les NCM (Figure 87).



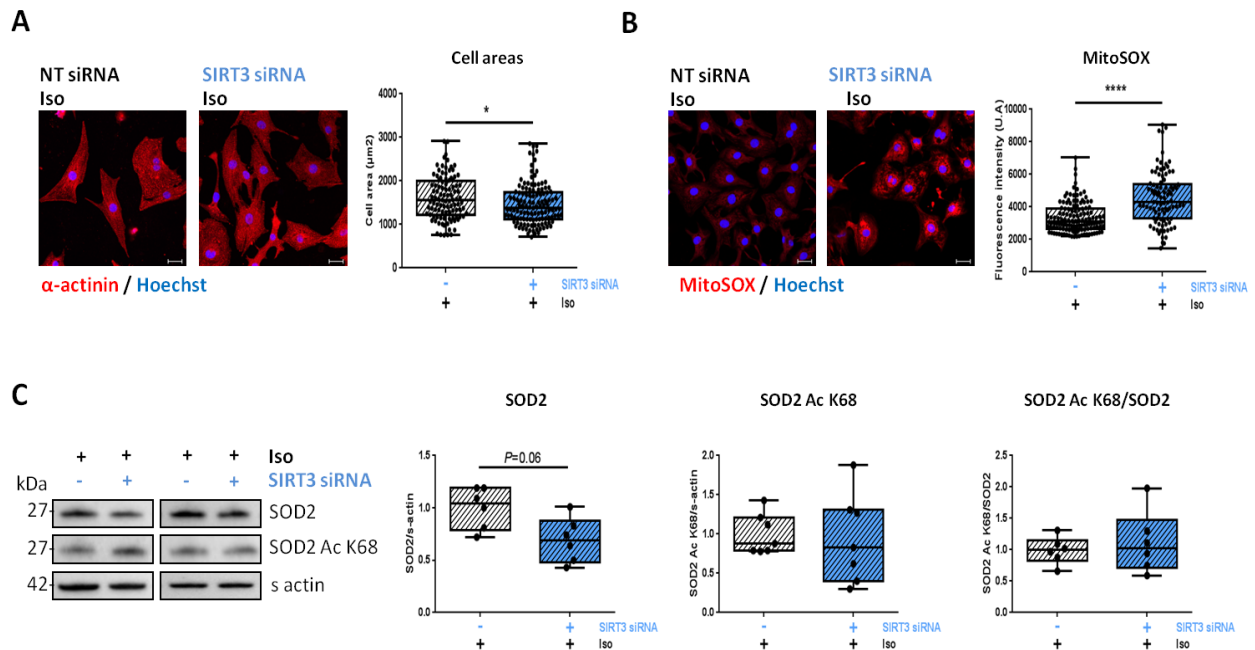
**Figure 87** : Impact de l'inhibition de l'expression de SIRT3 sur l'expression de SIRT1 et SIRT6 dans les NCM.

Validation de l'inhibition de l'expression de SIRT3 (n=3) et quantification de l'expression de SIRT1 (n=3) et 6 (n=3) dans les NCM lorsque l'expression de SIRT3 est inhibée par siRNA (SIRT3 siRNA) (72h, 20 nM) par comparaison aux NCM contrôles (NT siRNA) (médiane ± interquartiles, test de Mann-Whitney, \*\* $P < 0.01$ ).

J'ai ensuite quantifié l'expression des SIRT1 et 6 dans ce modèle et n'ai pas observé de modulation significative de l'expression de SIRT1 et 6 lorsque l'expression de SIRT3 est inhibée (Figure 87), éliminant l'hypothèse d'une compensation de l'inhibition de SIRT3 par les isoformes SIRT1 et 6.

J'ai ensuite étudié l'impact de l'inhibition de SIRT3 sur l'hypertrophie induite par l'isoprénaline. Dans ce but, j'ai quantifié les aires des NCM après marquage de l'alpha-actinine en IF. J'ai ainsi observé une diminution significative de l'aire des NCM traités à l'isoprénaline lorsque l'expression de SIRT3 est inhibée (Figure 88A) par comparaison aux cellules transfectées par le siRNA contrôle, qui pourrait suggérer une diminution de l'hypertrophie

(Figure 88A). Au contraire, j'ai observé une augmentation significative de l'aire des NCM non traités à l'isoprénaline (données non montrées) pour lesquels l'expression de SIRT3 est inhibée.



**Figure 88** : Impact de l'inhibition de l'expression de SIRT3 sur l'aire cellulaire, le stress oxydant et l'expression de SOD2 dans les NCM hypertrophiés.

Quantification par fluorescence de l'aire cellulaire (A) après marquage de l'alpha actinine (rouge) et du noyau (bleu) (n=3, 120 cellules quantifiées minimum) et de la production d'anions superoxydes mitochondriaux (B) après marquage par la sonde MitoSOX (rouge) et du noyau (bleu) (n=3, 92 cellules quantifiées minimum) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Student, \* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ) dans les NCM traités à l'isoprénaline (Iso) (10  $\mu\text{M}$ , 24h) pour lesquels l'expression de SIRT3 a été inhibée (SIRT3 siRNA) (72h, 20 nM) par comparaison aux cellules traitées à l'Iso uniquement (échelle = 20  $\mu\text{m}$ ). Quantification par western blot de l'expression de SOD2 (C) (n=3), de sa forme acétylée en Lys 68 (SOD2 Ac K68) (C) (n=3) et du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (C) (n=3) dans les NCM transfectées par siRNA dirigé spécifiquement contre SIRT3 (SIRT3 siRNA) (72h, 20 nM) puis traités à l'Iso (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Mann-Whitney).

De plus, j'ai quantifié la production d'anions superoxydes mitochondriaux dans les NCM traités à l'isoprénaline lorsque l'expression de SIRT3 est inhibée par utilisation de la sonde MitoSOX en fluorescence. J'ai observé une augmentation significative du taux d'anions superoxydes mitochondriaux lorsque l'expression de SIRT3 est inhibée dans les NCM traités à l'isoprénaline (Figure 88B). Cette augmentation du stress oxydant mitochondrial semble contradictoire à la diminution de l'aire cellulaire précédemment observée dans les NCM traités à l'isoprénaline pour lesquels l'expression de SIRT3 est inhibée. Ces données pourraient suggérer que l'inhibition ne protège pas les NCM de l'hypertrophie cellulaire mais serait plutôt associée à une mortalité cellulaire, qui pourrait expliquer la diminution de l'aire des NCM. En outre, j'ai également observé une diminution significative du taux d'anions superoxydes

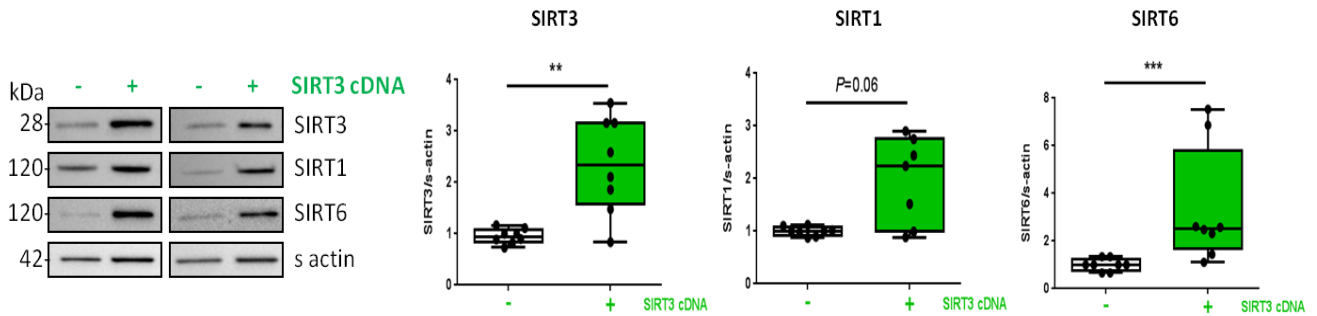
mitochondriaux dans les NCM transfectés par siRNA dirigé contre SIRT3 en conditions basales (sans traitement à l'isoprénaline) (données non montrées). Ces résultats suggèrent un effet délétère de l'inhibition de l'expression de SIRT3 avec une augmentation du stress oxydant dans les NCM.

J'ai ensuite quantifié l'expression de SOD2 et de sa forme acétylée en Lys 68 dans ce modèle et j'ai observé une tendance à la diminution de l'expression de SOD2 lorsque l'expression de SIRT3 est inhibée dans les NCM traités à l'isoprénaline (Figure 88C), sans modulation significative de l'expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68 (Figure 88C) ainsi que du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (Figure 88C). Il est à noter que l'expression de SOD2 et de sa forme acétylée en Lys 68 ne sont également pas modulées dans les NCM sous-exprimant la protéine SIRT3 et non traités à l'isoprénaline (données non montrées).

L'ensemble de ces données confirme l'effet délétère de l'inhibition de l'expression de SIRT3 dans les NCM. Ainsi, l'inhibition de l'expression de SIRT3 entraînerait une diminution de l'expression des formes actives de SOD2, favorisant le développement du stress oxydant dans les NCM traités à l'isoprénaline.

#### ***4.2) Impact de la surexpression de SIRT3 dans les NCM traités à l'isoprénaline.***

De manière complémentaire, j'ai surexprimé la protéine SIRT3 dans les NCM par transfection avec un plasmide contenant la séquence codante de la protéine SIRT3 murine. Cette transfection a permis une augmentation de 2,5 fois de l'expression de SIRT3 dans les NCM (Figure 89). Cependant, j'ai également observé une augmentation significative de l'expression de SIRT1 et de SIRT6 dans ce modèle, suggérant de nouveau une autorégulation des différents isoformes SIRT dans les NCM (Figure 89).



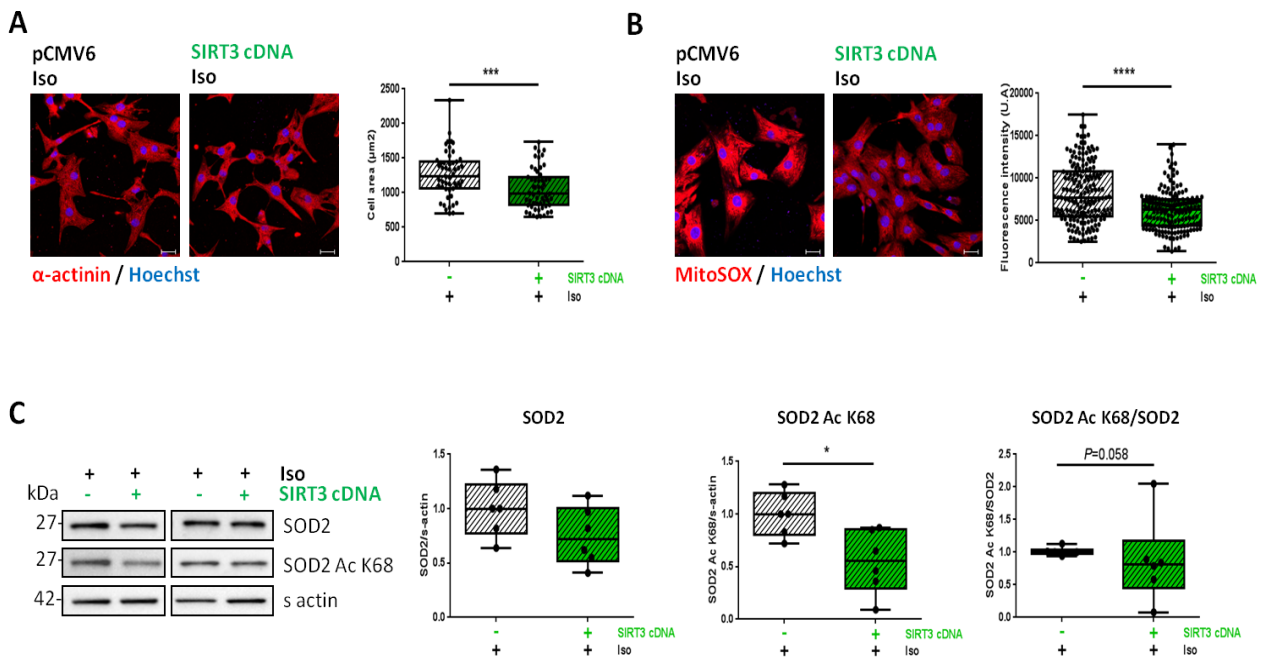
**Figure 89** : Impact de la surexpression de SIRT3 sur l’expression des SIRT1 et 6 dans les NCM.

Validation de la surexpression de SIRT3 (n=3) et quantification par western blot de l’expression de SIRT1 (n=3) et SIRT6 (n=3) dans les NCM transfectés par le plasmide PCMV6 contenant la séquence codante de la protéine SIRT3 (SIRT3 cDNA) (72h, 3µg) par rapport aux NCM contrôles transfectées par le plasmide PCMV6 vide (médiane ± interquartiles, test de Mann Whitney, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

Par la suite, j’ai quantifié l’aire des NCM surexprimant SIRT3 et traités à l’isoprénaline après marquage de l’alpha actinine en IF et j’ai observé une diminution significative de l’aire des NCM traités à l’isoprénaline lorsque l’expression de SIRT3 est augmentée (Figure 90A) par comparaison aux cellules transfectées par le plasmide vide.

De plus, je n’ai pas observé de modulation significative de l’aire cellulaire des NCM non traités lorsque l’expression de SIRT3 est augmentée (données non montrées). Ces données suggèrent un effet protecteur de la surexpression de SIRT3 sur l’hypertrophie induite par l’isoprénaline dans les NCM.

J’ai ensuite quantifié la production d’anions superoxyde mitochondriaux dans les NCM surexprimant la protéine SIRT3 par utilisation de la sonde MitoSOX en IF. Nous avons observé une diminution significative de la production d’anions superoxydes mitochondriaux (Figure 90B) dans les NCM traités à l’isoprénaline lorsque l’expression de SIRT3 est inhibée par comparaison aux cellules contrôles. La production d’anions superoxydes mitochondriaux est cependant augmentée lorsque l’expression de SIRT3 est augmentée dans les NCM non traités (données non montrées), ce qui pourrait refléter le stress induit par l’action de la transfection dans les NCM. Ces résultats indiquent un effet protecteur de la surexpression de SIRT3 sur le stress oxydant induit par le traitement à l’isoprénaline.



**Figure 90** : Impact de la surexpression de SIRT3 sur l'aire cellulaire, le stress oxydant et l'expression de SOD2 dans les NCM traités à l'isoprénaline.

Quantification par fluorescence de l'aire cellulaire (A) (n=3, au moins 86 cellules quantifiées minimum) après marquage de l'alpha actinine (rouge) et du noyau (bleu) ainsi que de la production d'anions superoxydes mitochondriaux (B) (n=3, 151 cellules quantifiées minimum) après utilisation du marquage MitoSOX (rouge) et marquage du noyau (bleu) pour les NCM surexprimant la protéine SIRT3 après transfection par plasmide (SIRT3 cDNA) (72h, 3 µg) et hypertrophiés par traitement à l'isoprénaline (Iso) (10 µM) pendant 24h par rapport aux cellules ne surexprimant pas SIRT3 (médiane ± interquartiles, test de Student, \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Quantification par western blot de l'expression de SOD2 (C) (n=2), de sa forme acétylée en Lys 68 (SOD2 Ac K68) (C) (n=2) et du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (C) (n=2) dans les NCM traités à l'Iso pour lesquels l'expression de SIRT3 est augmentée après transfection (72h, 3 µg) par plasmide contenant la séquence codante de la protéine SIRT3 (SIRT3 cDNA) par comparaison aux cellules traitées à l'Iso uniquement (médiane ± interquartiles, test de Mann Whitney, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

Je me suis enfin intéressée à l'expression de SOD2 et de sa forme acétylée en Lys 68 dans ce modèle. J'ai quantifié une diminution significative de l'expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68 (Figure 90C), ainsi qu'une tendance à la diminution du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 dans les NCM traités à l'isoprénaline surexprimant SIRT3 (Figure 90C), qui est significativement modulé dans les NCM non traités (données non montrées). Ces résultats préliminaires confirment l'effet protecteur de la surexpression de SIRT3 dans les NCM. La surexpression de SIRT3 entraîne l'activation de SOD2 par désacétylation, permettant de protéger les NCM du stress oxydant et de l'hypertrophie induite par le traitement à l'isoprénaline.

J'ai donc montré dans un modèle *in vitro* de NCM que la protéine SIRT3 protège de l'hypertrophie et du stress oxydant induit par le traitement à l'isoprénaline, en activant la

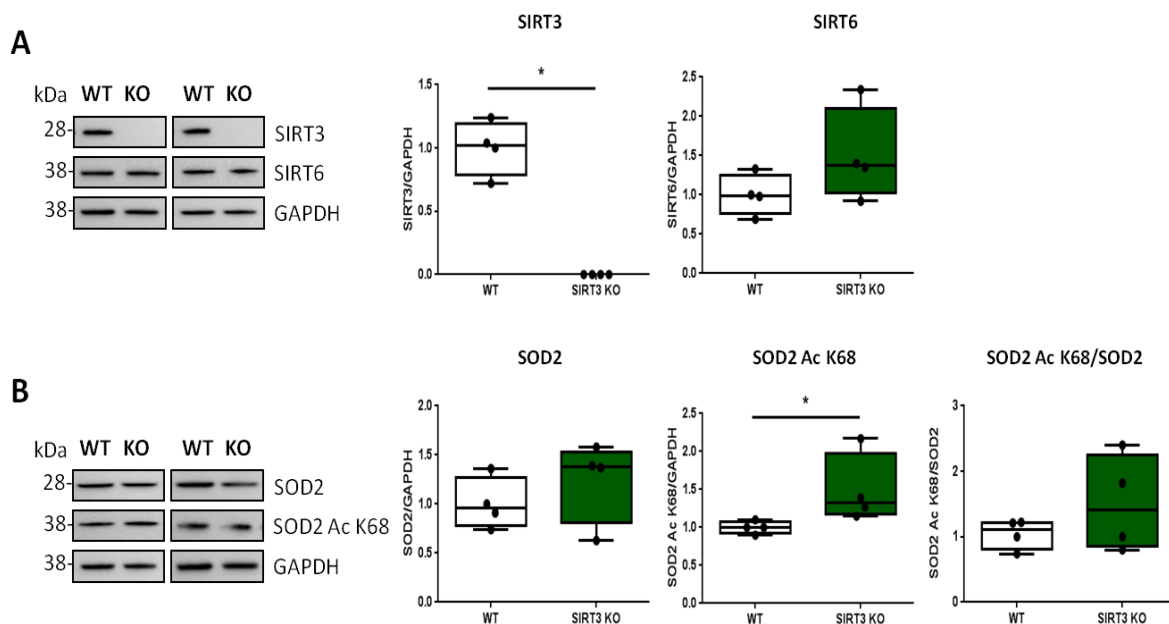
protéine SOD2 par désacétylation. Par la suite, j'ai confirmé l'implication de SIRT3 dans la désacétylation de SOD2 *in vivo* dans un modèle de souris SIRT3 KO.

## 5) Etude de l'implication des SIRT dans la désacétylation de SOD2 *in vivo* dans le cœur.

### 5.1) Impact de la délétion de SIRT3 *in vivo* dans les cardiomyocytes isolés de souris SIRT3 KO.

Afin de confirmer l'implication de SIRT3 dans la régulation de SOD2 *in vivo*, j'ai travaillé sur un modèle de souris SIRT3 KO, obtenu en collaboration avec le Pr Luc Bertrand (IREC, CARD, Bruxelles).

J'ai observé une inhibition totale de l'expression de SIRT3 dans les cardiomyocytes isolés de souris SIRT3 KO (Figure 91A), confirmant l'efficacité de la délétion de SIRT3.



**Figure 91** : Etude de l'expression des SIRT et de SOD2 dans les cardiomyocytes isolés de souris SIRT3 KO.

Validation de l'inhibition de l'expression de SIRT3 (A) et quantification de l'expression de SIRT6 (A) par western blot dans les cardiomyocytes isolés de souris SIRT3 KO (n=4 souris) par comparaison aux souris WT (n=4 souris). Quantification par western blot de l'expression de SOD2 (B), de sa forme acétylée en Lys 68 (SOD2 Ac K68) (B) et du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (B) dans les cardiomyocytes isolés de souris SIRT3 KO (n=4 souris) par comparaison aux souris WT (n=4 souris) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Mann-Whitney, \* $P < 0.05$ ).

De plus, je n'ai pas observé de modulation significative de l'expression de SIRT6 dans ce modèle (Figure 91A). L'expression de la protéine SIRT1 n'a pas pu être quantifiée dans ce contexte suite à des problèmes de détection de la protéine en western blot malgré l'utilisation de différents anticorps.

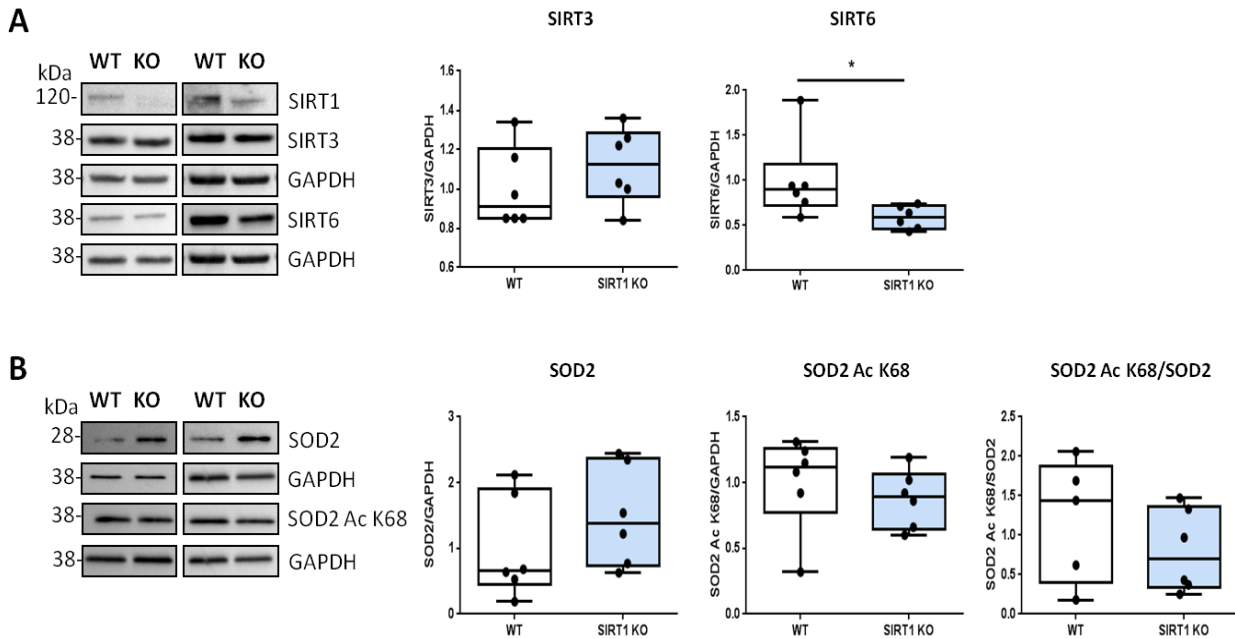
J'ai ensuite quantifié l'expression de la protéine SOD2 et de sa forme acétylée en Lys 68 dans ce modèle et j'ai observé une augmentation significative de l'expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68 (Figure 91), sans modulation de l'expression des formes totales de SOD2 (Figure 91B) ainsi que du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (Figure 91B) dans les cardiomyocytes isolés de souris SIRT3 KO par comparaison aux souris WT. Ces données confirment dans un modèle *in vivo* l'implication de SIRT3 dans la désacétylation de SOD2 dans le cœur.

### ***5.2) Impact de la délétion cardiaque spécifique de SIRT1 dans le cœur de souris SIRT1 KO.***

De façon complémentaire, j'ai travaillé sur un modèle de souris SIRT1 KO, obtenu par collaboration avec l'UMR S-1180 et le Dr Anne Garnier (Châtenay-Malabry), pour lesquelles une inhibition spécifique de l'expression de SIRT1 au niveau cardiaque a été induite. Dans ce modèle, l'inhibition de l'expression de SIRT1 est associée à une diminution significative de l'expression de SIRT6 (Figure 92A), sans modulation de l'expression de SIRT3 (Figure 92A), suggérant une trans-régulation de l'expression des SIRT nucléaires dans le cœur.

Je n'ai pas observé de modulation significative de l'expression de SOD2 (Figure 92B), de sa forme acétylée en Lys 68 (Figure 92B) ainsi que du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 dans le cœur de souris SIRT1 KO par comparaison aux souris WT, confirmant que la protéine SIRT1 ne semble pas être impliquée dans la régulation de l'acétylation de SOD2 dans le cœur. L'ensemble de ces résultats *in vivo* confirment les résultats précédemment observés *in vitro* dans les NCM.





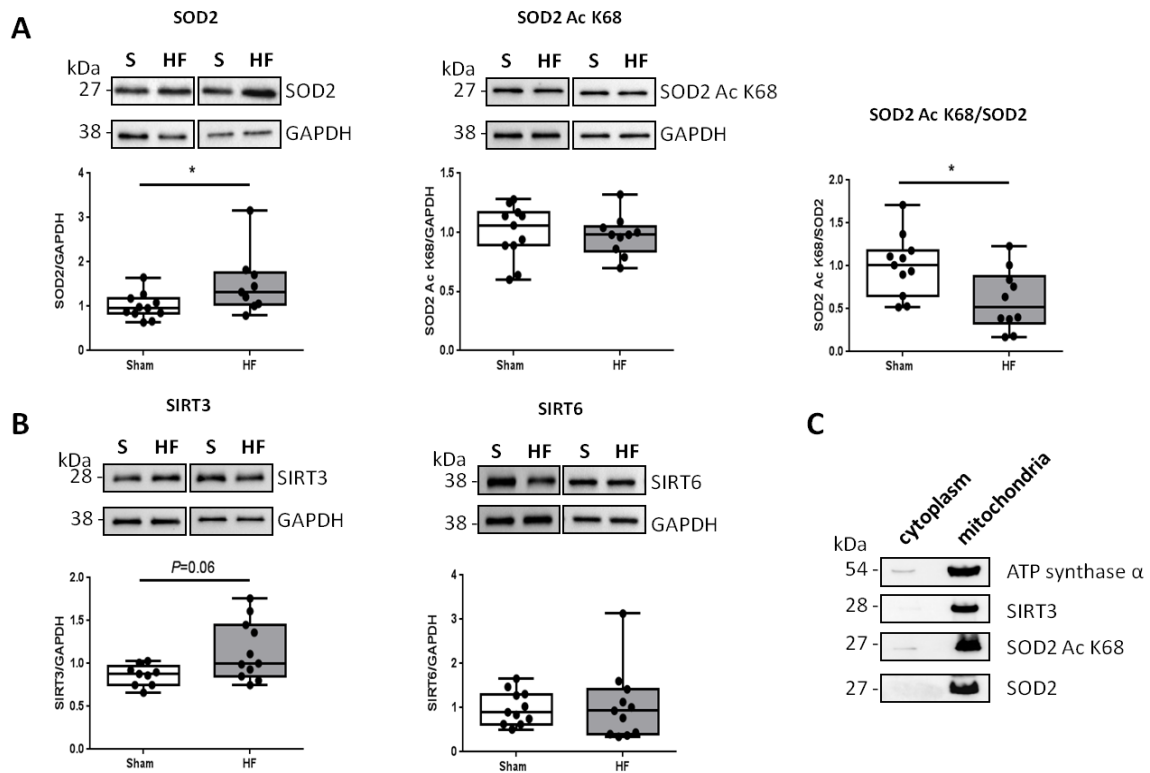
**Figure 92** : Etude de l'expression des SIRT et de SOD2 dans le cœur de souris SIRT1 KO. Western blot et quantification de l'expression des SIRT3 (A), de SIRT6 (A), de SOD2 (B), de sa forme acétylée en Lys 68 (SOD2 Ac K68)(B) ainsi que du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (B) dans le cœur de souris présentant une délétion spécifique de SIRT1 au niveau cardiaque (n=6 souris) par comparaison aux souris WT (n=6 souris) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Mann-Whitney, \* $P < 0.05$ ).

### 5.3) Caractérisation de la régulation de l'acétylation de SOD2 et du stress oxydant in vivo dans un modèle expérimental de rats IC.

Afin de mieux comprendre comment se traduit cette régulation dans le contexte pathologique du RVG et de l'IC, j'ai travaillé sur le modèle expérimental de rats IC, obtenu en collaboration avec l'unité INSERM U1096 et ayant servi au criblage protéomique. Dans ce modèle, l'IDM est induit par ligature de l'artère coronaire descendante gauche et les cœurs des rats sont prélevés 2 mois après l'IDM, correspondant à la phase tardive du RVG et notamment caractérisée par l'hypertrophie des cardiomyocytes.

Dans ce modèle, j'ai quantifié une augmentation significative de l'expression de SOD2 (Figure 93A), sans modulation de l'expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68 (Figure 93A) ainsi qu'une diminution significative du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (Figure 93A) dans les VG de rats IC par comparaison aux rats témoins. Ces résultats montrent une augmentation significative de l'activité de SOD2 en réponse au stress induit par le développement du RVG.



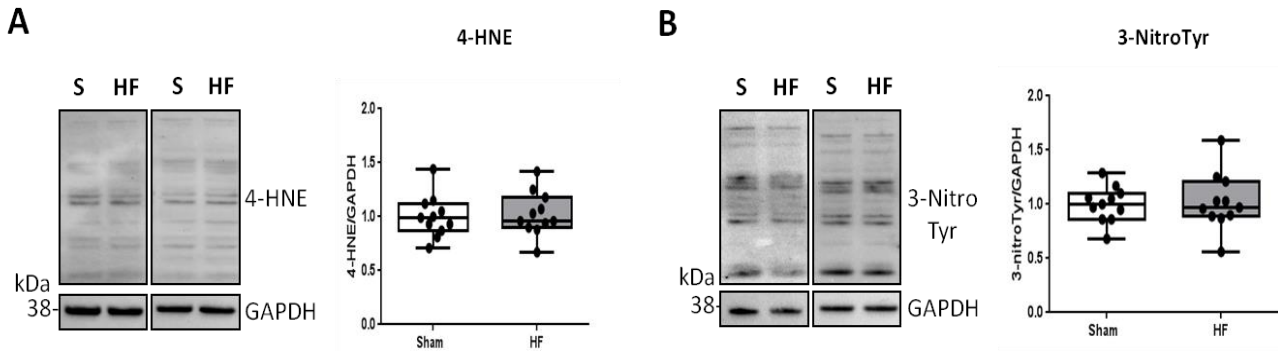


**Figure 93** : Caractérisation de la régulation de l’acétylation de SOD2 dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM.

Quantification par western blot de l’expression de SOD2 (A), de sa forme acétylée en Lys 68 (SOD2 Ac K68) (A) et du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (A) ainsi que de l’expression des SIRT3 (B) et SIRT6 (B) dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM (n=9 à 11 rats) par comparaison aux rats témoins (n=9 à 11 rats) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Mann-Whitney,  $*P<0.05$ ). Localisation subcellulaire de SOD2, de sa forme acétylée en Lys 68 et SIRT3 par fractionnement cytoplasme-mitochondries (C) dans le VG de rats (n=4 rats).

De manière complémentaire, j’ai observé une tendance à l’augmentation de l’expression de SIRT3, sans modulation de l’expression de SIRT6, dans ce modèle (Figure 93B). Par fractionnement cytoplasme-mitochondries, j’ai observé une localisation mitochondriale de SOD2, de sa forme acétylée en Lys 68 ainsi que de SIRT3 (Figure 93C), en faveur de l’hypothèse précédemment établie d’une interaction directe de ces protéines dans les mitochondries.

J’ai également quantifié par western blot le stress oxydant dans ce modèle de manière indirecte, par quantification des produits 4-HNE, issus de la peroxydation lipidique, ainsi que des résidus 3-NitroTyrosines (3-NitroTyr), provenant de la nitrosylation des protéines. Aucune modulation significative du taux de résidus 3-NitroTyr (Figure 94B) ainsi que du taux de 4-HNE (Figure 94A) dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM n’a été observée par comparaison aux rats contrôles.



**Figure 94** : Caractérisation du stress oxydant dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM. Western blot et quantification du taux de 4-HNE (A) ainsi que du taux de résidus 3-NitroTyr (B) dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM (n=11 rats) par comparaison aux rats témoins (n=11 rats) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Mann-Whitney).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la protéine SIRT3 pourrait favoriser l'expression et l'activation de la protéine SOD2 dans le cœur afin d'empêcher l'augmentation du stress oxydant suite à un IDM, confirmant ainsi l'importance de la régulation de l'activité de SOD2 et du stress oxydant dans le contexte du RVG post-IDM et de l'IC. Les données obtenues *in vivo* semblent ainsi confirmer les résultats précédemment obtenus *in vitro* dans les NCM hypertrophiés.

## 6) Caractérisation du rôle de l'acetyl transferase P300 dans la régulation de l'acétylation de SOD2.

De manière complémentaire à l'étude de la désacétylation de SOD2, je me suis intéressée à la réaction d'acétylation de SOD2, entraînant son inactivation, dans le cœur.

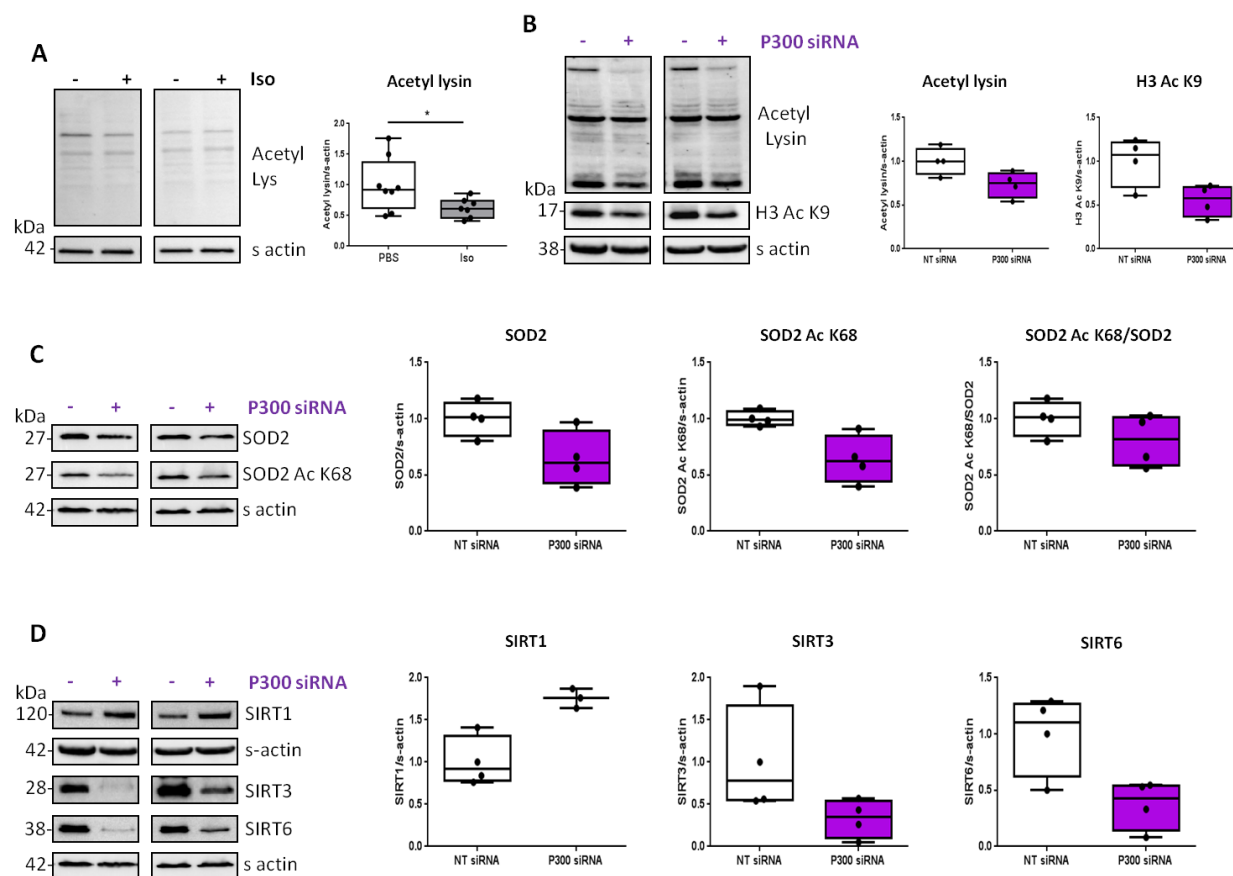
Afin d'étudier la manière dont la protéine SOD2 est acétylée dans le cœur, j'ai d'abord quantifié l'expression des protéines totales possédant une Lys acétylée (Acetyl Lys) dans les NCM traités à l'isoprénaline pendant 24h (Figure 95a). J'ai observé une diminution significative du taux de protéines possédant un ou plusieurs résidus Lys acétylés dans les NCM hypertrophiés par comparaison aux cellules contrôles. Ces résultats favorisent l'hypothèse d'une acétylation enzymatique de SOD2 dans le cœur. Dans ce contexte, je me suis plus particulièrement intéressée à la protéine P300, décrite comme pouvant intervenir dans la régulation de l'acétylation de SOD2.

Dans un premier temps, j'ai cherché à détecter la protéine P300 dans le modèle de NCM hypertrophiés. Malgré l'utilisation de différentes techniques (western blot, RT-qPCR ou encore IF) et des différents outils disponibles, je ne suis pas parvenue à détecter la protéine P300 dans les différents modèles *in vivo* ou *in vitro*. Cela pourrait s'expliquer par le haut poids moléculaire de la protéine (300 kDa), la rendant plus difficile à détecter, mais également par sa faible disponibilité dans la cellule à l'image d'autres facteurs de transcription. Afin d'étudier l'implication de la protéine P300, j'ai donc décidé de moduler son expression dans les NCM et d'utiliser des moyens indirects de vérification de cette modulation.

Ainsi, j'ai procédé à son inhibition dans les NCM par transfection par siRNA à la concentration de 100 nM pendant 72h. J'ai quantifié l'expression de la forme acétylée de l'histone H3 en Lys 9 (H3 Ac K9), issue de l'acétylation de l'histone H3 par la protéine P300, dans ce modèle (Figure 95B).

Les premiers résultats obtenus indiquent que l'inhibition de l'expression de la protéine P300 est associée à une diminution de l'expression de la forme acétylée de la protéine H3 en Lys 9 dans les NCM (Figure 95B), ainsi qu'à une diminution de l'acétylation en Lys des protéines totales (Figure 95B), ce qui confirme l'efficacité de la transfection et l'inhibition de l'expression de la protéine P300 dans les NCM.

J'ai ensuite quantifié l'expression de la protéine SOD2 et de sa forme acétylée en Lys 68 dans ce modèle. J'ai observé une diminution de l'expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68 (Figure 95C), ainsi que de l'expression des formes totales de SOD2 (Figure 95C), sans modulation du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (Figure 95C) lorsque l'expression de P300 est inhibée dans les NCM. Ces résultats préliminaires suggèrent l'implication de la protéine P300 dans la régulation de l'expression de SOD2. Cependant, la diminution de l'expression des formes totales de SOD2 dans ce modèle suggère que la protéine P300 serait plutôt impliquée dans la régulation transcriptionnelle de SOD2 plutôt que dans la régulation directe de son acétylation.



**Figure 95** : Caractérisation de l’acétylation de SOD2 et impact de l’inhibition de l’expression de P300 dans les NCM.

Western blot et quantification des résidus Lyss acétylés des protéines totales (A) dans les NCM traités à l’isoprénaline (Iso) (10 μM, 24h) par comparaison aux NCM contrôles (PBS). Validation de l’inhibition de l’expression de P300 dans les NCM par quantification de l’expression des résidus Lyss acétylés des protéines totale (B) (n=2) et de l’histone H3 acétylée en Lys 9 (H3 Ac K9) (B) (n=2). Quantification par western blot de l’expression des protéines SOD2 (C) (n=2), de sa forme acétylée en Lys 68 (SOD2 Ac K68) (C) (n=2), du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (C) (n=2) ainsi que de l’expression des SIRT1 (C) (n=2), 3 (C) (n=2) et 6 (C) (n=2) dans les NCM pour lesquels l’expression de P300 est inhibée (P300 siRNA) (72h, 100 nM) par comparaison aux cellules contrôles (siNT) (médiane ± interquartiles, test de Mann-Whitney).

Par la suite, j’ai quantifié l’expression des protéines SIRT1, 3 et 6 dans ce modèle. Les premiers résultats obtenus indiquent une diminution de l’expression de SIRT3 (Figure 95D) dans les NCM lorsque l’expression de P300 est inhibée. Cette diminution pourrait s’expliquer par le besoin moindre de désacétylation, notamment pour SOD2, engendrée par la baisse d’acétylation. Cette hypothèse se confirme par la diminution significative de l’expression de SIRT6 (Figure 95D) lorsque l’expression de P300 est inhibée. Cependant, une augmentation de l’expression de SIRT1 (Figure 95D) serait observée lorsque l’expression de P300 est inhibée dans les NCM. Cette augmentation permettrait de compenser la diminution de l’expression de

SIRT6 dans le noyau et de maintenir un équilibre de l'état d'acétylation des protéines dans ce compartiment, en particulier au niveau des histones.

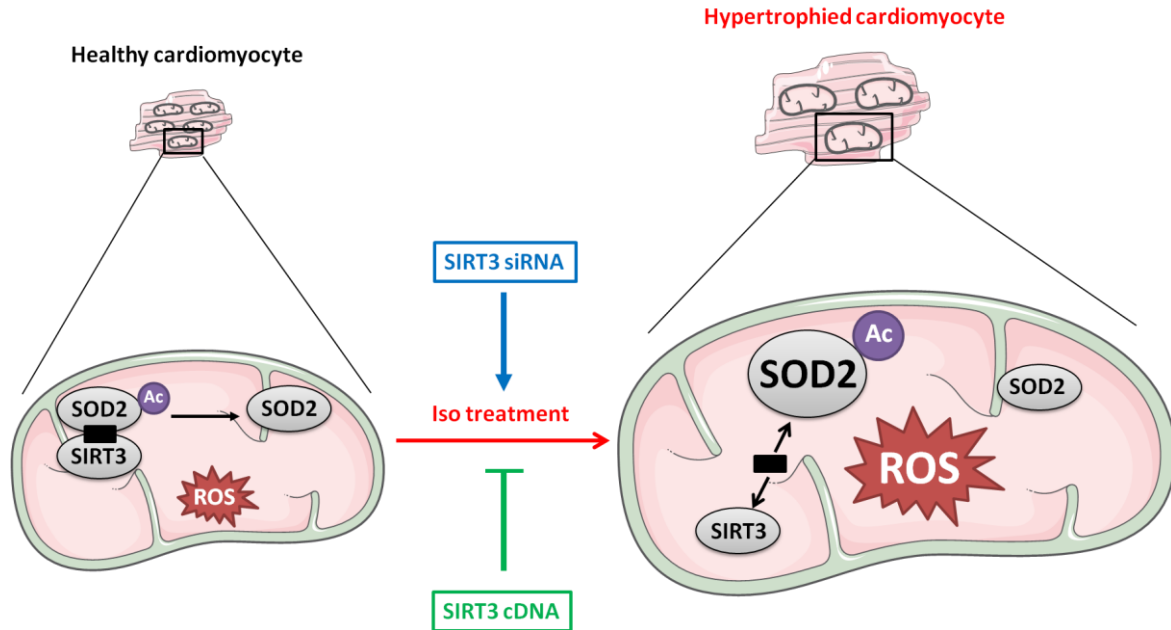
L'ensemble de ces résultats indiquent que la protéine P300 est impliquée dans la régulation de l'expression de SOD2 dans les NCM. La modulation de l'expression de P300 est également associée à une modulation de l'expression des SIRT1, 3 et 6 dans la cellule, afin de maintenir l'état d'acétylation dans les cellules de compenser l'inhibition de l'expression de P300.

### III) Conclusions

L'étude du stress oxydant dans le modèle *in vitro* de NCM hypertrophiés par traitement à l'isoprénaline m'a permis de mettre en évidence une régulation de l'activité de la protéine SOD2 dans ce modèle. J'ai ainsi observé que la protéine SOD2 est inactivée par acétylation après 24h de traitement à l'isoprénaline, ce qui entraîne une augmentation du taux d'anions superoxydes mitochondriaux. J'ai également montré que l'augmentation de l'acétylation de la protéine SOD2 en Lys 68, localisée majoritairement dans la mitochondrie, est associée à une diminution de son interaction avec la désacétylase mitochondriale SIRT3 mais pas avec les désacétylases SIRT1 et 6, suggérant l'implication de la protéine SIRT3 dans la désacétylation de SOD2.

Afin de confirmer le rôle de SIRT3 dans la régulation de la désacétylation et de l'activité de SOD2, j'ai modulé son expression dans les NCM hypertrophiés ce qui m'a permis de mettre en évidence un effet protecteur de la protéine SIRT3 sur l'hypertrophie et sur la production d'anions superoxydes mitochondriaux induits par le traitement à l'isoprénaline (Figure 96).

J'ai montré que cet effet protecteur peut s'expliquer par une régulation de l'acétylation et de l'activité de SOD2 dans les NCM hypertrophiés (Figure 96). Il est également à noter que la modulation de l'expression d'un isoforme SIRT peut impacter l'expression des différents isoformes SIRT localisés dans des compartiments subcellulaires différents, suggérant une auto-régulation de l'expression des SIRT au sein de la cellule. L'implication de SIRT3 dans la régulation de l'acétylation de SOD2 a ensuite été confirmée *in vivo* dans un modèle de souris SIRT3 KO pour lesquelles l'expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68 est diminuée par comparaison aux souris WT. Enfin, j'ai confirmé ces résultats dans un modèle *in vivo* de rats IC pour lesquels l'augmentation de l'expression de SOD2, associée à une tendance à l'augmentation de l'expression de SIRT3, permet de prévenir le stress oxydant dans les VG de rats IC à 2 mois post-IDM.



**Figure 96** : Schéma récapitulatif de l'implication de SIRT3 dans la régulation de l'acétylation de SOD2, du stress oxydant et de l'hypertrophie dans les NCM traités à l'isoprénaline.

•O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anions superoxydes ; cDNA : ADN complémentaire ; H<sub>2</sub>O : eau ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène ; siRNA : *silencing RNA* ; SIRT3 : sirtuine 3 ; SOD2 : superoxyde dismutase 2 ; SOD2 Ac K68 : forme acétylée de SOD2 en Lys 68.

De manière complémentaire, j'ai étudié la réaction d'acétylation de la protéine SOD2 par la protéine acetyl transferase P300. J'ai montré que la protéine P300 est impliquée dans la régulation de l'expression de SOD2 et de sa forme acétylée en Lys 68, suggérant une régulation transcriptionnelle de SOD2 par P300. J'ai également montré que l'inhibition de l'expression de P300 était associée à une modulation de l'expression des SIRT1, 3 et 6, permettant de compenser la perte d'acétylation induite par l'inhibition de l'expression de P300 ou permettant de maintenir le niveau d'acétylation de la cellule par cross-régulation des SIRT, confirmant l'hypothèse précédemment établie.

L'ensemble de ces résultats confirme l'implication de SOD2 dans les mécanismes physiopathologiques de l'hypertrophie cardiaque et du RVG post-IDM, ainsi que l'importance des modifications post-traductionnelles, et plus particulièrement de l'acétylation, dans la régulation de l'activité de SOD2. La protéine SOD2 ainsi que de ses régulateurs SIRT3 et P300 constituent donc des cibles de choix dans la prise en charge du stress oxydant et de l'hypertrophie cardiaque. C'est pourquoi ma seconde partie sera centrée sur l'impact de deux traitements anti-oxydants, le EUK 134, mimétique de l'activité SOD, ainsi que la MitoQuinone (MitoQ), un anti-oxydant mitochondrial, dans le cœur.

***Partie 2 : Etude de l'impact des traitements anti-  
oxydants EUK 134 et MitoQuinone dans le cœur***





## I) Données préliminaires

Le stress oxydant est impliqué dans le processus physiopathologique de nombreuses maladies cardiovasculaires dont l'IDM et l'IC. Il est ainsi particulièrement observé au moment de l'IDM ainsi que dans la phase dite tardive RVG, menant à l'IC. L'utilisation des anti-oxydants constitue donc une perspective thérapeutique intéressante dans la prise en charge de ces pathologies. J'ai montré précédemment que l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par traitement à l'isoprénaline est associée à un stress oxydant mitochondrial qui s'explique notamment par l'inactivation de la protéine SOD2. Le stress oxydant mitochondrial et l'activité SOD semblent donc constituer des cibles intéressantes dans le développement de stratégies anti-oxydantes.

Dans ce but, j'ai étudié l'impact de deux traitements anti-oxydants sur le cœur : la MitoQuinone (MitoQ), un anti-oxydant ciblant spécifiquement le stress oxydant mitochondrial, ainsi que le EUK 134, un anti-oxydant intracellulaire global, mimétique des protéines SOD. Dans un premier temps, j'ai caractérisé l'impact de ces deux traitements anti-oxydants sur le stress oxydant et l'hypertrophie cardiaque. J'ai ensuite cherché à comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans les effets protecteurs et/ou délétères de ces traitements.

## II) Résultats

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (soumise) en annexe : Peugnet *et al.*, 2021.

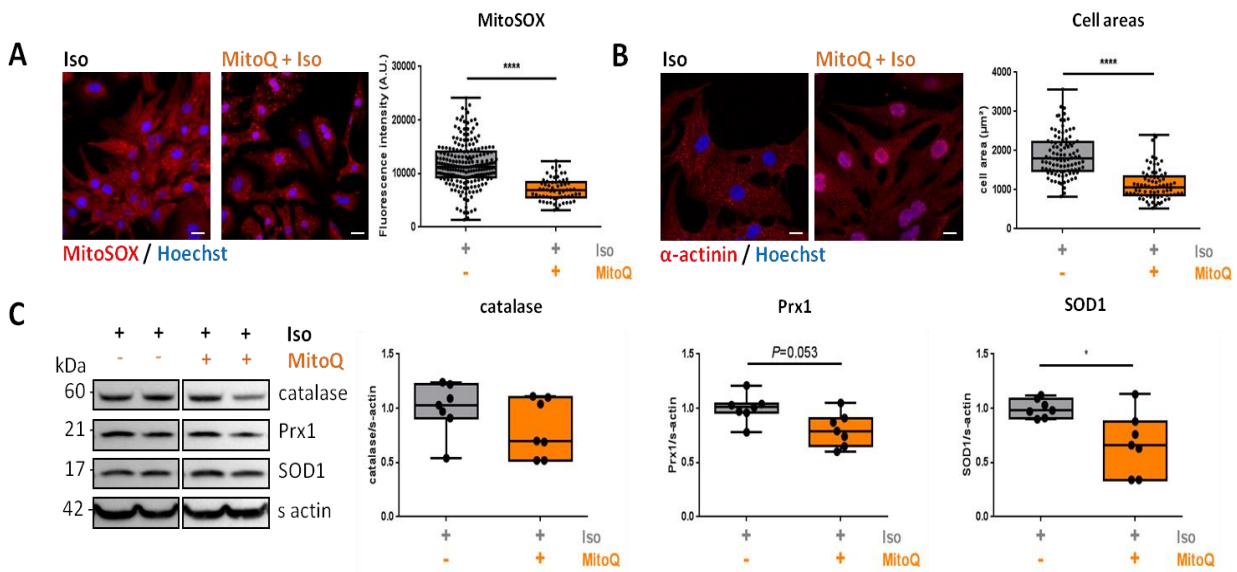
### 1) Etude de l'impact du traitement anti-oxydant MitoQ dans le cœur.

Dérivé de l'ubiquinone, la MitoQ constitue une molécule anti-oxydante adressée spécifiquement à la mitochondrie par son motif TPP s'accumulant à la membrane mitochondriale. Afin de contrer le stress oxydant mitochondrial induit par l'isoprénaline et les effets délétères qui y sont associés dans les NCM, la MitoQ a été utilisée en prétraitement à la concentration de 1  $\mu\text{M}$  pendant 2h avant le traitement à l'isoprénaline afin d'étudier l'impact de la MitoQ sur le stress oxydant, l'hypertrophie et la signalisation intracellulaire.

#### *1.1) Impact du prétraitement à la MitoQ sur le stress oxydant dans les NCM traitées à l'isoprénaline.*

Dans un premier temps, l'efficacité du prétraitement à la MitoQ a été confirmée par quantification du taux d'anions superoxyde mitochondriaux après marquage par la sonde MitoSOX en fluorescence. J'ai observé une diminution significative de la production d'anions superoxydes mitochondriaux associée au prétraitement à la MitoQ dans les NCM traités à l'isoprénaline (Figure 97A), confirmant l'action anti-oxydante de la MitoQ dans les NCM.

J'ai ensuite quantifié l'aire des NCM après marquage de l'alpha actinine en immunofluorescence. J'ai observé une diminution significative de l'aire cellulaire lorsque les NCM sont prétraités à la MitoQ avant d'être traités à l'isoprénaline (Figure 97B) par comparaison aux NCM traités à l'isoprénaline uniquement. Ces résultats suggèrent un effet protecteur du prétraitement à la MitoQ sur le stress oxydant et l'hypertrophie induite par l'isoprénaline.

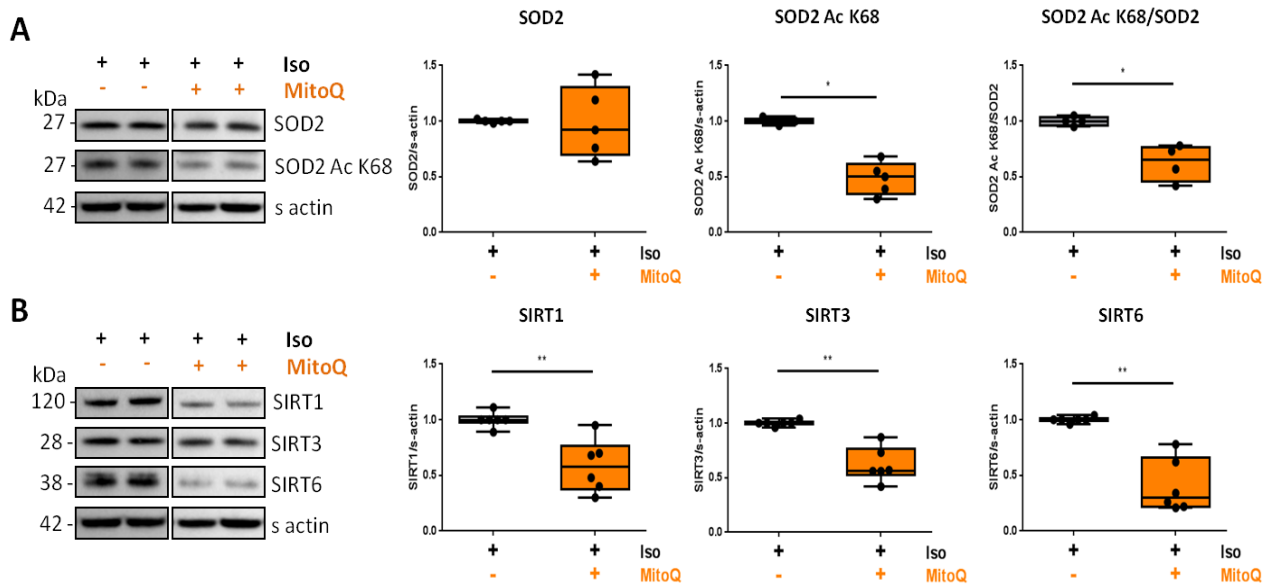


**Figure 97** : Impact du prétraitement à la MitoQ sur le stress oxydant et l’aire cellulaire dans les NCM traités à l’isoprénaline.

Quantifications par fluorescence du taux d’anions superoxydes mitochondriaux (A)(n=3, 61 cellules quantifiées au minimum) après marquage par la sonde MitoSOX (rouge) et du noyau (bleu) ainsi que de l’aire cellulaire (B) (n=3, 75 cellules quantifiées au minimum) après marquage de l’alpha actinine (rouge) et du noyau (bleu) dans les NCM prétraités ou non à la MitoQ (1  $\mu\text{M}$ , 2h) puis traités à l’isoprénaline (Iso) (10  $\mu\text{M}$ , 24h) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Student, \*\*\*\*P<0.0001) (échelle = 10  $\mu\text{m}$ ). Image et quantification de l’expression des enzymes anti-oxydantes catalase (C), Prx1 (C) et SOD1 (C) par western blot dans les NCM prétraités ou non à la MitoQ (1 $\mu\text{M}$ , 2h) puis traités à l’Iso (10  $\mu\text{M}$ , 24h) (n=3, duplicats ou triplicats, médiane  $\pm$  interquartiles, test de Mann-Whitney, \*P<0.05).

Afin de mieux caractériser le stress oxydant, j’ai ensuite quantifié l’expression des principales enzymes anti-oxydantes dans ce modèle. Je n’ai pas observé de modulation significative de l’expression de la catalase (Figure 97C). Cependant, j’ai montré une tendance à la diminution de l’expression de Prx1 (Figure 97C) ainsi qu’une diminution significative de l’expression de SOD1 (Figure 97C) dans ce modèle. Par ailleurs, j’ai quantifié l’expression de SOD2 et de sa forme acétylée en Lys 68 et j’ai montré que le prétraitement à la MitoQ est associé à une diminution significative de l’expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68 (Figure 98A), sans modulation de l’expression des formes totales de SOD2 (Figure 98A), entraînant une diminution du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (Figure 98A) dans les NCM traités à l’isoprénaline.

Ces résultats suggèrent une activation de SOD2, associée à une diminution des enzymes anti-oxydantes cytosoliques, avec le prétraitement à la MitoQ qui pourrait participer à la détoxification des anions superoxydes mitochondriaux.



**Figure 98** : Impact du prétraitement à la MitoQ sur la régulation de l’expression de SOD2 dans les NCM traités à l’isoprénaline.

Western blot et quantifications de l’expression de SOD2, de sa forme acétylée en lysine 68 (SOD2 Ac K68) et du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (A) (n=3, duplicats) ainsi que de l’expression des SIRT1, 3 et 6 (B) (n=3, duplicats) dans les NCM prétraités ou non à la MitoQ (1  $\mu$ M, 2h) puis traités à l’isoprénaline (Iso) (10  $\mu$ M, 24h) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Mann-Whitney, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01).

J’ai ensuite quantifié l’expression des désacétylases SIRT et j’ai montré de manière surprenante que le prétraitement à la MitoQ est associé à une diminution significative de l’expression des SIRT1, 3 et 6 dans les NCM traités à l’isoprénaline (Figure 98B). Or nous savons que les protéines SIRT sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires en dehors de la désacétylation des protéines. Particulièrement, de par sa localisation mitochondriale, la protéine SIRT3 est impliquée dans la régulation du métabolisme mitochondrial, le maintien de la balance redox ainsi que dans les mécanismes de biogenèse mitochondriale et de la mitophagie. La diminution de l’expression des SIRT3, contradictoire avec la diminution de l’expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68, pourrait refléter un effet délétère du prétraitement à la MitoQ sur la fonction mitochondriale.

Par la suite, je me suis donc intéressée de manière plus globale à l'impact du prétraitement à la MitoQ sur la fonction cellulaire et plus particulièrement sur le métabolisme mitochondrial.

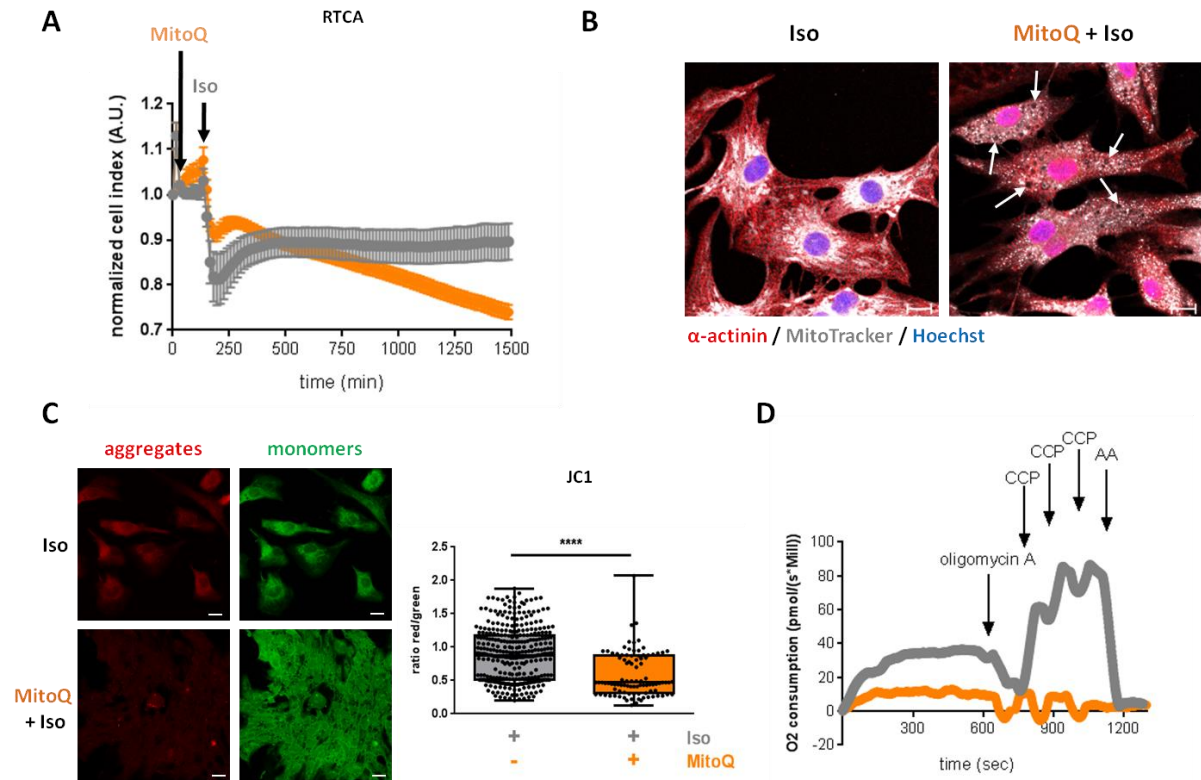
### ***1.2) Impact du prétraitement à la MitoQ sur le métabolisme mitochondrial dans les NCM traités à l'isoprénaline.***

J'ai d'abord comparé les profils RTCA des NCM traités à l'isoprénaline, avec ou sans prétraitement à la MitoQ et j'ai observé une augmentation progressive de l'index cellulaire lors du prétraitement à la MitoQ par comparaison aux cellules contrôles pour lesquelles l'index cellulaire reste stable (Figure 99A). Le traitement à l'isoprénaline des cellules, prétraitées ou non à la MitoQ, entraîne ensuite une chute de l'index cellulaire. Ce dernier remonte progressivement pour atteindre un plateau au bout de 6h pour les NCM non prétraités. En revanche, l'index cellulaire continue de baisser progressivement et de manière constante lorsque les NCM ont été prétraités à la MitoQ, pour devenir inférieur à l'index cellulaire des cellules non prétraités à la MitoQ après 8h de traitement à l'isoprénaline (Figure 99A). Ces résultats suggèrent un impact du prétraitement à la MitoQ sur l'adhésion, la prolifération, la morphologie ou la mortalité des NCM.

J'ai donc visualisé la morphologie cellulaire ainsi que le réseau mitochondrial par marquage respectivement de l'alpha-actinine et des mitochondries par le *MitoTracker Deep Red* en fluorescence. J'ai ainsi observé que le prétraitement à la MitoQ est associé à une destructuration du cytosquelette (marquage de l'alpha-actinine) dans les NCM traités à l'isoprénaline ainsi qu'à la formation de cavités au sein du cytosquelette (désignées par les flèches sur la Figure 99B). Cette destructuration du cytosquelette est associée à une perturbation de l'organisation des mitochondries dans les cellules. Tandis que ces dernières forment un réseau dense et regroupé plus particulièrement autour du noyau dans les NCM traités à l'isoprénaline, elles apparaissent totalement désordonnées et dispersées dans les cellules sous la forme de points en IF (Figure 99B). Ces résultats indiquent un effet délétère du prétraitement à la MitoQ sur les mitochondries dans les NCM traités à l'isoprénaline.

Afin de mieux comprendre l'impact de la MitoQ sur les mitochondries, j'ai quantifié le potentiel membranaire mitochondrial à l'aide de la sonde JC1 en fluorescence. J'ai observé une diminution significative du ratio rouge/vert avec le prétraitement à la MitoQ dans les NCM traités à l'isoprénaline par comparaison aux cellules qui n'ont pas été prétraitées (Figure 99C).

Ces résultats indiquent que le prétraitement à la MitoQ est associé à une dépolarisation mitochondriale. De façon complémentaire, la respiration mitochondriale a été mesurée dans ce modèle par utilisation de la technique d'oxygraphie qui m'a permis de montrer une diminution significative de la consommation en oxygène et de la respiration mitochondriale associée au prétraitement à la MitoQ dans les NCM traités à l'isoprénaline (Figure 99D).

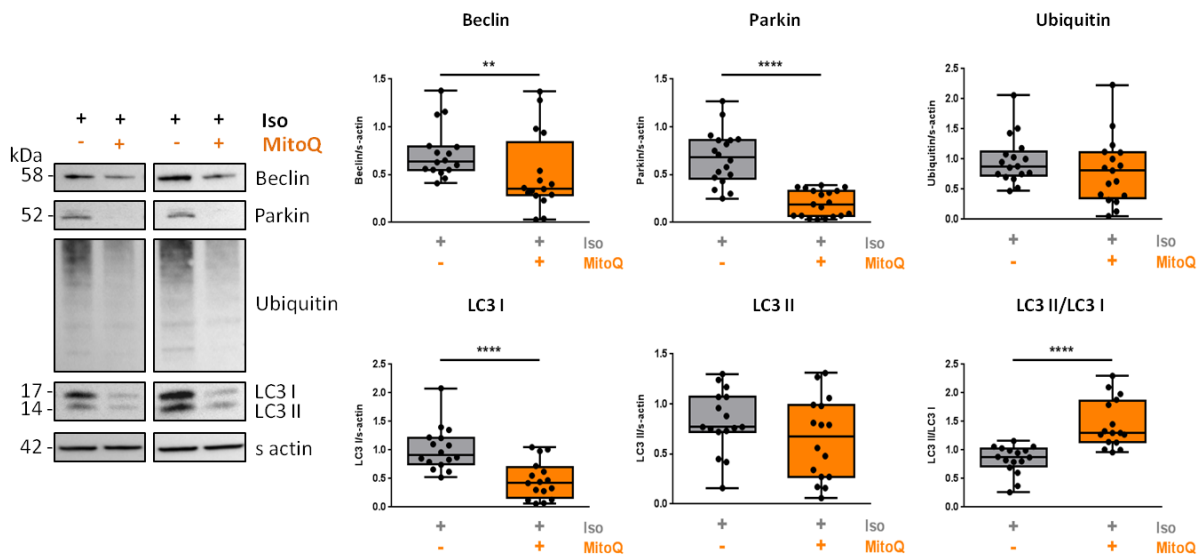


**Figure 99** : Impact du prétraitement à la MitoQ sur le comportement cellulaire et le métabolisme mitochondrial des NCM traités à l'isoprénaline.

Quantification de l'index cellulaire (A) des NCM traités à l'isoprénaline (Iso) avec ou sans prétraitement à la mitoQ par utilisation de la technique RTCA. Visualisation de la morphologie cellulaire et du réseau mitochondriale en fluorescence (B) après marquage de l'alpha actinine (rouge), des mitochondries (MitoTracker) (gris) et du noyau (bleu). Utilisation de la sonde JC1 en fluorescence pour quantifier le potentiel membranaire mitochondrial (C) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Student, \*\*\*\* $P < 0.0001$ ) (échelle = 10  $\mu$ m). Etude de la respiration mitochondriale et quantification de la consommation en O<sub>2</sub> (D) par utilisation de la technique d'oxygraphie dans les NCM prétraités ou non à la MitoQ (1  $\mu$ M, 2h) puis traités à l'Iso (10  $\mu$ M, 24h).

L'ensemble de ces résultats confirme l'effet délétère du prétraitement à la MitoQ sur le métabolisme mitochondrial dans les NCM traités à l'isoprénaline. Il est à noter que des résultats similaires sont retrouvés sur les NCM qui ont été traités uniquement à la MitoQ, indépendamment du traitement à l'isoprénaline (données non montrées). Le traitement à la MitoQ entraîne donc une perte de fonction des mitochondries dans les NCM.

L'élimination des mitochondries non fonctionnelles ou en surplus est habituellement réalisée par la voie de l'autophagie/mitophagie. Afin de savoir si le prétraitement à la MitoQ impactait cette voie, j'ai quantifié l'expression des protéines impliquées dans ces processus. J'ai ainsi observé une diminution significative de l'expression de la protéine Beclin et de la protéine Parkin sans modulation significative du taux de protéines ubiquitinylées (Figure 100).



**Figure 100** : Impact du prétraitement à la MitoQ sur l'autophagie/la mitophagie dans les NCM traités à l'isoprénaline.

Western Blot et quantification de l'expression des protéines Beclin, Parkin, ubiquitine, LC3 I, LC3 II (n=3) ainsi que du ratio LC3 I / LC3 II dans les NCM traités à l'isoprénaline (Iso) (10 μM, 24h) et prétraités ou non à la MitoQ (1 μM, 2h) (n=6, duplicats ou triplicats, médiane ± interquartiles, test de Mann Whitney, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

J'ai également quantifié l'expression de la protéine LC3 dans ce modèle et j'ai observé une diminution significative de l'expression de LC3I, sans modulation de l'expression de la protéine LC3II, conduisant à une augmentation du ratio LC3II/LC3I (Figure 100) associée au prétraitement à la MitoQ dans les NCM traités à l'isoprénaline.

L'ensemble de ces résultats montrent que bien qu'étant protecteur face au stress oxydant induit par l'isoprénaline, le prétraitement à la MitoQ est associé à un défaut d'autophagie/mitophagie, empêchant l'élimination de mitochondries dysfonctionnelles des cellules. Face aux effets délétères de cet anti-oxydant et l'implication de SOD2 dans la régulation du stress oxydant, je me suis intéressée à une seconde molécule anti-oxydante, le EUK 134 (mimétique des SOD) sur les NCM traités à l'isoprénaline.



## 2) Etude de l'impact du traitement anti-oxydant EUK 134 dans le cœur.

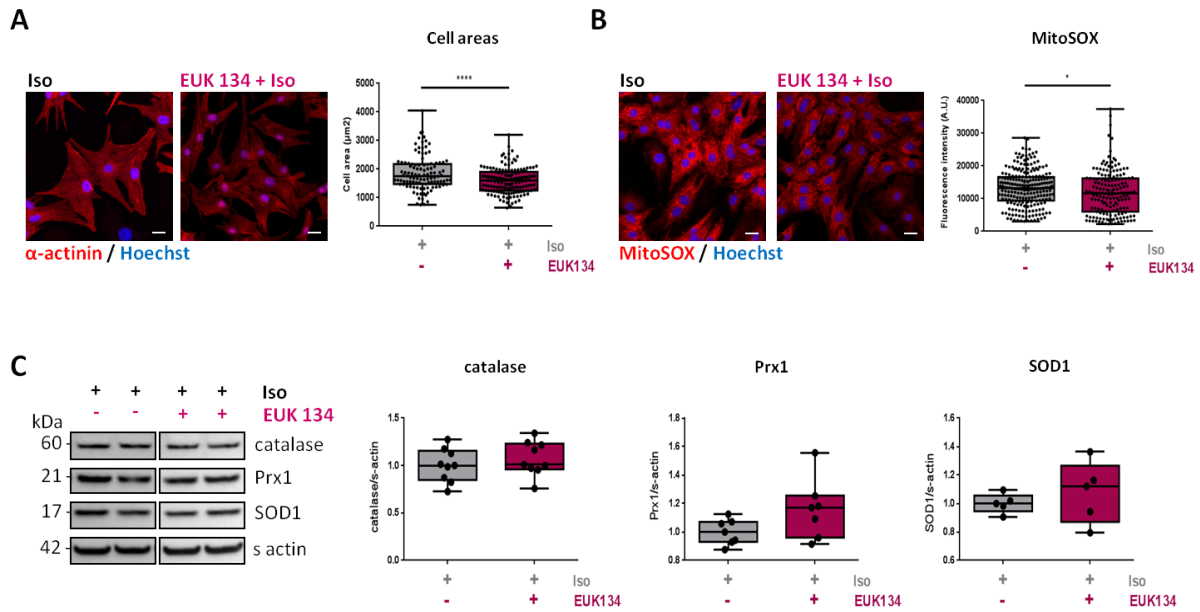
J'ai précédemment montré qu'un défaut d'activité de la protéine SOD2 dans le cœur est associé à une production excessive d'anions superoxydes mitochondriaux et au développement d'un stress oxydant dans le cœur. De plus, j'ai montré une diminution de l'expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68 inactive participant aux effets anti-oxydants de la MitoQ. Ma seconde stratégie consistait donc à utiliser la molécule EUK 134, un anti-oxydant mimant l'activité des isoformes intracellulaires des SOD, et à étudier son impact dans le cœur.

### *2.1) Etude des effets préventifs du EUK 134 dans les NCM.*

#### **2.1.1) Impact du prétraitement au EUK 134 sur le stress oxydant dans les NCM traités à l'isoprénaline.**

En accord avec les données observées dans la littérature, j'ai d'abord utilisé le EUK 134 en pré-traitement à la concentration de 10  $\mu$ M pendant 1h dans les NCM avant le traitement à l'isoprénaline, afin de bloquer le stress oxydant. J'ai confirmé l'efficacité du prétraitement au EUK 134 en quantifiant une diminution significative du taux d'anions superoxydes mitochondriaux dans les NCM traités à l'isoprénaline et prétraité au EUK 134 (Figure 101B). Ces résultats confirment l'activité anti-oxydante du EUK 134 dans les NCM.

Par la suite, j'ai étudié l'impact du EUK 134 sur l'hypertrophie cellulaire et montré une diminution significative de l'aire cellulaire lorsque les NCM sont prétraités au EUK 134 par comparaison aux NCM traités à l'isoprénaline uniquement (Figure 101A). Ces résultats suggèrent un effet protecteur du prétraitement aux EUK 134 sur l'hypertrophie induite par l'isoprénaline dans les NCM.

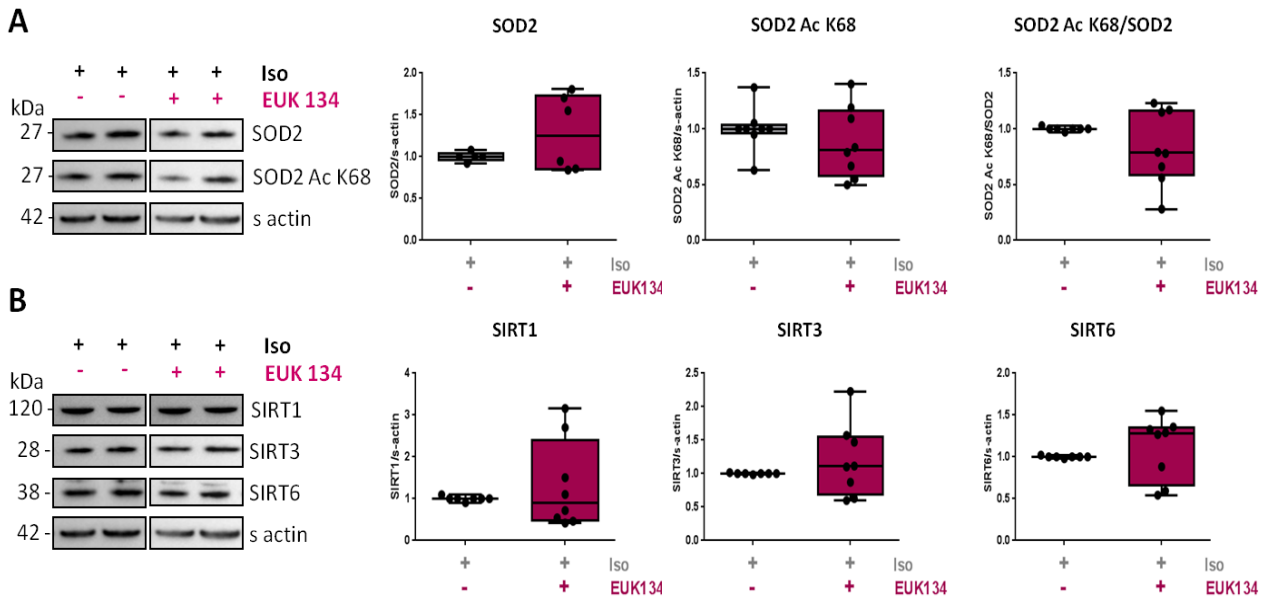


**Figure 101** : Caractérisation de l’aire cellulaire et du stress oxydant dans les NCM prétraités au EUK 134 puis à l’isoprénaline.

Quantification par fluorescence de l’aire cellulaire (A) (n=4, au moins 110 cellules quantifiées) après marquage de l’alpha actinine (rouge) et du noyau (bleu) ainsi que de la production d’anions superoxydes mitochondriaux (B) (n=3, au moins 169 cellules quantifiées) après marquage par le MitoSOX (rouge) et le noyau (bleu) dans les NCM prétraités au EUK 134 (10 µM, 1h) (contrôle : DMSO) puis traités à l’isoprénaline (Iso) (10 µM, 24) (contrôle : PBS) par comparaison aux NCM traités à l’Iso uniquement (échelle = 20 µm) (médiane ± interquartiles, test de Student, \* $P < 0.05$  ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Quantification par western blot de l’expression des protéines catalase, Prx1 et SOD1 (C) (n=3, duplicats ou triplicats) dans les NCM traités à l’Iso et prétraités ou non au EUK 134 et traités à l’Iso (médiane ± interquartiles, test de Mann-Whitney).

Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux effets protecteurs du prétraitement au EUK 134, j’ai également quantifié l’expression des principales enzymes anti-oxydantes dans ce modèle. Je n’ai pas observé de modulation significative de l’expression de la catalase (Figure 101C), de Prx1 (Figure 101C) et de SOD1 (Figure 101C) dans les NCM prétraités au EUK 134 puis traités à l’isoprénaline pendant 24h, par comparaison aux cellules traitées à l’isoprénaline uniquement. Ces résultats suggèrent que le EUK 134 ne module pas l’expression des enzymes anti-oxydantes catalase, Prx1 et SOD1 dans les NCM.

De plus, l’expression de SOD2 (Figure 102A), de sa forme acétylée en Lys 68 (Figure 102A) ainsi que le ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (Figure 102A) n’est pas modulé dans les NCM prétraités au EUK 134 par comparaison aux NCM qui n’ont pas été prétraités par l’anti-oxydant.



**Figure 102** : Impact du prétraitement au EUK 134 sur l’expression de SOD2 et des SIRT1, 3 et 6 dans les NCM traités à l’isoprénaline.

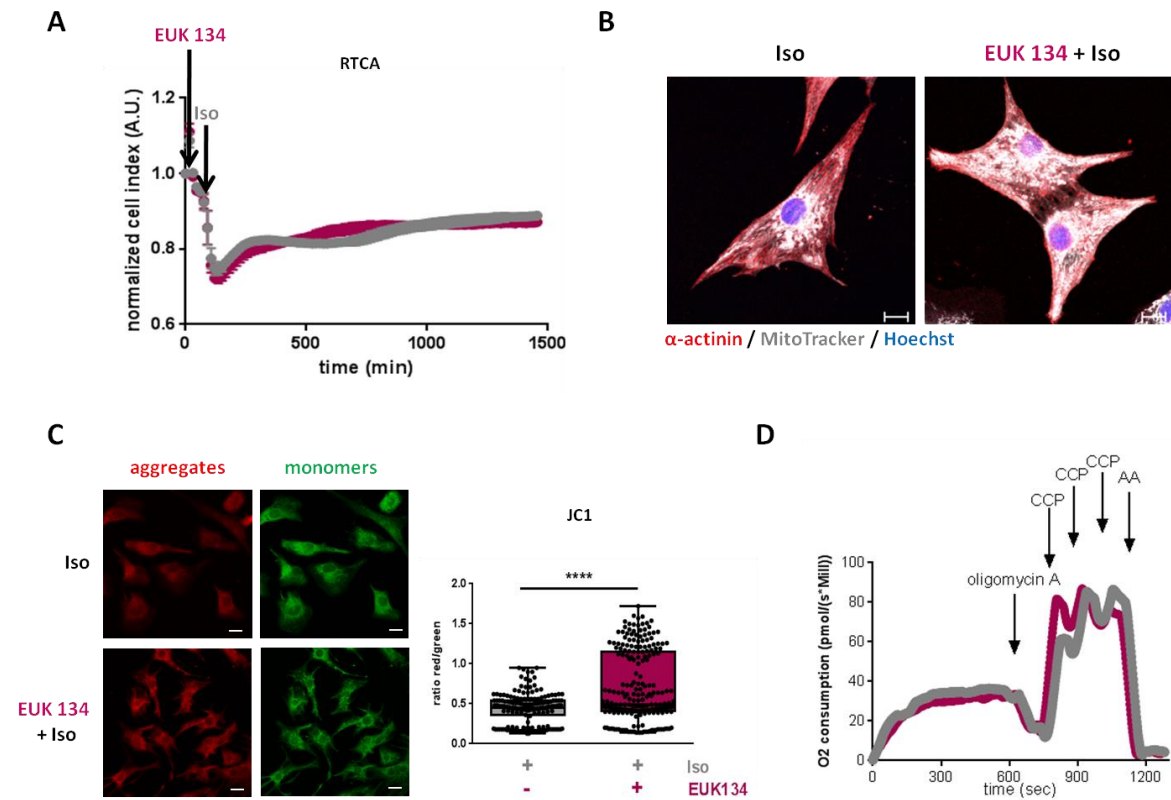
Western Blot et quantification de l’expression de SOD2 (A) (n=3), de sa forme acétylée en lysine 68 (SOD2 Ac K68) (A) (n=3) et du ratio SOD2 Ac K68/SOD2 (A) (n=3) ainsi que de l’expression des SIRT1 (B) (n=3), 3 (B) (n=3) et 6 (B) (n=3) dans les NCM prétraitées ou non au EUK 134 (10 µM, 1h) et traitées à l’isoprénaline (Iso) (10 µM, 24h) (médiane ± interquartiles, test de Mann-Whitney).

De plus, je n’ai pas observé de modulation significative de l’expression des SIRT1, 3 et 6 dans ce modèle (Figure 102B). L’effet protecteur du prétraitement au EUK 134 ne semble donc pas impacter l’activité de SOD2 dans les NCM traités à l’isoprénaline.

J’ai donc montré que mimer l’activité SOD par le prétraitement au EUK 134 permet de prévenir l’hypertrophie et le stress oxydant induit par l’isoprénaline dans les NCM.

### 2.2.2) Impact du prétraitement au EUK 134 sur le métabolisme mitochondrial dans les NCM traités à l’isoprénaline.

Dans un premier temps, j’ai analysé l’impact du prétraitement au EUK 134 sur les NCM traités à l’isoprénaline par utilisation de la technique RTCA. J’ai observé un profil similaire pour les NCM prétraités ou non au EUK 134 (Figure 104A).



**Figure 103** : Impact du prétraitement au EUK 134 sur la morphologie cellulaire et sur le métabolisme mitochondrial des NCM traités à l’isoprénaline.

Quantification du cell index (A) des NCM traités à l’isoprénaline (Iso) (10  $\mu$ M, 24h) et prétraités ou non au EUK 134 (10  $\mu$ M, 1h) par utilisation de la technique RTCA. Visualisation de la morphologie cellulaire et du réseau mitochondrial (B) après marquage de l’alpha actinine (rouge), des mitochondries (gris) et du noyau (bleu) dans les NCM prétraités ou non au EUK 134 (10  $\mu$ M, 1h) puis traités à l’Iso (10  $\mu$ M, 24h) en fluorescence (échelle = 10  $\mu$ m). Utilisation de la sonde JC1 en fluorescence pour quantifier le potentiel membranaire mitochondrial (C) dans les NCM prétraités ou non au EUK 134 (1  $\mu$ M, 1h) et traités à l’Iso (10  $\mu$ M, 24h) (n=3, au moins 198 cellules quantifiées, médiane  $\pm$  interquartiles, test de Student, \*\*\*\* $P$ <0.0001) (échelle = 20  $\mu$ m). Mesure de la respiration mitochondriale et quantification de la consommation en dioxygène (D) dans les NCM prétraités au EUK 134 (10  $\mu$ M, 1h) ou non puis traités à l’Iso (10  $\mu$ M, 24h).

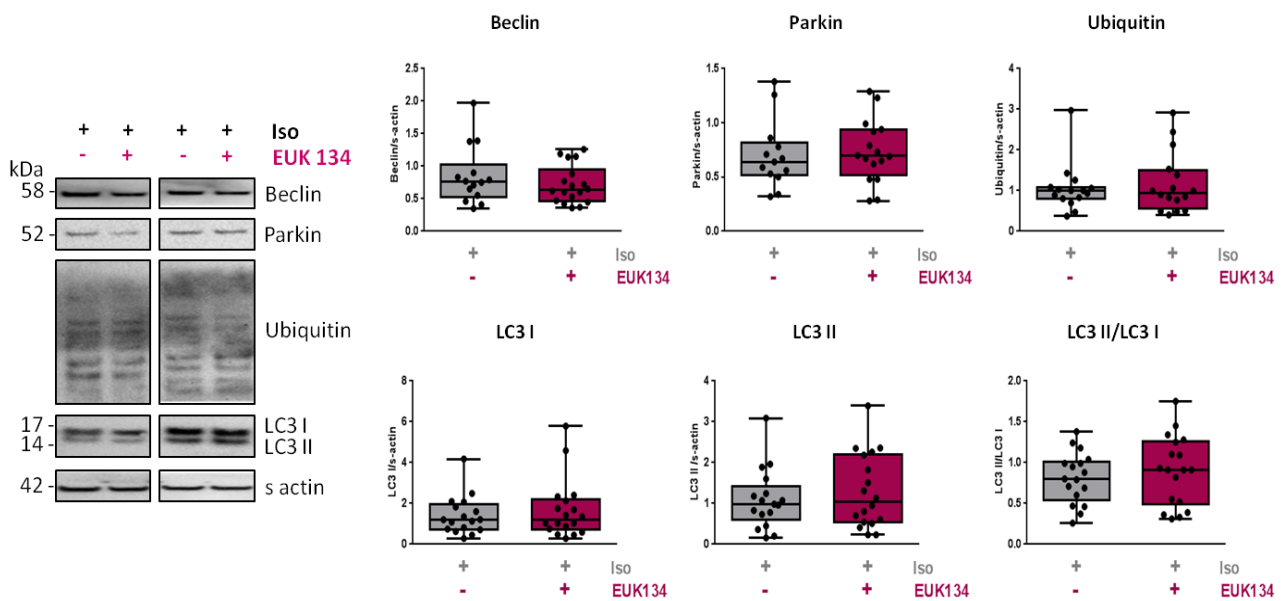
De façon complémentaire, j’ai étudié la morphologie cellulaire ainsi que l’organisation du réseau mitochondrial dans les NCM prétraités ou non au EUK 134. Je n’ai pas observé d’impact du EUK 134 sur la morphologie cellulaire, l’organisation du cytosquelette ou encore l’organisation du réseau de mitochondries dans les NCM (Figure 103B), suggérant que le prétraitement au EUK 134 n’entraîne pas d’effets délétères sur la morphologie des cardiomyocytes.

J’ai précédemment montré que le traitement à l’isoprénaline était associé à des dysfonctions mitochondriales, caractérisées notamment par des modifications de la structure et

de la morphologie des mitochondries ainsi que par une diminution du potentiel membranaire mitochondrial. J'ai montré que le prétraitement au EUK 134 est associé à une augmentation significative du potentiel membranaire mitochondrial dans les NCM traités à l'isoprénaline (Figure 103C).

J'ai également évalué la respiration mitochondriale par la technique d'oxygraphie dans ce modèle et je n'ai pas observé de modulation de la consommation en dioxygène des NCM prétraités au EUK 134 puis traités à l'isoprénaline par comparaison aux cellules qui n'ont pas été prétraitées au EUK 134 (Figure 103D).

Similairement au prétraitement à la MitoQ, je me suis ensuite intéressée à l'impact du prétraitement au EUK 134 sur l'autophagie/mitophagie dans les NCM traités à l'isoprénaline. Je n'ai pas observé de modulation significative de l'expression de Beclin, Parkin, l'ubiquitine ou encore LC3 dans les NCM prétraités au EUK 134 puis traités à l'isoprénaline par comparaison aux NCM traités à l'isoprénaline uniquement (Figure 104). Ce processus ne semble donc pas être impacté par le prétraitement au EUK 134.



**Figure 104** : Impact du prétraitement au EUK 134 sur les processus d'autophagie et de mitophagie dans les NCM traités à l'isoprénaline.

Western blot et quantification de l'expression de Beclin, Parkin, ubiquitine, LC3 I, LC3 II ainsi que du ratio LC3 I/LC3 II dans les NCM prétraités ou non au EUK 134 (10  $\mu$ M, 1h) et traités à l'isoprénaline (Iso) (10  $\mu$ M, 24h) (n=6, duplicats ou triplicats, médiane  $\pm$  interquartiles, test de Mann Whitney).

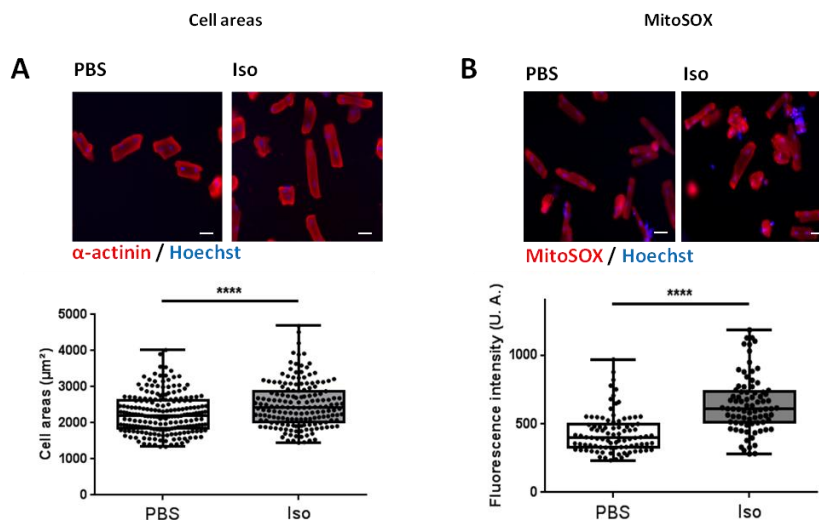
Les effets protecteurs du EUK 134 semblent donc être associés à l'amélioration de la fonction mitochondriale et au maintien de la mitophagie dans les NCM traités à l'isoprénaline.

Par la suite, j'ai étudié l'impact de ce traitement sur le modèle plus complexe de cardiomyocytes isolés de rats adultes (ACM), plus pertinent physiologiquement car présentant un métabolisme basé sur l'oxydation des acides gras contrairement aux NCM présentant un métabolisme basé sur la glycolyse.

## 2.2) Etude des effets préventifs du EUK 134 dans les ACM.

Ayant obtenue une bourse de mobilité internationale auprès de l'I-SITE ULNE, je me suis rendue dans le laboratoire du Pr Luc Bertrand à Bruxelles où j'ai été formée à l'isolement des ACM, afin de mettre au point les conditions d'hypertrophie dans ce modèle pour étudier l'impact du prétraitement au EUK 134.

Dans ce but, j'ai testé différentes concentrations d'isoprénaline afin d'induire une hypertrophie des ACM et j'ai ainsi observé une augmentation significative de l'aire des ACM lorsque les cellules sont traitées à l'isoprénaline à la concentration de 50  $\mu\text{M}$  pendant 48h (Figure 105A), confirmant l'induction de l'hypertrophie dans ces conditions.

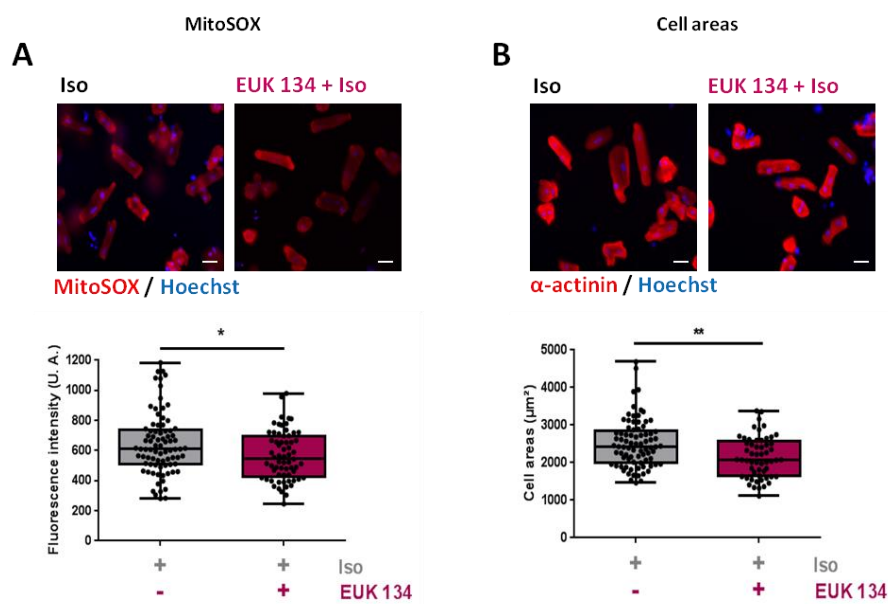


**Figure 105:** Caractérisation de l'hypertrophie et du stress oxydant dans les ACM traités à l'isoprénaline.

Quantification de l'aire cellulaire (A) ( $n=3$ , 82 cellules quantifiées au minimum) après marquage de l'alpha actinine (rouge) et du noyau (bleu) en fluorescence et du taux d'anions superoxydes mitochondriaux (B) ( $n=3$ , 82 cellules quantifiées au minimum) après marquage par la sonde MitoSOX (rouge) et du noyau (bleu) dans les ACM traités à l'isoprénaline (Iso) (50  $\mu\text{M}$ , 48h) par comparaison aux cellules contrôles (PBS) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Student, \*\*\*\* $P<0.0001$ ) (échelle = 10  $\mu\text{m}$ ).

J'ai ensuite quantifié une augmentation significative du taux d'anions superoxydes mitochondriaux dans les ACM traités à l'isoprénaline par comparaison aux cellules contrôles (Figure 105B). Ces résultats confirment dans cet autre modèle *in vitro* d'ACM l'induction d'un stress oxydant associé à l'hypertrophie cellulaire. Ces conditions m'ont donc permis d'étudier le potentiel anti-oxydant et anti-hypertrophique du EUK 134 dans les ACM.

J'ai montré que le prétraitement au EUK 134 est associé à une diminution de la production des anions superoxydes mitochondriaux dans les ACM traités à l'isoprénaline (Figure 106A) par comparaison aux ACM traités à l'isoprénaline uniquement. Ces résultats confirment l'efficacité du prétraitement anti-oxydant EUK 134 dans les ACM.



**Figure 106** : Caractérisation du stress oxydant et de l'hypertrophie dans les ACM prétraités au EUK 134.

Quantifications par fluorescence du taux d'anions superoxydes mitochondriaux (A) (n=2, 56 cellules quantifiées au minimum) après marquage par la sonde MitoSOX (rouge) et du noyau (bleu) ainsi que de l'aire cellulaire (B) (n=2, 65 cellules quantifiées au minimum) après marquage de l'alpha actinine (rouge) et du noyau (bleu) dans les ACM prétraités ou non au EUK 134 (50  $\mu\text{M}$ , 1h)(contrôle : DMSO) puis à l'isoprénaline (Iso) (50  $\mu\text{M}$ , 48h) (médiane  $\pm$  interquartiles, test de Student, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01).

Par ailleurs, j'ai étudié l'impact du prétraitement au EUK 134 sur l'hypertrophie et j'ai observé une diminution significative de l'aire des ACM prétraités aux EUK 134 puis traités à l'isoprénaline par comparaison aux cellules traitées à l'isoprénaline uniquement (Figure 106B). Ces résultats confirment l'effet protecteur du EUK 134 sur l'hypertrophie induite par l'isoprénaline dans les ACM.



L'ensemble de ces résultats m'a permis de montrer l'effet protecteur et préventif du EUK 134 dans les NCM et les ACM sur le stress oxydant et l'hypertrophie, confirmant ainsi l'efficacité du ciblage du stress oxydant dans la prise en charge de l'hypertrophie. Cependant, dans une visée thérapeutique, il serait intéressant d'étudier l'effet du EUK 134 en post-traitement. Dans ce but, j'ai initié l'étude de l'impact du post-traitement au EUK 134 sur l'hypertrophie et le stress oxydant dans les NCM traités à l'isoprénaline.

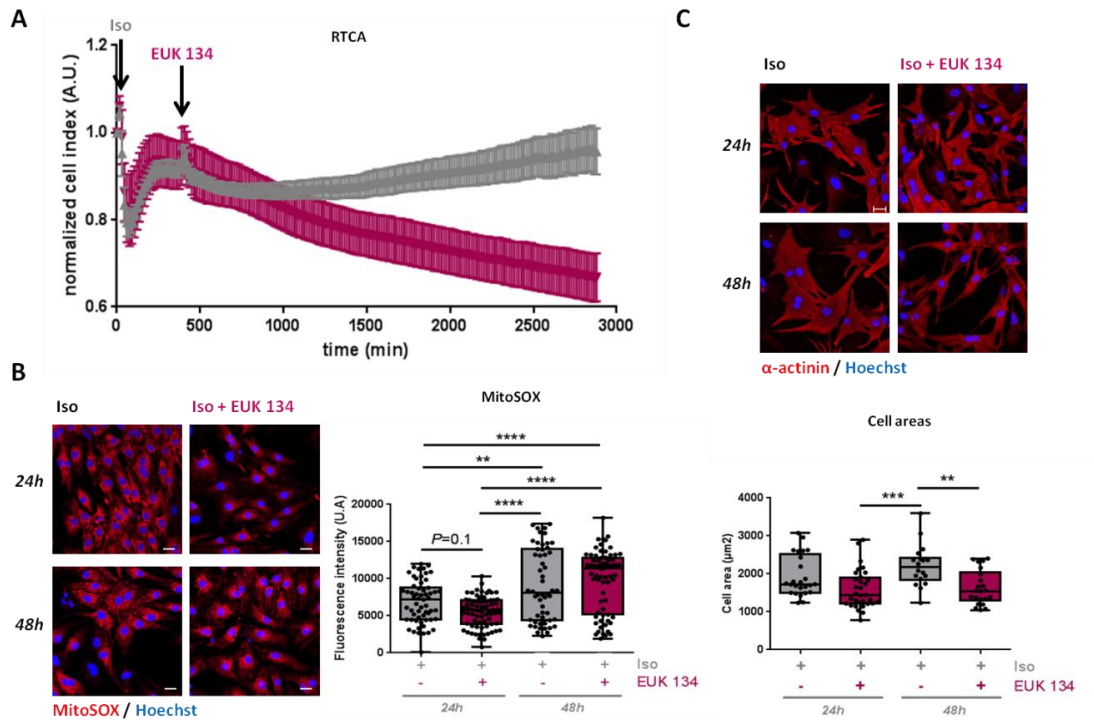
### ***2.3) Etude des effets thérapeutiques du EUK 134 dans les NCM.***

Face au potentiel anti-oxydant et anti-hypertrophique du EUK 134 et en l'absence d'effets délétères sur la morphologie cellulaire et le métabolisme mitochondrial, l'utilisation du EUK 134 pourrait constituer une perspective thérapeutique intéressante dans la prise en charge du stress oxydant associé à l'hypertrophie cardiaque. Dans ce contexte, j'ai utilisé le EUK 134 en post-traitement dans les NCM, 6h après le traitement à l'isoprénaline.

Dans un premier temps, j'ai étudié le comportement cellulaire des NCM post-traités au EUK 134 par utilisation de la technique RTCA et j'ai observé une diminution constante et progressive de l'index cellulaire lorsque les NCM sont traités au EUK 134 après 6h de traitement à l'isoprénaline (Figure 107A). Ces résultats montrent un impact du EUK 134 utilisé en post-traitement sur l'adhésion, la prolifération et la morphologie cellulaire. Ils suggèrent également un impact différent du EUK 134 selon son mode d'utilisation, en prétraitement (Figure 103A) ou en post-traitement (Figure 107A).

Dans un second temps, j'ai quantifié le stress oxydant et l'aire cellulaire des NCM traités à l'isoprénaline puis traités ou non au EUK 134 en fluorescence. Les premiers résultats obtenus indiquent que le post-traitement au EUK 134 pourrait être associé à une diminution du stress oxydant, caractérisé par la production d'anions superoxydes mitochondriaux, après 24h de traitement à l'isoprénaline uniquement mais plus après 48h (Figure 107B). De plus, le post-traitement au EUK 134 pourrait être associé à une diminution de l'aire cellulaire après 24h et 48h de traitement à l'isoprénaline (Figure 107C) par comparaison aux NCM traités à l'isoprénaline uniquement. L'ensemble de ces données suggérerait donc des effets bénéfiques mais transitoires du post-traitement au EUK 134 sur les cardiomyocytes traités à l'isoprénaline.





**Figure 107** : Impact du EUK 1344 utilisé en post-traitement sur les NCM traités à l’isoprénaline.

Quantification de l’index cellulaire (A) des NCM traités à l’isoprénaline (Iso) (24h et 48h, 10  $\mu$ M) et post-traités au EUK 134 (10  $\mu$ M ; 6h après traitement à l’Iso) par utilisation de la technique RTCA. Quantification du taux d’anions superoxydes mitochondriaux (B) (n=2, 46 cellules quantifiées au minimum) après utilisation de la sonde MitoSOX (rouge) et de l’aire cellulaire (C) (n=1, 18 cellules quantifiées au minimum) après marquage de l’alpha actinine (rouge) et du noyau (bleu) en fluorescence (échelle = 10  $\mu$ m) (médiane  $\pm$  interquartiles, test Anova,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ,  $****P<0.0001$ ).

### 2.4) Etude de l’impact du traitement au EUK 134 chez les rats IC.

De façon complémentaire, j’ai souhaité confirmer le potentiel thérapeutique du EUK 134 *in vivo* dans le modèle de rats IC. Par collaboration avec le Pr Paul Mulder (U1096, Rouen), une dose unique de EUK 134 à la concentration de 15mg/kg a été injectée en intrapéritonéal chez le rat 4 mois après induction de l’IDM par ligature de l’artère coronaire gauche. Puis les paramètres échocardiographiques ont été mesurés avant injection, ainsi que 6h et 24h après l’injection de EUK 134 (Figure 109).

	T0	T+6h EUK 134	T+24h EUK 134
Weight (g)	494,5 ± 6,5	487 ± 6	494,5 ± 10,5
HR (bpm)	342 ± 11	350,75 ± 22,25	356 ± 21,5
SV (ml)	0,4 ± 0,03	0,39 ± 0,01	0,35 ± 0,02
<b>FS (%)</b>	<b>21,67 ± 2,60</b>	<b>33,36 ± 3,66</b>	<b>32,64 ± 2,4</b>
LVEDD (mm)	10,83 ± 1,13	10,93 ± 0,52	11,55 ± 0,85
LVESD (mm)	8,45 ± 0,6	7,30 ± 0,75	7,80 ± 0,85
AWTED (mm)	1,95 ± 0,4	1,85 ± 1,20	2,05 ± 0,35
AWTES (mm)	2,70 ± 0,2	3,68 ± 1,53	4,25 ± 0,45
PWTED (mm)	2,18 ± 0,28	1,98 ± 0,18	2,10 ± 0,10
PWTES (mm)	1,98 ± 0,02	1,7 ± 0,4	1,78 ± 0,28
VTI (cm)	6,09 ± 0,41	5,92 ± 0,19	5,36 ± 0,31

**Figure 109** : Mesure des paramètres échocardiographiques des rats IC à 4 mois post-IDM à 6h et 24h après injection de EUK 134.

AWT ED: *anterior wall thickness end-diastolic*; AWT ES: *anterior wall thickness end-systolic*; bpm: battement par minute; cm: centimètres; FS: *fractional shortening*; g: gramme; HR: *heart rate*; LVEDD: *left ventricle end-diastolic diameter*; LVESD: *left ventricle end-systolic diameter*; mm: millimètres; ml: millilitres; PWT ED: *posterior wall thickness end diastolic*; PWT ES: *posterior wall thickness end-systolic*; SV: *stroke volume*; VTI: *velocity time integral* (n=2, moyenne ± sem).

De manière intéressante, les premières expériences indiquent une amélioration de la fraction d'éjection, estimée par la fraction de raccourcissement (+ 11.66%) chez les rats 6h après l'injection de EUK 134, qui subsiste jusqu'à 24h (+ 10.97%) après l'injection de EUK 134 (Figure 109), traduisant une amélioration de la fonction cardiaque. Les premiers résultats n'indiquent pas de modulation du débit cardiaque, du volume d'éjection systolique (SV), des diamètres télédiastoliques (LVEDD) et télésystoliques (LVESD), de l'intégrale temps-vitesse (VTI) ainsi que des épaisseurs de la paroi antérieure (AWT) et postérieure (PWT) du VG en télédiastole (ED) et télésystole (ES).

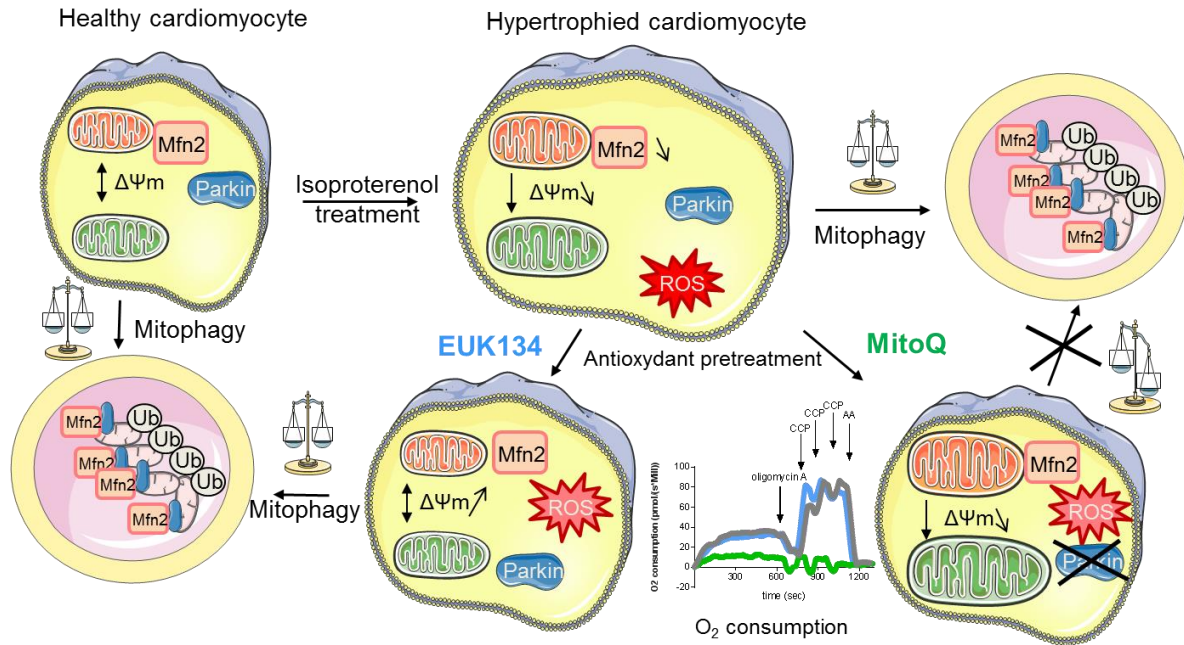
Ces premiers résultats favorisent donc l'hypothèse d'un effet protecteur du EUK 134 sur la fraction d'éjection *in vivo* chez le rat. Ces premiers résultats nécessitent cependant d'être confirmés sur un plus grand nombre d'animaux. De plus, le mécanisme d'action du EUK 134 dans ce modèle nécessite une étude plus approfondie.

### III) Conclusions

Afin de contrer le stress oxydant observé au cours de l'hypertrophie cardiaque, j'ai utilisé deux traitements anti-oxydants différents : la MitoQ, un anti-oxydant spécifique mitochondrial ainsi que le EUK 134, un mimétique des SOD. J'ai d'abord montré que ces deux traitements anti-oxydants, utilisés en prétraitement, protègent les NCM du stress oxydant et de l'hypertrophie induite par l'isoprénaline en diminuant respectivement la production d'anions superoxydes mitochondriaux ainsi que l'aire cellulaire des NCM. Nous avons cependant montré des modes d'actions contradictoires de la MitoQ et du EUK 134.

D'une part, nous avons montré que le prétraitement à la MitoQ est associé à une diminution de l'expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68, ce qui pourrait expliquer la diminution du stress oxydant observée. En revanche, nous avons observé une diminution de l'expression des SIRT dont la protéine SIRT3, responsable de la désacétylation de SOD2 et impliquée dans le maintien du potentiel redox et du métabolisme mitochondrial, suggérant un effet délétère du prétraitement à la MitoQ sur les mitochondries. Par la suite, nous avons effectivement montré que le prétraitement à la MitoQ est associé à une désorganisation cellulaire et à des dysfonctions mitochondriales, se traduisant par une perte de la structure en réseau des mitochondries, une diminution du potentiel membranaire mitochondrial ainsi qu'une diminution de la respiration, qui pourrait expliquer la diminution de la production de ROS (Figure 110). J'ai également montré que le prétraitement à la MitoQ est associé à une diminution des processus d'autophagie/mitophagie, entraînant une accumulation des mitochondries dysfonctionnelles dans les cellules et participant aux effets délétères de la MitoQ (Figure 110).

D'autre part, nous avons montré que le prétraitement au EUK 134 n'impacte pas l'expression de SOD2 et de sa forme acétylée en Lys 68, de même que l'expression des SIRT1, 3 et 6. De plus, le prétraitement au EUK 134 n'entraîne pas d'effets délétères sur la morphologie cellulaire et permet de restaurer les dysfonctions mitochondriales induites par le traitement à l'isoprénaline (telle que la baisse du potentiel membranaire mitochondrial) (Figure 110).



**Figure 110** : Schéma récapitulatif de l'impact des traitements anti-oxydantes EUK 134 et MitoQ sur les NCM hypertrophiés.

$\Delta\Psi_m$  : potentiel membranaire mitochondrial ; AA : antimycine A ; CCP : carbonylcyanure phenylhydrazone ; MitoQ : MitoQuinone ; Mfn2 : mitofusine 2 ; O<sub>2</sub> : dioxygène ; Ub : ubiquitine ; ROS : reactive oxygen species.

L'ensemble de ces résultats m'ont donc permis de montrer les effets contradictoires de deux traitement anti-oxydants différents, malgré les effets bénéfiques sur le stress oxydant et l'hypertrophie des cardiomyocytes, ainsi que l'importance du maintien de l'intégrité mitochondriale et de la balance de la mitophagie dans ces effets protecteurs.

Face aux résultats prometteurs obtenus avec le prétraitement au EUK 134 et dans une visée thérapeutique, j'ai par la suite décidé de l'utiliser en post-traitement afin de savoir s'il conservait toujours ses effets bénéfiques sur l'hypertrophie et le stress oxydant. Les premiers résultats m'ont ainsi montré que l'utilisation du EUK en post-traitement pourrait être associé à une diminution de l'aire cellulaire, conférant une protection face à l'hypertrophie induite par l'isoprénaline. Cependant, je n'observe des effets sur le stress oxydant qu'après 24h de traitement à l'isoprénaline mais plus après 48h, ce qui pourrait suggérer un effet transitoire du traitement au EUK 134. De manière complémentaire, les premiers résultats obtenus *in vivo* chez les rats IC indiquent une amélioration de la fraction d'éjection chez les rats 6h et 24h après l'injection intrapéritonéale de EUK 134 en dose unique, confirmant l'efficacité du EUK 134

dans un modèle *in vivo*. L'ensemble de ces résultats confirment donc l'efficacité de la stratégie anti-oxydante dans la prise en charge de l'hypertrophie cardiomyocytaire et de l'IC ainsi que le ciblage de l'activité SOD dans cette prise en charge.

*Discussion et  
perspectives*



## I) La protéine SOD2, une nouvelle cible dans la prise en charge du stress oxydant pathologique ?

Bien que possédant une action en tant que molécules de signalisations en conditions physiologiques, l'accumulation de ROS et la perte de l'équilibre entre leur formation et leur détoxification est associée à de nombreux contextes pathologiques tels que l'hypoxie ou un régime riche en graisse (Egea et al. 2017). De par sa richesse en mitochondries, source principale de ROS, le tissu cardiaque constitue un site préférentiel pour le développement d'un stress oxydant en conditions pathologiques. Nous avons montré que la protéine SOD2, détoxifiant les anions superoxydes, semble être la principale enzyme anti-oxydante impliquée dans la régulation du stress oxydant au niveau mitochondrial dans le cœur. Suite à son identification dans les années 2000, l'acétylation de SOD2 a été mise en évidence dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertrophie cardiaque (Yun and Yang 2020), l'hypertension (Dikalova et al. 2017) ou encore l'inflammation vasculaire (Fu et al. 2016). Au cours de ma thèse, j'ai montré le rôle prépondérant de la régulation de l'expression et de l'activité de la protéine SOD2 dans le cœur. Tandis que l'augmentation de son expression empêche le développement d'un stress oxydant *in vivo* dans le cœur de rats IC à 2 mois-post IDM, son inactivation de SOD2 par acétylation est associée au développement d'un stress oxydant dans les NCM traités à l'isoprénaline. Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression et de l'acétylation de SOD2 dans le cœur, le premier objectif de ma thèse consistait en l'identification des acteurs impliqués dans la régulation de l'acétylation de SOD2.

Les désacétylases SIRT sont impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques dont l'homéostasie cellulaire, le stress oxydant, le métabolisme ou l'inflammation. Par conséquent, l'hypothèse d'une régulation de l'activité des SIRT suite à une modification de l'état redox a rapidement été mise en avant (Santos, Escande, and Denicola 2016). Le stress oxydant pourrait ainsi moduler l'expression des SIRT, leur interactome, leurs modifications post-traductionnelles ou encore le taux de NAD intracellulaire, nécessaire à leur activité (Santos, Escande, and Denicola 2016). Plusieurs études ont montré une modulation de l'activité des SIRT en cas de stress oxydant (Santos, Escande, and Denicola 2016; D'Onofrio, Servillo, and Balestrieri 2018). Face à leur fonction de désacétylase et de régulation du stress



oxydant, je me suis intéressée au rôle des SIRT dans la régulation de la désacétylation de SOD2, et plus particulièrement aux rôles des SIRT1, 3 et 6 dont l'implication dans la régulation de l'expression de SOD2 a été auparavant démontrée dans des contextes physiopathologiques divers (Kuno, Tanno, and Horio 2015; Tanno et al. 2010; Shen et al. 2016; Wang et al. 2016). J'ai montré que les localisations subcellulaires cytoplasmique et/ou nucléaire de SIRT1 et 6 ne favorisent pas leur interaction avec la protéine mitochondriale SOD2 et sa forme acétylée en Lys 68, éliminant l'hypothèse d'une désacétylation directe de SOD2 par les SIRT1 et dans les NCM hypertrophiés par traitement à l'isoprénaline. En revanche, j'ai montré une localisation mitochondriale de SIRT3, SOD2 et sa forme acétylée en Lys 68 dans les NCM hypertrophiés, qui permettrait une interaction directe entre ces protéines dans les mitochondries. Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence une interaction entre SOD2 et SIRT3 dans les NCM par expérience de PLA, confirmant l'hypothèse précédemment établie.

Si l'implication de SIRT3 dans la régulation de l'expression de SOD2 semble bien établie dans la bibliographie, la plupart des études se sont intéressées à son mode d'action dans la régulation de l'expression de SOD2 et non pas à l'interaction entre les deux protéines. Il a ainsi été montré que le mode d'action de SIRT3 diffère selon le contexte pathologique et les modèles utilisés. Tandis qu'elle peut directement désacétyler SOD2 dans la mitochondrie comme cela a été montré dans un modèle de restriction calorique chez la souris (Qiu et al. 2010), elle peut également avoir un effet sur l'expression de SOD2 par l'intermédiaire de la protéine FOXO3A, facteur de transcription de SOD2, comme tel est le cas dans un modèle *in vivo* d'ischémie reperfusion chez le rat (Chang et al. 2019). *In vitro*, il a récemment été montré que le traitement à la PE dans les NCM, induisant une hypertrophie par stimulation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques, est associé à une diminution du stress oxydant et à une augmentation de l'expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 122, conduisant à une augmentation du stress oxydant dans les NCM (Yun and Yang 2020). Similairement, le traitement à l'Ang II dans les NCM est associé à une diminution de l'expression de SIRT3 et une augmentation de l'expression de l'acétylation de SOD2, entraînant une augmentation du stress oxydant (Meng et al. 2018). Au cours de ma thèse, j'ai montré que la Lys 68 constitue le principal site d'acétylation de SOD2 modulant son activité dans les NCM traités à l'isoprénaline. La perte d'interaction entre SOD2 et SIRT3 observée en PLA est associée à une augmentation de l'expression de la forme acétylée de SOD2 en lysine 68, favorisant le développement d'un stress oxydant mitochondrial dans les NCM hypertrophiés.

Mes travaux de doctorat ont également mis en évidence l'effet protecteur de la protéine SIRT3 sur l'hypertrophie et le stress oxydant induit par l'isoprénaline dans les NCM, en utilisant une double approche d'inhibition et de surexpression de SIRT3 et non pas une modulation indirecte de l'expression de SIRT3 par l'intermédiaire d'activateurs ou d'inhibiteurs tels que le resveratrol (Wang et al. 2020), l'honokiol (Pillai et al. 2017), l'acide sinapique (Yun and Yang 2020) ou encore le sulfure d'hydrogène (Meng et al. 2018), comme cela est majoritairement le cas dans les études réalisées jusqu'à présent. Ces molécules, bien que connues pour leurs effets anti-oxydants, manquent cependant de spécificité et ciblent également d'autres isoformes SIRT ou d'autres voies de signalisations dans lesquelles les SIRT sont impliquées tels que le métabolisme du glucose, de l'insuline ou encore la survie cellulaire. A titre d'exemple, le resveratrol peut être étudié en tant qu'activateur de la protéine SIRT1 (Ma et al. 2017) ou de SIRT3 (Wang et al. 2020). Or j'ai montré au cours de ma thèse une auto-régulation des protéines SIRT, permettant de compenser positivement ou négativement la modulation d'expression ou d'activité de l'un des isoformes. Cette auto-régulation des SIRT, bien que connue car notamment démontrée entre SIRT3 et SIRT6 dans un contexte de cardiomyopathie diabétique (Kanwal et al. 2019), ou encore entre SIRT1 et SIRT6 dans le contexte d'ischémie reperfusion (Cattelan et al. 2015), n'a à notre connaissance jamais été prise en compte dans l'étude la régulation de l'expression de SOD2 par les SIRT. A ce titre, nous ne pouvions nous permettre d'exclure un effet indirect de SIRT1 et 6 dans la régulation de l'expression de SOD2, tel que cela a été décrit auparavant. Il a notamment été montré que la protéine SIRT6 active la protéine SOD2 par l'intermédiaire de la protéine FOXO3A dans un modèle d'ischémie-reperfusion *in vivo* chez la souris et *in vitro* dans les NCM (Wang et al. 2016). De plus, l'expression de SOD2 peut être régulée par l'intermédiaire des protéines FOXO3A et PGC1- $\alpha$  dans le cœur (D'Onofrio, Servillo, and Balestrieri 2018). Mes travaux de thèse ont montré que la protéine SIRT1 ne régule pas l'expression de SOD2 dans les NCM hypertrophiés. En revanche, l'inhibition de SIRT6 est associée à une diminution de l'expression de SOD2. Cependant, cette modulation d'expression peut s'expliquer par la régulation de l'expression de SIRT3 en réponse à l'inhibition de l'expression de SIRT6, confirmant l'importance de prendre en compte l'auto-régulation des SIRT entre elles dans l'étude des voies de signalisation dans lesquelles elles sont impliquées.

Une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'expression des SIRT s'avère alors nécessaire pour mieux comprendre les effets « hors-cibles » des activateurs de SIRT actuellement utilisés en essai clinique, ainsi que le réseau de régulation de SIRT3. Ces

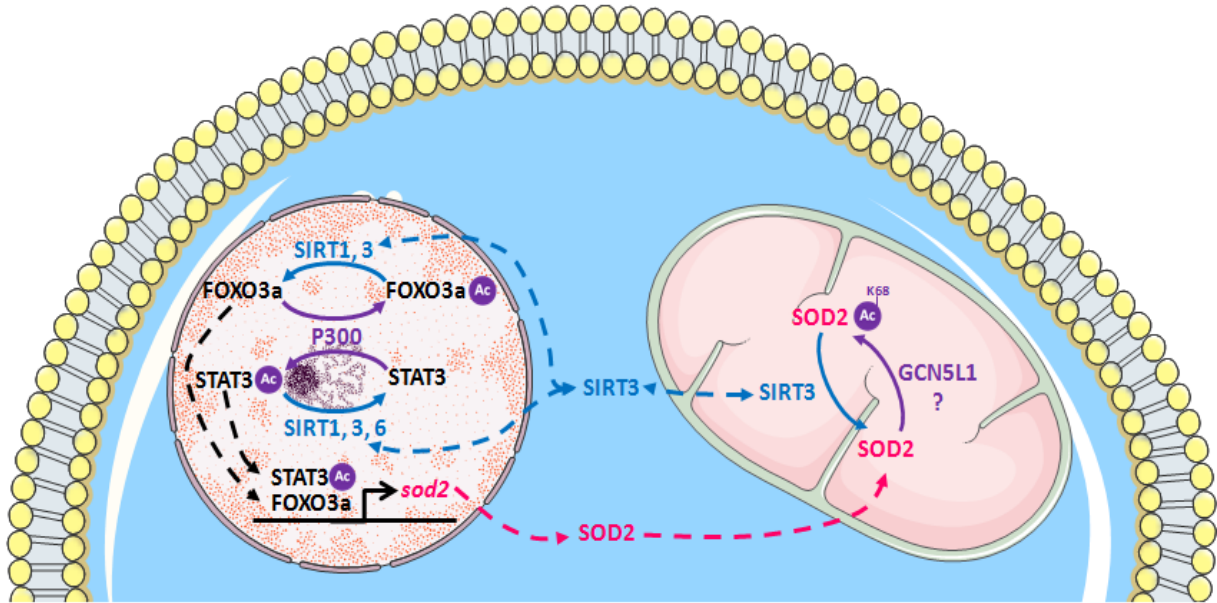
paramètres sont actuellement étudiés à l'aide de divers essais cliniques évaluant notamment l'impact du resveratrol sur la fonction mitochondriale et la forme physique (NT02123121) ou encore l'impact du nicotinamide riboside, activant la voie SIRT3-AMPK, sur le muscle squelettique chez les patients IC jeunes (NT02457260). De plus, les effets à long terme de l'activation de SIRT3 sur les différentes fonctions cellulaires doivent être prise en compte dans l'évaluation du potentiel thérapeutique de SIRT3 et de ses activateurs (Chen et al. 2021).

Pendant mon doctorat, l'utilisation du modèle expérimental d'IC m'a permis de confirmer dans un modèle physiopathologique plus complexe l'importance du maintien de l'activité SOD pour la prise en charge du stress oxydant observé lors des processus de RVG et du développement vers l'IC. En effet, l'hypertrophie cellulaire, étudiée à travers le modèle de NCM traités à l'isoprénaline, ne représente qu'une seule des modifications structurales et fonctionnelles associées au RVG. Le modèle expérimental de rats IC permet au contraire de travailler sur un modèle physiopathologique plus complexe, présentant un RVG et une IC comparable à celle observée chez l'homme, associée à une dilatation du ventricule gauche, une hypertrophie des cardiomyocytes et une fibrose cicatricielle. Nous avons montré dans le modèle *in vivo* de rats IC que le stress oxydant ne semble pas être modulé à deux mois post-IDM, ainsi qu'une augmentation de l'expression de la protéine SOD2 à ce temps. L'utilisation de ce modèle nous confirme donc le rôle central de SOD2 dans la prise en charge du stress oxydant dans le cœur. Nous avons également montré que l'augmentation de l'expression de SOD2 est associée à une tendance à l'augmentation de l'expression de la protéine SIRT3, qui pourrait prévenir l'inactivation de SOD2 par acétylation. Ces données sont notamment renforcées par l'utilisation du modèle de souris SIRT3 KO nous a également permis de confirmer l'impact de SIRT3 sur l'acétylation de SOD2 *in vivo*. Dans le cadre de notre étude, il serait intéressant de confirmer les résultats préliminaires obtenus sur un plus grand nombre d'animaux, ainsi que l'effet protecteur de SIRT3 dans le modèle de souris SIRT3 KO en quantifiant l'aire cellulaire et la production des anions superoxydes mitochondriaux dans les cardiomyocytes isolés.

L'utilisation du modèle *in vivo* de rats IC ne nous permet pas d'exclure une régulation transcriptionnelle de l'expression de SOD2. En effet, nous avons montrée une augmentation de l'expression des formes totales de SOD2 dans ce modèle, qui pourraient s'expliquer par une désacétylation mais également par des mécanismes de régulation transcriptionnelles. A ce propos, l'équipe a d'ailleurs montré dans le modèle de rats IC une augmentation du taux des miR 21-5p et 23a-3p dans le plasma de rats IC à 2 mois post-IDM par comparaison aux rats

témoins. Ces miR ciblent respectivement les protéines STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), et FOXO3a, qui jouent le rôle de facteurs de transcription pour SOD2. L'étude de ces protéines pourrait ainsi permettre une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'expression de SOD2 dans le cœur.

Contrairement à la désacétylation/activation de SOD2, son acétylation n'a été que peu étudiée. A ce jour, l'acétylation de SOD2 a été plus largement attribuée, à l'image d'autres protéines mitochondriales, à l'augmentation du taux d'Acetyl-CoA observée suite au passage de l'utilisation du métabolisme des acides gras à l'utilisation du métabolisme du glucose pour fournir l'énergie nécessaire à la contraction cardiaque dans l'IC. Une étude a cependant montré l'implication potentielle de la protéine acetyl transferase P300 dans la régulation de l'expression de SOD2 dans un contexte de dystrophie musculaire (Kuno, Tanno, and Horio 2015). Les premières expériences réalisées pendant mon doctorat montrent que la protéine P300 serait impliquée dans la régulation de l'expression de SOD2 dans les NCM. Il semblerait cependant que la protéine P300 ne soit pas impliquée dans l'ajout du motif acétylé en lysine 68 de SOD2 mais plutôt dans la régulation de l'expression de la protéine. Cette hypothèse est notamment renforcée par la localisation nucléaire de P300 connue dans la littérature, différente de la localisation mitochondriale de SOD2. De plus, la protéine P300 est impliquée dans la régulation de l'acétylation des protéines FOXO3A et STAT3 précédemment évoqués. Il a ainsi été montré que la protéine FOXO3A est inactivée par acétylation par la protéine P300 (Senf et al. 2011) tandis qu'elle est activée par désacétylation par les protéines SIRT1 et 3 (Senf et al. 2011; Chang et al. 2019). De plus, la protéine STAT3 peut être acétylée par la protéine P300, ce qui favorise son activité transcriptionnelle (Rozovski et al. 2018) et peut entraîner sa translocation à la mitochondrie (Y. S. Xu et al. 2016). Sa désacétylation serait prise en charge par les protéines SIRT1 (Z. Tao et al. 2021), 3 (Guo et al. 2017) et 6 (Xiaoying Zhang et al. 2016). Je peux donc émettre l'hypothèse d'une régulation de l'expression de SOD2 par P300 par l'intermédiaire des protéines STAT3 et FOXO3a dans les NCM (Figure 111).



**Figure 111** : Schéma récapitulatif des hypothèses de régulation de l'expression et de l'acétylation de SOD2.

Ac : acétylation FOXO3a : *forkhead box O3a* ; GCN5L1 : *general control of amino acids synthesis 5 – like 1*; SOD2 : superoxyde dismutase 2 ; SIRT : sirtuine ; STAT3 : *signal transducer and activator of transcription 3*.

D'un point de vue expérimental, il s'avérerait alors intéressant d'étudier l'expression et l'acétylation des protéines STAT3 et FOXO3A dans le modèle de NCM pour lesquels l'expression de P300 est inhibée, afin de juger de leur état d'activité et de leur impact sur l'expression de SOD2, ce qui fait actuellement l'objet d'un stage de Master 1 que j'encadre. De plus, l'implication de P300 dans la régulation de l'expression de SOD2 sera vérifiée dans un modèle de surexpression de P300 dans les NCM, actuellement en cours de mise au point. L'impact de la modulation de l'expression de P300 sur l'hypertrophie et le stress oxydant induit par l'isoprénaline pourra ensuite être étudiée dans ces modèles.

Enfin, il a récemment été montré que la protéine acetyl transférase mitochondriale GCN5L1 serait responsable de l'acétylation de SOD2 en Lys 68 dans le rein (Lv et al. 2021). Par la suite, il serait donc intéressant d'étudier l'implication de la protéine GCN5L1 dans la régulation de l'acétylation de SOD2 dans les différents modèles que j'ai mis en place au laboratoire.

L'étude de l'acétylation de SOD2 s'est enfin développée dans de nombreux autres contextes pathologiques tels que le cancer (Tao et al. 2014; He et al. 2019), les désordres

neurodégénératifs (Zhang et al. 2016) ou encore les pathologies liées au vieillissement (Fu et al. 2016). A ce propos, la régulation de l'acétylation de SOD2 pourra être étudiée au laboratoire dans un modèle *in vivo* de souris soumises à un régime riche en graisse et exposées à la fumée de cigarette, pour lesquelles une augmentation de l'expression de la forme acétylée de SOD2 en Lys 68 a été mise en évidence dans le cœur de souris obèses, exposées ou non à la fumée de cigarette, par comparaison aux animaux contrôles. Cette étude nous permettra de confirmer l'intérêt d'étendre l'étude de la régulation de SOD2 à d'autres contextes pathologiques.

L'ensemble des données acquises au cours de ma thèse confirment l'intérêt de cibler la protéine SOD2 et le stress oxydant mitochondrial dans l'hypertrophie cardiaque. C'est dans ce contexte que j'ai ensuite étudié l'impact des traitements MitoQ et EUK 134 sur le phénotype cardiaque.

## **II) L'utilisation des molécules anti-oxydantes comme perspective thérapeutique.**

Face au rôle prépondérant des mitochondries dans le stress oxydant et la production de ROS dans les pathologies cardiovasculaire, les mitochondries se révèlent être une cible thérapeutique intéressante dans la prise en charge de l'IC. A ce propos, diverses molécules anti-oxydantes ciblant spécifiquement les ROS mitochondriaux ont été testées. Dans ce contexte, le second objectif de ma thèse consistait en l'étude de l'impact de deux molécules anti-oxydantes, la MitoQ et le EUK 134, sur le phénotype cardiaque.

Parmi les molécules ciblant spécifiquement les ROS mitochondriaux, la MitoQ constitue une approche intéressante mais dont les effets sont mal connus à l'heure actuelle. Plusieurs études ont montré des effets contradictoires de la MitoQ. Il a ainsi été montré que le traitement à la MitoQ est associé à une préservation du réseau mitochondries-réticulum sarcoplasmique et à une amélioration de la contraction cardiaque dans un modèle d'IC chez la souris induit par constriction aortique (Kim et al. 2020). Il a également été montré que la MitoQ permet de prévenir la fibrose et l'hypertrophie cardiaque *in vivo* chez les rats obèses ainsi que le stress oxydant et l'altération des protéines impliquées dans le métabolisme mitochondrial dans les cardiomyoblastes H9c2 stimulés par l'acide palmitique (Jiménez-González et al. 2020).

De façon contradictoire, le traitement à la MitoQ entraîne une augmentation de la production des ROS et une augmentation de l'apoptose dans les cellules endothéliales (Doughan and Dikalov 2007). Plus récemment, la MitoQ a été associée à un gonflement des mitochondries et à une dépolarisation de la membrane mitochondriale dans les cellules épithéliales du tubule proximal du rein (Gottwald et al. 2018).

Au cours de ma thèse, j'ai montré que le prétraitement à la MitoQ présentait également des effets contradictoires dans les NCM traités à l'isoprénaline : bien qu'il semble protéger de l'hypertrophie et du stress oxydant induit par l'isoprénaline, en activant notamment la protéine SOD2, il est également associé à des dysfonctions mitochondriales, caractérisées par une dépolarisation mitochondriale, une diminution de la respiration et une altération de l'autophagie/mitophagie. Ces dysfonctions mitochondriales sont associées à une diminution de l'expression de la protéine SIRT3, impliquée dans la régulation du métabolisme mitochondrial (Parodi-Rullán et al. 2018). Ces effets délétères pourraient notamment s'expliquer par le motif TPP d'adressage à la mitochondrie, associé lui-même aux effets délétères auparavant évoqués dans le tubule rénal en l'absence du motif quinone anti-oxydant (Gottwald et al. 2018). De manière intéressante, j'ai également montré que les effets délétères de la MitoQ sont spécifiques aux NCM, et non observés dans les fibroblastes néonataux, ce qui pourrait suggérer une spécificité d'action de la MitoQ à certains types cellulaires uniquement. D'un point de vue expérimental, il serait intéressant d'étudier l'impact de la MitoQ dans le modèle *in vitro* d'ACM hypertrophiés. A ce propos, j'ai débuté au cours de ma thèse la mise au point des conditions d'utilisation de la MitoQ en prétraitement sur les ACM hypertrophiés, lors de ma mobilité dans le laboratoire de Luc Bertrand à Bruxelles. Les premières expériences réalisées semblent indiquer des effets délétères similaires aux NCM du prétraitement à la MitoQ sur l'hypertrophie et le stress oxydant dans les ACM. Il sera cependant intéressant d'étudier l'impact de ce traitement sur le métabolisme mitochondrial des ACM plus complexe et plus pertinent car utilisant un métabolisme différent des NCM et plus proche des conditions physiologiques de l'Homme pour fournir l'énergie nécessaire à la contraction cardiaque. De plus, il serait intéressant d'utiliser la MitoQ en post-traitement sur les NCM et les ACM, afin de savoir si les effets observés restent identiques ou différents selon l'état de stress des cellules au moment de l'utilisation de la MitoQ.

L'utilisation de la MitoQ m'a également permis de mettre en évidence le rôle primordial de la mitophagie dans le maintien de la fonction cardiaque. Au laboratoire, nous avons en effet

montré que le défaut de la voie de mitophagie dépendante de Parkin participe aux effets délétères de la MitoQ sur les NCM traités à l'isoprénaline, en accumulant les mitochondries dysfonctionnelles dans la cellule. De plus, l'inhibition de l'expression de Parkin est associée à une dépolarisation mitochondriale et une suppression de la mitophagie dans les NCM. Des résultats similaires ont été observés *in vivo* dans un modèle de souris déficientes pour la protéine Parkin et présentant une diminution de la mitophagie et une accumulation des mitochondries endommagées dans le cœur. Ces modifications sont associées à des dommages cardiaques tels qu'une diminution de la fraction d'éjection et de la fraction de raccourcissement et une susceptibilité plus grande à l'IDM (Kubli et al. 2012). De plus, il a été montré qu'une altération de la mitophagie dépendante de la voie PINK1/Parkin entraîne des dysfonctions cardiaques (Morales et al. 2020).

Contrairement à la MitoQ, le EUK 134 ne présente pas d'effets délétères sur le métabolisme mitochondrial. Au cours de ma thèse, j'ai ainsi montré que le EUK 134, utilisé en prétraitement à l'isoprénaline, protège les NCM de l'hypertrophie et du stress oxydant induit par l'isoprénaline, en accord avec les données de la bibliographie indiquant une protection du EUK 134 face à l'hypertrophie cardiomyocytaire, la fibrose interstitielle et le stress oxydant dans un modèle *in vivo* d'hypertension artérielle pulmonaire ou encore face à l'hypertrophie induite par la PE dans les cardiomyoblastes H9c2 (Redout et al. 2010; Purushothaman and Nair 2016). J'ai également montré que le prétraitement au EUK 134 permet de restaurer les altérations mitochondriales induites par l'isoprénaline et n'altère pas l'expression de SOD2 et des SIRT, ni l'équilibre de la mitophagie, ce qui favorise son effet bénéfique sur les NCM. L'ensemble de ces données confirment l'importance de maintenir l'équilibre de la mitophagie et l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles pour assurer le maintien de la fonction cardiaque, et d'assurer son maintien dans les stratégies thérapeutiques anti-oxydantes.

Récemment, une étude a mis en évidence une élimination des mitochondries cardiaques par la voie des exophères. Les mitochondries dysfonctionnelles seraient ainsi prise en charge par des vésicules appelées exophères, qui sont libérées dans le milieu extracellulaire pour permettre la dégradation des organites endommagés par les macrophages. Il a été montré que la diminution de l'élimination des mitochondries par la voie des exophères entraîne une activation de l'inflammasome et un arrêt de l'autophagie, conduisant à des effets délétères sur la forme mitochondriale, la protéostasie tissulaire et la fonction cardiaque (Nicolás-Ávila et al. 2020). A ce jour, les premières expériences réalisées au laboratoire ont permis de détecter la présence de mitochondries en cytométrie de flux dans le milieu de culture des NCM prétraités



à la MitoQ après marquage par le MitoTracker, ce qui pourrait suggérer une élimination des mitochondries par la voie des exophères dans ce modèle. Par la suite, l'implication de cette voie sera donc plus précisément étudiée dans les NCM traitées à la MitoQ.

Face aux effets protecteurs du EUK 134 utilisé en prétraitement sur les NCM hypertrophiés, j'ai débuté l'étude de son utilisation thérapeutique sur les NCM en post-traitement à l'isoprénaline ainsi que dans le modèle *in vivo* de rats IC en collaboration avec le Pr Paul Mulder (Rouen). Les premiers résultats obtenus sur le modèle de NCM confirment l'effet protecteur du traitement au EUK 134 sur l'hypertrophie après 24h et 48h de traitement à l'isoprénaline. En revanche, l'effet bénéfique observé sur le stress oxydant semble être transitoire, comme l'indique la diminution du stress oxydant observée après 24h d'isoprénaline uniquement mais plus après 48h. Il s'avère alors nécessaire de mieux comprendre les effets à long terme de l'administration de EUK 134 et son impact sur la signalisation cellulaire. De plus, l'utilisation du modèle *in vivo* de rats IC traités au EUK 134, pour lequel des premiers résultats encourageants sur la fraction d'éjection des rats IC ont été observés, nous permettra alors de mieux comprendre l'effet du EUK 134 sur un modèle plus complexe. De nombreuses questions demeurent cependant concernant l'utilisation thérapeutique du EUK 134. D'une part, une étude *in vivo* à plus long terme est nécessaire afin de déterminer si le EUK 134 conserve toujours des effets bénéfiques sur le cœur sans altération de voies de signalisation secondaires. Une étude à long terme permettrait alors de déterminer le nombre d'injections nécessaire ainsi que la quantité à EUK 134 à utiliser pour conserver ses effets bénéfiques à long terme. De plus, les premiers tests réalisés sur le modèle *in vivo* de rats IC ont montré que l'efficacité du EUK 134 pouvait dépendre du niveau d'altération des paramètres cardiaques au moment de l'injection. Ainsi, le EUK 134 s'avèrerait être moins efficace à 7 jours post-IDM, où la dégradation des paramètres cardiaques n'est pas aussi bien établie qu'à 2 mois post-IDM. Les études qui seront réalisées *in vivo* chez le rat IC permettront alors d'éclaircir ces points et d'envisager une utilisation thérapeutique ciblée du EUK 134 en pratique clinique.

Si le EUK 134 semble majoritairement mimer l'activité SOD ou est parfois décrit comme ciblant la mitochondrie (Ajith 2014), il est tout de même à noter qu'il possède également une activité catalase, prenant en charge la peroxyde d'hydrogène formé par détoxification des anions superoxydes.. Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier l'impact du traitement au EUK 134 sur le stress oxydant intracellulaire global et non plus spécifiquement mitochondrial, en étudiant notamment le devenir du peroxyde d'hydrogène formé par la détoxification des

anions superoxydes mitochondriaux observée avec le EUK 134 dans les NCM traités à l'isoprénaline.

Finalement, l'ensemble de ces données m'aura donc permis de montrer l'efficacité de cibler le stress oxydant mitochondrial et l'activité SOD2 dans les stratégies de défenses anti-oxydantes, ainsi que l'importance de prendre en compte les effets secondaires de ces traitements, notamment sur le métabolisme mitochondrial et la mitophagie, dans l'évaluation de leurs effets thérapeutiques. A ce jour, il s'agit d'ailleurs de l'un des points faibles expliquant le faible taux de réussite et d'utilisation des agents anti-oxydants dans les essais cliniques. Bien que montrant des effets bénéfiques en conditions de laboratoire, les essais cliniques en cours ne prennent généralement pas assez en considération la multiplicité des sources de ROS, le niveau très élevé de défenses anti-oxydantes présent physiologiquement dans l'organisme, la toxicité des composés synthétiques ou naturels utilisés ainsi que les effets secondaires qui y sont associés (Suzuki 2009). Une meilleure compréhension des effets hors-cibles des molécules anti-oxydantes s'avère donc nécessaire pour permettre une meilleure utilisation clinique de ces composés. A ce propos, les effets de la MitoQ sont actuellement évalués à l'aide de plusieurs essais cliniques dans le contexte des dysfonctions dyastoliques (NCT03586414), des pathologies touchant les artères périphériques (NCT03506633) ou encore des pathologies rénales chroniques (NCT02364648) (Dubois-Deruy et al. 2020). Si à ce jour aucun essai clinique évalue le potentiel thérapeutique de EUK 134 à notre connaissance, ce dernier est déjà commercialisé dans le domaine des cosmétiques et ne présente à ce jour pas d'effets secondaires connus, ce qui pourra faciliter son utilisation thérapeutique. Enfin, face à la multiplicité des pathologies associées au stress oxydant, l'utilisation de ces traitements s'avère prometteuse au-delà du contexte cardiovasculaire. A ce propos, le laboratoire étudiera l'impact du traitement à la N-acétylcystéine, un anti-oxydant stimulant la production de glutathion, sur les NCM exposés à la fumée de cigarette ainsi que l'impact de la metformine, un anti-diabétique possédant un effet anti-oxydant, sur le cœur de souris soumise à un régime riche en graisse et/ou exposées à la fumée de cigarette.

### **III) Conclusion générale**

Mes travaux de doctorat ont permis de mettre en évidence que la protéine SOD2 et le stress oxydant mitochondrial constitue une cible de choix pour les traitements anti-oxydants et pourrait permettre à terme d'identifier de nouveaux agents thérapeutiques dans la prise en charge de l'hypertrophie cardiaque et du stress oxydant qui lui associé. En dehors de leur stricte

### *Discussion - Perspectives*

efficacité dans la détoxification des ROS, l'évaluation de l'efficacité des traitements anti-oxydants doit cependant prendre en compte le large spectre d'action qu'ils possèdent, étendu à plusieurs types ou compartiments cellulaires, ainsi que les voies de signalisations secondaires dans lesquels ils sont impliqués, afin de mieux contrôler les effets délétères auxquels ils peuvent être associés. A ce titre, le maintien de la fonction mitochondriale, et plus particulièrement du maintien du métabolisme et de leur élimination par mitophagie, semble constituer un critère de choix dans l'évaluation du potentiel thérapeutique d'une molécule anti-oxydante.

# *Bibliographie*



- A -

- Ajith, Thekkuttuparambil Ananthanarayanan. 2014. "Mitochondria-Targeted Agents: Future Perspectives of Mitochondrial Pharmaceuticals in Cardiovascular Diseases." *World Journal of Cardiology* 6 (10): 1091. <https://doi.org/10.4330/wjc.v6.i10.1091>.
- Andres, Allen M, Aleksandr Stotland, Bruno B Queliconi, and Roberta A Gottlieb. 2014. "A Time to Reap, a Time to Sow: Mitophagy and Biogenesis in Cardiac Pathophysiology." <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.10.003>.
- Arai, M., N. R. Alpert, D. H. MacLennan, P. Barton, and M. Periasamy. 1993. "Alterations in Sarcoplasmic Reticulum Gene Expression in Human Heart Failure: A Possible Mechanism for Alterations in Systolic and Diastolic Properties of the Failing Myocardium." *Circulation Research* 72 (2): 463–69. <https://doi.org/10.1161/01.RES.72.2.463>.
- Azadmanesh, Jahaun, and Gloria E.O. Borgstahl. 2018. "A Review of the Catalytic Mechanism of Human Manganese Superoxide Dismutase." *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox7020025>.

- B -

- B. Andrews, Zane. 2010. "Uncoupling Protein-2 and the Potential Link Between Metabolism and Longevity." *Current Aging Science* 3 (2): 102–12. <https://doi.org/10.2174/1874609811003020102>.
- Bai, Xue Yuan, Yuxiang Ma, Rui Ding, Bo Fu, Suozhu Shi, and Xiang Mei Chen. 2011. "MiR-335 and MiR-34a Promote Renal Senescence by Suppressing Mitochondrial Antioxidative Enzymes." *Journal of the American Society of Nephrology* 22 (7): 1252–61. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010040367>.
- Baker, Anthony J. 2014. "Adrenergic Signaling in Heart Failure: A Balance of Toxic and Protective Effects." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1491-5>.
- Barouki, Robert. 2006. "Ageing Free Radicals and Cellular Stress." *Medecine/Sciences*. Editions EDK. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006223266>.
- Bauters, Christophe, Emilie Dubois, Sina Porouchani, Eric Saloux, Marie Fertin, Pascal de Groote, Nicolas Lamblin, and Florence Pinet. 2017. "Long-Term Prognostic Impact of Left Ventricular Remodeling after a First Myocardial Infarction in Modern Clinical Practice." Edited by Philippe Rouet. *PLOS ONE* 12 (11): e0188884. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188884>.
- Bayeva, Marina, Mihai Gheorghide, and Hossein Ardehali. 2013. "Mitochondria as a Therapeutic Target in Heart Failure." *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier USA. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.08.1021>.
- Bergmann, Olaf, Sofia Zdunek, Anastasia Felker, Mehran Salehpour, Kanar Alkass, Samuel

## Bibliographie

- Bernard, Staffan L. Sjostrom, et al. 2015. "Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart." *Cell* 161 (7): 1566–75. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.026>.
- Bernardo, Bianca C, Kate L Weeks, Lynette Pretorius, and Julie R McMullen. 2010. "Molecular Distinction between Physiological and Pathological Cardiac Hypertrophy: Experimental Findings and Therapeutic Strategies." *Pharmacology & Therapeutics* 128: 191–227. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.04.005>.
- Berry, Cristine E., and Joshua M. Hare. 2004. "Xanthine Oxidoreductase and Cardiovascular Disease: Molecular Mechanisms and Pathophysiological Implications." *Journal of Physiology* 555 (3): 589–606. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.055913>.
- Borgstahl, Gloria E.O., Hans E. Parge, Michael J. Hickey, Wayne F. Beyer, Robert A. Hallewell, and John A. Tainer. 1992. "The Structure of Human Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase Reveals a Novel Tetrameric Interface of Two 4-Helix Bundles." *Cell* 71 (1): 107–18. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90270-M](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90270-M).
- Bouvet, Marion, Emilie Dubois-Deruy, Tchilabalo Dilezitoko Alayi, Paul Mulder, Myriam El Amrani, Olivia Beseme, Philippe Amouyel, Vincent Richard, Stanislas Tomavo, and Florence Pinet. 2016. "Increased Level of Phosphorylated Desmin and Its Degradation Products in Heart Failure." *Biochemistry and Biophysics Reports* 6 (July): 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.02.014>.
- Brutsaert, Dirk L. 2003. "Cardiac Endothelial-Myocardial Signaling: Its Role in Cardiac Growth, Contractile Performance, and Rhythmicity." *Physiological Reviews*. American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2002>.
- Bugger, Heiko, and Katharina Pfeil. 2020a. "Mitochondrial ROS in Myocardial Ischemia Reperfusion and Remodeling." <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165768>.

## - C -

- Candas, Demet, Ming Fan, Danupon Nantajit, Andrew T Vaughan, Jeffrey S Murley, Gayle E Woloschak, David J Grdina, and Jian Jian Li. 2013. "CyclinB1/Cdk1 Phosphorylates Mitochondrial Antioxidant MnSOD in Cell Adaptive Response to Radiation Stress." *Journal of Molecular Cell Biology* 5 (3): 166–75. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs062>.
- Carrière, Audrey, Anne Galinier, Yvette Fernandez, Maria-Carmen Carmona, Luc Pénicaud, and Louis Casteilla. 2006. "Les Espèces Actives de l'oxygène : Le Yin et Le Yang de La Mitochondrie Effets Cellulaires Des EAO : Pourquoi Tant de Controverses Bibliographiques ?" *REVUES SYNTHÈSE M/S N° 22*: 47–53. <https://doi.org/10.1051/medsci/200622147>.
- Castanier, Céline, and Damien Arnoult. 2010. "La Dynamique Mitochondriale Au Cours de l'apoptose." *Médecine/Sciences* 26 (10): 830–35. <https://doi.org/10.1051/medsci/20102610830>.
- Cattelan, Arianna, Giulio Ceolotto, Sergio Bova, Mattia Albiero, Maniselvan Kuppusamy, Sara

## Bibliographie

- De Martin, Andrea Semplicini, Gian Paolo Fadini, Saula Vigili de Kreutzenberg, and Angelo Avogaro. 2015. "NAD<sup>+</sup>-Dependent SIRT1 Deactivation Has a Key Role on Ischemia-Reperfusion-Induced Apoptosis." *Vascular Pharmacology* 70 (July): 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.02.004>.
- Chacinska, Agnieszka, Carla M. Koehler, Dusanka Milenkovic, Trevor Lithgow, and Nikolaus Pfanner. 2009. "Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms." *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.005>.
- Chan, David C. 2012. "Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health." *Annual Review of Genetics* 46 (1): 265–87. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132529>.
- Chang, Guodong, Yingwei Chen, Hongwei Zhang, and Wen Zhou. 2019. "Signaling Pathway ☆." <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.03.056>.
- Chen, Bijun, and Nikolaos G. Frangogiannis. 2017. "Immune Cells in Repair of the Infarcted Myocardium." *Microcirculation* 24 (1): e12305. <https://doi.org/10.1111/micc.12305>.
- Chen, Hsiuchen, and David C. Chan. 2017. "Mitochondrial Dynamics in Regulating the Unique Phenotypes of Cancer and Stem Cells." *Cell Metabolism* 26 (1): 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.016>.
- Chen, Jie, Shiqi Chen, Bingxia Zhang, and Junwei Liu. 2021. "SIRT3 as a Potential Therapeutic Target for Heart Failure." *Pharmacological Research*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105432>.
- Chen, Yaohui, Jinye Zhang, Yan Lin, Qunying Lei, Kun Liang Guan, Shimin Zhao, and Yue Xiong. 2011. "Tumour Suppressor SIRT3 Deacetylates and Activates Manganese Superoxide Dismutase to Scavenge ROS." *EMBO Reports* 12 (6): 534–41. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.65>.
- Cheung, Kyle G., Laura K. Cole, Bo Xiang, Keyun Chen, Xiuli Ma, Yvonne Myal, Grant M. Hatch, Qiang Tong, and Vernon W. Dolinsky. 2015. "Sirtuin-3 (SIRT3) Protein Attenuates Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Improves Mitochondrial Respiration in H9c2 Cardiomyocytes." *Journal of Biological Chemistry* 290 (17): 10981–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.607960>.
- Chuong Nguyen, Minh Vu, Bernard Lardy, Marie Hélène Paquet, Francis Rousset, Sylvie Berthier, Athan Baillet, Laurent Grange, Philippe Gaudin, and Françoise Morel. 2015. "Les NADPH Oxydases, Nox." *Medecine/Sciences* 31 (1): 43–52. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153101012>.
- Cieniewski-Bernard, Caroline, Paul Mulder, Jean Paul Henry, Hervé Drobecq, Emilie Dubois, Gwenael Pottiez, Christian Thuillez, Philippe Amouyel, Vincent Richard, and Florence Phiet. 2008. "Proteomic Analysis of Left Ventricular Remodeling in an Experimental Model of Heart Failure." *Journal of Proteome Research* 7 (11): 5004–16. <https://doi.org/10.1021/pr800409u>.



- D -

- D'Onofrio, Nunzia, Luigi Servillo, and Maria Luisa Balestrieri. 2018. "SIRT1 and SIRT6 Signaling Pathways in Cardiovascular Disease Protection." *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7178>.
- Davidson, Michael T., Paul A. Grimsrud, Ling Lai, James A. Draper, Kelsey H. Fisher-Wellman, Tara M. Narowski, Dennis M. Abraham, Timothy R. Koves, Daniel P. Kelly, and Deborah M. Muoio. 2020. "Extreme Acetylation of the Cardiac Mitochondrial Proteome Does Not Promote Heart Failure." *Circulation Research* 127 (8): 1094–1108. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317293>.
- Del, Dominic P, Dulguun Amgalan, Andreas Linkermann, Qinghang Liu, and Richard N Kitsis. 2019. "Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease." *Physiol Rev* 99: 1765–1817. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2018>.
- Detienne, Giel, Wouter De Haes, Lucas Mergan, Samantha L. Edwards, Liesbet Temmerman, and Sven Van Bael. 2018. "Beyond ROS Clearance: Peroxiredoxins in Stress Signaling and Aging." *Ageing Research Reviews* 44 (February): 33–48. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.03.005>.
- Dietl, Alexander, and Christoph Maack. 2017. "Targeting Mitochondrial Calcium Handling and Reactive Oxygen Species in Heart Failure." *Current Heart Failure Reports* 14 (4): 338–49. <https://doi.org/10.1007/s11897-017-0347-7>.
- Dikalova, Anna E, Hana A Itani, Rafal R Nazarewicz, William G McMaster, Charles R Flynn, Roman Uzhachenko, Joshua P Fessel, Jorge L Gamboa, David G Harrison, and Sergey I Dikalov. 2017. "Sirt3 Impairment and SOD2 Hyperacetylation in Vascular Oxidative Stress and Hypertension HHS Public Access." *Circ Res* 121 (5): 564–74. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310933>.
- Dirkx, Ellen, Paula A Da Costa Martins, and Leon J De Windt. 2013. "Regulation of Fetal Gene Expression in Heart Failure ☆." <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.07.023>.
- Doenst, Torsten, T Dung Nguyen, and E Dale Abel. 2013. "Cardiac Metabolism in Heart Failure-Implications beyond ATP Production." *Circ Res* 113 (6): 709–24. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300376>.
- Dorn, Gerald W. 2015. "Mitochondrial Dynamism and Heart Disease: Changing Shape and Shaping Change." *EMBO Molecular Medicine* 7 (7): 865–77. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404575>.
- Doughan, Abdulrahman K, and Sergey I Dikalov. 2007. "Original Research Communication Mitochondrial Redox Cycling of Mitoquinone Leads to Superoxide Production and Cellular Apoptosis." *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING* 9 (11): 1825–36. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1693>.
- Drazic, Adrian, Line M Myklebust, Rasmus Ree, and Thomas Arnesen. 2016. "The World of Protein Acetylation." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.007>.

## Bibliographie

- Dubois-Deruy, Emilie, Marie Cuvelliez, Jan Fiedler, Henri Charrier, Paul Mulder, Eleonore Hebbar, Angelika Pfanne, et al. 2017. "MicroRNAs Regulating Superoxide Dismutase 2 Are New Circulating Biomarkers of Heart Failure." *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15011-6>.
- Dubois-deruy, Emilie, Victoriane Peugnet, Annie Turkieh, and Florence Pinet. 2020. "Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases." *Antioxidants* 9 (9): 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox9090864>.
- Dubois, Emilie, Vincent Richard, Paul Mulder, Nicolas Lamblin, Hervé Drobecq, Jean Paul Henry, Philippe Amouyel, Christian Thuillez, Christophe Bauters, and Florence Pinet. 2011. "Decreased Serine207 Phosphorylation of Troponin T as a Biomarker for Left Ventricular Remodelling after Myocardial Infarction." *European Heart Journal* 32 (1): 115–23. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq108>.
- Dujardin, J.-J, and J.-P Cambou. 2005. "Épidémiologie de l'infarctus Du Myocarde Epidemiology of Myocardial Infarction." <https://doi.org/10.1016/j.emcaa.2005.07.010>.

## - E -

- Egea, Javier, Isabel Fabregat, Yves M. Frapart, Pietro Ghezzi, Agnes Görlach, Thomas Kietzmann, Kateryna Kubaichuk, et al. 2017. "European Contribution to the Study of ROS: A Summary of the Findings and Prospects for the Future from the COST Action BM1203 (EU-ROS)." *Redox Biology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.05.007>.

## - F -

- Fedak, Paul W.M., Subodh Verma, Richard D. Weisel, and Ren Ke Li. 2005. "Cardiac Remodeling and Failure: From Molecules to Man (Part II)." *Cardiovascular Pathology* 14 (2): 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2005.01.005>.
- Fertin, Marie, Bernadette Hennache, Martial Hamon, Pierre V. Ennezat, Frdric Biaisque, Mariam Elkohen, Olivier Nugue, et al. 2010. "Usefulness of Serial Assessment of B-Type Natriuretic Peptide, Troponin I, and C-Reactive Protein to Predict Left Ventricular Remodeling after Acute Myocardial Infarction (from the REVE-2 Study)." *American Journal of Cardiology* 106 (10): 1410–16. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2010.06.071>.
- Förstermann, Ulrich, and William C. Sessa. 2012. "Nitric Oxide Synthases: Regulation and Function." *European Heart Journal* 33 (7): 829–37. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>.
- Freya, Terrence G., and Carmen A. Mannellab. 2000. "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).
- Friedman, Jonathan R, and Jodi Nunnari. 2014. "Mitochondrial Form and Function." *Nature*

505 (7483): 335–43. <https://doi.org/10.1038/nature12985>.

Fu, Yao, Michael Kinter, Joanna Hudson, Kenneth M. Humphries, Rachel S. Lane, Jeremy R. White, Michael Hakim, Yong Pan, Eric Verdin, and Timothy M. Griffin. 2016. “Aging Promotes Sirtuin 3–Dependent Cartilage Superoxide Dismutase 2 Acetylation and Osteoarthritis.” *Arthritis and Rheumatology* 68 (8): 1887–98. <https://doi.org/10.1002/art.39618>.

- G -

Gabet, A., A. Pasquereau, R. Andler, and V. Olié. 2019. “Epidemiology of Myocardial Infarction in Women: A Specific Concern in Women Less than 65-Years-Old.” *Archives Des Maladies Du Coeur et Des Vaisseaux - Pratique*. Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.amcp.2019.02.004>.

Gaertner, Roger, Damien Logeart, Jean-Baptiste Michel, Jean-Jacques Mercadier, R Gaertner, D Logeart, JB Michel, et al. 2004. “Remodelage Précoce Du Ventricule Gauche Après Un Accident Coronarien Aigu.” *MEDECINE/SCIENCES* 20: 643. <https://doi.org/10.1051/medsci/2004206-7643>.

Gajarsa, Jason J., and Robert A. Kloner. 2011. “Left Ventricular Remodeling in the Post-Infarction Heart: A Review of Cellular, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Modalities.” *Heart Failure Reviews* 16 (1): 13–21. <https://doi.org/10.1007/s10741-010-9181-7>.

George, Jacob, and Allan D. Struthers. 2009. “Role of Urate, Xanthine Oxidase and the Effects of Allopurinol in Vascular Oxidative Stress.” *Vascular Health and Risk Management* 5 (0): 265–72. <https://doi.org/10.2147/vhrm.s4265>.

Giacomello, Marta, Aswin Pyakurel, Christina Glytsou, and Luca Scorrano. 2020. “The Cell Biology of Mitochondrial Membrane Dynamics.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (4): 204–24. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0210-7>.

Gjesdal, Ola, David A. Bluemke, and Joao A. Lima. 2011. “Cardiac Remodeling at the Population Level-Risk Factors, Screening, and Outcomes.” *Nature Reviews Cardiology*. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.154>.

Gottwald, Esther M, Michael Duss, Milica Bugarski, Dominik Haenni, Claus D Schuh, Ehud M Landau, Andrew M Hall, and Correspondence M Andrew Hall. 2018. “The Targeted Anti-Oxidant MitoQ Causes Mitochondrial Swelling and Depolarization in Kidney Tissue.” *Physiol Rep* 6 (7). <https://doi.org/10.14814/phy2.13667>.

Grevel, Alexander, Nikolaus Pfanner, and Thomas Becker. 2019. “Coupling of Import and Assembly Pathways in Mitochondrial Protein Biogenesis.” *Biological Chemistry* 401 (1): 117–29. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0310>.

Guo, Xiaobin, Fangying Yan, Jingyuan Li, Chunmei Zhang, and Peili Bu. 2017. “SIRT3 Attenuates AngII-Induced Cardiac Fibrosis by Inhibiting Myofibroblasts Transdifferentiation via STAT3-NFATc2 Pathway.” *American Journal of Translational Research* 9 (7): 3258–69.

- H -

- Haleng, J., J. Pincemail, J. O. Defraigne, C. Charlier, and J. P. Chapelle. 2007. “Le Stress Oxydant.” *Revue Medicale de Liege*. Vol. 62.
- Halestrap, Andrew P. 2009. “What Is the Mitochondrial Permeability Transition Pore?” <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.02.021>.
- Hassanpour, Seyyed Hossein, Mohammad Amin Dehghani, and Seyyedeh Zeinab Karami. 2018. “Study of Respiratory Chain Dysfunction in Heart Disease.” *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research* 10 (1): 1–13. <https://doi.org/10.15171/jcvtr.2018.01>.
- Hata, Jonathan A., and Walter J. Koch. 2003. “Phosphorylation of G Protein-Coupled Receptors: GPCR Kinases in Heart Disease.” *Molecular Interventions*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. <https://doi.org/10.1124/mi.3.5.264>.
- He, Chenxia, Jeanne M. Danes, Peter C. Hart, Yueming Zhu, Yunping Huang, Andre Luelsdorf de Abreu, Joseph O’Brien, et al. 2019. “SOD2 Acetylation on Lysine 68 Promotes Stem Cell Reprogramming in Breast Cancer.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (47): 23534–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902308116>.
- Humphrey, Sean J, David E James, Matthias Mann, D E Mpg James, M De, and ) Mann. 2015. “Special Issue: Systems Approach to Metabolic Disease Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation.” *Trends in Endocrinology & Metabolism* 26 (12). <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.09.013>.

- J -

- Jeinsen, Beatrice von, Meghan I. Short, Martin G. Larson, Vanessa Xanthakis, David D. McManus, Emelia J. Benjamin, Gary F. Mitchell, Jayashri Aragam, Susan Cheng, and Ramachandran S. Vasani. 2020. “Prognostic Significance of Echocardiographic Measures of Cardiac Remodeling.” *Journal of the American Society of Echocardiography* 33 (1): 72–81.e6. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2019.08.001>.
- Jiménez-González, Sara, Gema Marín-Royo, Raquel Jurado-López, María Visitación Bartolomé, Ana Romero-Miranda, María Luaces, Fabián Islas, María Luisa Nieto, Ernesto Martínez-Martínez, and Victoria Cachofeiro. 2020. “The Crosstalk between Cardiac Lipotoxicity and Mitochondrial Oxidative Stress in the Cardiac Alterations in Diet-Induced Obesity in Rats.” *Cells* 9 (2): 451. <https://doi.org/10.3390/cells9020451>.
- Jin, Cuihong, Lili Qin, Yan Shi, Demet Candas, Ming Fan, Chung Ling Lu, Andrew T.M. Vaughan, et al. 2015. “CDK4-Mediated MnSOD Activation and Mitochondrial Homeostasis in Radioadaptive Protection.” *Free Radical Biology and Medicine* 81: 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.12.026>.
- John Sutton, Martin G. St., and Norman Sharpe. 2000. “Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction: Pathophysiology and Therapy.” *Circulation* 101 (25): 2981–88. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.25.2981>.

- K -

- Kalyanaraman, Balaraman. 2013. "Teaching the Basics of Redox Biology to Medical and Graduate Students: Oxidants, Antioxidants and Disease Mechanisms." *Redox Biology* 1 (1): 244–57. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.014>.
- Kanwal, Abhinav, Vinodkumar B. Pillai, Sadhana Samant, Madhu Gupta, and Mahesh P. Gupta. 2019. "The Nuclear and Mitochondrial Sirtuins, Sirt6 and Sirt3, Regulate Each Other's Activity and Protect the Heart from Developing Obesity-mediated Diabetic Cardiomyopathy." *The FASEB Journal* 33 (10): 10872–88. <https://doi.org/10.1096/fj.201900767R>.
- Kim, Seulhee, Jiajia Song, Patrick Ernst, Mary N. Latimer, Chae Myeong Ha, Kah Yong Goh, Wenxia Ma, et al. 2020. "MitoQ Regulates Redox-Related Noncoding RNAs to Preserve Mitochondrial Network Integrity in Pressure-Overload Heart Failure." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 318 (3): H682–95. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00617.2019>.
- Kubli, Dieter A, Xiaoxue Zhang, Youngil Lee, Rita A Hanna, Melissa N Quinsay, Christine K Nguyen, Rebecca Jimenez, Susanna Petrosyan, Anne N Murphy, and Åsa B Gustafsson. 2012. "Parkin Protein Deficiency Exacerbates Cardiac Injury and Reduces Survival Following Myocardial Infarction \*." <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.411363>.
- Kuno, Atsushi, Masaya Tanno, and Yoshiyuki Horio. 2015. "The Effects of Resveratrol and SIRT1 Activation on Dystrophic Cardiomyopathy." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1348 (1): 46–54. <https://doi.org/10.1111/nyas.12812>.

- L -

- Li, Li, Qian Zhao, and Wei Kong. 2018. "Extracellular Matrix Remodeling and Cardiac Fibrosis." <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.013>.
- Liesa, Marc, Manuel Palacín, and Antonio Zorzano. 2009. "Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease." *Physiological Reviews*. American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2008>.
- Loyer, Xavier, Christophe Heymes, and Jane Lise Samuel. 2008. "Constitutive Nitric Oxide Synthases in the Heart from Hypertrophy to Failure." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 35 (4): 483–88. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.04901.x>.
- Lu, Jiaqi, Kuoyuan Cheng, Bo Zhang, Huan Xu, Yuanzhao Cao, Fei Guo, Xudong Feng, and Qing Xia. n.d. "Original Contribution Novel Mechanisms for Superoxide-Scavenging Activity of Human Manganese Superoxide Dismutase Determined by the K68 Key Acetylation Site." Accessed July 21, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.011>.

Lv, Tingting, Yao Lu, Yi Liu, Hong Feng, Chensheng Li, Wei Sheng, Zhengguo Cui, et al. 2021. “General Control of Amino Acid Synthesis 5-Like 1-Mediated Acetylation of Manganese Superoxide Dismutase Regulates Oxidative Stress in Diabetic Kidney Disease.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6691226>.

- M -

Ma, Sai, Jing Feng, Ran Zhang, Jiangwei Chen, Dong Han, Xiang Li, Bo Yang, et al. 2017. “SIRT1 Activation by Resveratrol Alleviates Cardiac Dysfunction via Mitochondrial Regulation in Diabetic Cardiomyopathy Mice.” <https://doi.org/10.1155/2017/4602715>.

Matsushima, Shouji, and Junichi Sadoshima. 2015. “The Role of Sirtuins in Cardiac Disease.” *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00053.2015>.

Mazat, Jean-Pierre, Anne Devin, and Stéphane Ransac. 2020. “Modelling Mitochondrial ROS Production by the Respiratory Chain.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 77: 455–65. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03381-1>.

Mendis, Shanthi, Kristian Thygesen, Kari Kuulasmaa, Simona Giampaoli, Markku Mahonen, Kathleen Ngu Blackett, and Liu Lisheng. 2011. “World Health Organization Definition of Myocardial Infarction: 2008-09 Revision.” *International Journal of Epidemiology* 40 (1): 139–46. <https://doi.org/10.1093/ije/dyq165>.

Meng, Guoliang, Jieqiong Liu, Shangmin Liu, Qiuyi Song, Lulu Liu, Liping Xie, Yi Han, and Yong Ji. 2018. “Hydrogen Sulfide Pretreatment Improves Mitochondrial Function in Myocardial Hypertrophy via a SIRT3-Dependent Manner.” *British Journal of Pharmacology* 175 (8): 1126–45. <https://doi.org/10.1111/bph.13861>.

Miao, Lu, and Daret K. St. Clair. 2009. “Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Disease.” *Free Radical Biology and Medicine* 47 (4): 344–56. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018>.

Migdal, Camille, and Mireille Serres. 2011. “Espèces Réactives de l’oxygène et Stress Oxydant” 27: 2011. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017>.

Miriyala, Sumitra, Ivan Spasojevic, Artak Tovmasyan, Daniela Salvemini, Zeljko Vujaskovic, Daret St. Clair, and Ines Batinic-Haberle. 2012. “Manganese Superoxide Dismutase, MnSOD and Its Mimics.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.002>.

Morales, Pablo E., Carla Arias-Durán, Yáreni Ávalos-Guajardo, Geraldine Aedo, Hugo E. Verdejo, Valentina Parra, and Sergio Lavandero. 2020. “Emerging Role of Mitophagy in Cardiovascular Physiology and Pathology.” *Molecular Aspects of Medicine*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.09.006>.

Morales, Pablo E, Carla Arias-Durán, Yáreni Ávalos-Guajardo, Geraldine Aedo, Hugo E Verdejo, Valentina Parra, and Sergio Lavandero. 2019. “Emerging Role of Mitophagy in Cardiovascular Physiology and Pathology.” <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.09.006>.



## Bibliographie

- Münzel, Thomas, Giovanni G. Camici, Christoph Maack, Nicole R. Bonetti, Valentin Fuster, and Jason C. Kovacic. 2017. “Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series.” *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier USA. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.035>.
- Murdoch, Colin E, David J Grieve, Alison C Cave, Yee Hoo Looi, Ajay M Shah, Christoph Thiemermann, and Magdi Yaqoob. 2006. “NADPH Oxidase and Heart Failure This Review Comes from a Themed Issue on Cardiovascular and Renal Edited.” *Current Opinion in Pharmacology* 6: 148–53. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.10.008>.
- Murphy, Elizabeth, and Charles Steenbergen. 2008. “Mechanisms Underlying Acute Protection from Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury.” *Physiological Reviews*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2007>.

## - N -

- Narita, Takeo, Brian T. Weinert, and Chunaram Choudhary. 2019. “Functions and Mechanisms of Non-Histone Protein Acetylation.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0081-3>.
- Nestler, Eric J, and Paul Greengard. 1999. “Protein Phosphorylation Is of Fundamental Importance in Biological Regulation.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28063/>.
- Nicolás-Ávila, José A., Ana V. Lechuga-Vieco, Lorena Esteban-Martínez, María Sánchez-Díaz, Elena Díaz-García, Demetrio J. Santiago, Andrea Rubio-Ponce, et al. 2020. “A Network of Macrophages Supports Mitochondrial Homeostasis in the Heart.” *Cell* 183 (1): 94-109.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.031>.
- Noma, Kensuke, Yasuki Kihara, and Yukihiro Higashi. 2017. “Is Serum Uric Acid a Biomarker, but Not a Mediator in Patients with Lifestyle and Cardiovascular Diseases?” *International Heart Journal* 58 (4): 467–69. <https://doi.org/10.1536/ihj.17-301>.

## - O -

- Orogo, Amabel M., and Åsa B. Gustafsson. 2013. “Cell Death in the Myocardium: My Heart Won’t Go On.” *IUBMB Life* 65 (8): 651–56. <https://doi.org/10.1002/iub.1180>.

## - P -

- Park, Kyung Chan, David C. Gaze, Paul O. Collinson, and Michael S. Marber. 2017. “Cardiac Troponins: From Myocardial Infarction to Chronic Disease.” *Cardiovascular Research* 113 (14): 1708–18. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx183>.

## Bibliographie

- Parodi-Rullán, Rebecca M., Xavier R. Chapa-Dubocq, and Sabzali Javadov. 2018a. “Acetylation of Mitochondrial Proteins in the Heart: The Role of SIRT3.” *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01094>.
- Perry, J. J.P., D. S. Shin, E. D. Getzoff, and J. A. Tainer. 2010. “The Structural Biochemistry of the Superoxide Dismutases.” *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.004>.
- Pillai, Vinodkumar B., Abhinav Kanwal, Yong Hu Fang, Willard W. Sharp, Sadhana Samant, Jack Arbiser, and Mahesh P. Gupta. 2017. “Honokiol, an Activator of Sirtuin-3 (SIRT3) Preserves Mitochondria and Protects the Heart from Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Mice.” *Oncotarget* 8 (21): 34082–98. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16133>.
- Pinto, Alexander R., Alexei Ilinykh, Malina J. Ivey, Jill T. Kuwabara, Michelle L. D’antoni, Ryan Debuque, Anjana Chandran, et al. 2016. “Revisiting Cardiac Cellular Composition.” *Circulation Research* 118 (3): 400–409. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307778>.
- Piquereau, Jerome, Fanny Caffin, Marta Novotova, Christophe Lemaire, Vladimir Veksler, Anne Garnier, Renee Ventura-Clapier, and Frederic Joubert. 2013. “Mitochondrial Dynamics in the Adult Cardiomyocytes: Which Roles for a Highly Specialized Cell?” *Frontiers in Physiology* 4 MAY. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00102>.
- Pougovkina, Olga, Heleen Te Brinke, Rob Ofman, Arno G Van Cruchten, Wim Kulik, Ronald J.A. Wanders, Sander M Houten, and Vincent C.J. De Boer. 2014. “Mitochondrial Protein Acetylation Is Driven by Acetyl-CoA from Fatty Acid Oxidation.” *Human Molecular Genetics* 23 (13): 3513–22. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu059>.
- Poulter, Neil. 2003. “Global Risk of Cardiovascular Disease.” In *Heart*. Vol. 89. [https://doi.org/10.1136/heart.89.suppl\\_2.ii2](https://doi.org/10.1136/heart.89.suppl_2.ii2).
- Prabhu, Sumanth D, and Nikolaos G Frangogiannis. 2016. “The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis.” *Circ Res* 119 (1): 91–112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>.
- Prola, Alexandre, Julie Pires Da Silva, Arnaud Guilbert, Lola Lecru, Jérôme Piquereau, Maxance Ribeiro, Philippe Mateo, et al. 2017. “SIRT1 Protects the Heart from ER Stress-Induced Cell Death through EIF2 $\alpha$  Deacetylation.” *Cell Death and Differentiation* 24 (2): 343–56. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.138>.
- Purushothaman, Sreeja, and R. Renuka Nair. 2016. “Mitoprotective Antioxidant EUK-134 Stimulates Fatty Acid Oxidation and Prevents Hypertrophy in H9C2 Cells.” *Molecular and Cellular Biochemistry* 420 (1–2): 185–94. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2788-9>.

## - Q -

- Qiu, Xiaolei, Katharine Brown, Matthew D. Hirschey, Eric Verdin, and Danica Chen. 2010. “Calorie Restriction Reduces Oxidative Stress by SIRT3-Mediated SOD2 Activation.” *Cell Metabolism* 12 (6): 662–67. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.11.015>.



- R -

- Rababa'h, Abeer M., Ashley N. Guillory, Rima Mustafa, and Tamara Hijjawi. 2018. "Oxidative Stress and Cardiac Remodeling: An Updated Edge." *Current Cardiology Reviews* 14 (1): 53–59. <https://doi.org/10.2174/1573403x14666180111145207>.
- Rapundalo, Stephen T. 1998. "Cardiac Protein Phosphorylation: Functional and Pathophysiological Correlates." *Cardiovascular Research*. Oxford Academic. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00063-7).
- Razeghi, Peter, Martin E. Young, Joseph L. Alcorn, Christine S. Moravec, O. H. Frazier, and Heinrich Taegtmeier. 2001. "Metabolic Gene Expression in Fetal and Failing Human Heart." *Circulation* 104 (24): 2923–31. <https://doi.org/10.1161/hc4901.100526>.
- Reddy, Koushik, Asma Khaliq, and Robert J Henning. 2015. "Recent Advances in the Diagnosis and Treatment of Acute Myocardial Infarction." *World J Cardiol* 7 (5): 243–76. <https://doi.org/10.4330/wjc.v7.i5.243>.
- Redout, Everaldo M., Annette Van Der Toorn, Marian J. Zuidwijk, Cees W.A. Van De Kolk, Cees J.A. Van Echteld, René J.P. Musters, Cornelis Van Hardeveld, Walter J. Paulus, and Warner S. Simonides. 2010. "Antioxidant Treatment Attenuates Pulmonary Arterial Hypertension-Induced Heart Failure." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 298 (3): 1038–47. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00097.2009>.
- Riehle, C., and J. Bauersachs. 2019. "Key Inflammatory Mechanisms Underlying Heart Failure." *Herz* 44 (2): 96–106. <https://doi.org/10.1007/s00059-019-4785-8>.
- Rimbaud, Stéphanie, Anne Garnier, and Renée Ventura-Clapier. 2009. "Mitochondrial Biogenesis in Cardiac Pathophysiology."
- Rosca, Mariana G, Bernard Tandler, and Charles L Hoppel. 2012. "Mitochondria in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure." <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.09.002>.
- Rowe, Glenn C, Aihua Jiang, and Zolt Arany. 2010. "PGC-1 Coactivators in Cardiac Development and Disease." Edited by Daniel P. Kelly. *Circulation Research* 107 (7): 825–38. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223818>.
- Rozovski, Uri, David M. Harris, Ping Li, Zhiming Liu, Preetesh Jain, Alessandra Ferrajoli, Jan Burger, et al. 2018. "STAT3 Is Constitutively Acetylated on Lysine 685 Residues in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells." *Oncotarget* 9 (72): 33710–18. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26110>.

- S -

- Sabbah, Hani N. 2016. "Targeting Mitochondrial Dysfunction in the Treatment of Heart Failure." *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 14 (12): 1305–13. <https://doi.org/10.1080/14779072.2016.1249466>.

## Bibliographie

- Sainte-Marie, Yannis, Malik Bissier, Florence Tortosa, and Frank Lezoualc'h. 2015. "Les Acteurs Moléculaires Du Remodelage Cardiaque Pathologique - Exemple Des Protéines Epac et Carabin." *Médecine/Sciences* 31 (10): 881–88. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153110014>.
- Santos, Leonardo, Carlos Escande, and Ana Denicola. 2016. "Potential Modulation of Sirtuins by Oxidative Stress." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2016/9831825>.
- Savoie, Christine, Octave Equine, Olivier Tricot, Olivier Nugue, Benoit Segrestin, Karine Sautière, Mariam Elkohen, et al. 2006. "Left Ventricular Remodeling After Anterior Wall Acute Myocardial Infarction in Modern Clinical Practice (from the REmodelage VEentriculaire [REVE] Study Group)." *American Journal of Cardiology* 98 (9): 1144–49. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.06.011>.
- Scher, Michael B., Alejandro Vaquero, and Danny Reinberg. 2007. "SirT3 Is a Nuclear NAD<sup>+</sup>-Dependent Histone Deacetylase That Translocates to the Mitochondria upon Cellular Stress." *Genes and Development* 21 (8): 920–28. <https://doi.org/10.1101/gad.1527307>.
- Schirone, Leonardo, Maurizio Forte, Silvia Palmerio, Derek Yee, Cristina Nocella, Francesco Angelini, Francesca Pagano, et al. 2017. "A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling." <https://doi.org/10.1155/2017/3920195>.
- Schüttler, Dominik, Sebastian Clauss, Ludwig T. Weckbach, and Stefan Brunner. 2019. "Molecular Mechanisms of Cardiac Remodeling and Regeneration in Physical Exercise." *Cells* 8 (10): 1128. <https://doi.org/10.3390/cells8101128>.
- Schwarz, Konstantin, Nishat Siddiqi, Satnam Singh, Christopher J. Neil, Dana K. Dawson, and Michael P. Frenneaux. 2014. "The Breathing Heart - Mitochondrial Respiratory Chain Dysfunction in Cardiac Disease." *International Journal of Cardiology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.12.014>.
- Scialò, Filippo, Daniel J. Fernández-Ayala, and Alberto Sanz. 2017. "Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease." *Frontiers in Physiology* 8 (JUN): 428. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00428>.
- Scolletta, Sabino, and Bonizella Biagioli. 2010. "Energetic Myocardial Metabolism and Oxidative Stress: Let's Make Them Our Friends in the Fight against Heart Failure." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 64 (3): 203–7. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.10.002>.
- Seddon, Mike, Yee H. Looi, and Ajay M. Shah. 2007. "Oxidative Stress and Redox Signalling in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure." *Heart* 93 (8): 903–7. <https://doi.org/10.1136/hrt.2005.068270>.
- Senf, Sarah M., Pooja B. Sandesara, Sarah A. Reed, and Andrew R. Judge. 2011. "P300 Acetyltransferase Activity Differentially Regulates the Localization and Activity of the FOXO Homologues in Skeletal Muscle." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 300 (6): C1490. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00255.2010>.
- Sepasi Tehrani, Hessam, and Ali Akbar Moosavi-Movahedi. 2018. "Catalase and Its Mysteries." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 140: 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001>.

- Sequeira, Vasco, and Christoph Maack. 2018. “Rebalancing Protein Phosphorylation in Heart Failure to Prevent Arrhythmias The Role of Raf Kinase Inhibitor Protein in Regulation of the Time Course of Cardiac Fibrosis View Project.” *Article in European Journal of Heart Failure*. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1315>.
- Shen, Peiye, Xiaojun Feng, Xiaoying Zhang, Xiaoyang Huang, Shenglan Liu, Xia Lu, Jingyan Li, et al. 2016. “SIRT6 Suppresses Phenylephrine-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy Though Inhibiting P300.” *Journal of Pharmacological Sciences* 132 (1): 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2016.03.013>.
- Shires, Sarah E., and Åsa B. Gustafsson. 2015. “Mitophagy and Heart Failure.” *Journal of Molecular Medicine* 93 (3): 253–62. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1254-6>.
- Siasos, Gerasimos, Vasiliki Tsigkou, Marinos Kosmopoulos, Dimosthenis Theodosiadis, Spyridon Simantiris, Nikoletta Maria Tagkou, Athina Tsimpiktsioglou, et al. 2018. “Mitochondria and Cardiovascular Diseases—from Pathophysiology to Treatment.” *Annals of Translational Medicine* 6 (12): 256–256. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.06.21>.
- Sies, Helmut. 2015. “Oxidative Stress: A Concept in Redox Biology and Medicine.” *Redox Biology* 4: 180–83. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.
- Singh, Chandra K., Gagan Chhabra, Mary Ann Ndiaye, Liz Mariely Garcia-Peterson, Nicholas J. MacK, and Nihal Ahmad. 2018. “The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling.” *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7290>.
- Song, Y. H., J. Wang, G. Nie, Y. J. Chen, X. Li, X. Jiang, and W. H. Cao. 2017. “MicroRNA-509-5p Functions as an Anti-Oncogene in Breast Cancer via Targeting SOD2.” *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 21 (16): 3617–25. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201708\\_13273](https://doi.org/10.26355/eurrev_201708_13273).
- Spinale, Francis G. 2007. “Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteinases: Influence on Cardiac Form and Function.” *Physiological Reviews*. American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2007>.
- Starheim, Kristian K., Kris Gevaert, and Thomas Arnesen. 2012. “Protein N-Terminal Acetyltransferases: When the Start Matters.” *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.02.003>.
- Suzuki, Keiichiro. 2009. “Anti-Oxidants for Therapeutic Use: Why Are Only a Few Drugs in Clinical Use? ☆.” <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.002>.

- T -

- Taegtmeyer, Heinrich, Shiraj Sen, and Deborah Vela. 2010. “Return to the Fetal Gene Program: A Suggested Metabolic Link to Gene Expression in the Heart.” In *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1188:191–98. Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05100.x>.

## Bibliographie

- Tanno, Masaya, Atsushi Kuno, Toshiyuki Yano, Tetsuji Miura, Shin Hisahara, Satoko Ishikawa, Kazuaki Shimamoto, and Yoshiyuki Horio. 2010. "Induction of Manganese Superoxide Dismutase by Nuclear Translocation and Activation of SIRT1 Promotes Cell Survival in Chronic Heart Failure." *Journal of Biological Chemistry* 285 (11): 8375–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.090266>.
- Tao, Randa, Athanassios Vassilopoulos, Loukia Parisiadou, Yufan Yan, and David Gius. 2014. "Regulation of MnSOD Enzymatic Activity by Sirt3 Connects the Mitochondrial Acetylome Signaling Networks to Aging and Carcinogenesis." *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5482>.
- Tao, Zhipeng, Limin Shi, Jane Parke, Louise Zheng, Wei Gu, X. Charlie Dong, Dongmin Liu, Zongwei Wang, Aria F. Olumi, and Zhiyong Cheng. 2021. "Sirt1 Coordinates with ER $\alpha$  to Regulate Autophagy and Adiposity." *Cell Death Discovery* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00438-8>.
- Tham, Yow Keat, Bianca C. Bernardo, Jenny Y.Y. Ooi, Kate L. Weeks, and Julie R. McMullen. 2015. "Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy and Heart Failure: Signaling Pathways and Novel Therapeutic Targets." *Archives of Toxicology*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1477-x>.
- Thygesen, Kristian, Joseph S. Alpert, Allan S. Jaffe, Bernard R. Chaitman, Jeroen J. Bax, David A. Morrow, Harvey D. White, et al. 2018. "Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)." *Circulation* 138 (20): e618–51. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000617>.
- Tilokani, Lisa, Shun Nagashima, Vincent Paupe, and Julien Prudent. 2018. "Mitochondrial Dynamics: Overview of Molecular Mechanisms." *Essays in Biochemistry* 62: 341–60. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>.
- Tsutsui, Hiroyuki, Shintaro Kinugawa, and Shouji Matsushima. 2011. "Oxidative Stress and Heart Failure." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 301 (6): 2181–90. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00554.2011>.

## - U -

- Umar, Soban, and Arnoud Van Der Laarse. 2010. "Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthase Isoforms in the Normal, Hypertrophic, and Failing Heart." *Molecular and Cellular Biochemistry* 333 (1–2): 191–201. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0219-x>.

## - V -

- Ventura-Clapier, Renée. 1998. "Créatine Kinases et Transferts d'énergie Dans Le Myocyte Cardiaque." *Médecine/Sciences*, October 1998.
- Ventura-Clapier, Renée, Anne Garnier, Vladimir Veksler, and Frédéric Joubert. 2010. "Bioenergetics of the Failing Heart ☆." <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.006>.

- Verdin, Eric, and Melanie Ott. 2015. "50 Years of Protein Acetylation: From Gene Regulation to Epigenetics, Metabolism and Beyond." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm3931>.
- Victorino, Vanessa Jacob, André Luiz Mencalha, and Carolina Panis. 2014. "Post-Translational Modifications Disclose a Dual Role for Redox Stress in Cardiovascular Pathophysiology." <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.11.008>.

- W -

- Walker, Lori A., David A. Fullerton, and Peter M. Buttrick. 2013. "Contractile Protein Phosphorylation Predicts Human Heart Disease Phenotypes." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 304 (12): H1644. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00957.2012>.
- Wang, Chunxin, and Richard J Youle. 2009. "The Role of Mitochondria." *Annual Review of Genetics* 43 (1): 95–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134850>.
- Wang, Hai Ning, Ji Lin Li, Tan Xu, Huai Qi Yao, Gui Hua Chen, and Jing Hu. 2020. "Effects of Sirt3-Autophagy and Resveratrol Activation on Myocardial Hypertrophy and Energy Metabolism." *Molecular Medicine Reports* 22 (2): 1342–50. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11195>.
- Wang, Xi-Ying, Fen Zhang, Chi Zhang, Liang-Rong Zheng, and Jian Yang. 2020. "The Biomarkers for Acute Myocardial Infarction and Heart Failure." *BioMed Research International* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2018035>.
- Wang, Xiao Xiao, Xu Lei Wang, Ming ming Tong, Lu Gan, Huali Chen, Si si Wu, Jia Xiang Chen, et al. 2016. "SIRT6 Protects Cardiomyocytes against Ischemia/Reperfusion Injury by Augmenting FoxO3 $\alpha$ -Dependent Antioxidant Defense Mechanisms." *Basic Research in Cardiology* 111 (2): 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0531-z>.
- Wang, Yonggang, Xiao Miao, Yucheng Liu, Fengsheng Li, Quan Liu, Jian Sun, and Lu Cai. 2014. "Dysregulation of Histone Acetyltransferases and Deacetylases in Cardiovascular Diseases." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Landes Bioscience. <https://doi.org/10.1155/2014/641979>.
- Webster, Keith A. 2012. "Mitochondrial Membrane Permeabilization and Cell Death during Myocardial Infarction: Roles of Calcium and Reactive Oxygen Species." <https://doi.org/10.2217/fca.12.58>.
- Wiedemann, Nils, and Nikolaus Pfanner. 2017. "Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly." *Annual Review of Biochemistry* 86 (1): 685–714. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014352>.
- Wu, Meng Yu, Giou Teng Yiang, Wan Ting Liao, Andy Po Yi Tsai, Yeung Leung Cheng, Pei Wen Cheng, Chia Ying Li, and Chia Jung Li. 2018. "Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury." *Cellular Physiology and Biochemistry* 46 (4): 1650–67. <https://doi.org/10.1159/000489241>.

- X -

- Xu, Tao, Wei Ding, Xiaoyu Ji, Xiang Ao, Ying Liu, Wanpeng Yu, and Jianxun Wang. 2019. “Oxidative Stress in Cell Death and Cardiovascular Diseases.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/9030563>.
- Xu, Yan S., Jinyuan J. Liang, Yumei Wang, Xiang Zhong J. Zhao, Li Xu, Ye Yang Xu, Quanli C. Zou, et al. 2016. “STAT3 Undergoes Acetylation-Dependent Mitochondrial Translocation to Regulate Pyruvate Metabolism.” *Scientific Reports* 6 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep39517>.

- Y -

- Yang, Jihong, Yufeng Liu, Xiaohui Fan, Zheng Li, and Yiyu Cheng. 2014. “A Pathway and Network Review on Beta-Adrenoceptor Signaling and Beta Blockers in Cardiac Remodeling.” *Heart Failure Reviews* 19 (6): 799–814. <https://doi.org/10.1007/s10741-013-9417-4>.
- Yun, Ui Jeong, and Dong Kwon Yang. 2020a. “Sinaptic Acid Inhibits Cardiac Hypertrophy via Activation of Mitochondrial Sirt3/SOD2 Signaling in Neonatal Rat Cardiomyocytes.” *Antioxidants* 9 (11): 1–17. <https://doi.org/10.3390/antiox9111163>.

- Z -

- Zelko, Igor N, Thomas J Mariani, and Rodney J Folz. 2002. “SUPEROXIDE DISMUTASE MULTIGENE FAMILY: A COMPARISON OF THE CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), AND EC-SOD (SOD3) GENE STRUCTURES, EVOLUTION, AND EXPRESSION.”
- Zhang, Liwen, Chwen-Lih Chen, Patrick T Kang, Zhicheng Jin, and Yeong-Renn Chen. 2017a. “Differential Protein Acetylation Assists Import of Excess SOD2 into Mitochondria and Mediates SOD2 Aggregation Associated with Cardiac Hypertrophy in the Murine SOD2-Tg Heart HHS Public Access.” *Radical Biol Med* 108: 595–609. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.022>.
- Zhang, Liwen, Chwen Lih Chen, Patrick T. Kang, Zhicheng Jin, and Yeong Renn Chen. 2017b. “Differential Protein Acetylation Assists Import of Excess SOD2 into Mitochondria and Mediates SOD2 Aggregation Associated with Cardiac Hypertrophy in the Murine SOD2-Tg Heart.” *Free Radical Biology and Medicine* 108 (July): 595–609. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.022>.
- Zhang, Xiaoying, Wei Li, Peiye Shen, Xiaojun Feng, Zhongbao Yue, Jing Lu, Jia You, et al. 2016. “STAT3 Suppression Is Involved in the Protective Effect of SIRT6 Against Cardiomyocyte Hypertrophy.” *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 68 (3): 204–14. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000404>.

## Bibliographie

- Zhang, Xuefei, Xiaoqing Ren, Qi Zhang, Zheyi Li, Shuaipeng Ma, Jintao Bao, Zeyang Li, et al. 2016. "PGC-1 $\alpha$ /ERR $\alpha$ -Sirt3 Pathway Regulates DAergic Neuronal Death by Directly Deacetylating SOD2 and ATP Synthase  $\beta$ ." *Antioxidants and Redox Signaling* 24 (6): 312–28. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6403>.
- Zhang, Yixuan, Priya Murugesan, Kai Huang, and Hua Cai. 2020. "NADPH Oxidases and Oxidase Crosstalk in Cardiovascular Diseases: Novel Therapeutic Targets." *Nature Reviews Cardiology* 17 (3): 170–94. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0260-8>.
- Zhou, Bo, and Rong Tian. 2018. "Mitochondrial Dysfunction in Pathophysiology of Heart Failure." *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI120849>.
- Zhou, Pingzhu, and William T. Pu. 2016. "Recounting Cardiac Cellular Composition." *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308139>.
- Zorov, Dmitry B., Magdalena Juhaszova, and Steven J. Sollott. 2014. "Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release." *Physiological Reviews*. American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>.
- Zuurbier, Coert J., Luc Bertrand, Christoph R. Beauloye, Ioanna Andreadou, Marisol Ruiz-Meana, Nicholas R. Jespersen, Duvaraka Kula-Alwar, et al. 2020. "Cardiac Metabolism as a Driver and Therapeutic Target of Myocardial Infarction." *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15180>.

# *Annexes*





## *Annexe 1 :*

**Mitochondrial-targeted therapies require mitophagy to prevent oxidative stress induced by cardiac hypertrophy (soumis).**

Peugnet V, Chwastyniak W, Lancel S, Bultot L, Fourny N, Beseme O, Loyens A, Heyse W, Amouyel P, Bertrand L, Pinet F, Dubois-Deruy E.



## **Mitochondrial-targeted therapies require mitophagy to prevent oxidative stress induced by cardiac hypertrophy**

Victoriane Peugnet, MSC<sup>a</sup>, Maggy Chwastyniak, MSC<sup>a</sup>, Steve Lancel, PhD<sup>a</sup>, Laurent Bultot, PhD<sup>b</sup>, Natacha Fourny, PhD<sup>b</sup>, Olivia Beseme, MSC<sup>a</sup>, Anne Loyens, MSC<sup>c</sup>, Wilfried Heyse, MSC<sup>a</sup>, Philippe Amouyel, MD, PhD<sup>a</sup>, Luc Bertrand, PhD<sup>b</sup>, Florence Pinet, PhD<sup>a\*</sup>, and Emilie Dubois-Deruy, PhD<sup>a\*</sup>

*<sup>a</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, F-59000 Lille, France*

*<sup>b</sup> Pole of Cardiovascular Research, Institut de recherche expérimentale et clinique, UCLouvain, Bruxelles, Belgium*

*<sup>c</sup> Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, UMR9020-UMR-S 1277-Canther-Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France*

\*Corresponding authors:

Dr Emilie Dubois-Deruy and Dr Florence Pinet, INSERM U1167-IPL, 1 rue du professeur Calmette, 59019 Lille cedex, France. Tel: +33 (0)3 20 87 73 62 / +33 (0)3 20 87 72 15. Fax: (33) 3 20 87 78 94.

E-mail: emilie.deruy@pasteur-lille.fr / Florence.pinet@pasteur-lille.fr

ORCID number: 0000-0002-9811-617X / 0000-0002-5471-1487

## **Mitochondrial-targeted therapies require mitophagy to prevent oxidative stress induced by cardiac hypertrophy**

Heart failure, mostly associated with cardiac hypertrophy, is a major cause of illness and death. Oxidative stress causes contractile failure and the accumulation of reactive oxygen species leads to mitochondrial dysfunction, associated with heart failure, suggesting that mitochondria-targeted therapies could be effective in this context. The purpose of this work was to characterize how mitochondrial oxidative stress is involved in cardiac hypertrophy and to determine if mitochondria-targeted therapies could improve phenotypes. We used neonatal (NCMs) and adult (ACMs) rat cardiomyocytes hypertrophied by isoproterenol (Iso) to induce an increase of mitochondrial superoxide anion. To counteract the mitochondrial oxidative stress induced by hypertrophy, we evaluated the impact of two anti-oxidants, mitoquinone (MitoQ) and EUK 134. Both significantly decreased mitochondrial superoxide anion and hypertrophy in hypertrophied NCMs and ACMs. Conversely to EUK 134 which preserved cell functions, MitoQ impaired mitochondrial function by decreasing maximal mitochondrial respiration, mitochondrial membrane potential and mitophagy (particularly parkin expression) and altering mitochondrial structure. The same decrease of parkin was found in human cardiomyocytes but not in fibroblasts suggesting a cell-specific deleterious effect of MitoQ. We validated by siRNA, the key role of parkin in mitochondrial biogenesis. Our data showed the importance of mitochondrial oxidative stress in the development of cardiomyocyte hypertrophy. We observed that targeting mitochondria by MitoQ impaired metabolism by defective mitophagy leading to accumulation of deficient mitochondria specifically in cardiomyocytes. Interestingly, the SOD mimic (EUK 134) decreased both oxidative stress and cardiomyocyte hypertrophy and restored impaired cardiomyocyte metabolism and mitochondrial biogenesis, suggesting its beneficial therapeutic potential.

Keywords: anti-oxidants, cardiac hypertrophy, mitochondrial dysfunction, mitophagy, oxidative stress, parkin

**Abbreviations:**

Acetylated form of SOD2 in lysine 68 (SOD2acK68); adult rat cardiomyocytes (ACMs); antimycin A (AA); bafilomycin A (Baf), carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), heart failure (HF); human cardiac myocytes (HCMs); isoproterenol (Iso); hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT); mitofusin 2 (Mfn2); mitochondrial fission 1 protein (Fis1); mitoquinone (MitoQ); rat neonatal cardiac fibroblasts (NCFs); neonatal rat cardiac myocytes (NCMs); NADPH Oxidase 4 (NOX4); nuclear respiratory factor (NRF); peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1 $\alpha$ ); peroxiredoxin-1 (Prx-1); reactive oxygen species (ROS); real time cell analysis (RTCA), superoxide dismutase (SOD).

|

## **Introduction**

Heart failure (HF) remains a major cause of illness and death and its prevalence is increasing with a high rate of morbidity and mortality [1]. Despite major significant advances, HF remains a therapeutic challenge, and several adverse consequences of HF are still poorly controlled. The common phenotype associated with HF is the development of cardiac hypertrophy, defined as an increase in heart size in order to compensate the increase in cardiac workload.

Oxidative stress, characterized by imbalanced reactive oxygen species (ROS) production and anti-oxidant defences, plays an important role in regulating a wide variety of cellular functions, including gene expression, cell growth and death [2]. ROS cause contractile failure and structural damage in the myocardium [2] and activate a broad variety of prohypertrophy signalling kinases and transcription factors [3]. ROS production is well described to increase in several animal models of cardiac diseases [4] such as cardiac alterations associated with obesity [5], myocardial infarction [6] or cardiomyocytes hypertrophy [7]. Moreover, the accumulation of ROS in cells and tissues leads to mitochondrial dysfunction, defined as decreased mitochondrial biogenesis, mitochondria's number and altered membrane potential [8]. Cardiac stress-induced mitophagy, the mitochondria selectively targeted autophagy, helps to remove damaged and dysfunctional mitochondria, thus preventing oxidative damage that could in turn initiate apoptosis and ultimately lead to HF [9]. Indeed, impaired mitochondrial function is associated with aging and HF [10], suggesting that mitochondria-targeted therapies could be effective in HF [11,12].

In this context, mitoquinone (MitoQ) [5,13], a derivative of coenzyme Q and EUK 134 [14], an antioxidant with superoxide dismutase activity, have been demonstrated to effectively improve mitochondrial function and attenuate redox-related cardiomyopathies. Nevertheless, some studies, notably in cancer cells, described that

MitoQ could lead to ROS production, rapid membrane depolarization and apoptotic cell death [15–17]. In this context, the purpose of this work was (1) to characterize how mitochondrial oxidative stress is involved in cardiac hypertrophy and (2) to determine if mitochondria-targeted therapies could improve cardiac phenotypes.

## **Results**

### ***Characterization of mitochondrial oxidative stress and biogenesis in hypertrophied neonatal rat cardiomyocytes***

To understand the impact of oxidative stress in cardiac hypertrophy specifically in the cardiomyocytes, we used the model of hypertrophied neonatal rat cardiomyocytes (NCMs) [18]. First, the cell index quantified by Real Time Cell Analysis (RTCA) technology was used to determine the time point from which the NCMs profiles were stable. Indeed, the curve shows the dynamic change in the cell index, which represents a relative change in electrical impedance depending on the proliferation of the cultured cells (first exponential phase) (Fig. S1A). After serum privation, the curve stabilized and then we observed a decrease in cell index in early time of treatment of cardiomyocytes (120 min). Finally, the global cell index was similar between control (PBS) and hypertrophied NCMs (Isoproterenol (Iso)) (Fig. S1A). Based on this data, we have chosen 24h of Iso treatment for the following experiments. We validated the development of hypertrophy in NCMs with a significant increase of cell area (Fig. 1A) and observed a significant increase in mitochondrial superoxide anion levels quantified after 24h of hypertrophy with MitoSOX probe (Fig. 1B) as well as a significant decrease in NADPH oxidase 4 (NOX4) (Fig. 1C) without any mitochondrial hydrogen peroxide accumulation (Fig. S1B).

We also quantified anti-oxidant enzymes and observed no significant modulation of catalase, superoxide dismutase 1 (SOD1) and peroxiredoxin-1 (Prx1)



(Fig. S1C) due to hypertrophy. We previously showed that SOD2 was significantly increased during HF [19]. As the lysine 68 (K68) is the most important acetylation site contributing to SOD2 inactivation [20], we quantified the SOD2 acetylated on lysine 68 (SOD2acK68) and observed a significant increase of the SOD2acK68/SOD2 ratio with no modulation of total SOD2 expression (Fig. 1D), meaning that SOD2 activity is significantly decreased in hypertrophied NCMs. We confirmed a mitochondrial localization of SOD2 shown by a colocalization with mitotracker probe (Fig. 1E), with no impact of Iso treatment on the mitochondrial localization of SOD2 (Pearson coefficient: 0.805 for PBS, 0.806 for Iso) (Fig. 1E and S1D). We also confirmed that SOD2 and SOD2acK68 are both localized in mitochondria independently of Iso treatment by subcellular fractionation (Fig. S1E).

As SOD2 is a mitochondrial enzyme, we then investigated the main regulator of mitochondrial biogenesis, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1 $\alpha$ ) and its transcriptional coactivators nuclear respiratory factor (NRF)1 and NRF2 as well as different molecules involved in mitochondrial fusion and fission in hypertrophied NCMs. We first observed a significant decrease of mitochondrial biogenesis quantified by PGC1 $\alpha$ , NRF1 and NRF2 RNA levels (Fig. 1F and S1F). Moreover, RNA levels of mitofusin 2 (Mfn2) as well as mitochondrial fission 1 protein (Fis 1) were significantly decreased in hypertrophied NCMs (Fig. 1F).

All these results suggested that mitochondrial biogenesis is impaired during hypertrophy, which is corroborated by electronic microscopy showing a significant decrease of the number of altered (loss of electron-dense matrix) and larger (significant increased length, width and area) mitochondria (Fig. 1G). We also observed a significant decrease of aconitase 2, an enzyme of Krebs cycle reflecting mitochondrial function (Fig. 1H). We then quantified mitochondrial respiration by oxygraphy using

isolated NCMs treated or not with Iso. We observed a classical profile, including: basal respiration, ATP production-coupled respiration (oligomycin A), maximal and reserve capacities (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP)) and non-mitochondrial respiration (antimycin A (AA)) but we did not observe any significant modulation of oxygen consumption upon Iso treatment compared to untreated NCMs (Fig. S1G). These results suggested that mitochondria biogenesis is strongly decreased, with no detectable impact on oxygen consumption, during cardiac hypertrophy induced by  $\beta$ -adrenergic stimulation.

### ***Characterization of mito(auto)phagy in hypertrophied NCMs***

As mitophagy is the selective pathway of degradation of defective mitochondria, we investigated how hypertrophy could affect this process. As the inner mitochondrial membrane depolarization is the precursor step for mitophagy, we first used the JC-1 dye, with a green fluorescence emission for the monomeric form of the probe and a red fluorescent emission for a concentration-dependent formation of J-aggregates. We observed a significant mitochondrial depolarization, indicated by the decreased red/green ratio, in hypertrophied NCMs after 24h of Iso (Fig. 2A). We then quantified the proteins involved in mitophagy/autophagy process. As previously shown [21], Iso treatment induced a decrease of mitophagy/autophagy with a significant decrease of parkin and LC3II/LC3I ratio (Fig. 2B). No modulation of ubiquitinated proteins and beclin-1 was observed (Fig. 2B). To determine if autophagy is active, NCM were treated by Bafilomycin A (Baf) to inhibit the autophagosome–lysosome fusion. This inhibition induced an increase of LC3I, LC3II and LC3II/LC3I ratio, but not of parkin, showing that autophagy is decreased but still active in hypertrophied NCMs (Fig. 2C).

### ***Effect of mitochondrial anti-oxidant (MitoQ) and SOD mimic (EUK 134) on oxidative stress in hypertrophied neonatal rat cardiomyocytes***

To prevent cardiac hypertrophy induced by oxidative stress, we pre-treated NCMs with two antioxidants, MitoQ, a derivative of coenzyme Q that target ROS in mitochondria and the EUK 134, a mimic of SOD, non-specific of mitochondria. First, we observed two phases in cell index of NCMs pre-treated by MitoQ with an increase during the first 2h, corresponding to the pre-treatment followed by a progressive but significant decrease of cell index during the next 24h (Fig. 3A). As expected, we quantified a significant decrease in cardiomyocytes area as well as in superoxide anion production in NCM pre-treated by MitoQ before Iso treatment (Fig. 3B and 3C). More surprisingly, we observed a significant increase of NOX4 RNA levels in NCM pre-treated by MitoQ (Fig. 3D). Interestingly, the SOD2acK68/SOD2 ratio is significantly decreased, reflecting an increase of SOD2 activity in NCMs pre-treated by MitoQ (Fig. 3E). Finally, the pre-treatment did not affect SOD2 mitochondrial localization, as confirmed by colocalisation with the mitotracker probe but we observed that the mitochondria seem altered in NCMs pre-treated by MitoQ (Fig. 3F). We also quantified the other anti-oxidant enzymes and observed no modulation of catalase but a significant decrease of Prx-1 and SOD1 in NCMs pre-treated by MitoQ (Fig. S2A).

We did not observe significant changes of cell index in NCMs pre-treated by EUK 134 compared to NCMs only treated with Iso (Fig. 3G). As expected, we quantified a significant decrease in cardiomyocytes area as well as in superoxide anion production in NCM pre-treated by EUK 134 before Iso treatment (Fig. 3H and 3I) without modulation of NOX4 RNA levels in NCM pre-treated by EUK 134 (Fig. 3J). Conversely to MitoQ pre-treatment, the SOD2acK68/SOD2 ratio is not modulated in NCMs pre-treated by EUK 134 (Fig. 3K). EUK 134 pre-treatment did not affect SOD2 mitochondrial localization, as confirmed by colocalisation with the mitotracker probe

(Fig. 3L). No modulation of the anti-oxidant enzymes was observed in NCMs pre-treated by EUK 134 (Fig. S2B).

***Differential effect of mitochondrial anti-oxidant (MitoQ) and SOD mimic (EUK 134) on mitochondrial biogenesis in hypertrophied rat cardiomyocytes***

In order to understand how the two antioxidants, MitoQ and EUK 134 act differently in cardiomyocytes, we investigated the mitochondrial biogenesis and respiration in hypertrophied NCM pre-treated with MitoQ and EUK 134. Interestingly, we quantified a significant increase of both NRF1 and NRF2 without modulation of PGC1 $\alpha$  RNA levels (Fig. S2C) in NCMs pre-treated by MitoQ. Moreover, RNA levels of Mfn2 and Fis 1 were not modulated in hypertrophied NCMs pre-treated with MitoQ (Fig. S2C). In the other hand, we did not observe any significant modulation of PGC1 $\alpha$ , NRF1, NRF2, Mfn 2 and Fis 1 in NCMs pre-treated with EUK 134 (Fig. S2D). All these results indicated that EUK 134 did not impact mitochondrial biogenesis conversely to the effect of MitoQ.

Finally, we quantified mitochondrial respiration and observed a significant decrease of oxygen consumption with a loss of respiration capacity (shown by no response to CCCP) in hypertrophied NCMs pre-treated with MitoQ whereas no difference of oxygen consumption was observed in NCM pre-treated by EUK 134 (Fig. 4A). Moreover, electronic microscopy showed an aggravation of mitochondria alteration after pre-treatment with MitoQ as indicated by the increased mitochondria area, length and width associated with an important loss of electron-dense matrix whereas mitochondria were not affected by EUK 134 pre-treatment compared to only Iso treatment (Fig. 4B). We also observed a significant and stronger decrease of aconitase 2 in hypertrophied NCMs pre-treated with MitoQ whereas the pre-treatment with EUK 134 did not modulate aconitase 2 expression (Fig. 4C).

Of note, all these data were confirmed in NCMs only pre-treated with MitoQ or EUK 134 (Fig. S3A-D). These results showed that mitochondria biogenesis and function are highly altered by MitoQ, independently of Iso treatment whereas mitochondrial biogenesis and function are not affected by the anti-oxidant and anti-hypertrophic effect of EUK 134.

***Differential effect of mitochondrial anti-oxidant (MitoQ) and SOD mimic (EUK 134) on mitophagy in hypertrophied rat cardiomyocytes***

As mitophagy is the selective pathway of degradation of defective mitochondria, we investigated how the two antioxidants, MitoQ, and EUK 134 could affect this process. We first used the JC-1 dye and quantified a significant and stronger decrease of the red/green ratio in hypertrophied NCMs pre-treated with MitoQ whereas the pre-treatment with EUK 134 increased significantly the mitochondrial membrane potential (Fig. 4D). We then quantified the proteins involved in mitophagy/autophagy process. Interestingly, parkin expression was completely suppressed by MitoQ (alone or with Iso) (Fig. 4E and S3E) and MitoQ pre-treatment significantly decreased the expression of beclin-1 and LC3I without modulation of ubiquitinated proteins (Fig. 4E), suggesting a dysregulation of mitophagy/autophagy induced by MitoQ. To determine if autophagy is active, NCM were treated by Baf at the same time of MitoQ and Iso treatment. The inhibition of the autophagosome–lysosome fusion did not modulate the LC3II/LC3I ratio, suggesting that autophagy is inactive in hypertrophied NCMs pre-treated with MitoQ (Fig. S3F). Conversely, EUK 134 pre-treatment did not impact mitophagy/autophagy process (Fig. S3G).

***Effect of parkin depletion on hypertrophy, oxidative stress, mitochondrial biogenesis and mitophagy in neonatal rat cardiomyocytes***

To understand how the decrease of parkin induced by MitoQ could affect the NCMs, we transfected NCMs with the siRNA specifically targeting rat parkin mRNA (si prk). First, the cell index quantified by RTCA technology is non-significantly decreased in NCMs transfected with si prk compared to the non-target (si NT) (Fig. 5A). The depletion of parkin did not impact the morphology of NCMs with no modulation of cell area (Fig. 5B) but induced a significant decrease of mitochondrial superoxide anion production (Fig. 5C). This decrease could be explained by a significant alteration of mitochondria reflected by a significant accumulation of aconitase 2, despite no modulation of SOD2 (Fig. 5D). We also quantified the mitochondrial biogenesis by PGC1 $\alpha$ , NRF1 and NRF2, Mfn2 and Fis 1 and observed a significant decrease of NRF1 and NRF2 in NCMs transfected by si prk (Fig. 5E), thus validating a mitochondrial defect.

We then investigated how mitophagy is impacted by parkin depletion. We first used the JC-1 dye and quantified a significant mitochondrial depolarization shown by the decreased red/green ratio in NCMs silenced for parkin (Fig. 5F). We then quantified the proteins involved in mitophagy/autophagy process. As expected, parkin expression was completely suppressed by siRNA but LC3II and LC3II / LC3I ratio were significantly increased without modulation of ubiquitinated proteins and beclin-1 (Fig. 5G), suggesting a dysregulation of mitophagy/autophagy induced by parkin depletion.

#### ***Cardiomyocyte-specificity of the impact of mitochondrial anti-oxidant (MitoQ) on mitophagy***

We then, tested these two antioxidants MitoQ and EUK 134 on hypertrophied adult cardiomyocytes (ACMs). As expected, Iso induced a significant increase of cell area (Fig. 6A) and mitochondrial superoxide anion (Fig. 6B). We did not observe any modulation in cardiomyocytes area in ACMs pre-treated by EUK 134 compared to Iso

alone (Fig. 6A) despite a significant decrease in superoxide anion production (Fig. 6B). We also quantified a significant and progressive decrease in superoxide anion production in ACMs pre-treated by MitoQ before Iso (Fig. 6C). Moreover, we observed in parallel a constant decrease in cell number, probably due to strong cell mortality (Fig. 6C). These data showed the same effect of the two antioxidants in neonatal and adult rat cardiomyocytes.

Interestingly, we did not observe any modulation of mitophagy/autophagy proteins in neonatal cardiac fibroblasts (NCFs) (Fig. S4A), suggesting that the impact of MitoQ on mitophagy is specific of cardiomyocytes. Of note, the pre-treatment of NCFs with EUK-134 did not alter the mitophagy/autophagy process (Fig. S4B).

We then quantified the mitophagy/autophagy proteins in human cardiomyocytes (HCMs) and we observed a significant decrease of parkin in HCMs pre-treated by MitoQ (Fig. 6D) without modulation of some proteins involved in autophagy (ubiquitinated proteins and beclin-1). Surprisingly, we observed a single band for LC3, probably LC3I, which is significantly increased in HCMs pre-treated by MitoQ as observed in NCMs (Fig. 4D). These data validated the key role of parkin in cardiomyocyte to prevent oxidative stress.

## **Discussion**

In this paper, we characterized how mitochondrial oxidative stress is involved in cardiac hypertrophy and how mitochondria-targeted therapies act to prevent these effects. We also highlighted the key role of mitophagy in the deleterious effect of mitochondrial anti-oxidant (MitoQ) in mitochondrial biogenesis despite its beneficial effect by reducing mitochondrial oxidative stress and cardiomyocytes hypertrophy.

Oxidative stress is considered as a major regulator of the signal transduction in cardiac cells under pathological conditions. The understanding of the

pathophysiological mechanisms which are involved in cardiac hypertrophy and remodeling process is crucial for the development of new therapeutic strategies [3]. Here, we used an in vitro model of hypertrophied cardiomyocytes [18] to decipher the impact of oxidative stress. We observed an increase in mitochondrial oxidative stress associated with mitochondrial dysfunction. Indeed, excessive ROS production with mitochondrial dysfunction have been described to induce irreversible damage to mitochondria, leading to the development of cardiovascular diseases [8]. For example, an increase in mitochondrial ROS production has been described in a murine model of myocardial infarction induced by 4 weeks of coronary ligation [22] and ROS-generated by angiotensin II stimulation induced mitochondrial dysfunction, cardiomyocytes hypertrophy and HF [7]. Moreover, mitophagy, the selective autophagic removal of mitochondria, is essential for clearing away the defective mitochondria but can also lead to cell damage and death if excessive. At cardiovascular levels, mitophagy is involved in metabolic activity, cell differentiation, apoptosis and other physiological processes as reviewed recently [9].

Here, we showed that mitochondrial oxidative stress is associated with an inactivation of SOD2 by acetylation. SODs are metalloproteins able to catalyze the transformation of superoxide anion into hydrogen peroxide and it is the most effective antioxidant enzyme in humans [4]. The acetylation of K68 site is the most important acetylation site contributing to SOD2 inactivation [20] and to hypertension [23]. Inhibition of SOD2 expression induced both mitochondrial oxidative stress and hypertrophy of cardiomyoblasts [19] and mice deficient in SOD2 die of cardiomyopathy within 10 days of birth whereas the heterozygous SOD2 (+/-) mice show ultrastructural damage of the myocardium associated with an increased oxidative stress [24].



It was suggested that mitochondria-targeted therapies could be effective in HF [11,12]. In this context, we selected two anti-oxidants molecules, one targeting the mitochondria, the mitochondrial derivative of coenzyme Q (MitoQ) and one anti-oxidant with superoxide dismutase activity (EUK 134), whose pre-treatment decreased Iso-induced hypertrophy and mitochondrial oxidative stress. Surprisingly, we observed a deleterious effect of MitoQ on mitochondrial function and mitophagy. Controversial data described a protective or deleterious role of MitoQ. Indeed, in vitro, MitoQ has been described to prevent oxidative stress and alterations in mitochondrial proteins observed in palmitic acid-stimulated cardiomyoblasts [5]. In vivo, MitoQ reduced cardiac oxidative stress and prevented the development of cardiac fibrosis and hypertrophy in obese rats [5]. MitoQ could also significantly improved left ventricular dysfunction and increased metabolism-related gene expression in mice subjected to ascending aortic constriction [13]. These discrepancies could be explained by the cell-specificity. Indeed, here, we observed specifically a decrease in parkin expression in the human and rat cardiomyocytes but not in the fibroblasts. Nevertheless, according to our data, some studies, notably in cancer cells, described that MitoQ could lead to ROS production, rapid membrane depolarization and apoptotic cell death [15,16]. Indeed, MitoQ could cause mitochondrial swelling and depolarization in kidney proximal tubule cells by a mechanism non-related to the anti-oxidant activity but most likely because of the increased inner mitochondrial membrane permeability due to insertion of the alkyl chain [17]. These side effects of MitoQ are in accordance with our data showing impaired cardiomyocytes respiration, in link with the mitochondria ultrastructure and mitochondrial membrane potential alterations. The more striking point is the abolished expression of parkin upon MitoQ treatment leading to defective mitophagy and accumulation of deficient mitochondria in cardiomyocytes. We confirmed the key role

of parkin by its silencing in cardiomyocyte showing a defect in mitochondrial biogenesis and function.

Interestingly, the other anti-oxidant, EUK 134 seems more promising with no obvious side effects. Until now, EUK 134 was described to decrease hypertrophy and oxidative stress and restore mitochondrial membrane potential in cardiomyoblasts H9c2 hypertrophied by phenylephrine [14]. In vivo, EUK 134 improved remodelling induced by hindlimb unloading as well as atrophy of muscle fibers by decreasing ROS production [25] and attenuated cardiomyocyte hypertrophy, oxidative stress, proapoptotic signalling and interstitial fibrosis in congestive HF in the rat monocrotaline model of pulmonary arterial hypertension. Here, this SOD mimic restored impaired cardiomyocyte metabolism and mitochondrial biogenesis without affecting mitophagy. Its effect on mitochondrial oxidative stress was observed both in neonatal and adult cardiomyocytes.

In conclusion, anti-oxidant therapeutic strategies should take into account the functional interaction between mitochondrial dynamism, biogenesis and mitophagy [26].

The new hypothesis related to this work are that both anti-oxidant (MitoQ and EUK 134) improve cardiac hypertrophy and ROS production in cardiomyocytes but MitoQ induces impaired mitochondria morphology, oxygen respiration and membrane potential through a defect in mitophagy, specifically in cardiomyocytes whereas EUK 134 restores impaired cardiomyocyte metabolism and mitochondrial biogenesis (Fig. 7).

## **Materials and Methods**

### ***Cell Culture***

### *Primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes and fibroblasts*

Primary cultures of NCMs and NCFs were prepared from heart ventricles of 1- or 2-day-old rats, killed by decapitation as previously described [27,28]. Briefly, cardiac cells were dissociated by enzymatic digestion with 0.04% collagenase II (Worthington, LS004176) and 0.05% pancreatin (Sigma-Aldrich, P3292) at 37°C. NCMs and NCFs were removed from cell suspension by centrifugation 30 min at 3000 rpm in a discontinuous Percoll gradient (bottom 58.5%, top 40.5%) (Sigma-Aldrich, P4937).

NCMs were seeded at a density 4 or 8 × 10<sup>5</sup> cells/well in 6-well plates coated with 0.01% of collagen (Sigma-Aldrich, C8919) and cultured in a medium containing DMEM/Medium199 (4:1), 10% horse serum (Thermo Fisher Scientific, 16050-122), 5% fetal bovine serum (LGC Standards, 30-2020), 1% penicillin and streptomycin (P/S) (10 000 U/mL) (Thermo Fisher Scientific, 15140-122) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. NCMs were starved for 24h before Isoproterenol (Iso, 10 µmol/L) (Tocris Bioscience ,1747) or PBS (as control) treatment for 24h. A pre-treatment of MitoQ (1 µmol/L, 2h) (10-1363, Clinisciences), EUK 134 (10 µmol/L, 1h) (Euromedex, S4261) or DMSO (as control) were also used. For autophagy experiments, Baf (10 nmol/L) (Sigma-Aldrich, B1793) could also be added during 24h at the same time of the pre-treatment with both anti-oxidants and the totality of Iso treatment.

NCFs were seeded at a density 3.5 × 10<sup>5</sup> cells/well in 6-well plates and cultured in a medium containing DMEM/Glutamax (Thermo Fisher Scientific, 31966047), 10% fetal bovine serum, 1% P/S at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. NCFs were starved for 24h before pre-treatment of MitoQ (1 µmol/L, 2h), EUK 134 (10 µmol/L, 1h) or DMSO (as control). Cells were then maintained during 24h in the privation medium.

### *Transfection with parkin siRNA*

The siRNA specifically targeting rat parkin mRNA (si prk) and non-targeting control (si NT) were used (ON-TARGETplus Rat Prkn (56816) siRNA - SMARTpool, Horizon Discovery, #L-090709-02-0010). NCMs were plated (650 000 cells/well) in 6-well plates and were allowed to grow for 24h without P/S. Parkin or NT siRNA (25 nmol/L) were transfected with 4  $\mu$ L of the DharmaFECT® reagent (Horizon Discovery, T-2001-03) according to the manufacturer's recommendations. Total cell extracts were collected 72h after transfection.

### *Primary cultures of adult rat cardiomyocytes*

ACMs were isolated as previously described [29]. Briefly, hearts were collected from male Wistar rats and perfused in Krebs-Henseleit buffer containing 10 mmol/L HEPES, 5 mmol/L glucose, 2 mmol/L pyruvate and 25 mmol/L NaCl. Hearts were then digested in Krebs-Henseleit buffer containing 1mg/mL collagenase type II and 0.4% free fatty acid BSA for 30 min at 37°C. After collagenase perfusion, hearts were removed from the perfusion apparatus, cut in small fragments and incubated under agitation for 10 min at 37°C in Krebs-Henseleit Buffer containing 0.02 mmol/L CaCl<sub>2</sub>. Calcium chloride was progressively added to the medium to reach 1 mmol/L final concentration. After sedimentation and washing, cells were finally resuspended in MEM medium containing 20 mmol/L HEPES, 2.5% fetal bovine serum and 2% P/S and equally seeded in 3-cm diameter wells (20 wells for one digested heart) previously coated with laminin and incubated at 37°C for at least 1h. Two hours after seeding, ACMs were starved for 24h before Iso (50  $\mu$ mol/L) or PBS (as control) treatment for 48h. A pre-treatment of MitoQ (0.25 to 5  $\mu$ mol/L, 2h), EUK 134 (10  $\mu$ mol/L, 1h) or DMSO (as control) were also used.

### *Human cell line*

HCMs (PromoCell, C-12810) were seeded at a density  $1.5 \times 10^5$  cells/well in 12-well plates and cultured in a myocyte growth medium (PromoCell, C-22170), containing 0.5 ng/ml epidermal growth factor, 2 ng/ml basic fibroblast growth factor, 5  $\mu$ g/ml insulin and 5% fetal calf serum. HCMs were starved for 24h before pre-treatment of MitoQ (1  $\mu$ mol/L, 2h), EUK 134 (10  $\mu$ mol/L, 1h) or DMSO (as control). Cells were then maintained during 24h in the privation medium.

### ***RNA Extraction and qRT-PCR analyses***

RNA was extracted from NCMs with QIAGEN RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104), as described by the manufacturers's instructions. Reverse-transcription was performed with 100, 250 or 500 ng of total RNA using the miScript II RT kit (Qiagen, 218160) and the cDNA was amplified with miScript SYBR Green PCR (Qiagen, 218073) on an Aria Mx Q-PCR system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The sequences of the different primers (Eurogentec, Seraing, Belgium) used were: Fis 1 (sense: GCACGCAGTTTGAATACGCC, antisense: CTGCTCCTCTTTGCTACCTTTGG); hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) (sense: ATGGGAGGCCATCACATTGT, antisense: ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA); Mfn2 (sense: GATGTCACCACGGAGCTGGA, antisense: AGAGACGCTCACTCACTTTG); NOX4 (sense: ATCTGGGTCTGCAGAGACAT, antisense: CTGAGGTACTGATGTT); NRF1 (sense : CGCAGTGACGTCCGCACAGA, antisense: AAGGTCCTCCCGCCCATGCT), NRF2 (sense: GCAACTCCAGAAGGAACAGG, antisense: AGGCATCTTGTTTGGGAATG) and PGC1 $\alpha$  (sense: AAAAGCTTGACTGGCGTCAT, antisense : TCAGGAAGATCTGGGCAAAG).  $\Delta\Delta$ CT method was used for data analysis.

## ***Protein extraction and western blot***

### *Protein extraction*

Proteins were extracted from 6-well plates cell into ice-cold RIPA buffer (50 mmol/L Tris [pH7.4], 150 mmol/L NaCl, 1% Igepal CA-630, 50 mmol/L deoxycholate, and 0.1% SDS) containing anti-proteases (Complete™ EDTA-free, Sigma-Aldrich, COEDTAF-RO), serine/threonine protein phosphatase inhibitors (Phosphatase inhibitor Cocktail 2 and 3, Sigma-Aldrich, P5726 and P0044) and 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Lysates were incubated for 1h at 4°C, centrifuged 15 min at 11 000 g to collect the soluble proteins. Protein concentrations were determined with a Lowry-based method protein assay and samples were kept at -80°C.

### *Cytosol-mitochondria fractionation*

NCMs were seeded at 2 000 000 cells/dish before Iso treatment as described above. After treatment, media was removed and cells washed with 5 mL ice-cold PBS and scrapped in 750 µL of ice-cold buffer H (0.3 mol/L sucrose, 5 mmol/L TES, 2 mmol/L EGTA, pH 7.2) [30]. Scrapped cells were then transferred in a 2 mL tube in which 500 µL of buffer H containing 1 mg/mL BSA was added. After 6 times inversion, the tubes were centrifuged for 10 min at 500 g and the supernatant was collected before 10 min centrifugation at 3 000 g. Cytoplasmic fraction (supernatant) was collected and 100 µL of RIPA 2X buffer was added. Mitochondrial fraction (pellet) was resuspended in 50 µL RIPA 2X buffer.

### *Western blot*

Soluble proteins (10 to 50 µg) were resolved on NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gels (Thermo Fisher Scientific) or on SDS-PAGE gels (12 or 15%, depending on the proteins analysed) and transferred on 0.2 µm nitrocellulose membranes (Trans-

Blot® Turbo™ Transfert Pack, Bio-Rad, 1704159). Equal total proteins loads were confirmed by Ponceau red 0.1% (Sigma-Aldrich, P3504), 5% acetic acid (v/v) staining of the membranes. The membranes were then blocked in 5% milk or 5% BSA in TBS-Tween buffer for 1h before 4°C overnight incubation with primary antibodies diluted in blocking solution. Blots were then washed three times with TBS-Tween 0.1 % buffer and incubated with corresponding secondary antibodies for 1h (1/5 000 to 1/10 000) in blocking solution. The Chemidoc® camera (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was used for imaging and densitometry analysis after membranes were incubated with enhanced chemiluminescence (ECL™) western blotting detection reagents (GE Healthcare, RPN2209).

#### *Antibodies*

The primary antibodies used for western blot analysis were: aconitase 2 (1/10 000, CliniSciences, GTX109736), ATP synthase alpha (1/5 000, Thermo Fisher Scientific, A-21350), beclin-1 (1/1 000, Ozyme, 3738); catalase (1/1 000, Sigma-Aldrich, CO979); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (1/10 000, Santa Cruz, sc-365062), LC3 B (1/2 000, Ozyme, 2775); parkin (1/1 000, Thermo Fisher Scientific, 702785); Prx1 (1/1 000, Abcam, ab59538); sarcomeric-actin (1/5 000, Agilent Technologies, M0874), SOD1 (1/1 000, Proteintech, 10269-1-AP), SOD2 (1/5 000, Abcam, ab 13533), SOD2acK68 (1/1 000, Abcam, ab 137037), ubiquitinated proteins (1/2 500, Enzo Life Science, BML-PW8810-0500). The horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies used were: anti-rabbit IgG (GE healthcare, NA934V) and anti-mouse IgG (GE healthcare, NA931) antibodies.

#### ***Transmission electronic microscopy***

NCMs were fixed overnight in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer, and then washed 3 times with Phosphate buffer 0.1 mol/L. Samples were then

post-fixed in 1% osmium tetroxide in Phosphate buffer 0.1 mol/L at room temperature for 1h then followed by dehydration steps (5 min in ethanol 50%, 5 min in ethanol 70%, 5 min in ethanol 80%, 2 x 15 min in ethanol 95%, 3 x 20 min in ethanol 100%). Cells were then detached and centrifuged 10 min at 12 000 rpm. Pellets were then incubated with propylene oxide for 30 min. Samples were then stained in propylene oxide/Epon (V/V) for 1h, then in Epon 100% twice for 1h, followed by overnight incubation before capsules embedding at 60°C for 4 days.

Ultrathin sections (85 nm) were performed with a UM EC7 ultramicrotome (Leica, Wetzlar, Germany), and sections were contrasted by uranyl acetate 2%/ethanol 50% treatment for 8 min followed by Reynolds lead citrate for 8 min. Sections were observed using a EM900 electron microscope (Zeiss, Jena, Germany) with Gatan Orius SC1000 camera. Quantification of mitochondria number, length, width and area were performed with analysis software (Zeiss).

### ***Immunofluorescence***

Biphotonic confocal microscopy was used for the imaging of 4% paraformaldehyde and 0.1% Triton fixed/permeabilized cardiomyocytes. Immunofluorescence staining was performed by saturation for 30 min with 1% BSA before incubation with anti- $\alpha$ -actinin antibody (Sigma-Aldrich, A-7811) or anti-SOD2 (Abcam, ab 16956) (dilution 1/50) overnight at 4°C. Alexa Fluor® 568 coupled anti-mouse secondary antibody at dilution 1/300 was incubated for 30 min at room temperature before nuclei staining for 10 min at room temperature (Thermo Fisher Scientific, Hoechst 33258) with mounting medium.

Cardiomyocytes were incubated in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) with 10  $\mu$ mol/L MitoSOX Red (Thermo Fisher Scientific, M36008) to stain mitochondrial superoxide anion levels and 100 nmol/L Mitotracker Deep red (Thermo Fisher



Scientific, M22426) to stain mitochondria or 10 µg/mL of JC-1 sensor (Thermo Fisher Scientific, T3168) to quantify the mitochondrial membrane potential for 30 min at 37°C.

Staining was visualized with a x40 objective on an LSM710 confocal microscope that used Zen image acquisition and analysis software (Zeiss). Images were acquired with a resolution of at least 1024×1024 and analysed with Image J software.

#### ***Detection of mitochondrial hydrogen peroxide levels using MitoPY1***

NCMs were seeded at 20 000 cells/well in 96 well-plate. The cells were serum-deprived for 24h and treated with PBS (control) or Iso at 10 µmol/L for 24h in serum-free medium. After treatment, media was removed and cells were washed twice with 100 µL PBS 1X/well and then immediately stained with 50 µmol/L MitoPY1 probe (Sigma-Aldrich, 4428) for 30 min at 37°C in PBS 1X. After staining, cells were washed twice in 100 µL PBS 1X. Then 200 µL PBS 1X was added in 96 well-plates and absorbance was measured with a microplate reader at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm.

#### ***Oxygraphy analysis***

NCMs were seeded at 400 000 cells/well in 6 well-plate (1 plate per condition) in culture medium with serum. Then, cells were serum-deprived for 24h and treated with PBS (control) or Iso at 10 µmol/L for 24h in serum-free medium. A pre-treatment of MitoQ (1 µmol/L, 2h), EUK 134 (10 µmol/L, 1h) or DMSO (as control) were also used. At the end of treatment, NCMs were gently rinsed twice with PBS. Pre-warmed trypsin solution was adding in each well and incubated at 37°C for 10 min. Once cells appear detached, trypsin was inactivating by addition of medium containing serum and centrifuged at 800 g for 7 min. After removing the supernatant, the cell pellet was resuspended in pre-warmed medium with serum and count with Malassez cell.

NCMs (between 1 and 1.5 million) were incubated into the O2K oxygraph chambers (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) at 37°C under constant stirring. After a 15 min stabilization leading to resting respiration, oligomycin A (5 nmol/L) was added to measure leak respiration for 5 min. Then, CCCP pulses (0.5 to 2.5 μmol/L steps) were performed until maximal oxygen consumption was achieved. Non-mitochondrial oxygen consumption was obtained after AA (2.5 μmol/L) injection for 5 minutes.

#### ***Cell index quantification by Real Time Cell Analysis (RTCA)***

NCMs were seeded in 0.64 cm<sup>2</sup> well covered with 80% gold electrodes (Agilent Technologies, 00300600840) from which a low voltage alternating current (20 mV) is generated in the culture medium from one electrode to another by an iCELLingence system (Agilent Technologies, 00380601000). The electrical resistance of adherent cells (RCell) is registered by a control unit (Agilent Technologies, 00380601430) equipped with RTCA Lite software (Agilent Technologies, 00310100210) and is expressed at each time in cellular index (ICell) defined by the equation:  $ICell = (RCell - R_m) / R_m$  where  $R_m$  corresponds to the resistance of the medium without the cells. The L8 E-Plates are incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> and the cell index is recorded every 15 min until the end of the experiment.

#### ***Statistical analysis***

Data are expressed as medians with interquartile ranges and analysed with GraphPad software version 7.0. Data were compared using nonparametric Mann–Whitney test. For RTCA experiments, the data were analysed by functional ANOVA, performed using the R package fdANOVA [31]. Statistical significance was accepted at the level of  $P < 0.05$ .

## **Acknowledgments**

We thank Dr N. Malmanche for confocal microscopy and the UMS 2014 – US 41 – PLBS – Plateformes Lilloises en Biologie & Santé for cell imaging and animal facility. We would like to thank Servier for the network used in the graphical abstract (Servier Medical Art, <https://smartservier.com>).

## **Fundings**

This work was supported by grants from "Fédération Française de Cardiologie", "Fondation de France" and Lille University "AAS 2020 – Soutien à l'internationalisation de la recherche" (FRABELICA). EDD was supported by grants from region Hauts de France, CPER "Longévité" of Institut Pasteur de Lille and "Fondation Lefoulon Delalande". VP received a grant from I-site université Lille Nord-Europe : « Bourse de mobilité internationale de recherche ».

## **Conflict of interest**

None

## **References**

- [1] Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* [Internet]. 2020 [cited 2021 Feb 8];141:E139–E596. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31992061/>.
- [2] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2008 [cited 2018 Feb 6];81:449–456. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854381>.

- [3] Rababa'h AM, Guillory AN, Mustafa R, et al. Oxidative Stress and Cardiac Remodeling: An Updated Edge. *Curr Cardiol Rev.* 2018;14:53–59.
- [4] Dubois-Deruy E, Peugnet V, Turkieh A, et al. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants* [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 17];9:864. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/9/864>.
- [5] Jiménez-González S, Marín-Royo G, Jurado-López R, et al. The Crosstalk between Cardiac Lipotoxicity and Mitochondrial Oxidative Stress in the Cardiac Alterations in Diet-Induced Obesity in Rats. *Cells.* 2020;9:451.
- [6] Merabet N, Bellien J, Glevarec E, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition improves myocardial perfusion and function in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;52:660–666.
- [7] Dai DF, Johnson SC, Villarin JJ, et al. Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and gaq overexpression-induced heart failure. *Circ Res.* 2011;108:837–846.
- [8] Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2017;1863:1066–1077. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010>.
- [9] Morales PE, Arias-Durán C, Ávalos-Guajardo Y, et al. Emerging role of mitophagy in cardiovascular physiology and pathology. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2020;71:100822. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.09.006>.
- [10] Pisano A, Cerbelli B, Perli E, et al. Impaired mitochondrial biogenesis is a common feature to myocardial hypertrophy and end-stage ischemic heart failure. *Cardiovasc Pathol* [Internet]. 2016;25:103–112. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.carpath.2015.09.009>.

- [11] Sabbah HN. Targeting mitochondrial dysfunction in the treatment of heart failure. *Expert Rev Cardiovasc Ther* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 19];14:1305–1313. Available from:  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14779072.2016.1249466>.
- [12] Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients* [Internet]. 2019;11:2090. Available from:  
<https://www.mdpi.com/2072-6643/11/9/2090>.
- [13] Kim S, Song J, Ernst P, et al. MitoQ regulates redox-related noncoding RNAs to preserve mitochondrial network integrity in pressure-overload heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2020;318:H682–H695.
- [14] Purushothaman S, Nair RR. Mitoprotective antioxidant EUK-134 stimulates fatty acid oxidation and prevents hypertrophy in H9C2 cells. *Mol Cell Biochem*. 2016;420:185–194.
- [15] Doughan AK, Dikalov SI. Mitochondrial redox cycling of mitoquinone leads to superoxide production and cellular apoptosis. *Antioxidants Redox Signal*. 2007;9:1825–1836.
- [16] Pokrzywinski KL, Biel TG, Kryndushkin D, et al. Therapeutic targeting of the mitochondria initiates excessive superoxide production and mitochondrial depolarization causing decreased mtDNA integrity. *PLoS One*. 2016;11:1–22.
- [17] Gottwald EM, Duss M, Bugarski M, et al. The targeted anti-oxidant MitoQ causes mitochondrial swelling and depolarization in kidney tissue. *Physiol Rep*. 2018;6:1–9.
- [18] Turkieh A, Fertin M, Bouvet M, et al. Expression and Implication of Clusterin in Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Heart Fail*

- [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 23];11:e004838. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29891738>.
- [19] Dubois-Deruy E, Cuvelliez M, Fiedler J, et al. MicroRNAs regulating superoxide dismutase 2 are new circulating biomarkers of heart failure. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7:1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15011-6>.
- [20] Lu J, Cheng K, Zhang B, et al. Novel mechanisms for superoxide-scavenging activity of human manganese superoxide dismutase determined by the K68 key acetylation site. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2015 [cited 2018 Jun 13];85:114–126. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25908444>.
- [21] Turkieh A, Porouchani S, Beseme O, et al. Increased clusterin levels after myocardial infarction is due to a defect in protein degradation systems activity. *Cell Death Dis* [Internet]. 2019 [cited 2020 Oct 15];10:608. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31406108/>.
- [22] Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res*. 2001;88:529–535.
- [23] Dikalova AE, Itani H a., Nazarewicz RR, et al. Sirt3 impairment and SOD2 hyperacetylation in vascular oxidative stress and hypertension. *Circ Res*. 2017;121:564–574.
- [24] Strassburger M, Bloch W, Sulyok S, et al. Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase results in severe lipid peroxidation and spontaneous apoptosis in murine myocardium in vivo. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2005 [cited 2018 May 31];38:1458–1470. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15890620>.

- [25] Kuczmariski JM, Hord JM, Lee Y, et al. Effect of Eukarion-134 on Akt–mTOR signalling in the rat soleus during 7 days of mechanical unloading. *Exp Physiol* [Internet]. 2018 [cited 2020 Oct 2];103:545–558. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/29315934/>.
- [26] Song M, Franco A, Fleischer JA, et al. Abrogating Mitochondrial Dynamics in Mouse Hearts Accelerates Mitochondrial Senescence. *Cell Metab* [Internet]. 2017 [cited 2020 Nov 3];26:872–883.e5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29107503/>.
- [27] Bouvet M, Dubois-Deruy E, Alayi TD, et al. Increased level of phosphorylated desmin and its degradation products in heart failure. *Biochem Biophys Reports* [Internet]. 2016;6:54–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405580816300206>.
- [28] Dubois-Deruy E, Belliard A, Mulder P, et al. Interplay between troponin T phosphorylation and O-N-acetylglucosamylation in ischaemic heart failure. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2015;107:56–65. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvv136>.
- [29] Bertrand L, Ginion A, Beauvoys C, et al. AMPK activation restores the stimulation of glucose uptake in an in vitro model of insulin-resistant cardiomyocytes via the activation of protein kinase B. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 2006 [cited 2020 Oct 15];291:H239–H250. Available from: [www.ajpheart.org](http://www.ajpheart.org).
- [30] Fazal L, Laudette M, Paula-Gomes S, et al. Multifunctional mitochondrial Epac1 controls myocardial cell death. *Circ Res*. 2017;120:645–657.
- [31] Górecki T, Smaga Ł. fdANOVA: an R software package for analysis of variance for univariate and multivariate functional data. *Comput Stat*. 2019;34:571–597.

**Figure 1: Characterization of mitochondrial oxidative stress in hypertrophied neonatal rat cardiomyocytes.** (A) Hypertrophy was quantified in NCMs untreated (PBS) (white box) or treated with Isoproterenol (Iso) (grey box) for 24h by immunofluorescence of alpha-actinin (red) and nuclei (blue) (top panels) and quantification of cell area ( $\mu\text{m}^2$ ) (bottom panel) (from 3 independent experiments and at least 273 cells). Oxidative stress was quantified in NCMs untreated (PBS) or Iso treated for 24h by fluorescence quantification of (B) mitochondrial superoxide anion with mitoSOX probes (red) (from 3 independent experiments and at least 236 cells), by RT-qPCR of (C) NADPH oxidase (NOX) 4, and by western blot of (D) SOD2 acetylated on lysine 68 (SOD2acK68) on SOD2 ratio. (E) Representative images of SOD2 (green) localized in mitochondria (white) of NCMs untreated (PBS) or Iso treated for 24h. Colocalization appeared in merge images. Nuclei were stained by Dapi (blue). Mitochondrial biogenesis was quantified in NCMs untreated (PBS) or Iso treated for 24h by RT-qPCR of (F) peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1 $\alpha$ ), Nuclear Respiratory Factor (NRF) 2, mitofusin (Mfn) 2 and Fis1. Data were normalized to HPRT for RNA and actin for protein. (G) Ultrastructure of PBS and Iso treated NCMs (magnification x7 000 with a scale bar of 5  $\mu\text{m}$  (left images) and x12 000 with a scale bar of 2  $\mu\text{m}$  (right images)) and quantification of mitochondria number, length ( $\mu\text{m}$ ), width ( $\mu\text{m}$ ) and area ( $\mu\text{m}^2$ ) in NCMs untreated or Iso treated for 24h. (H) Quantification of Krebs cycle by western blot of aconitase 2 in NCMs untreated or Iso treated for 24h. P values are indicated with at least 3 independent experiments. Representative images were selected to represent the mean values of each condition.

**Figure 2: Characterization of autophagy / mitophagy in hypertrophied neonatal rat cardiomyocytes.** (A) Mitochondrial membrane potential was quantified in NCMs treated with Iso for 24h by fluorescence quantification of JC-1 dye for aggregates (red) and monomer (green) (from 3 independent experiments and at least 366 cells). Mitophagy was quantified in NCMs treated with Iso (B) and with Bafilomycin A1 (Baf) and Iso (C) for 24h by western blot of parkin, ubiquitinated proteins, beclin-1, LC3I, LC3II and LC3II/LC3I ratio. Data were normalized to actin. P values are indicated with at least 3 independent experiments. Representative images were selected to represent the mean values of each condition.



**Figure 3: Effect of anti-oxydants in hypertrophied neonatal rat cardiomyocytes.** (A and G) Cell index quantification by RTCA analysis in Iso treated-NCMs (grey line) with mitoquinone (MitoQ) (green line) (A) or EUK 134 pre-treatment (blue line) (G). Cell index was recorded every 15 minutes (n=4 independent isolations, in duplicate) and statistical analyses were performed by functional ANOVA (R package fdANOVA). Hypertrophy was quantified in NCMs treated with Iso for 24h with or without MitoQ (B) or EUK 134 (H) pre-treatment by immunofluorescence of alpha-actinin (red) and nuclei (blue) and quantification of cell area ( $\mu\text{m}^2$ ) (from 3 independent experiments and at least 75 cells). Mitochondrial superoxide anion was quantified in NCMs treated with Iso for 24h with or without MitoQ (C) or EUK 134 (I) pre-treatment by fluorescence quantification of mitoSOX (red) (from 3 independent experiments and at least 133 cells), by (D and J) RT-qPCR of NOX4 and by (E and K) western blot of SOD2acK68 on SOD2 ratio. (F and L) Representative images of SOD2 (green) localized in mitochondria (white) in NCMs treated with Iso for 24h with or without MitoQ (F) or EUK 134 (L). Colocalization appeared in merge images. Nuclei were stained by Dapi (blue). P values are indicated with at least 3 independent experiments. Representative images were selected to represent the mean values of each condition.

**Figure 4: Effect of anti-oxydants on mitochondrial function and mitophagy in hypertrophied neonatal rat cardiomyocytes.** Mitochondrial function was analyzed in NCMs treated with Iso for 24h with or without MitoQ or EUK-134 pre-treatment by (A) quantification of oxygen consumption, by (B) ultrastructure of NCMs (magnification x7000 with a scale bar 5  $\mu\text{m}$  (left images) and x12000 with a scale bar 2  $\mu\text{m}$  (right images)) and quantification of mitochondria number, length ( $\mu\text{m}$ ), width ( $\mu\text{m}$ ) and area ( $\mu\text{m}^2$ ). (C) Quantification of Krebs cycle by western blot of aconitase 2. (D) Mitochondrial membrane potential was quantified in NCMs treated with Iso for 24h with or without MitoQ or EUK-134 pre-treatment by fluorescence quantification of JC-1 dye for aggregates (red) and monomer (green) (from 3 independent experiments and at least 94 cells). (E) Mitophagy was quantified in NCMs treated with Iso for 24h with or without MitoQ pre-treatment by western blot of parkin, ubiquitinated proteins, beclin-1, LC3I, LC3II and LC3II/LC3I ratio. Data were normalized to actin. P values are indicated with at least 3 independent experiments. Representative images were selected to represent the mean values of each condition.

**Figure 5: Effect of parkin depletion on hypertrophy, oxidative stress, mitochondrial biogenesis and mitophagy in neonatal rat cardiomyocytes.** (A) Cell index quantification by RTCA analysis in NCMs transfected with the siRNA specifically targeting rat parkin mRNA (si prk, red line) or the non-targeted siRNA (si NT, black line) as control. Cell index was recorded every 15 minutes (n=2 independent isolations, in quadruplicate) and statistical analyses were performed by functional ANOVA (R package fdANOVA). Hypertrophy was quantified (B) by immunofluorescence of alpha-actinin (red) and nuclei (blue) and quantification of cell area ( $\mu\text{m}^2$ ) (from 3 independent experiments and at least 178 cells). Mitochondrial superoxide anion was quantified (C) by fluorescence quantification of mitoSOX (red) (from 3 independent experiments and at least 249 cells). Expression of mitochondrial proteins was quantified by western blot of (D) SOD2 and aconitase 2 and by RT-qPCR of (E) PGC1 $\alpha$ , NRF1 and 2, Mfn 2 and Fis1. (F) Mitochondrial membrane potential was quantified by fluorescence quantification of JC-1 dye (aggregates (red) and monomer (green)) (from 3 independent experiments and at least 257 cells). (G) Mitophagy was quantified by western blot of Parkin, ubiquitinated proteins, Beclin-1, LC3I, LC3II and LC3II/LC3I ratio. Data were normalized to HPRT for RNA and actin for protein. P values are indicated with at least 3 independent experiments. Representative images were selected to represent the mean values of each condition.

**Figure 6: Cardiomyocytes-specificity of both anti-oxidants.** (A) Hypertrophy was quantified in adult cardiomyocytes (ACMs) treated with Iso (50  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48h with or without EUK 134 pre-treatment by immunofluorescence of alpha-actinin (red) and nuclei (blue) (top panels) and quantification of cell area ( $\mu\text{m}^2$ ) (bottom panel) (from 3 independent experiments and at least 71 cells). (B) Mitochondrial superoxide anion was quantified in ACMs treated with Iso for 48h with or without EUK 134 pre-treatment by fluorescence quantification of mitoSOX (red) (from 3 independent experiments and at least 72 cells). (C) Mitochondrial superoxide anion was quantified in ACMs treated with Iso for 48h with or without mitoQ pre-treatment (at several concentrations) by fluorescence quantification of mitoSOX (red) (from at least 12 cells). (D) Mitophagy was quantified in human cardiomyocytes (HCMs) with or without MitoQ pre-treatment by western blot of parkin, ubiquitinated proteins, beclin-1 and LC3I. Data were normalized to GAPDH. P values are indicated with at least 3 independent experiments. Representative images were selected to represent the mean values of each condition.

**Figure 7: Graphical abstract.** In this work, we have shown that both anti-oxidants (MitoQ and EUK 134) improve cardiac hypertrophy and ROS production only in cardiomyocytes but MitoQ induces impaired mitochondria morphology and function (oxygen respiration and membrane potential) through a defect in mitophagy whereas EUK 134 restores impaired cardiomyocyte metabolism and mitochondrial biogenesis.

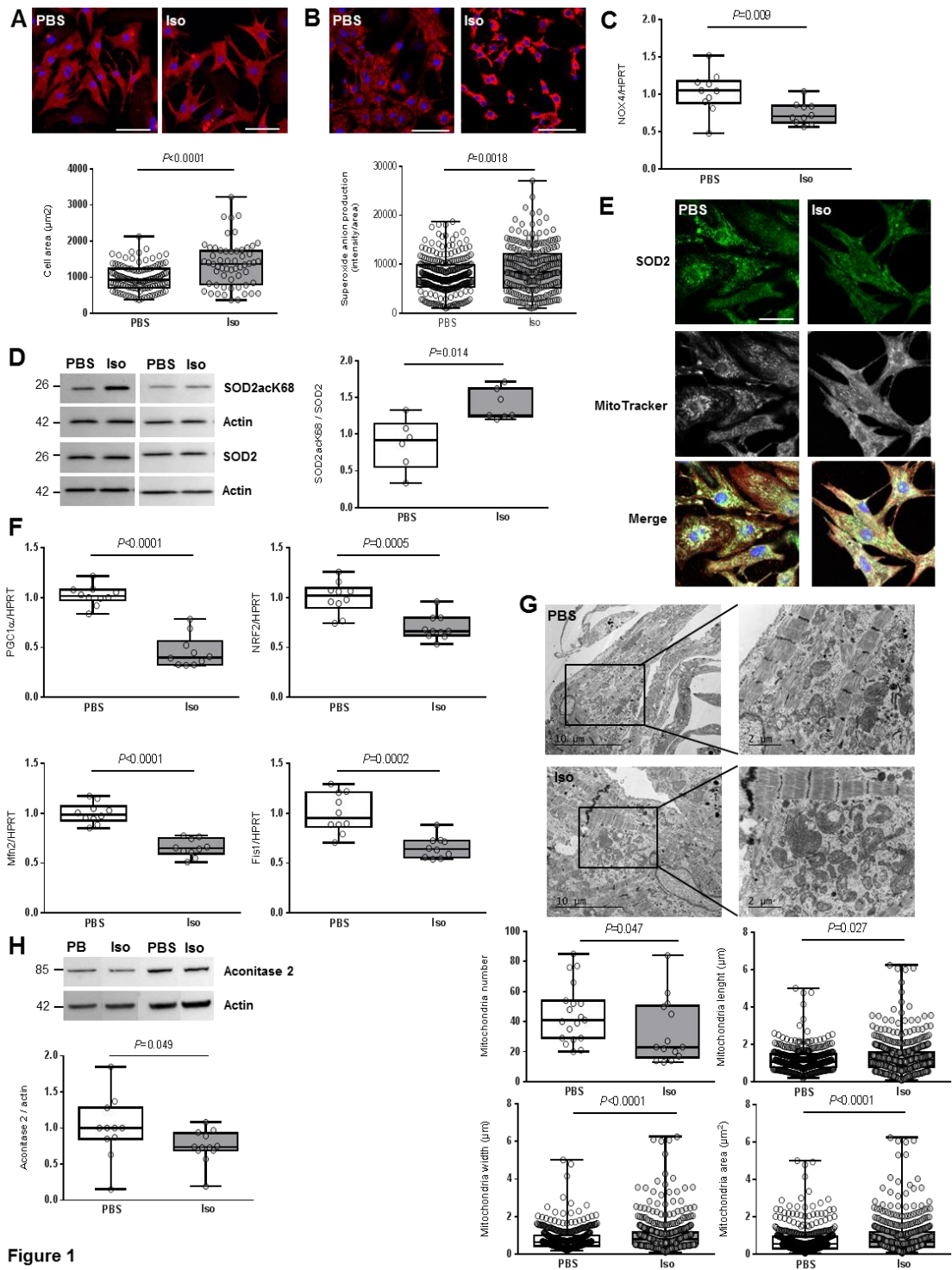
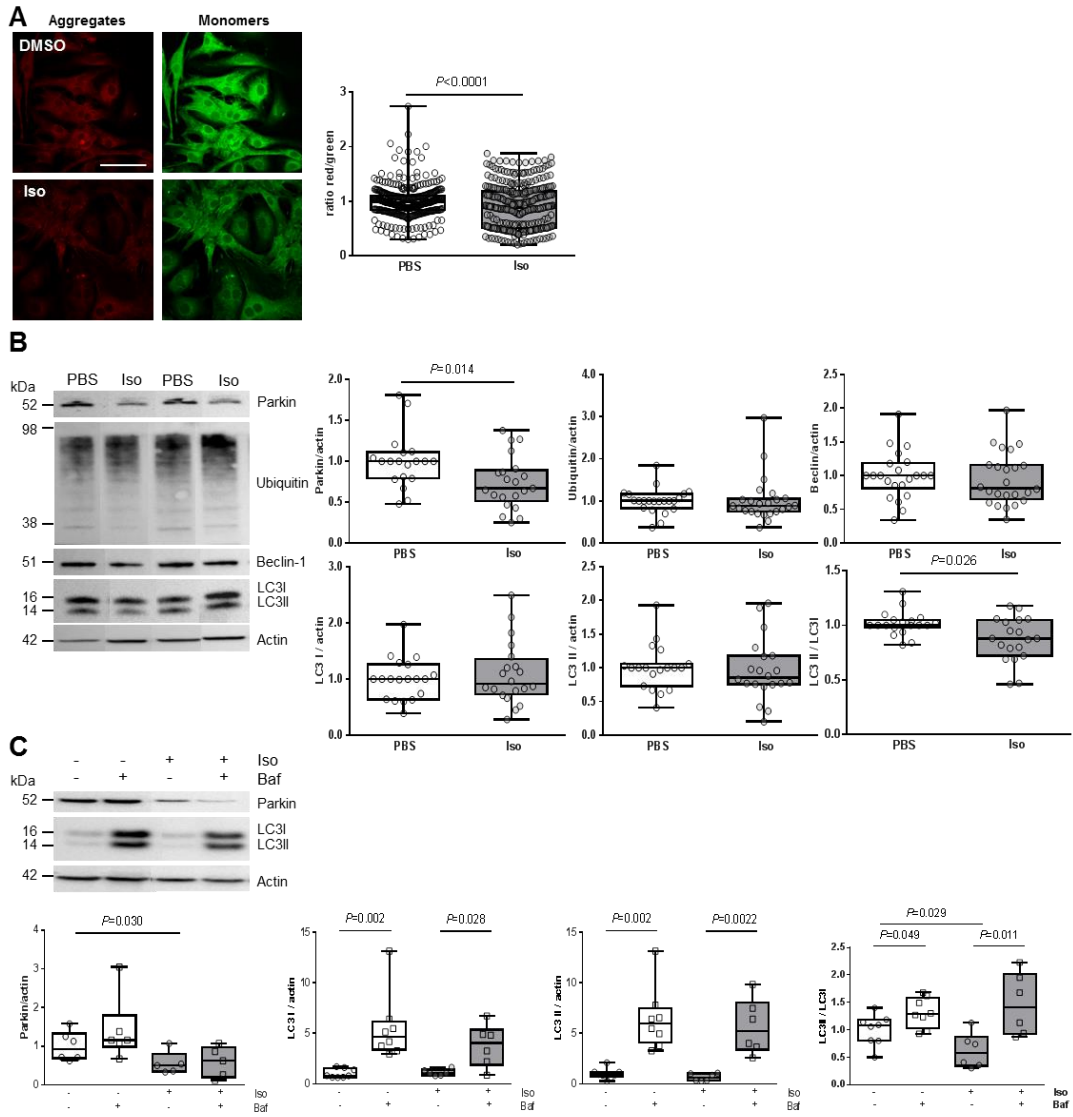


Figure 1



**Figure 2**

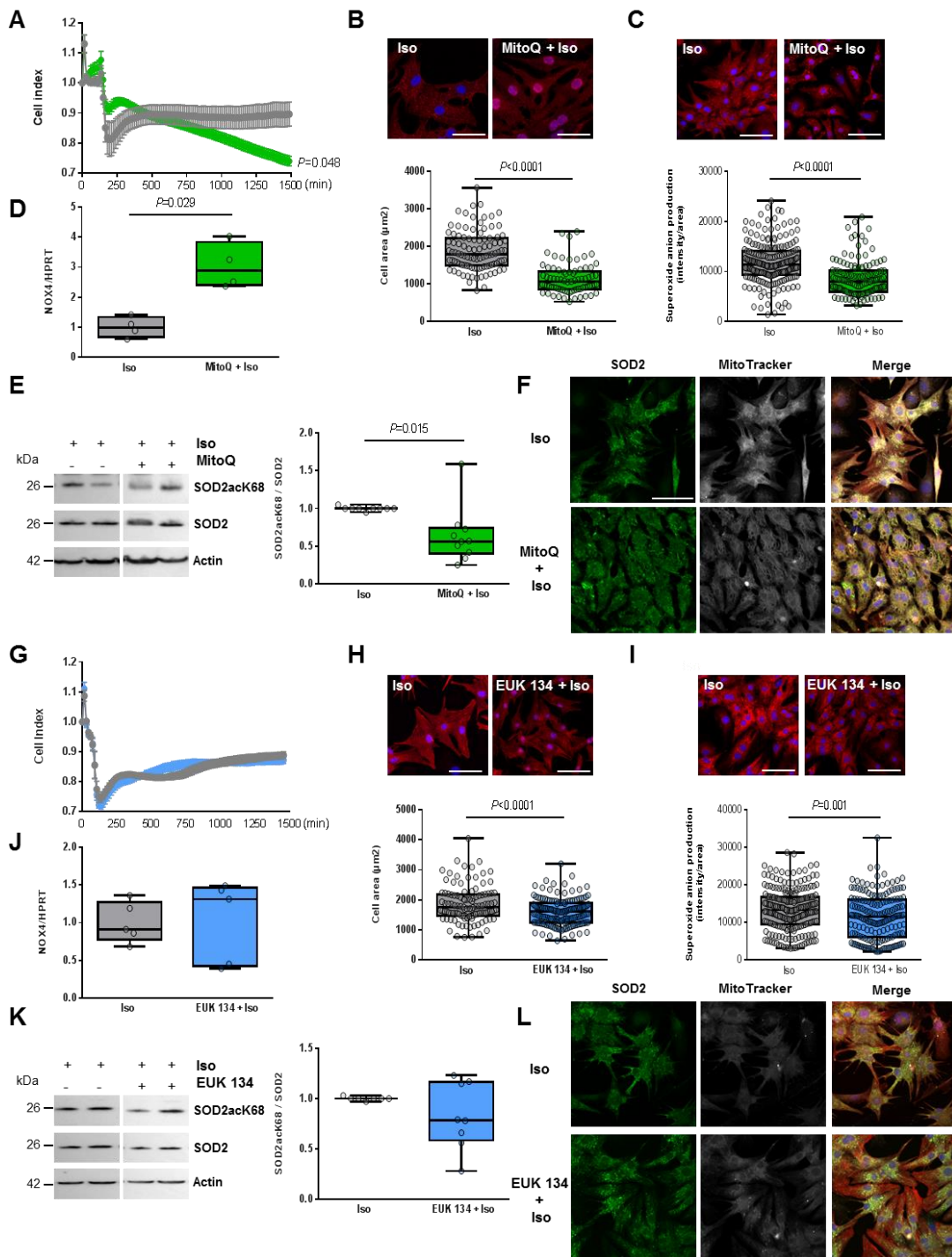


Figure 3

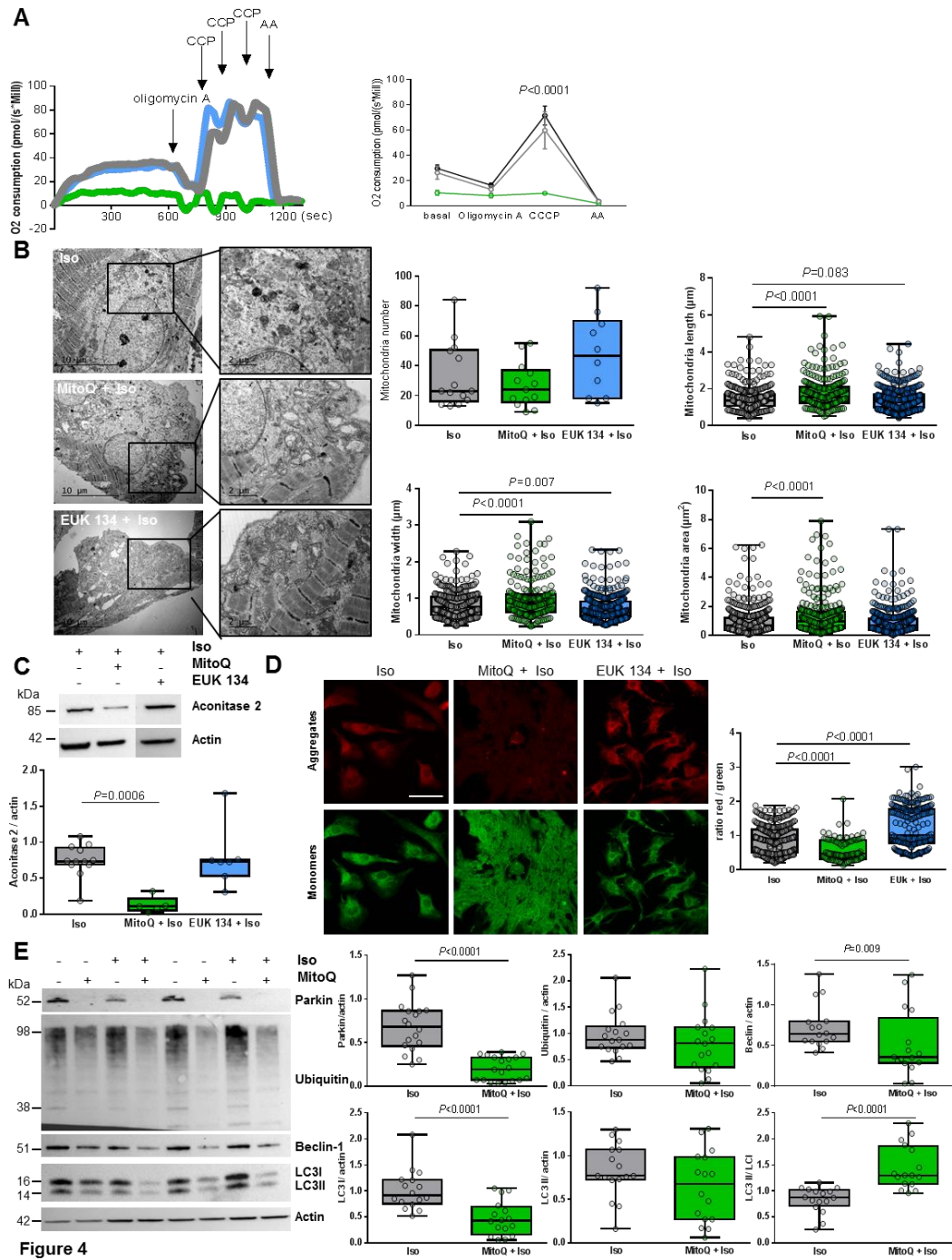


Figure 4



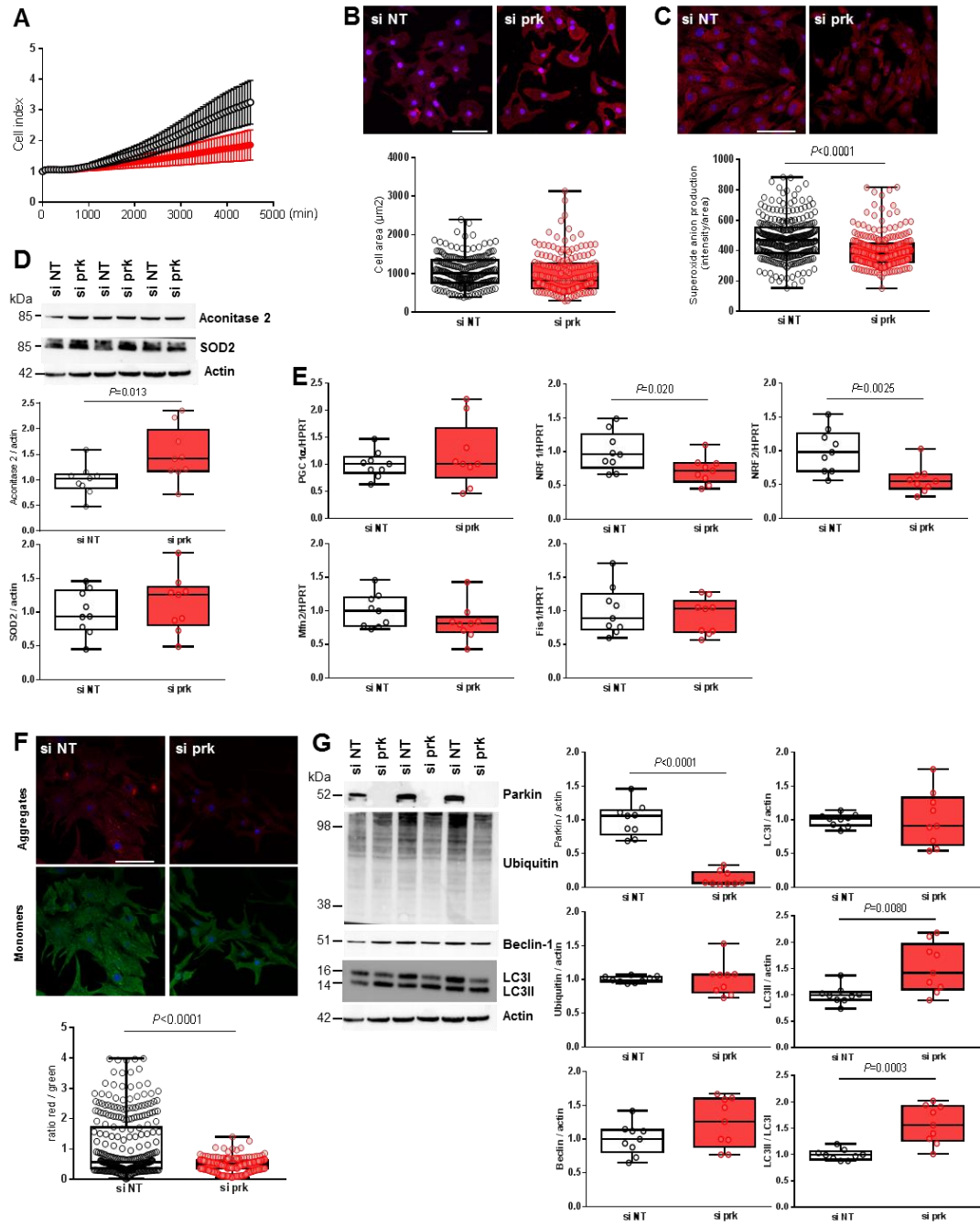


Figure 5



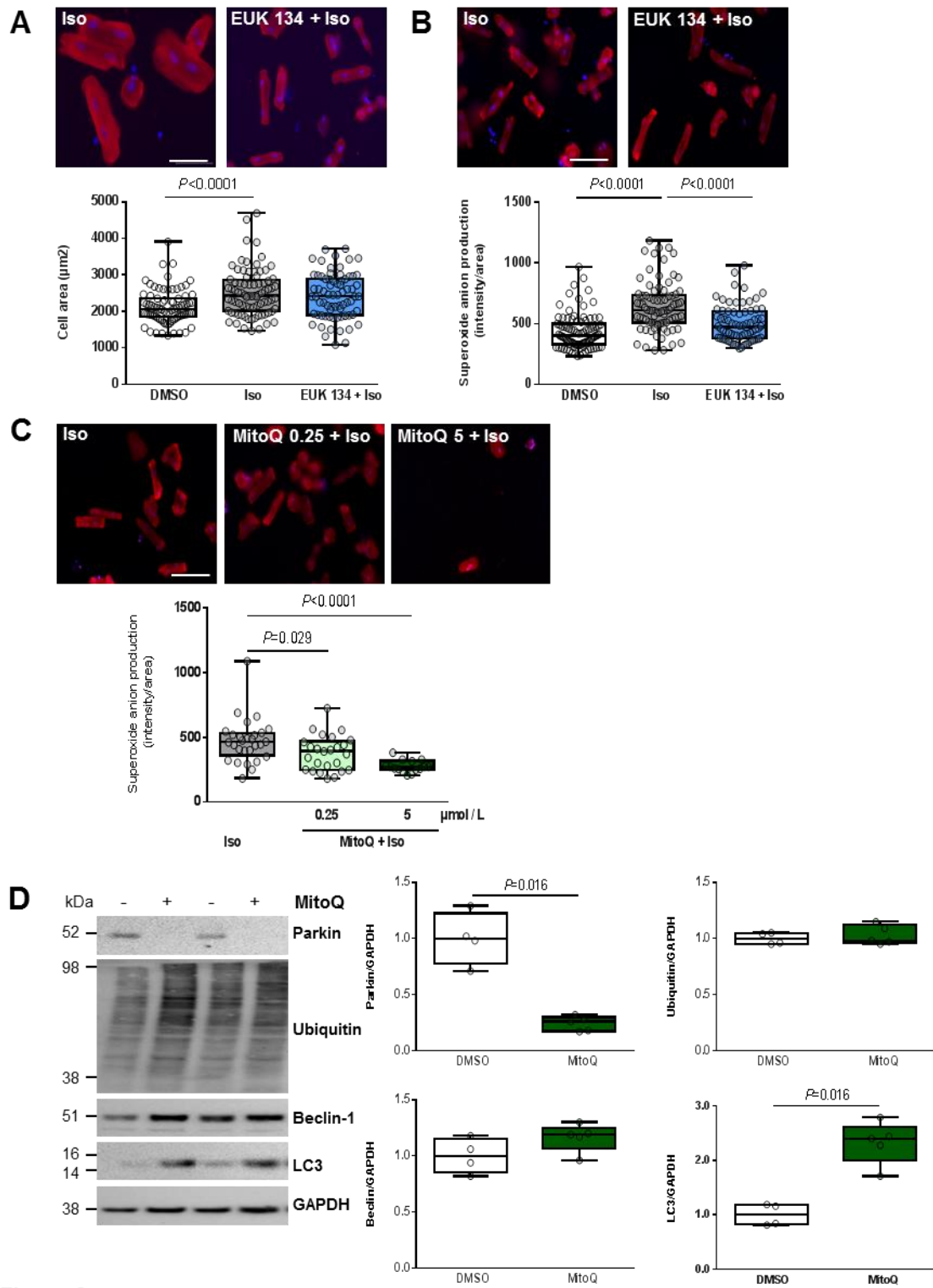
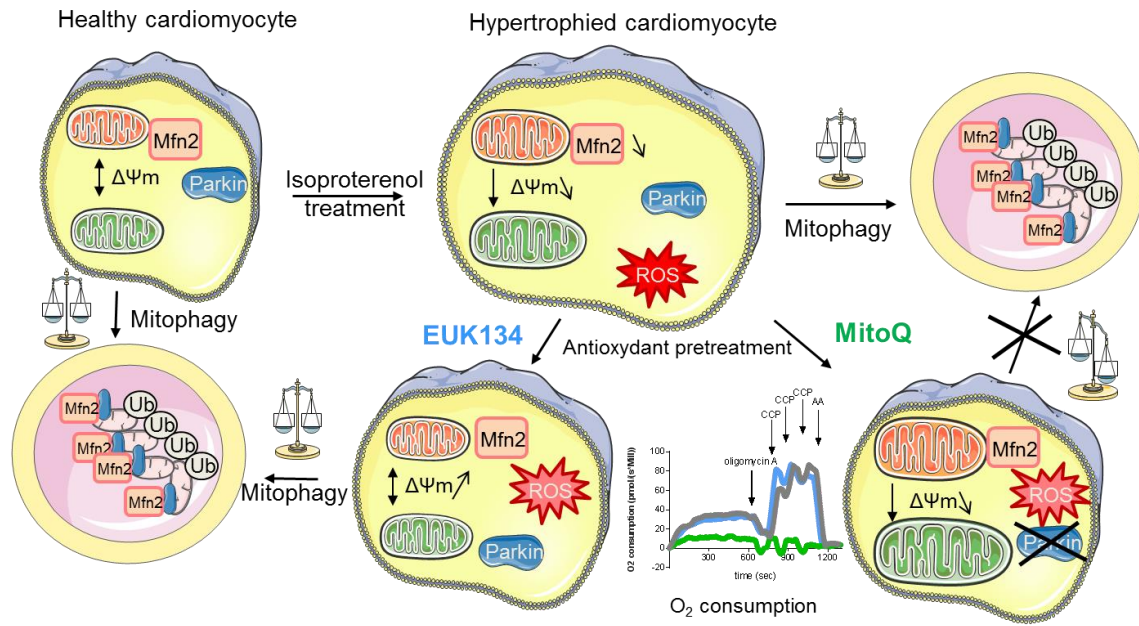


Figure 6



**Figure 7**

## **Mitochondrial-targeted therapies require mitophagy to prevent oxidative stress induced by cardiac hypertrophy**

Victoriane Peugnet, MSC<sup>a</sup>, Maggy Chwastyniak, MSC<sup>a</sup>, Steve Lancel, PhD<sup>a</sup>, Laurent Bultot, PhD<sup>b</sup>, Natacha Fourny, PhD<sup>b</sup>, Olivia Beseme, MSC<sup>a</sup>, Anne Loyens, MSC<sup>c</sup>, Wilfried Heyse, MSC<sup>a</sup>, Philippe Amouyel, MD, PhD<sup>a</sup>, Luc Bertrand, PhD<sup>b</sup>, Florence Pinet, PhD<sup>a\*</sup>, and Emilie Dubois-Deruy, PhD<sup>a\*</sup>

*<sup>a</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, F-59000 Lille, France*

*<sup>b</sup> Pole of Cardiovascular Research, Institut de recherche expérimentale et clinique, UCLouvain, Bruxelles, Belgium*

*<sup>c</sup> Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, UMR9020-UMR-S 1277-Canther-Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France*

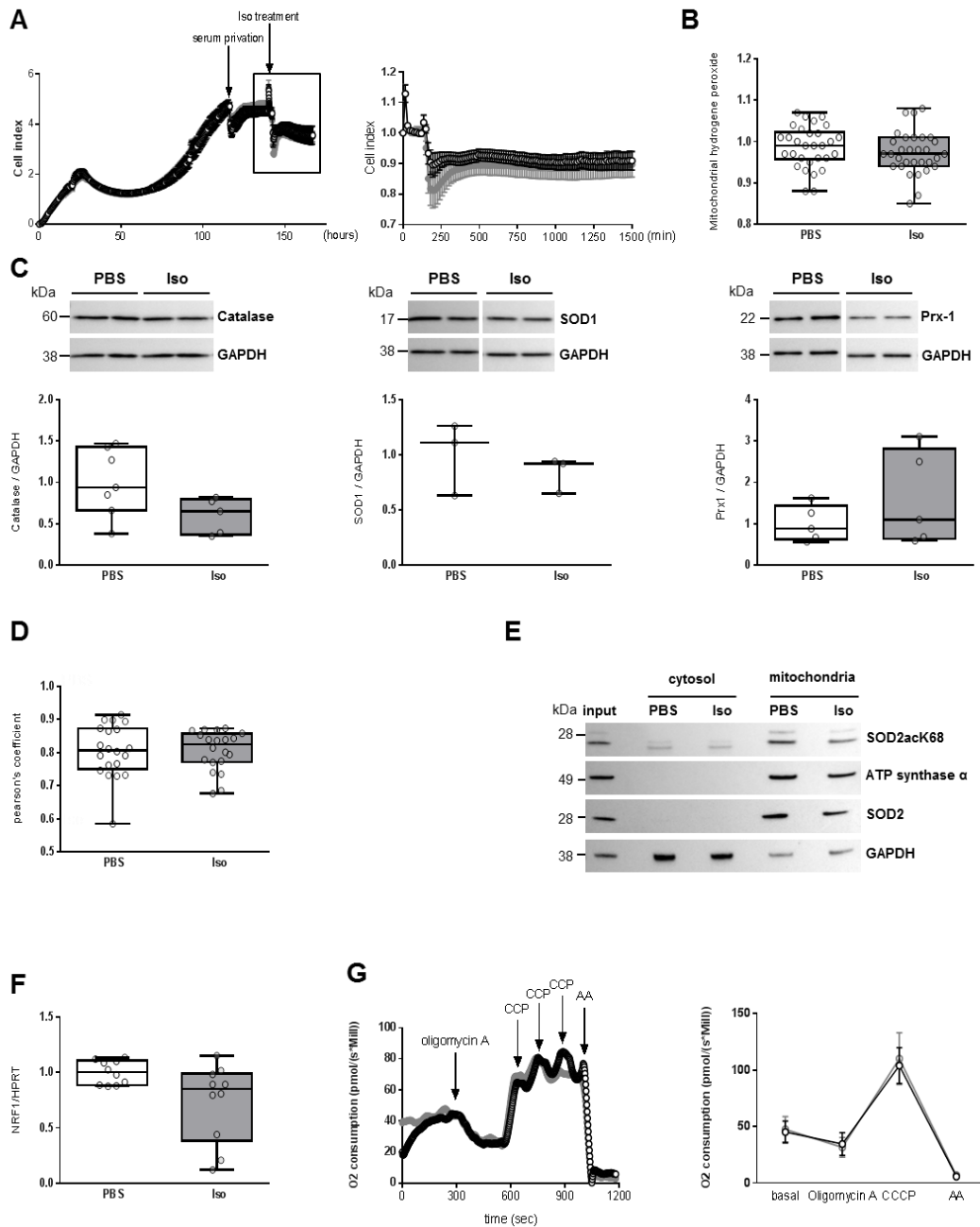
\*Corresponding authors:

Dr Emilie Dubois-Deruy and Dr Florence Pinet, INSERM U1167-IPL, 1 rue du professeur Calmette, 59019 Lille cedex, France. Tel: +33 (0)3 20 87 73 62 / +33 (0)3 20 87 72 15. Fax: (33) 3 20 87 78 94.

E-mail: emilie.deruy@pasteur-lille.fr / Florence.pinet@pasteur-lille.fr

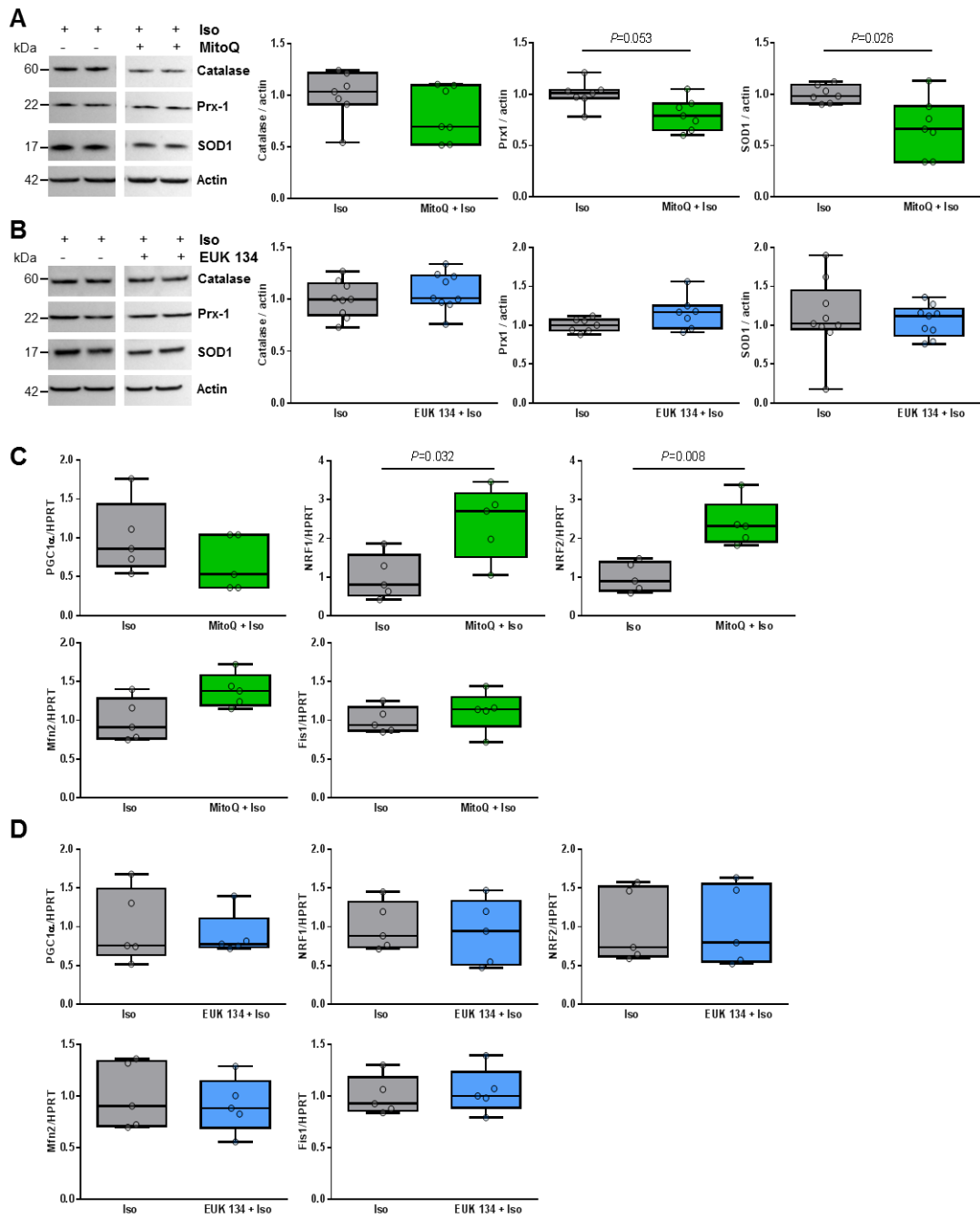
ORCID number: 0000-0002-9811-617X / 0000-0002-5471-1487

**Supplemental Figure legends:**



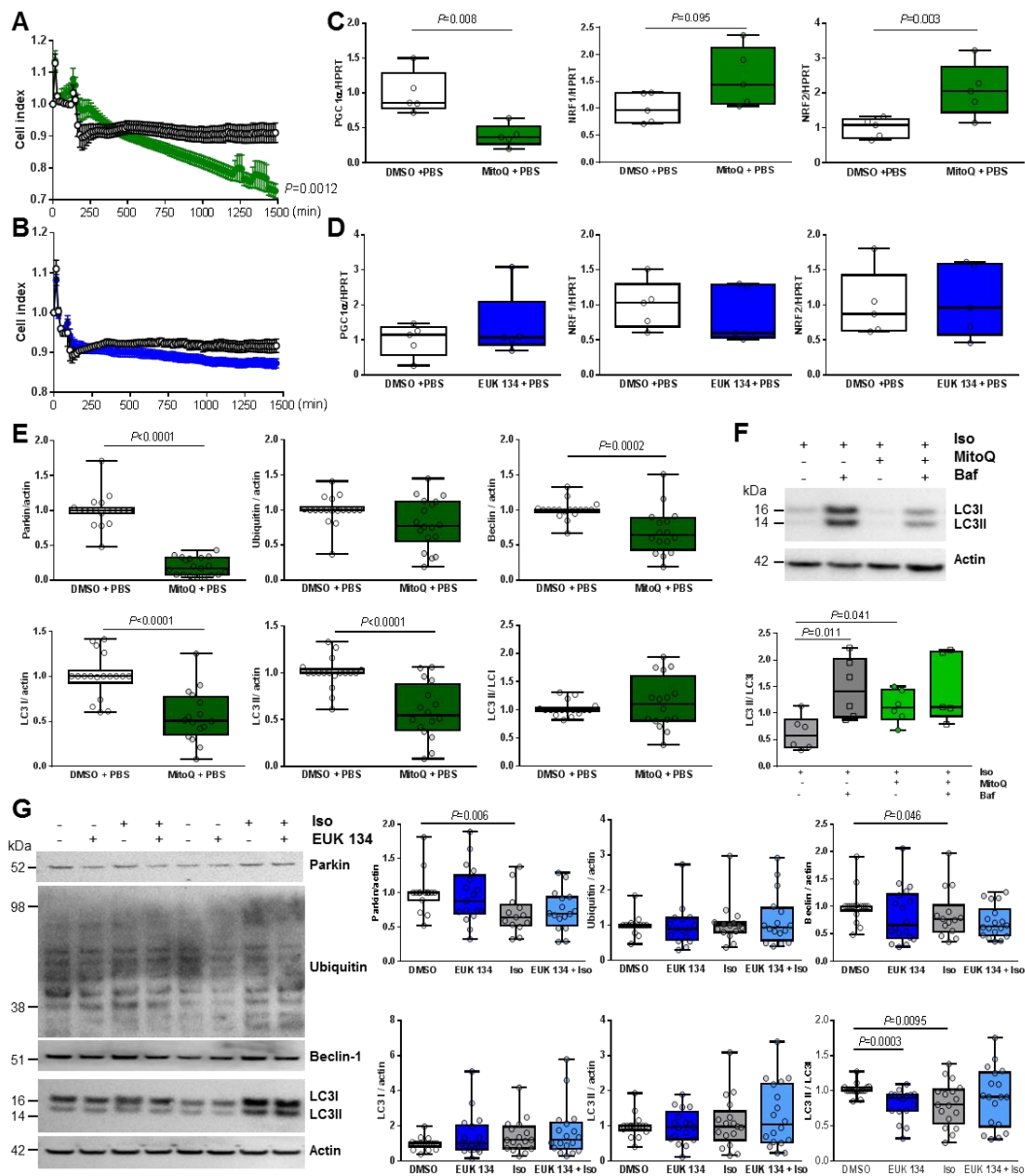
**Figure S1: Characterization of mitochondrial oxidative stress in hypertrophied neonatal rat cardiomyocytes.** (A) Cell index quantification of untreated- (black line) or Isoproterenol (Iso) treated (grey line) -NCMs by RTCA analysis. Cell index was recorded every 15 minutes for 6 days (n=4 independent isolations, in duplicate) and expressed as arbitrary unit (left panel). The square represents the curve from Iso treatment, zoomed in right panel. Statistical analyses of cell index were performed by functional ANOVA (R package fdANOVA). Oxidative stress was also quantified in NCMs untreated (PBS) or Iso treated for 24h by

mitochondrial hydrogen peroxide quantification **(B)**, and by western blot of **(C)** catalase, superoxide dismutase 1 (SOD1) and peroxiredoxin-1 (Prx1). **(D)** Localization of SOD2 in mitochondria was quantified by Pearson's coefficient, describing the correlation between the intensities of SOD2 and mitotracker images with the JACoP plugins on ImageJ software. **(E)** Representative images of SOD2acK68 and SOD2 localized in mitochondria (validated by ATP synthase  $\alpha$ ) after sub-cellular fractionation in untreated (PBS) or Iso treated-NCMs for 24h. **(F)** Mitochondrial biogenesis was quantified in NCMs untreated (PBS) or Iso treated for 24h by RT-qPCR of Nuclear Respiratory Factor (NRF) 1. **(G)** Representative oxygen consumption at basal level and after oligomycin, carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP) and antimycin A (AA) addition (left panel) with quantification to characterize mitochondrial respiration (n=9) (right panel). Data were normalized to HPRT for RNA and GAPDH or actin for protein and are presented as box-and-whisker plots showing median (line) and interquartile ranges (IQR). Representative images were selected to represent the mean values of each condition.



**Figure. S2 : Effect of anti-oxidants (mitoquinone and EUK 134) on hypertrophied neonatal rat cardiomyocytes.** Oxidative stress was quantified in Iso treated-NCMs with or without MitoQ (A) or EUK 134 (B) pre-treatment by western blot of catalase, Prx1 and SOD1. Mitochondrial biogenesis was quantified in Iso treated-NCMs with or without MitoQ (C) or EUK 134 (D) pre-treatment by RT-qPCR of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1 $\alpha$ ), NRF-1 and NRF-2, mitofusin (Mfn) 2 and Fis1. Data

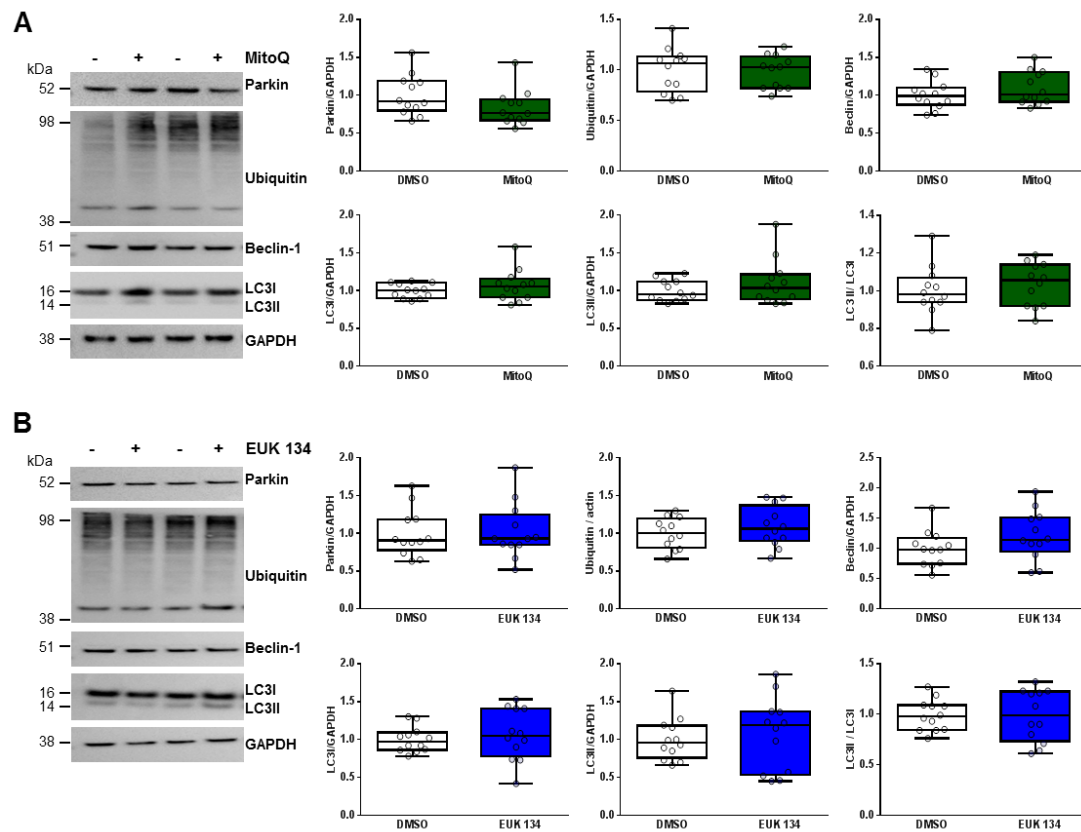
were normalized to actin for western blot and to HPRT for RT-qPCR. *P* values are indicated with at least 3 independent experiments. Representative images were selected to represent the mean values of each condition.



**Figure S3: Effect of both anti-oxidants on oxidative stress, mitochondrial biogenesis and mitophagy in hypertrophied neonatal rat cardiomyocytes. (A and B)** Cell index quantification by RTCA analysis in NCMs controls (DMSO + PBS) (black line) treated with mitoquinone (MitoQ) (green line) pre-treatment (A) or with EUK 134 (blue line) pre-treatment (B). Cell index was recorded every 15 minutes ( $n=4$  independent isolations, in duplicate) and statistical analyses were performed by functional ANOVA (R package fdANOVA). (C and D). Mitochondrial biogenesis was quantified in NCMs controls (DMSO + PBS) treated with or without MitoQ (C) or EUK 134 (D) pre-treatment by RT-qPCR of



PGC1 $\alpha$ , NRF 1 and NRF2. Data were normalized to HPRT. (E) Mitophagy was quantified in NCMs controls (DMSO + PBS) treated with MitoQ pre-treatment by western blot of parkin, ubiquitinated proteins, beclin-1, LC3I, LC3 II and LC3II / I ratio. Data were normalized to actin. Images of western blot are presented in Figure 4E. (F) Autophagy was quantified in NCMs treated by Iso with or without MitoQ pre-treatment and with or without Bafilomycin A1 (Baf) co-treatment by western blot of LC3I, LC3 II and LC3II / I ratio. (G) Mitophagy was quantified in NCMs treated with or without EUK 134 pre-treatment by western blot of parkin, ubiquitinated proteins, beclin-1, LC3I, LC3 II and LC3II / I ratio. Data were normalized to actin. *P* values are indicated with at least 3 independent experiments. Representative images were selected to represent the mean values of each condition.



**Figure S4: Effect of SOD mimic anti-oxidant (EUK 134) on mitophagy in neonatal rat fibroblasts.** Mitophagy was quantified in NCFs treated with or without MitoQ (**A**) or EUK 134 (**B**) pre-treatments by western blot of parkin, ubiquitinated proteins, beclin-1, LC3I, LC3 II and LC3II / I ratio. Data were normalized to GAPDH. Representative images were selected to represent the mean values of each condition.



## *Annexe 2 :*

**A new strategy to preserve and assess oxygen consumption in murine tissues (soumis).**

Kluza J, Peugnet V, Laine W, Kervoaze G, Rémy G, Loyens A, Maboudou P, Fovez Q, Grangette C, Wolowczuk I, Gosset P, Garçon G, Marchetti P, Pinet F, Pichavant M, Dubois-Deruy E.



# **A new strategy to preserve and assess oxygen consumption in murine tissues**

**Short title: Assessment of preserved mitochondrial metabolism in  
tissues.**

Jérôme Kluza<sup>1</sup>, Victoriane Peugnet<sup>2</sup>, William Laine<sup>1</sup>, Gwenola Kervoaze<sup>3</sup>, Gaëlle Rémy<sup>3</sup>,  
Anne Loyens<sup>1</sup>, Patrice Maboudou<sup>4</sup>, Quentin Fovez<sup>1</sup>, Corinne Grangette<sup>3</sup>, Isabelle  
Wolowczuk<sup>3</sup>, Philippe Gosset<sup>3</sup>, Guillaume Garçon<sup>5</sup>, Philippe Marchetti<sup>1</sup>, Florence Pinet<sup>2</sup>,  
Muriel Pichavant<sup>3\*¶</sup>, Emilie Dubois-Deruy<sup>2 ¶</sup>

(1) Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut de Recherche contre le Cancer de Lille,  
UMR9020-UMR-S 1277-Canther-Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to  
Therapies, Lille, France

(2) Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs de  
risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, Lille, France

(3) Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR9017 -  
CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France

(4) Centre de Bio-Pathologie, CHRU Lille, Lille, France

(5) CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, EA4483-IMPacts de l'Environnement Chimique sur la  
Santé (IMPECS), Univ. Lille, Lille, France

**\* Corresponding author**

e-mail: [muriel.pichavant@pasteur-lille.fr](mailto:muriel.pichavant@pasteur-lille.fr) (MP)

¶ These authors contributed equally to this work.

## **Abstract**

Mitochondrial dysfunctions are implicated in several pathologies such as metabolic, cardiovascular, respiratory, and neurological diseases, as well as in cancer and aging. These metabolic alterations are usually assessed in human or murine samples by mitochondrial respiratory chain enzymatic assays or by measuring the oxygen consumption of intact mitochondria isolated from tissues or from cells obtained after physical or enzymatic disruption of the tissues. However, these methodologies do not maintain tissue multicellular organization and cell-cell interactions, known to influence mitochondrial metabolism. Here, we develop an optimal model to measure mitochondrial oxygen consumption in heart and lung tissue samples using the XF24 Extracellular Flux Analyzer (SeaHorse), and discuss about the advantages and limitations of this technological approach. Our results demonstrate that tissue organisation, as well as mitochondrial ultrastructure and respiratory function, are preserved in heart and lung tissues either freshly processed or after overnight conservation at 4°C. Using this method, we confirmed the repeatedly reported obesity-associated mitochondrial dysfunction in the heart and extended it to the lungs. We set up and validate a new strategy to optimally assess mitochondrial function in murine tissues. As such, this method is of great potential interest for monitoring mitochondrial function in cohort samples.



## Introduction

Mitochondrial metabolism and glycolysis play critical roles in a variety of cellular processes, including cellular activation, proliferation, differentiation and death, as well as, more broadly, in disease progression [1]. Mitochondrial function is commonly evaluated through oxygen consumption measurements, using Clark electrodes [2], such as in high-resolution respirometry [3]. Another method, the XF24/XF96 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience), uses oxygen-sensing fluorophores to assess mitochondrial oxygen consumption in freshly isolated mitochondria [4,5], permeabilized fibers [6], intact cells [7,8] or fresh tissues [9]. Although these approaches provide highly specific information on the function of the mitochondrial respiratory chain, the *ex vivo* extemporaneous measurement is a well-recognized limitation, since mitochondrial function is poorly preserved in frozen samples [10].

Therefore, *ex vivo* techniques on isolated cells and mitochondria may not adequately reflect the *in vivo* status since cells and organelles will not be in their tissular and cellular micro-environments, respectively. Moreover, isolation procedures often altered cell and organelle structures and functions, notably through disrupting the mitochondrial network, due to the loss of intracellular interactions [11]. Most often individual cell populations are analyzed, losing the cell-to-cell interactions which occur in the whole tissue [11]. Analysis of permeabilized cells induced a lack of most of the cytoplasm (thus the impact of cytosolic factors and intra-tissular nutrients cannot be studied) and a risk of partial or excessive permeabilization [11]. Nevertheless, these *ex vivo* techniques are useless for bed-side monitoring whereas assessing mitochondrial function under (patho)physiological circumstances is essential to understand and evaluate changes in oxidative phosphorylation

[12]. However, information about how long the mitochondrial activity can be preserved after tissue removal remains unknown.

To overcome limitations of the *ex vivo* approaches, several *in vivo* techniques have been used to study mitochondrial function within the context of the physiological environment. Most commonly used methods are nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and near-infrared spectroscopy (NIRS). These techniques allow to monitor mitochondrial metabolism *in vivo* and investigate how it is modulated in health and disease, however they are not implemented in every laboratory [13].

With regards to lifestyle and environmental factors impact on health, it is well established that unhealthy diet consumption (such as high-fat diet (HFD) leads to obesity [7] and its related metabolic abnormalities, increasing the risk for cardiac hypertrophy [4,14] and lung chronic inflammatory disease [7]. In addition, chronic exposure to HFD can have a detrimental effect due to the accumulation of toxic metabolic derivatives, such as reactive oxygen species (ROS), and/or mitochondrial dysfunction [5]. To investigate the mitochondrial (dys)function in whole heart and lung tissues, we set up and validated a new strategy on preserved tissues using the XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse) technology. We notably evaluated the impact of overnight conservation of murine heart and lung tissues on oxygen consumption, macroscopic and histologic appearance, and mitochondrial ultrastructure, compared to fresh tissues. We validated our method using murine heart or lung tissues isolated from lean or obese mice. Altogether, we provided evidence that this procedure might be a useful tool for monitoring mitochondrial function in cohort samples.

# Materials and methods

## Chemicals

Rotenone (R8875) and antimycin A (A8674), were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) (D5030, Gibco), glutamine (25030149, Gibco), and glucose (A2494001, Gibco) were purchased from ThermoFisher Scientific (Carlsbad, CA, USA).

## Murine samples

Eight-week-old male C57BL/6J mice were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Animals were housed in specific pathogen-free conditions in the animal facilities of the Institut Pasteur de Lille (accredited no. A59107) and maintained in a temperature-controlled ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) facility with a strict 12-hour dark/light cycle. Before experimentation, animals were provided a one week acclimation period and were given *ad libitum* access to food and water. At the end of the protocol, mice were euthanized using cervical dislocation according to our Guidelines.

- Sample preparations

The left lobe of the lungs and the whole heart were collected from C57/BL6J male mice and put on ice. Tissues were then freshly processed, or kept in 1 mL of Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium completed with 10% fetal bovine serum (FBS), either at  $4^\circ\text{C}$  or at  $37^\circ\text{C}$  overnight until use. Transversal cuts ( $\sim 1 \text{ mm}^3$  for heart and  $\sim 0.5 \text{ mm}^3$  for lung) were performed with a scalpel starting from the main bronchi for the lung sample, and the apex of the left ventricle for the heart, as indicated in Figure 1A.

- Experimental obesity model

High-fat diet (60% kcal fat; D12492) and low-fat diet (10% kcal fat; D12450B) were both purchased irradiated from Research Diets (Brogaarden, Lyngø, Denmark). Mice were randomly assigned to be fed either with LFD diet (n = 20) or HFD diet (n = 26) for additional 16 weeks as we previously described [15].

### **Light microscopy**

Cardiac left ventricle and lung samples were fixed in formalin and provided to Oncovet Clinical Research (Loos, France) for histology analysis. After paraffin embedding, sections (4 µm) were then stained with Hematoxylin-Eosin-Saffron. Histopathological assessments were blindly performed by a veterinary pathologist.

### **Lactate dehydrogenase activity assay**

Supernatants of heart and lung tissues incubated in the different conditions of conservation were collected and lactate levels were measured on a SYNCHRON LX20 Clinical system (Beckman Coulter, Fullerton, CA USA).

### **Seahorse**

The XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse XF, Seahorse Bioscience Inc.) is a 24-well instrument that measures in real-time oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) relative to glycolysis activity. Sensor cartridges, containing fluorescence probe, were hydrated with XF Calibrant (Agilent Technologies) the day before the assays, according to manufacturer's instructions, and preloaded with the freshly prepared inhibitors rotenone and antimycin A, 30 minutes before running the assay. Prior to start the XF assay, biosensors were individually calibrated using the standard automated routine. A low-buffered DMEM medium (assay medium) containing glucose (10 mM) and glutamine (2

mM) was extemporarily prepared and adjusted to pH 7.4 before the assay. Freshly slices of heart (~ 1 mm<sup>2</sup>) and lung (~0.5 mm<sup>2</sup>) tissues were laid over the XF 24-well islet capture microplate wells (Seahorse Bioscience) in 200 µL of 37°C pre-warmed assay medium and then incubated at 37°C without CO<sub>2</sub> for 30 minutes. Then, 300 µL of pre-warmed (37°C) assay medium were added and equilibration performed after calibration. Prior to each rate measurement, mixing of the media in each well was performed by the XF24 Analyzer to allow the oxygen pressure to reach equilibrium. OCR and ECAR were then measured simultaneously (see Supplemental Table 1 for parameter settings). After the baseline measurement (at least 4 independent measures), 75 µL of rotenone/antimycin A mixture was injected into each well to reach a final concentration of 10 µM for both inhibitors and followed by mixing (see Supplemental Table 1 for parameters). At the end of each assay, tissues were removed from the well for protein quantification assay.

### **Protein quantification assay**

At the end of Seahorse experiments, samples were lysed through Dounce-Potter homogenization into 100 µL of ice-cold RIPA buffer (Sigma-Aldrich), and kept at -20°C until analysis. The protein quantification assay was performed with Pierce<sup>TM</sup>BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher) following manufacturer's instructions.

### **Electron microscopy**

Samples were fixed with paraformaldehyde 2% / picric acid 0.2% / glutaraldehyde 1% at 4°C for 72 hours, and then washed with Phosphate buffer 0.1M pH 7.5. Samples were then post-fixed in 1% osmium tetroxide in Phosphate buffer 0.1M at room temperature (RT) for 1 hour then washed with Phosphate buffer 0.1M pH 7.5; followed by dehydration steps (5 minutes in ethanol 50%, 5 minutes in ethanol 70%, 5 minutes in ethanol 80%, 2 x 15 minutes in ethanol

95%, 3 x 20 minutes in ethanol 100%, 20 minutes in propylene oxide). Samples were then stained in propylene oxide / Araldite® (V/V) for 1 hour, then in Araldite® 100% at 4°C, overnight before capsules embedding at 56°C overnight.

Ultrathin sections (85 nm) were performed with a Leica UM EC7 ultramicrotome, and contrast of sections were performed by uranyl acetate 2% / ethanol 50% treatment for 8 minutes followed by Reynolds lead citrate for 8 minutes. Sections were observed using a Zeiss EM900 electron microscope.

### **RNA extraction and quantitative RT-PCR**

Total RNA from cardiac left ventricles and lungs was prepared using TRI Reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. RNA (500 ng) from each sample was reverse transcribed with miScript II RT Kit (Qiagen). qPCR was then performed using the miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen). All samples were processed in duplicate reactions on a Stratagene Mx3005O (Agilent Technologies). Primer sequences used were Heme Oxygenase 1 (HO-1) (forward: 5'-AAGCCGAGAATGCTGAGTTCA-3'; reverse: 5'-GCCGTGTAGATATGGTACAAGGA-3') and Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) (Forward: AAAGGACCTCTCGAAGTGTT; Reverse: TGACACAAACGTGATTCAA). Relative mRNA levels ( $2^{-\Delta(\Delta C_t)}$ ) were determined by comparing 1) the PCR cycle thresholds (Ct) for the gene of interest and the housekeeping and 2)  $\Delta C_t$  values for the different conditions ( $\Delta\Delta C_t$ ).

### **Cell cultures**

The rat embryonic-heart-derived H9c2 cell-line (ATCC, CRL-1446) and the human normal bronchial epithelial Beas-2b cell-line (ATCC, CRL 9609) were cultured following the manufacturer's instructions.

## Statistics

Statistics were performed with GraphPad Prism® version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. Differences between measurements in groups were determined by Kruskal-Wallis with Dunn's post-test analysis when sample size  $< 6$ , and Student's *t*-test when sample size  $> 6$ .  $P < 0.05$  was considered significant with  $P < 0.05$  indicated as (\*),  $P < 0.01$  as (\*\*), and  $P < 0.001$  as (\*\*\*)

## Results and discussion

Several methods have been described to evaluate mitochondrial functions either from isolated mitochondria or from dissociated cells from fresh tissues [16,17]. Assessment of enzymatic activities of mitochondrial respiratory chain can also be easily performed from frozen tissues [18] yet all these analyses cannot adequately reflect the oxygen consumption of *in vivo* situation. Assessment of oxygen consumption from isolated mitochondria (extracted from fresh tissue) measures mitochondrial metabolism in an acellular environment [19]. In this context, the physiological process of fusion/fission of mitochondria is altered and the oxygen consumption measured cannot reflect the situation of the whole cell, and therefore the whole tissue (including the intra-tissue nutrients). Oxidative phosphorylation can also be determined from dissociated cells but they would suffer from the mechanical/physical/enzymatic methods used for tissue disruption. Moreover, this method altered cell shape and cytoskeleton and therefore the multicellular organization. Assessment of mitochondrial oxygen consumption from tissue samples, described in this study is another complementary approach. Using this procedure, cells are kept closely to their physiological environment: tissue architecture and cell-cell interactions are preserved, therefore reflecting the metabolic activity of the whole organ [16,17]. As an example, if OCR is decreased, it could suggest that the metabolic activity of the tissue is altered and that the associated organ could not be fully functional. However, the defective cell type responsible for the observed dysfunction cannot be identified. Moreover, the tissue outcome cannot necessarily reflect the defective status of a minor cell type. Thus, the reliable and easily set up technique that we described herein could be used as preliminary screening of tissue metabolic disorders.



## **Quantification of mitochondrial respiration in heart and lung tissue samples**

We designed a new protocol for evaluating oxygen (O<sub>2</sub>) consumption rates (OCR) in murine heart and lung tissues, using the XF24 Extracellular Flux Analyzer. First, multiple transversal cuts were performed with a scalpel, starting from the left ventricular apex for the heart (according to the orientation of the fibers), and from the main bronchi for the lung (Fig 1A). Size-matched tissue samples were prepared as thin as possible yet large enough to cover the bottom of a Seahorse Islet Plate's well. Tissue samples were maintained at the bottom of the plate thanks to the grid provided with the Seahorse Islet Plate (Figs 1B-1C). To limit variability between wells and therefore differences in mitochondrial metabolism readouts, samples of comparable area were selected for each tissue: ~ 1 mm<sup>2</sup> for heart and 0.5 mm<sup>2</sup> for lung (Fig 1D), which corresponds to, respectively, 200 and 80 µg of proteins (Fig 1E). Due to the variable sizes of the tissue samples analyzed (Fig 1D), normalization by protein amount was required in the following experiments to adequately compare the different conditions.

We then measured O<sub>2</sub> concentrations (mmHg) in the medium of each well containing cardiac left ventricles (Fig 2) and lung (Fig 3) samples. Supplemental Table 1 recapitulates the parameters that were used to assess the O<sub>2</sub> levels, OCR, ratios between mitochondrial vs. non-mitochondrial respiration and extracellular acidification rates (ECAR) of the different samples. Our experimental conditions allowed maintaining a high level of O<sub>2</sub> during all the procedure, therefore avoiding to reach hypoxia or anoxia conditions which are toxic for tissues and cells. We also checked that our experimental conditions permitted the total reoxygenation of the medium to allow the next measurement, knowing that the range of O<sub>2</sub> concentration is stable in the vehicle condition (Figs 2A and 3A). Next, we used the well-characterized mitochondrial inhibitors rotenone (rot) and antimycin A (AA), which respectively inhibit the complexes I and III of the mitochondrial respiratory chain. With both

drugs, a full inhibition of the mitochondrial respiration was observed after 90 minutes in heart and lung tissues (Figs 2B and 3B). We noticed that the respiration rate slightly decreased after 50 minutes in the absence of inhibitors in cardiac left ventricles, (Fig 2B). This was not observed in lung samples (Fig 3B). Of note, similar results have been obtained with potassium cyanide, an inhibitor of the complex IV of the mitochondrial respiratory chain (S3B Fig).

Next, the ratios between mitochondrial vs. non-mitochondrial respiration were compared between the tissue samples and the corresponding cell-lines H9c2 (for heart, Fig 2C) and Beas-2b2b (for lung, Fig 3C). Importantly, the non-mitochondrial respiration was not statistically different between cardiac left ventricles and lung samples and the corresponding cell-lines, suggesting that rotenone and antimycin A inhibited the respiratory chain similarly in tissues samples (Figs 2C and 3C) and cells (S1Fig). Of note, heart and lung biopsies exhibited different profiles in terms of O<sub>2</sub> concentration (amplitude) and OCR (initial levels).

### **Impact of the conditions of murine tissue conservation on mitochondrial integrity and function**

Heart (Fig 2) and lung (Fig 3) samples were kept at 4°C or 37°C overnight, and compared to fresh tissues. Macroscopically, we did not observe any obvious changes between fresh tissues and tissues stored at 4°C overnight. These observations were confirmed by photonic microscopy after hematoxylin/eosin staining since no significant modifications of the heart or lung tissue histology were evidenced (Figs 2D and 3D). In striking contrast, tissues kept at 37°C overnight seemed to be altered. Indeed, cardiac biopsies begun to lose cross striations and the nuclei were neither clearly visible nor centrally placed in most of the cells (Fig 2D). Similarly, lung biopsies have altered tissue histology, as evidenced by parenchymal inflammation and lesions, bronchial damages and necrosis (Fig 3D).

Accordingly, no significant ultrastructural changes were evidenced between fresh tissues and tissues stored at 4°C overnight (Figs 2E and 3E and S2A Fig). In both conditions, tissues had normal mitochondrial cristae and inner/outer mitochondrial membranes, suggesting preserved physiological and functional organization of the mitochondria. In marked contrast, heart and lung ultrastructures were totally disorganized after overnight conservation at 37°C, confirming that this condition was deleterious for tissue's integrity preservation.

These results were corroborated by evaluation of cell membrane disruption (relative to necrosis) assessed through lactate dehydrogenase (LDH) release in biopsies supernatants : the LDH activity remains low and comparable between fresh tissues and tissues stored at 4°C overnight, for both heart (Fig 2F) and lung (Fig 3F). In opposite, LDH activity was significantly increased after overnight conservation at 37°C for both tissues ( $P=0.001$  for heart, and  $P=0.014$  for lung). Preservation of tissue overnight at 4°C did not induce hypoxia as depicted by heme oxygenase 1 (HO-1) mRNA levels in contrast to 37°C in heart (S2B Fig) and lung (S2C Fig). Altogether, these results showed that overnight conservation of heart and lung samples at 4°C neither altered tissue viability or organization, nor induced hypoxia.

To further decipher the impact of conservation conditions on mitochondrial respiratory functions, we used the protocol above described (Figs 2A and 3A and S1 Table) using rotenone and antimycin A. We compared OCR in cardiac left ventricles (Fig 2G) and lung (Fig 3G) samples, either fresh or conserved overnight at 4°C or 37°C. We did not observe any significant change in OCR between fresh and 4°C-overnight-stored tissues. In contrast, the OCR values of tissues kept at 37°C overnight were drastically reduced, almost reaching the background level, in accordance with the observed damaged mitochondria (Figs 2E and 3E and S2A Fig).

Interestingly, our study demonstrates that heart and lung samples which have been stored overnight at 4°C (non hypoxic conditions) exhibit an unmodified respiration compared to

fresh tissue obtained shortly after mouse sacrifice. Therefore preserving samples overnight at 4°C could be useful to collect many samples from large cohorts and to compare their OCR on the same plate, limiting experimental errors as we compared mitochondrial metabolism of heart and lungs of obese/lean mice. In this pathological context, we failed to evaluate the OCR from various adipose tissues (visceral, subcutaneous and brown) due to the large heterogeneity of the samples and the low cell content.

However, this method has some limitations. The heart is a contracting muscle, which creates a permanent energetic demand for mitochondria. This method measures respiration in non-contracting heart tissue and probably underestimates oxygen consumption of the tissue. This problem could be probably solved by permeabilization of the tissue with digitonin or saponin and addition of ADP to mimic a high-energy demand but this methodology leads to intracellular component escape. Exposure to pronophore molecules such as carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) or (2-fluorophenyl){6-[(2-fluorophenyl)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pyrazin-5-yl)}amine (Bam15) could be another alternative to determine the maximal oxygen consumption rate of cardiac tissue. Moreover, a protocol was recently described to prepare highly viable adult ventricular myocardial slices [20]. If these contractile slices are compatible with Seahorse technology, this could further increase the interest of our method described here.

Culture medium used during the assay is based on usual formulations described by many other studies [21,22] but this standardized formulation is characterized by supraphysiological concentrations of substrates. Moreover, addition of some metabolites could be also more appropriated depending on the tissue origin. It is well established that cardiomyocytes use preferentially fatty acids as metabolites [23]. In our experimental settings, the oxygen consumption and therefore the metabolic profile of heart tissue could have been biased by the medium containing glucose and glutamine, favoring glycolysis.

## **Validation of the method by monitoring the mitochondrial metabolism in metabolically-altered tissues.**

As a “proof-of-concept”, we tested our method with heart and lung samples harvested from obese and lean mice. We chose this model because other teams reported that cells isolated from organs of obese mice (high-fat diet-induced obesity) exhibited an higher OCR, when compared with cells isolated from lean mice [5,7]. As shown on Figure 4A, sixteen weeks of high-fat diet (HFD) induced a significant increase in body weight ( $P<0.0001$ ), when compare to low-fat diet (LFD)-fed lean animals. Heart and lung tissues were collected from lean and obese animals, and stored at 4°C overnight. OCR and extracellular acidification rate (ECAR) values were then determined in tissue samples. As expected from literature, HFD induced significant increase in OCR and ECAR in cardiac left ventricles ( $P=0.0046$ ) (Figs 4B-C). Interestingly, we also showed that the OCR and ECAR rates are increased in the lung tissue of obese mice ( $P=0.0052$ ) (Figs 4D-E), compared to lean animals. This experiment confirms clearly that mitochondrial metabolic behavior is impaired in heart of HFD-mice and highlighted similar findings in the lung of obese mice. Importantly we demonstrated in pathologic situation that whole biopsies kept at 4°C overnight can be used for measuring mitochondrial metabolism. We also showed that our new reliable and easily set up method allows to demonstrate that HFD induced an increase in OCR consumption in cardiac and lung tissue sections. This metabolic behavior has already been observed in cells isolated by collagenase disruption from kidney [5] and lung [7] of obese mice in comparison with cells isolated from lean mice.

Pathological and physiological evidences reveal mitochondrial alterations in numerous major diseases. Mitochondrial oxygen consumption is now considered as a potential biomarker. In heart disease, mitochondrial metabolism is involved in coronary atherosclerosis, ischemia /

reperfusion injury, hypertension, obesity, metabolic syndrome and diabetes, as well as cardiac hypertrophy [24,25]. In lung diseases, mitochondrial activity has been implicated in the development of chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis, asthma and lung cancer [26]. Here, we have described and validated a methodology to evaluate the mitochondrial oxygen consumption in whole tissue, which could be useful to evaluate the pharmacological approaches protecting or restoring mitochondrial activity in the pathological mouse models.

In many experiments, mitochondrial activity is also a marker of cell viability. Mitochondrial activity can be easily assessed in monolayer cells by MTT assay (based on enzymatic activity of mitochondrial succinate) or by chemiluminescent measurement of ATP production. Yet, these methods cannot easily be used to assess cell viability in the tissue context. As seen in this work, morphological analysis is widely used to determine cell viability, but this approach is rather qualitative than quantitative. The evaluation of mitochondrial oxygen by XF Seahorse, as described here, can easily quantify tissue integrity. As a new method that could be used rapidly to screen metabolic activity of tissues / organs, we could translate our approach to clinic. In the critical field of heart and lung transplantation, the survival rate at 5-years is only of 65% and 40% respectively. These organs are particularly sensitive to environmental factors including donor surgery, transport and conservation conditions (6 hours maximum) and recipient surgery. Until now, organ quality is only macroscopically verified by a member of the transplant team before transplantation without evaluating the metabolic status of these organs. Because mitochondrial metabolism is essential to cell survival, our rapidly and easily set up procedure, using small biopsies and feasible within 2 hours, could be used to confirm the quality of heart or lung transplant before organ transplantation surgery.

## **Conclusions**

To investigate the mitochondrial (dys)function in whole tissues, we set up a novel procedure for monitoring mitochondrial oxidative phosphorylation in cardiac left ventricles and lung tissue samples using the XF24 Extracellular Flux analyzer. We showed that overnight conservation of tissue samples at 4°C did not impact the mitochondrial respiration, when compare to freshly treated samples. We further validated our approach in the pathophysiological context of obesity. This could be proposed as a potential clinical tool to monitor mitochondrial function (Figure 5).

In the end, we set up and validate a new strategy to optimally assess mitochondrial function in murine tissues. As such, this method is of great potential interest for monitoring mitochondrial function in cohort samples.

## **Acknowledgments**

We thank the Animal Resource Center (PLEHTA) of the “Institut Pasteur de Lille”.



## References

1. Chakrabarty S, Kabekkodu SP, Singh RP, Thangaraj K, Singh KK, Satyamoorthy K. Mitochondria in health and disease. *Mitochondrion*. 2018;43: 25–29. doi:10.1016/j.mito.2018.06.006
2. Piffaretti FM, Santhakumar K, Forte E, van den Bergh HE, Wagnières GA, Wagnières GA. Optical fiber-based setup for in vivo measurement of the delayed fluorescence lifetime of oxygen sensors. *J Biomed Opt*. 2011;16: 037005. doi:10.1117/1.3558846
3. Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov A, Rieger G, Margreiter R. Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *J Exp Biol*. 1998;1365: 249–254. Available: [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00076-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00076-0)
4. Chen D, Li X, Zhang L, Zhu M, Ga L, Gao L. A high-fat diet impairs mitochondrial biogenesis, mitochondrial dynamics, and the respiratory chain complex in rat myocardial tissues. *J Cell Biochem*. 2018;119: 8750–8762. doi:10.1002/jcb.27068
5. Ruggiero C, Ehrenshaft M, Cleland E, Stadler K. High-fat diet induces an initial adaptation of mitochondrial bioenergetics in the kidney despite evident oxidative stress and mitochondrial ROS production. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300: E1047–E1058. doi:10.1152/ajpendo.00666.2010.
6. Hughey CC, Hittel DS, Johnsen VL, Shearer J. Respirometric oxidative phosphorylation assessment in saponin-permeabilized cardiac fibers. *J Vis Exp*. 2011;48: e2431. doi:10.3791/2431
7. Pizzolla A, Oh DY, Luong S, Prickett SR. High Fat Diet Inhibits Dendritic Cell and T Cell Response to Allergens but Does Not Impair Inhalational Respiratory Tolerance. *PLoS One*. 2016;11: e0160407. doi:10.1371/journal.pone.0160407
8. Area-Gomez E, Guardia-Laguarta C, Schon EA, Przedborski S. Mitochondria, OxPhos,

- and neurodegeneration: cells are not just running out of gas. *J Clin Invest*. 2019;129: 34–45. doi:10.1172/JCI120848
9. Corazao-Rozas P, Guerreschi P, André F, Gabert P-E, Lancel S, Dekioux S, et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation controls cancer cells life and death decisions upon exposure to MAPK inhibitors. *Oncotarget*. 2016;7: 39473–39485. doi:10.18632/oncotarget.7790
  10. Villani G, Attardi G. In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in human cells. *Free Radic Biol Med*. 2000;29: 202–10. doi:DOI:10.1016/s0891-5849(00)00303-8
  11. Horan MP, Pichaud N, William, J. Ballard O. Review: Quantifying mitochondrial dysfunction in complex diseases of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67: 1022–1035. doi:10.1093/gerona/glr263
  12. Perry CGR, Kane DA, Lanza IR, Neuffer PD. Methods for assessing mitochondrial function in diabetes. *Diabetes*. 2013;62: 1041–53. doi:10.2337/db12-1219
  13. Befroy DE, Falk Petersen K, Rothman DL, Shulman GI. Assessment of in vivo mitochondrial metabolism by magnetic resonance spectroscopy. *Methods Enzymol*. 2009;457: 373–93. doi:10.1016/S0076-6879(09)05021-6
  14. Wang Z, Li L, Zhao H, Peng S, Zuo Z, Hospital SYM. Chronic high fat diet induces cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *Metabolism*. 2015;64: 917–925. doi:https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.04.010
  15. Kim HY, Lee HJ, Chang Y-J, Pichavant M, Shore SA, Fitzgerald KA, et al. Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. *Nat Med*. 2014;20: 54–61. doi:10.1038/nm.3423
  16. Zhang J, Nuebel E, Wisidagama DRR, Setoguchi K, Hong JS, Van Horn CM, et al. Measuring energy metabolism in cultured cells, including human pluripotent stem cells

- and differentiated cells. *Nat Protoc.* 2012;7: 1068–85. doi:10.1038/nprot.2012.048
17. Kuznetsov A V, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc.* 2008;3: pages 965–976. doi:10.1038/nprot.2008.61
  18. Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salviati L, Angelini C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc.* 2012;7: 1235–1246. doi:10.1038/nprot.2012.058
  19. Frezza C, Cipolat S, Scorrano L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc.* 2007;2: 287–295. doi:10.1038/nprot.2006.478
  20. Watson SA, Scigliano M, Bardi I, Ascione R, Terracciano CM, Perbellini F. Preparation of viable adult ventricular myocardial slices from large and small mammals. *Nat Protoc.* 2017;12: 2623–2639. doi:10.1038/nprot.2017.139
  21. Molina JR, Sun Y, Protopopova M, Gera S, Bandi M, Bristow C, et al. An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat Med.* 2018;24: 1036–1046. doi:10.1038/s41591-018-0052-4
  22. Marinangeli C, Kluza J, Marchetti P, Buée L, Vingtdoux V. Study of AMPK-Regulated Metabolic Fluxes in Neurons Using the Seahorse XFe Analyzer. *Methods Mol Biol.* 2018. pp. 289–305. doi:10.1007/978-1-4939-7598-3\_19
  23. Taegtmeyer H, Sen S, Vela D. Return to the fetal gene program. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1188: 191–198. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05100.x
  24. Siasos G, Tsigkou V, Kosmopoulos M, Theodosiadis D, Simantiris S, Tagkou NM, et al. Mitochondria and cardiovascular diseases-from pathophysiology to treatment. *Ann Transl Med.* 2018;6: 256. doi:10.21037/atm.2018.06.21
  25. Bertero E, Maack C, O'Rourke B. Mitochondrial transplantation in humans: “magical” cure or cause for concern? *J Clin Invest.* 2018;128: 5191–5194. doi:10.1172/JCI124944

26. Cloonan SM, Choi AMK. Mitochondria in lung disease. *J Clin Invest.* 2016;126: 809–20. doi:10.1172/JCI81113

## Figure legends

### **Figure 1: Sample preparation for reproducible respirometry experiments.**

Samples were obtained from heart and lung tissues and processed as shown in (A). Transversal cuts were performed with a scalpel, starting from the left ventricular apex for the heart, and the main bronchi for the lung, as indicated by the arrows (1 and 2). Size-matched samples (framed) were prepared as thin as possible (3 and 4). One sample per well was then placed in a Seahorse Islet plate (B). Each sample was maintained at the bottom of the plate using the grid provided with the Seahorse Islet plate before filling the well with medium (C). Samples mean diameter ( $\text{mm}^2$ ) (D), and protein quantity ( $\mu\text{g}$ ) (E) were obtained for the optimal quantification of the oxygen consumption rates (OCR) in heart (grey) and lung (white) tissues (n=10).

### **Figure 2: Oxygen ( $\text{O}_2$ ) consumption measurements and effect of conservation conditions in cardiac left ventricle samples.**

$\text{O}_2$  concentration (mmHg) (A), oxygen consumption rate (OCR, pmol/min/ $\mu\text{g}$  protein) (B) and mitochondrial OCR (%) (C) were quantified in cardiac left ventricle samples. In A, background (black line) corresponds to empty wells. A mix of rotenone (rot) and antimycin A (AA) was injected at the indicated time (arrow) in order to progressively inhibit mitochondrial respiration (red) and was compared to vehicle injection (grey). OCR has been assessed from duplicate biopsies of 3 mice for each condition (n=6) (B). Mitochondrial  $\text{O}_2$  consumption is calculated from basal OCR (obtained without inhibitor, grey) subtracted to OCR level after rot/AA treatment (non-mitochondrial respiration, black). Both values are compared as a percentage of basal OCR for tissue samples and the cardiac cell line H9c2 (C). Representative histological sections (Hematoxylin-Eosin-Saffron staining) of fresh and conserved overnight at  $4^\circ\text{C}$  and  $37^\circ\text{C}$  heart

samples (D). The corresponding macroscopically views are inserted in each panel. (E) Representative electronic microscopy images of heart (x20000 magnification, scale bar: 2  $\mu\text{m}$ ); (F) Lactate dehydrogenase (LDH) activity ( $\text{U.L}^{-1}$ ) was quantified in the medium surrounding the heart (n=3) as a surrogate of potential tissue damage. Graphs showed the individual and mean values. Significant *P* values are indicated, \*\* *P* <0.001. (G) Quantification of OCR ( $\text{pmol}/\text{min}/\mu\text{g}$  protein) in cardiac left ventricles samples stored in the different conditions: fresh (white), 4°C overnight (grey) and 37°C overnight (black). OCR has been assessed from duplicate biopsies of 3 mice for each condition (n=6). Injection of rotenone (rot) and antimycin A (AA) is indicated by an arrow.

**Figure 3: Oxygen ( $\text{O}_2$ ) consumption measurements and effect of conservation conditions lung samples.**  $\text{O}_2$  concentration (mmHg) (A), oxygen consumption rate (OCR,  $\text{pmol}/\text{min}/\mu\text{g}$  protein) (B) and mitochondrial OCR (%) (C) were quantified in lung samples. In A, background (black line) corresponds to empty wells. A mix of rotenone (rot) and antimycin A (AA) was injected at the indicated time (arrow) in order to progressively inhibit mitochondrial respiration (red) and was compared to vehicle injection (grey). OCR has been assessed from duplicate biopsies of 3 mice for each condition (n=6) (B). Mitochondrial  $\text{O}_2$  consumption is calculated from basal OCR (obtained without inhibitor, grey) subtracted to OCR level after rot/AA treatment (non-mitochondrial respiration, black). Values are compared as a percentage of basal OCR for tissue samples and the lung cell line Beas-2b (n=3) (C). Representative histological sections (Hematoxylin-Eosin-Saffron staining) of fresh and conserved overnight lung samples at 4°C and 37°C (D). The corresponding macroscopical views are inserted in each panel. (E) Representative electronic microscopy images of lung (x30000 magnification, scale bar: 1  $\mu\text{m}$ ). (F) Lactate dehydrogenase (LDH) activity ( $\text{U.L}^{-1}$ ) was quantified in the medium surrounding the lung (n=3) as a surrogate of

potential tissue damage. Graphs showed the individual and mean values. Significant *P* values are indicated, \* *P* <0.05. (G) Quantification of OCR (pmol/min/μg protein) in lung samples stored in the different conditions: fresh (white), 4°C overnight (grey) and 37°C overnight (black). OCR has been assessed from duplicate biopsies of 3 mice for each condition. Injection of rotenone (rot) and antimycin A (AA) is indicated by an arrow.

**Figure 4: Impact of high-fat diet (HFD) feeding on oxygen consumption in cardiac and lung samples.** Twenty-four weeks of high-fat diet (HFD) induced a significant increase in body weight compared to low-fat diet (LFD) (A). Mitochondrial oxygen consumption rate (basal OCR – non mitochondrial OCR) (B, D) and extracellular acidification rate (basal ECAR) (C, E) have been assessed from duplicate biopsies of 3 mice (n=6) for each diet in heart (B-C) and lung (D-E) samples. Graphs showed the individual and mean values. Significant *P* values are indicated, \*\* *P* <0.01. \*\*\* *P* <0.001.

**Figure 5: Schematic representation of methodology used to measure oxygen consumption in 4°C conserved tissues with XF24e Seahorse.** Heart and lung samples have been freshly removed from untreated/treated mice and quickly stored at 4°C overnight. Next day, tissues have been dissected and cut in small pieces of tissue for electron microscopy and oxygen consumption (OXPHOS assessment) analysis. Following measurements, protein concentrations of tissues have been determined to normalize oxygen consumption rate.

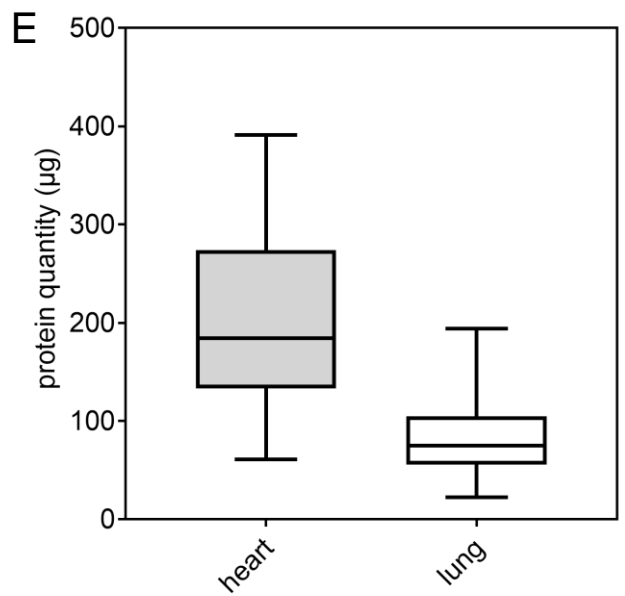
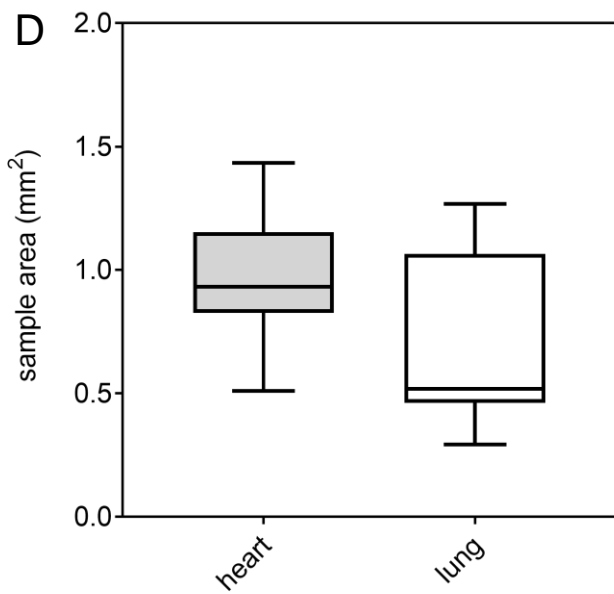
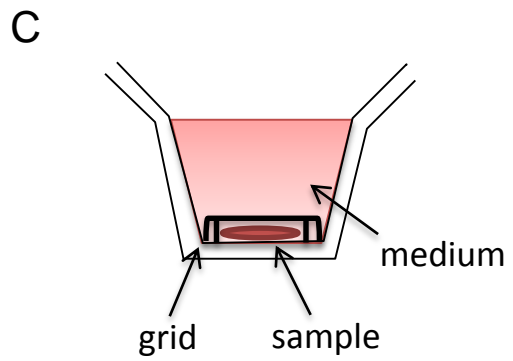
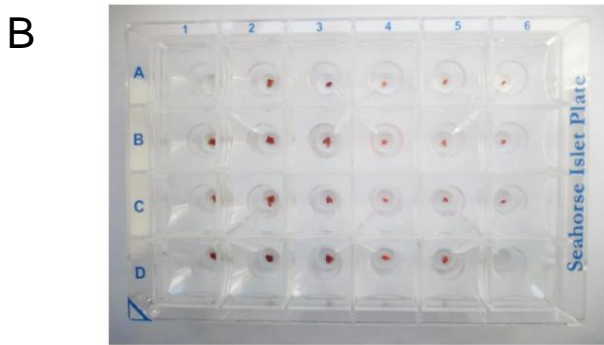
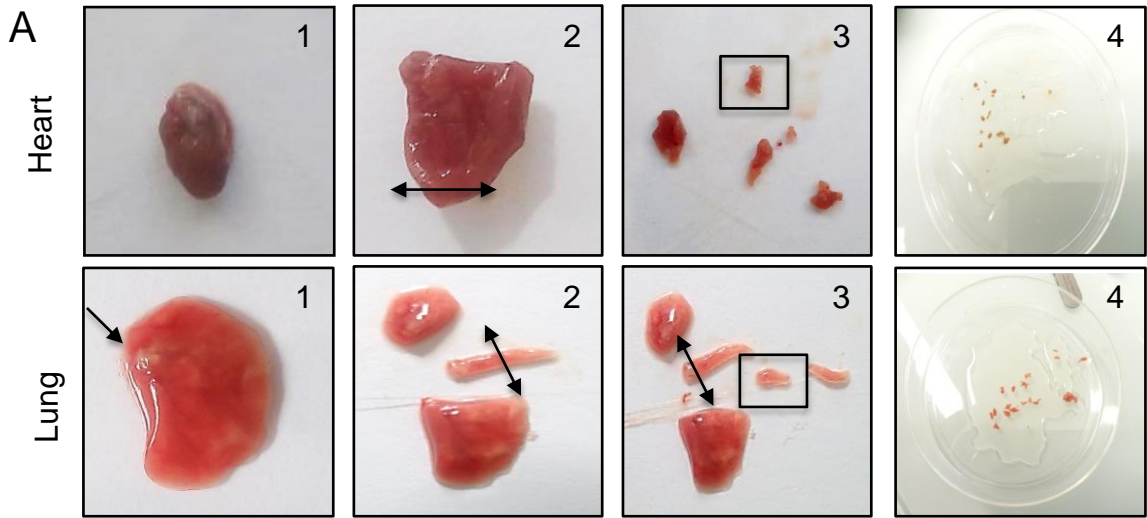


Figure 1



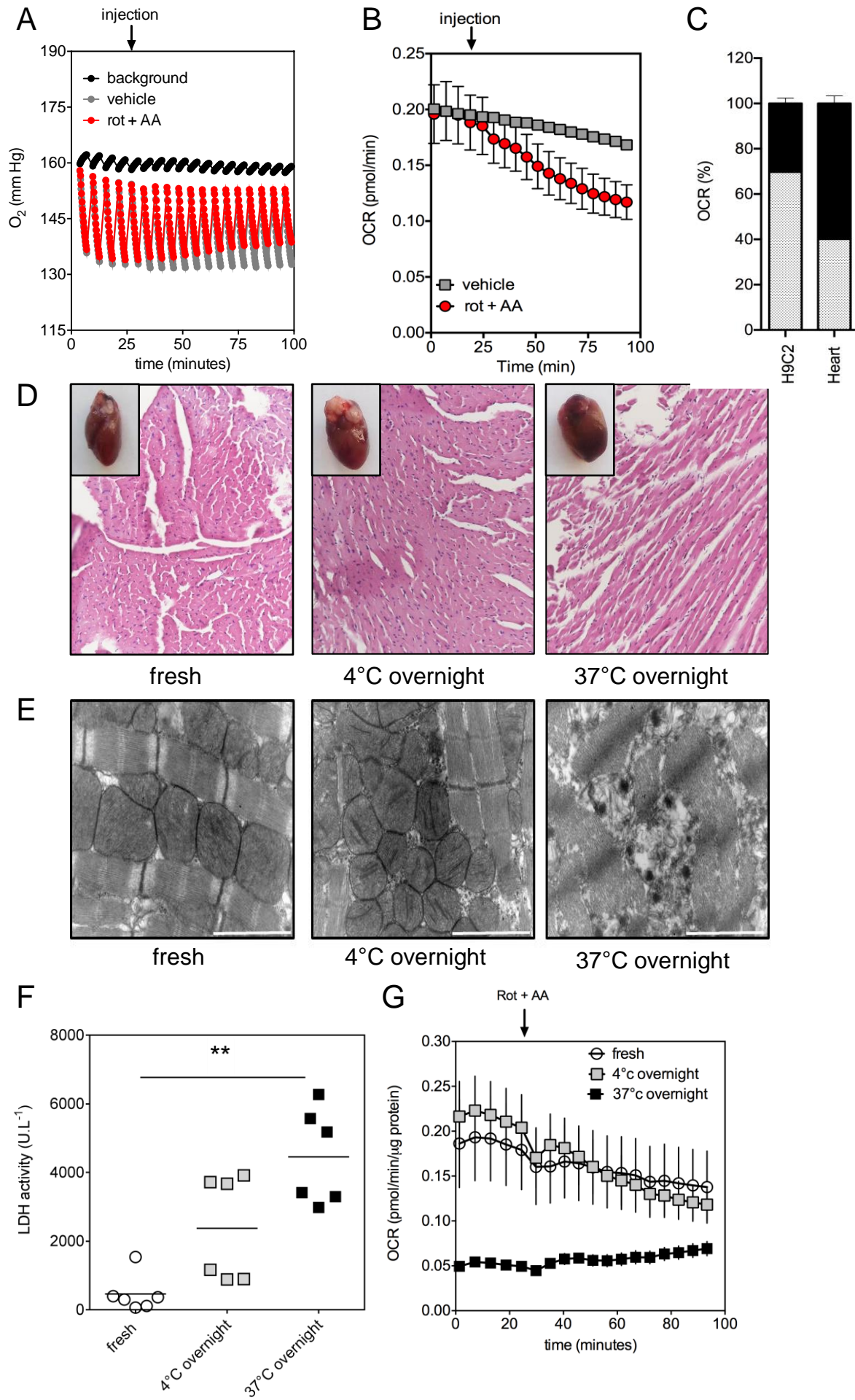


Figure 2

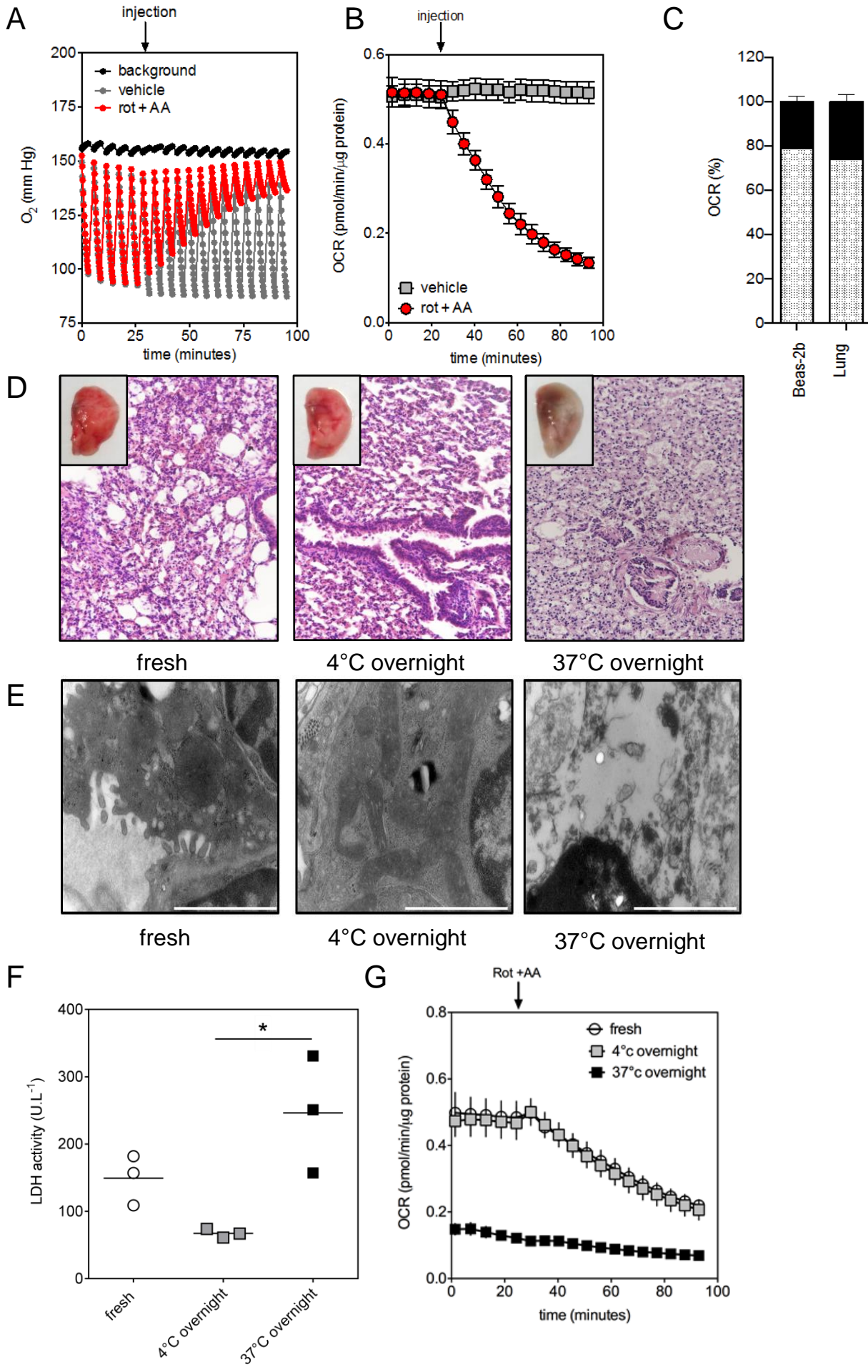
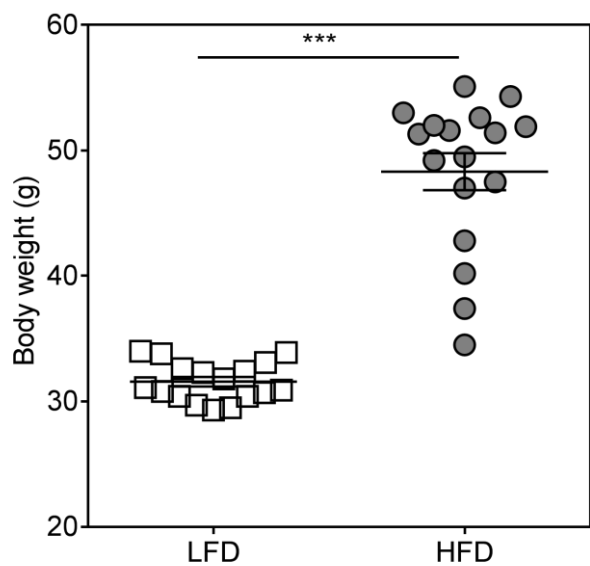
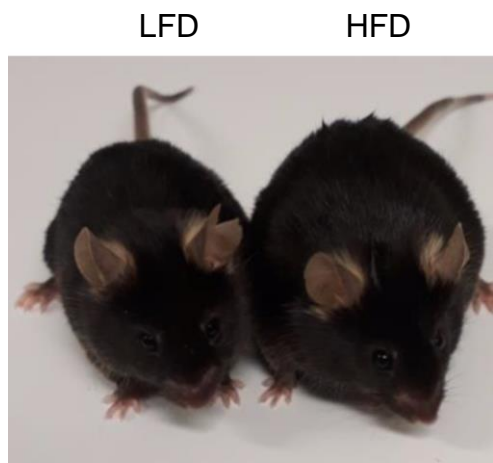
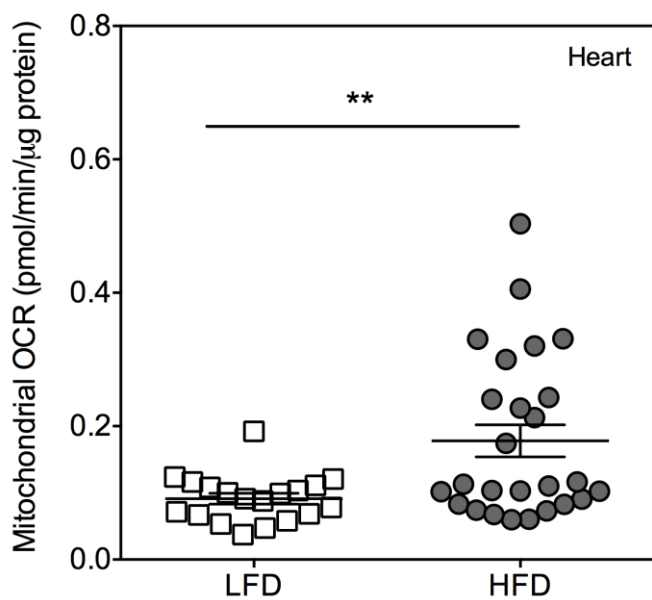


Figure 3

**A****B**

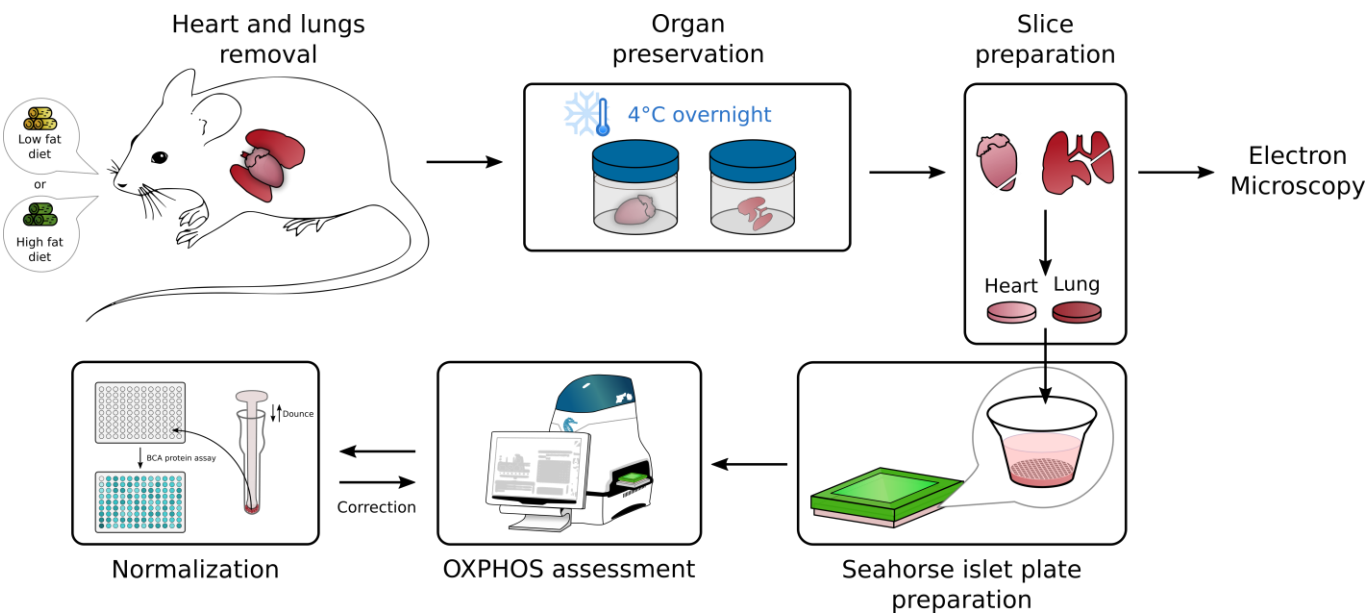


Figure 5

# **A new strategy to preserve and assess oxygen consumption in murine tissues**

Jérôme Kluza<sup>1</sup>, Victoriane Peugnet<sup>2</sup>, William Laine<sup>1</sup>, Gwenola Kervoaze<sup>3</sup>, Gaëlle Rémy<sup>3</sup>, Anne Loyens<sup>1</sup>, Patrice Maboudou<sup>4</sup>, Quentin Fovez<sup>1</sup>, Corinne Grangette<sup>3</sup>, Isabelle Wolowczuk<sup>3</sup>, Philippe Gosset<sup>3</sup>, Guillaume Garçon<sup>5</sup>, Philippe Marchetti<sup>1</sup>, Florence Pinet<sup>2</sup>, Muriel Pichavant<sup>3\*¶</sup>, Emilie Dubois-Deruy<sup>2</sup> ¶ (1) Univ.Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, UMR9020-UMR-S 1277-Canther-Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Lille, France

(2) Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, Lille, France

(3) Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR8204 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France

(4) Centre de Bio-Pathologie, CHRU Lille, France

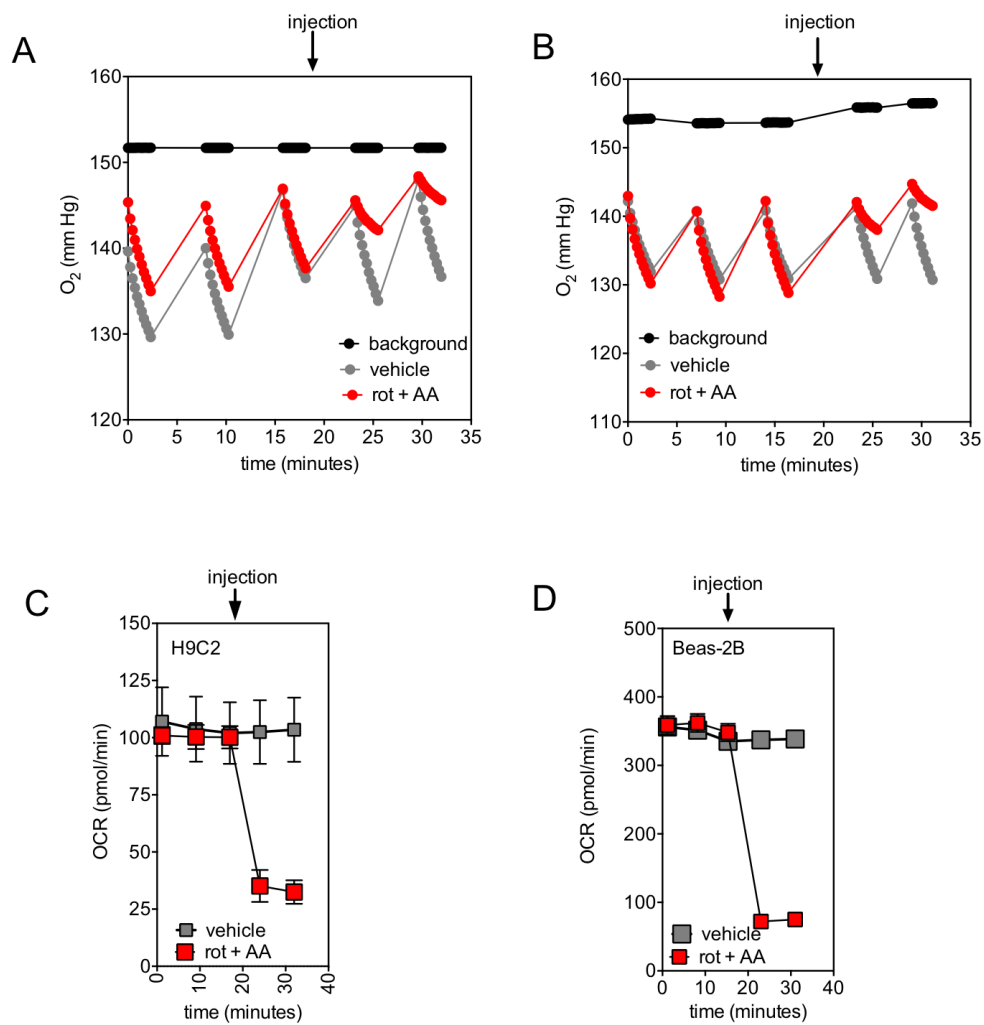
(5) CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, EA4483-IMPacts de l'Environnement Chimique sur la Santé (IMPECS), Univ. Lille, Lille, France

**\*Corresponding author**

muriel.pichavant@pasteur-lille.fr (MP)

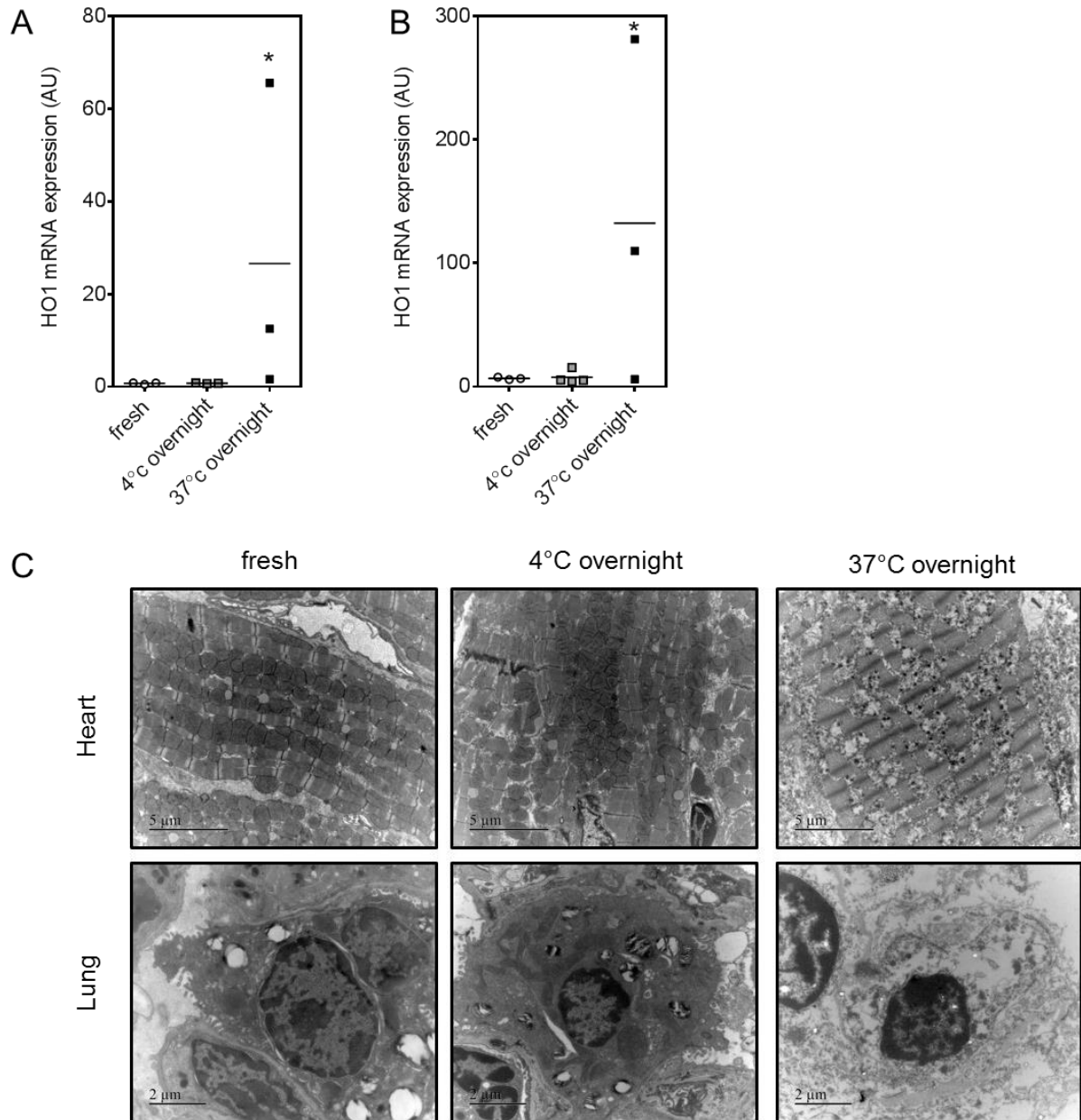
¶ These authors contributed equally to this work.

## Supplemental data

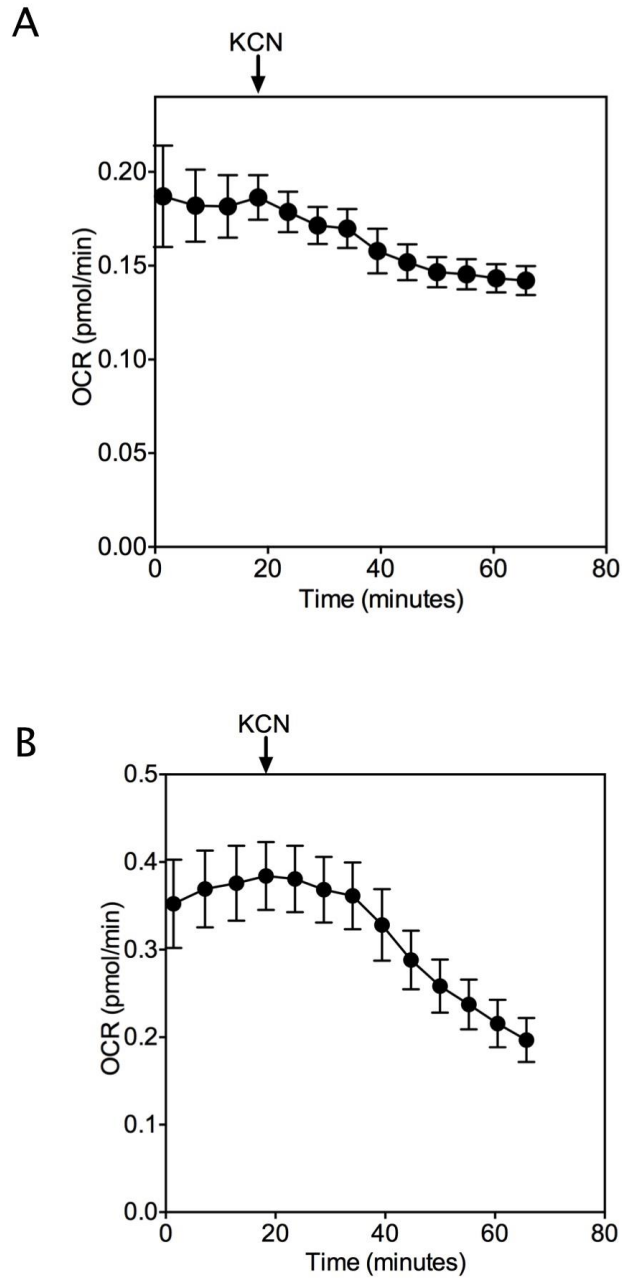


**Figure S1: Quantification of oxygen consumption in H9C2 (A and C) and BEAS-2B (B and D) cell lines.** O<sub>2</sub> concentration (mmHg) (A and B) and oxygen consumption rate (OCR, pmol/min/ $\mu$ g protein) were quantified in heart (H9C2; n=6) (A and C) and lung (BEAS-2B; n=6) (B and D) cell lines. In A and B, background (black) corresponds to empty wells. A mix of rotenone (rot) and antimycin A (AA) were injected at the indicated time (arrow) in order to inhibit the mitochondrial respiration (red) as compared to vehicle injection (grey).





**Figure S2: Effect of overnight conservation of heart and lung samples on hypoxia and mitochondrial ultrastructure.** Heart and lung samples either fresh or conserved overnight at 4°C or 37°C were compared. (A) heme oxygenase 1 (HO-1) mRNA level normalized on Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) quantified by RT-qPCR analysis and (B) representative electronic microscopy images of heart and lung samples at x7000 magnification for heart (scale bar: 5  $\mu\text{m}$ ) and x12000 magnification for lung (scale bar: 2  $\mu\text{m}$ ).



**Figure S3: Oxygen (O<sub>2</sub>) consumption measurements in cardiac left ventricle samples (A) or in lung samples (B).** Oxygen consumption rate (OCR, pmol/min/μg protein) were quantified in both tissues with XF24 Seahorse. KCN (100mM) was injected at the indicated time (arrow) in order to progressively inhibit mitochondrial respiration (grey). OCR has been assessed from duplicate biopsies of 3 mice for each condition (n=6).



## Supplemental table

**Supplemental table 1: Parameters of XF24 Seahorse used to measure O<sub>2</sub> concentration, oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR).**

<b>Basal respiration</b>	<b>Time</b>
Number of measurement cycles	5
Mixing	1'30 minutes
Pause	40 seconds
Measurement	3'00 minutes
<b>After rotenone/antimycin A injection</b>	
Number of measurement cycles	13
Mixing	1'00 minutes
Pause	40 seconds
Measurement	3'00 minutes

## *Annexe 3 :*

**Desmin aggregopathy in rat and human ischemic heart failure through protein kinase C  $\zeta$  and GSK3 $\beta$  as upstream signalling pathways. (en revision)**

Bouvet M, Dubois-Deruy E, Turkieh A, Mulder P, Peugnet V, Chwastyniak M, Beseme O, Dechaumes A, Amouyel P, Richard V, Lamblin N, Pinet F.



**Desmin aggrephagy in rat and human ischemic heart failure through protein kinase C  $\zeta$  and GSK3 $\beta$  as upstream signaling pathways**

**Short title: Desmin aggrephagy in heart failure**

**Marion Bouvet<sup>1</sup>, Emilie Dubois-Deruy<sup>1#</sup>, Annie Turkieh<sup>1#</sup>, Paul Mulder<sup>2</sup>, Victoriane Peugnet<sup>1</sup>, Maggy Chwastyniak<sup>1</sup>, Olivia Beseme<sup>1</sup>, Arthur Dechaumes<sup>1</sup>, Philippe Amouyel<sup>1</sup>, Vincent Richard<sup>2</sup>, Nicolas Lamblin<sup>1</sup>, Florence Pinet<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>INSERM, Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, FHU-REMOD-VHF, U1167 - RID-AGE - Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1096, FHU-REMOD-VHF, 76000 Rouen, France

<sup>3</sup>Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Pole of Pharmacology and Therapeutics and Cliniques Universitaires Saint-Luc, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

# co-authors

\*To whom correspondence should be addressed: Dr Florence PINET, INSERM U1167-IPL, 1 rue du professeur Calmette, 59019 Lille cedex, France, e-mail: [florence.pinet@pasteur-lille.fr](mailto:florence.pinet@pasteur-lille.fr), Tel: +33 (0)3 20 87 72 15, Fax: +33 (0)3 20 87 78 94, ORCID number: 0000-0002-5471-1487

## **Abstract**

**Background:** Post-translational modifications of cardiac proteins could participate to left contractile dysfunction resulting in heart failure. Using a rat model of ischemic heart failure, we showed an accumulation of phosphorylated desmin leading to toxic aggregates in cardiomyocytes, but the cellular mechanisms are unknown.

**Methods:** The same rat model was used to decipher the kinases involved in desmin phosphorylation and the proteolytic systems present in rat and human failing hearts. We used primary cultures of neonate rat cardiomyocytes for testing specific inhibitors of kinases and for characterizing the autophagic processes able to clear desmin aggregates.

**Findings:** We found a significant increase of active PKC $\zeta$ , a defect in macroautophagy and ubiquitin-proteasome system and an activation of chaperone-mediated autophagy in heart failure rats. We validated *in vitro* that PKC $\zeta$  inhibition induced a significant decrease of desmin and that activation of ubiquitination of proteins and of chaperone-mediated autophagy are able to decrease soluble and insoluble forms of desmin in cardiomyocytes.

**Interpretation:** These data demonstrate a novel signaling pathway implicating activation of PKC $\zeta$  in desmin phosphorylation associated with a defect of proteolytic systems in ischemic heart failure, leading to desmin aggregopathy. Our *in vitro* data demonstrated that ubiquitination of proteins and CMA are required for eliminating desmin aggregates with the contribution of its chaperone protein,  $\alpha$ -crystallin B-chain. Modulation of the kinases involved under pathological conditions may help preserving desmin intermediate filaments structure and thus protect the structural integrity of contractile apparatus of cardiomyocytes by limiting desmin aggregates formation.

## **Keywords**

Heart failure; cardiomyocyte; desmin; kinase; autophagy; human

## **Research in context**

### **Evidence before the study**

The aim of the study was to decipher the exact mechanisms underlying left ventricular remodeling following myocardial infarction which is one of the main identified causes of cardiac dysfunction leading to heart failure. We were the first group to discover by phosphoproteomic (ref 3) using the experimental heart failure rat model (ref 2, 22) an increase in desmin phosphorylation (ref 4, 27). The same findings were found at the same period, using another model of heart failure experimental model and other proteomic technology (ref 10 in 2014, ref 41 in 2017)

Up to recently, desmin is a neglected protein that has recently begun to show importance in the pathogenesis of heart failure (ref 4, 7, 12, 15).

The different proteolytic systems involved in clearance of aggregates toxic for the heart have been recently reviewed (ref 48)

Desmin GSK3 $\beta$ -dependent phosphorylation in heart and muscle has been quite well studied (ref 10, 11) but PKC $\xi$  is a poorly understood member of PKC family (ref 33). Cleaved for of desmin have been described in cytoplasmic aggregates (ref 41, 57).

### **Added value of this study**

We used several models: animal model of heart failure, primary culture of rat cardiomyocytes, and human heart biopsies to decipher the enzymes involved in desmin phosphorylation.

Several technological approaches: characterization of heart dysfunction in the experimental heart failure rat model (echography), *in silico* analysis to decipher the kinases involved in desmin phosphorylation and innovative proteomic analysis (Phos-tag<sup>TM</sup> gel).

We are the first to demonstrate the dependence of PKC $\xi$  to phosphorylate desmin by GSK3 $\beta$  in cardiomyocytes, and the cross-talk of chaperone-mediated autophagy and ubiquitination for elimination of desmin aggregates in cardiomyocyte.

The availability of human biopsies allows validating our findings in humans.

### **Implications of all the available evidence**

Our study and findings are relevant to human health, cardiac diseases and more specifically to heart failure.

We used a rat model of heart failure (myocardial infarction induced by left coronary artery ligation), that we believe to be the more appropriate for deciphering mechanisms underlying left ventricular dysfunction.

Human heart biopsies of control and HF patients were available to validate the data obtained in our rodent and in vitro cardiomyocyte models.

This study demonstrates for the first time the requirement of PKC $\xi$  for desmin GSK3 $\beta$ -dependent phosphorylation and of ubiquitination and CMA with the contribution of  $\alpha$ -crystallin B-chain for clearance of desmin aggregates in cardiomyocytes.

## **Introduction**

Left ventricular (LV) remodeling following myocardial infarction (MI) is one of the main identified causes of cardiac dysfunction leading to heart failure (HF) (1,2). To date, several mechanisms implicated in LV remodeling such as infarct size, fibrosis, and apoptosis as well as alterations in contractile proteins and in intracellular calcium handling have been identified, however the exact mechanisms underlying HF remain imperfectly known.

Using an experimental rat model of ischemic HF and phosphoproteomic technologies, we previously identified increased levels of serine phosphorylated desmin in the LV of HF rats 2 months after MI (3,4). Desmin is a 53kDa muscle-specific intermediate filament protein, which forms a three-dimensional scaffold around the myofibrillar Z-disk and interconnects the contractile apparatus to the nucleus, the cellular organelles and the sarcolemma (5). Desmin is the target of post-translational modifications (PTM), such as phosphorylation, ADP-ribosylation and ubiquitination as well as nonenzymatic modifications such as glycation, oxidation and nitration (6–8). The major effect of phosphorylation is the disassembly of desmin filaments (6) that impacts the solubilisation of insoluble intermediate filaments (9). Glycogen synthase kinase 3 (GSK3)  $\beta$  has been described to be involved in desmin phosphorylation (10), which was shown recently to induce calpain-1-mediated muscle desmin depolymerization (11).

We previously showed the presence of most of the desmin phosphorylated species in the insoluble LV protein fraction of ischemic HF rats (4) suggesting that desmin phosphorylation, could promote the formation of desmin aggregates in failing heart, as already observed in a canine pacing model of desynchronous HF (10,12) as well as in desminopathies. In the latter case, the majority of desmin causative mutations lead to cardiac conduction abnormalities and to the accumulation of insoluble desmin-containing aggregates (13,14). Desmin is one of major intermediate filaments of cytoskeletal network and desmin phosphorylation cause disturbance of this network, thus leading to loss of function of desmin linked to cardiomyocyte death and development of cardiomyopathy (15). Interestingly, it has been previously shown that desmin expression and its pattern of striation correlated with the level of myocardial injury in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy (16). Thus, desmin and more particularly its profile of phosphorylation and aggregation may contribute to cardiac toxicity and account for heart dysfunction during LV remodeling following MI (17). The aggregates of hyperphosphorylated desmin present in HF hearts are proteotoxic (18) and may be due to inefficient autophagy processes (19).



Therefore, a better understanding of the dynamics of mechanisms contributing to desmin phosphorylation and aggregation may offer new therapeutic perspectives for the treatment of ischemic HF.

The aim of the present study was to decipher the kinases involved in the phosphorylation of desmin and to investigate the contribution of the different proteolytic systems such as the ubiquitin-proteasome system (UPS), macroautophagy and chaperone-mediated autophagy (CMA) (20) in the accumulation of hyperphosphorylated desmin aggregates in human and experimental HF.

## **Methods**

### ***Pathway network analysis***

Integrated pathway enrichment analysis was performed by using the knowledge based canonical pathways and endogenous metabolic pathways MetaCore pathway analysis software (GeneGo). The differentially expressed (21) or phosphorylated (3) proteins were mapped into biological networks by using a manually curated proprietary database (MetaCore, GeneGo, St. Joseph, MI, USA), a pathway analysis tool. UniProt protein accession numbers provided from the UniProtKB database (<http://www.uniprot.org>) were uploaded into the database. For network analysis, expand by one interaction algorithm was used with phosphorylation / dephosphorylation filters. We also used advanced options by selecting both directions, disconnected root nodes and discarding low trust interactions, functional interactions and binding interactions.

### ***Experimental rat model of ischemic heart failure***

All animal experiments were performed according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication NO1-OD-4-2-139, revised in 2011). Animals were used and experimental protocols performed under the supervision of a person authorized to perform experiments on live animals (F. Pinet: 59-350126). Approval was granted by the institutional ethics review board ("Comité d'Ethique pour l'Experimentation Animale Nord Pas-de-Calais" N°242011, January 2012). In brief, rats were anaesthetized (xylazine 5 mg/kg intraperitoneally) as previously described (22). MI was induced in 10-week-old male Wistar rats (Janvier, Le Genest St Isle, France) by ligation of the left anterior descending coronary artery according to the method previously described (1,22). Haemodynamic and echocardiographic measurements were performed 2 months after surgery as previously described (21) and are summarized in Supplemental Table 1. After sacrifice of rats by an overdose of pentobarbital, their hearts were excised and dissected, the right and left ventricles were separated and the infarcted area was removed. Tissues were kept at -80°C until analysis.

### ***Transmission electronic microscopy***

Rat LVs were immediately fixed in 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer for 3 hrs. LV were then rinsed with PBS 1X, cut into 1 mm thickness pieces and incubated for 1 hr in 0.1 mol/L sodium cacodylate containing 1% glutaraldehyde. The samples were post-fixed in the dark for 1 hr in 1% osmium tetroxide/1.5% potassium

hexacyanoferrate. Several washes with deionized water were performed before incubation of samples in the dark for 1 hr in 4% uranyl acetate. The tissues were then rinsed in deionized water and dehydrated through increasing concentrations of ethanol (50%, 70%, 95%, 100% and 100%, 10 min each) before overnight incubation in a 1:1 mixture of ethanol/epoxy resin. The tissue pieces were embedded in fresh 100% epoxy resin containing 1.7% dimethylaminoethanol for 3 days before epoxy resin polymerization for 24 hrs at 60°C. The blocks were trimmed and 80 nm sections cut using a diamond knife, were collected on 100 mesh copper grids. Sections were observed using a Hitachi H7500 transmission electron microscope at 80 kV and photographed using an AMT digital camera.

### ***Human hearts***

Tissues from failing (n=6) and non-failing (n=6) human hearts were obtained respectively from Lille University Hospital (France) and from Catholic University of Leuven (Belgium). Explanted heart tissues were obtained from patients undergoing heart transplantation for end-stage ischemic heart failure and from patients died of non-ischemic causes including suicide (n=1), car crash (n=1), polytrauma (n=1) and trauma (n=3). Samples were quick-frozen and stored at -80°C. All materials from patients and controls were recovered as surgical waste with informed consent of the donors and with approval of the local ethical boards (“Centre Hospitalier et Universitaire de Lille”, Lille, France and Pole of Pharmacology and Therapeutics of “Université Catholique de Louvain” and “Cliniques Universitaires Saint-Luc”, Brussels, Belgium) and according to the Declaration of Helsinki.

### ***Cell Culture***

#### ***Primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes***

Primary cultures of rat neonatal contractile cardiac myocytes (NCM) were prepared from heart ventricles of 1- or 2-day-old rats as previously described (23). Briefly, cardiac cells of newborn rats' ventricles were dissociated by enzymatic digestion with 0.04% collagenase II (Worthington, Lakewood, NJ, USA) and 0.05% pancreatin (Sigma-Aldrich). Non-NCM cells were removed by 30 min centrifugation at 1,600 g in a discontinuous Percoll gradient (bottom 58.5%, top 40.5%, Sigma-Aldrich). NCM were then seeded at a density of  $4 \times 10^5$  cells per well in six-well plates coated with 0.01% of collagen (Sigma-Aldrich) and cultured in a medium containing DMEM/Medium199 (4:1), 10% horse serum (Life Technologies), 5% fetal bovine serum (FBS) (ATCC), 1% penicillin and streptomycin (10,000 U/mL, Life Technologies) for 7 days at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

To inhibit protein kinase C (PKC)  $\zeta$ , NCM were serum starved for 1 hr and then incubated with 10  $\mu\text{mol/L}$  of the myristoylated PKC $\zeta$  pseudosubstrate ( $^{114}\text{-IYRRGARRWRKL-}^{125}$ , myrPS, Enzo Life Sciences) for 1 hr.

To stimulate hypertrophy, NCM were serum starved for 24 hr and then incubated with 10  $\mu\text{mol/L}$  of isoproterenol (Iso), 2  $\mu\text{mol/L}$  of angiotensin II (AngII) or 20  $\mu\text{mol/L}$  of phenylephrine (PE) for 48 hr.

To induce macroautophagy, NCM were serum starved for 24 hr and then treated by HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (Sigma-Aldrich, 55037C) for 2 hrs. To inhibit the autophagosome-lysosome fusion, NCM were pre-treated with bafilomycin (Baf, 50 nmol/L) for 2 hrs before co-treatment of the cells with HBSS and Baf for 2 hrs.

To induce CMA, two pharmacological treatments were used: 2 and 5  $\mu\text{mol/L}$  of geldanamycin (GA, Sigma-Aldrich) for 17 hrs (24) and pretreatment for 1 hr with 10 mmol/L of a macroautophagy inhibitor (3-methyladenine, 3MA, Sigma-Aldrich), and then co-treatment for 18 hrs with 10 mmol/L 3MA and 10  $\mu\text{mol/L}$  of a proteasome inhibitor (MG132, Sigma-Aldrich).

#### *H9c2 cells*

Cells were cultured at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> in DMEM GlutaMax-1 (Life Technologies) supplemented into 10% FBS. Isolation of lysosomes was performed according to the method previously described with minor modifications (25).

Isolation of lysosomes from H9c2 cells was performed according to the method previously described with minor modifications (25). Briefly 8x10<sup>6</sup> H9c2 cells were washed twice with PBS and collected in 1 mL of homogenization medium (HM; 0.25 mol/L sucrose, 1 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mmol/L HEPES, pH 7.4) before 10 min centrifugation at 500 g. Cells were then lysed with a Potter-Elvehjem in 1 mL of HM and centrifuged 10 min at 800 g. The supernatant was kept on ice and the pellet was suspended in 500  $\mu\text{L}$  of HM and again centrifuged. The supernatants were pooled and mixed with 120  $\mu\text{L}$  10% FBS, 670  $\mu\text{L}$  of Percoll solution (90% Percoll, 0.25 mol/L sucrose, 1 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mmol/L HEPES, pH 7.4) and HM to a final volume of 3 mL before 45 min ultracentrifugation at 36,000 g and 4°C. The gradient dense-end-first was collected and supplemented with Igepal CA-630 at a final concentration of 0.5% before pelleting the Percoll by ultracentrifugation for 2 hrs at 100,000 g and 4°C. The supernatant was then diluted in 8 volumes of cold acetone and incubated overnight at -20°C to precipitate the proteins. After a 10 min centrifugation at

15,300 g and 4°C, the lysosomal proteins were suspended in Laemmli buffer and analysed by western blot.

### ***Subcellular fractionation***

Nuclei and cytosol were isolated from NCM untreated or treated with Iso as described above following the instructions provided with the NE-PER Nuclear and cytoplasmic extraction reagents kit (ThermoFisher Scientific Inc, 78833). NCM ( $1.5 \times 10^6$  cells) were harvested with trypsin-EDTA at 37°C. The following steps were carried out at 4°C or in ice. After centrifugation, the cell pellet was washed with PBS before adding buffer CER I. After resuspension of the pellet, the buffer CER II was added and the tube vigorously vortex before centrifugation and transfer the supernatant to a pre-chilled tube. The insoluble pellet fraction, representing the nuclei fraction was suspended in ice-cold NER buffer, vortex and incubated in ice, with these steps repeated 4 times before centrifugation and transfer of the supernatant to a clean tube (nuclei fraction). The cytosolic and nuclei fractions were then stored at -20°C before processing the samples.

### ***Immunofluorescence***

Frozen rat LV tissues and human heart tissues were included in Richard-Allan Scientific™ Neg-50™ (ThermoFisher Scientific Inc). The LV tissue sections (10 µm thickness) and cultured NCMs were fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde/PBS and then permeabilized with 0.1% Triton/PBS for 20 min before 30 min incubation in 1% FBS/PBS. After overnight incubation with primary antibodies (see below the detailed list) in 1% FBS/PBS at 4°C, the samples were incubated for 30 min at room temperature (RT) with a fluorescent conjugated secondary antibody (Alexa Fluor 488 or 555 coupled anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies) diluted 1/500 in 1% FBS/PBS. The LV tissue sections were rinsed with PBS before 10 min nuclei staining with Hoechst 33258 (10 µg/mL) (ThermoFisher Scientific Inc). After washing with PBS, coverslips were mounted with glycerol/PBS 10X (90/10, v/v). Staining was visualized with the x40 and x63 objectives of LSM710 confocal microscope followed by Zen image acquisition and software analysis (Zeiss). Images were acquired with a resolution of at least 1024×1024. At least 10 fields are photographed, corresponding to approximately 100 (x40 objective) -200 (x63 objective) cells depending on the magnification and the type of cells. Photographs shown are representative of the staining observed.

### ***Proteins extraction***

Proteins from human hearts and rat LVs were extracted from frozen tissues (after removing the infarcted area) with Dounce-Potter homogenization into ice-cold RIPA buffer (50 mmol/L Tris pH7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% Igepal CA-630, 50 mmol/L deoxycholate, and 0.1% SDS) containing antiproteases (Complete EDTA-free, Roche Diagnostics), serine/threonine and tyrosine protein phosphatase inhibitors (Phosphatase inhibitor Cocktail 2 and 3, Sigma-Aldrich) and 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. After 1 hr incubation at 4°C, the homogenate was centrifuged at 15,300 g for 15 min at 4°C and the supernatant containing soluble proteins was collected. The pellet containing insoluble proteins was solubilized in urea-thiourea buffer (5 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 50 mmol/L DTT, 0.1% SDS in PBS pH 7.4) and sonicated three times for 6 seconds at 20 Hz (Vibra Cell, Bioblock Scientific 72442) before 15 min centrifugation at 15,300 g and 4°C. The supernatant containing insoluble proteins was collected and samples were stored at -80°C. After pharmacological treatments, cells were rinsed twice with PBS before being mechanically scraped from the plate in 50 µL of ice-cold RIPA buffer. Soluble and insoluble proteins were extracted as describe above. Protein concentrations for all samples were determined with a Bradford-based method protein assay (Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

### ***Immunoprecipitation, western blot and Phos-tag gels***

#### *Immunoprecipitation*

Immunoprecipitation was performed with 50 µg of NCM proteins or LV proteins pre-cleared by incubation with protein A/G magnetic beads (88802, Pierce) for 1 hr at 4°C with gentle shaking. The pre-cleared proteins were then mixed with 5 µL of anti-desmin antibody diluted in 100 µL of RIPA 1X buffer as previously described (26). After overnight incubation at 4°C on a rotating device, immune complexes were precipitated at 4°C for only 2 hr on a rotating device with 35 µL of protein A/G magnetic beads washed 3 times in RIPA 1X buffer (Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads Thermo Scientific). The supernatant (Sur) was recuperated and the immunoprecipitated (IP) complexes were then washed four times with 750 µL of RIPA 1X buffer before denaturation of both in Laemmli buffer at 70°C for 10 min and western blot analysis.

#### *Western blot*

Soluble (5-50 µg) and insoluble proteins (1-20 µg) were analysed on SDS-PAGE gels (8, 10, 12 or 15%, depending on the protein analysed). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and blocked for 1 hr in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 (TBS-T) containing 5% skim milk or FBS with constant shaking. Membranes were then incubated with

primary antibodies (see supplemental Table S2) diluted in TBS-T with 5% skim milk or FBS overnight at 4°C with constant shaking. The blots were then washed with TBS-T and incubated at RT with horseradish peroxidase labelled secondary antibodies diluted in 5% skim milk or FBS/TBS-T for 1 hr. Following the secondary incubation, the membranes were washed with TBS-T before blots imaging. Equal protein loading was confirmed using GAPDH,  $\alpha$ -tubulin or sarcomeric actin immunoblotting.

#### *Phos-tag gels*

Soluble and insoluble proteins were analysed on 10% gels containing 40  $\mu$ mol/L of Phos-tag (Wako, Osaka, Japan) and 100  $\mu$ mol/L of  $Mn^{2+}$  for detection of the phosphorylated forms of desmin as previously described (27). (27)(27)(27)(27)(27)(27)(27)(27)(27)(Mercier et al. 2018)(Mercier et al. 2018)(Mercier et al. 2018)(Mercier et al. 2018)(Mercier et al. 2018)(Mercier et al. 2018) At equivalent phosphorylation levels, the position of the phosphate group can also influence the apparent molecular weight of a protein in a Phos-tag gel.

#### *Blots imaging*

The Chemidoc XRS+ camera (Biorad) and the Image Lab software were used for blots imaging and densitometry analysis. Membranes were incubated for 5 min with Clarity Western ECL Substrate (Biorad) before imaging. The signal was quantified from the image obtained just before saturation. The band corresponding to the protein of interest was framed within a defined area to express the signal intensity depending of the area. This value was related to the intensity value of the reference protein (GAPDH,  $\alpha$ -tubulin or sarcomeric actin). The values were expressed in arbitrary units (U.A.).

#### ***mRNA isolation and quantitative reverse transcription PCR***

Total RNA isolation was prepared from LV tissues using TRI Reagent® (Sigma-Aldrich). Tissues were homogenized with an Ultra-Turrax® at 4°C and then incubated for 5 min at RT. After 10 min centrifugation at 12,300 g the supernatant containing RNA was collected. One part of chloroform was added for 5 parts of TRI Reagent® containing RNA. Samples were shaken and centrifuged for 12 min at 12,000 g. The supernatant was collected and one volume of isopropanol was added for overnight incubation at -20°C. After 30 min centrifugation at 13,000 g the pellet was washed with ethanol 70% and centrifuged for 10 min at 12,000 g. The pellet was air dried in ice before RNase-free water solubilization. RNA samples were heated for 5 min at 85°C and then stored at -80°C. Sample RNA quality was checked with a bioanalyzer (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies) to determine the RNA integrity

number. Total RNA (500 ng) was subjected for first stand cDNA synthesis with the miScript II RT kit (Qiagen) according to the manufacture's recommendations. After cDNA synthesis, the ASB2 $\beta$  expression was evaluated by quantitative PCR with the miSYBR Green PCR kit (Qiagen) on an Mx3000P Q-PCR System (Agilent Technologies). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) was used as an internal control. The relative ASB2 $\beta$  mRNA expression was quantified using the method  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , where  $-\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (HF sample) -  $\Delta Ct$  (Sham sample), and  $\Delta Ct = Ct$  (ASB2 $\beta$ ) -  $Ct$  (HPRT). PCR primers were ATCTCTTTGTTGCCTAGACC (forward) - CAGAAGAGTGA CT CAGCAG (reverse) for ASB2 $\beta$  (8) and ATGGGAGGCCATCACATTGT (forward) and ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA (reverse) for HPRT.

### ***Statistical analysis***

Data expressed as mean  $\pm$  SEM were analyzed with GraphPad Prism version 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA) and comparisons were performed by Mann-Whitney (two-tailed), one- or two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's *post hoc* test, as appropriate. Results were considered statistically significant if the  $P < 0.05$ .



## Results

### *Desmin is phosphorylated by active PKC $\zeta$ and GSK3 $\beta$ in LV of HF-rats 2 months after MI*

We previously showed, a modulation of desmin phosphorylation in the LV of HF-rats 2 months after MI (4) without any modulation of desmin protein levels (4,21). Phosphorylation is a dynamic process resulting from changes in phosphatases or kinases activities. As previously shown, neither the activity nor the protein levels of PP2A, a central cardiac phosphatase involved in the dephosphorylation of cardiac proteins (28) was significantly modulated in the LV of HF-rats (23). Consequently, we performed an *in silico* screening with GeneGo Pathways Software and selected four kinases (Fig. 1a), potentially involved in desmin phosphorylation, calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), Aurora B, PKC ( $\epsilon$  and  $\zeta$  isoforms) and GSK3 ( $\alpha$  and  $\beta$  isoforms). We investigated their expression in our rat HF model and excluded CaMKII and Aurora B. Indeed, active CaMKII (CaMKII pT286/CaMKII ratio) was completely decreased in the LV of HF-rats (Supplementary Fig. S1a), in accordance with the significantly decreased levels of one of its substrate, the phosphorylated form of phospholamban (PLB) at T17 (Supplementary Fig. S1b). Aurora B was not significantly modulated in the LV of HF-rats (Supplementary Fig. S1c). It has been previously described that *in vitro* Aurora B can specifically phosphorylate desmin at serine 60 (29). Consequently we measured the phosphorylation levels of desmin at serine 60 to monitor Aurora B-specific desmin phosphorylation and showed no difference between the 2 groups of rats (Supplementary Fig. S1c). We confirmed the nuclear localization of Aurora B without colocalization with desmin (Supplementary Fig. S1c) validating that Aurora B was not involved in the increased desmin phosphorylation in our experimental model of ischemic HF. We also excluded PKC $\epsilon$  as modulator of desmin phosphorylation, since its expression was decreased in the LV of HF-rats (23). Then, we first evaluated GSK3 levels, recently shown to be involved in desmin phosphorylation in an experimental canine model of dyssynchronous HF (10), especially GSK3 $\beta$  for which its role in cardiac biology is well recognized (30). GSK3 $\beta$  phosphorylation levels at S9, which inhibits its ability to phosphorylate primed substrates (31), was significantly decreased in LV of HF-rats without any modulation of GSK3 $\beta$  levels, corresponding to a decrease of the inactive form (Fig. 1b), suggesting that GSK3 $\beta$  could be active in this model. We also showed a significant decrease of the inactive form of GSK3 $\alpha$  phosphorylated at S21 without any modulation of GSK3 $\alpha$  levels (Supplementary Fig. S1d). Finally, we showed an increase of PKC $\zeta$  phosphorylated on T560 without any modulation of PKC $\zeta$  levels (Fig. 1c) in the LV of HF-rats. The T560 residue of

PKC $\zeta$  which is located in the turn motif of the kinase domain has been shown to be regulated by a mechanism of autophosphorylation, activating PKC under basal resting conditions (32,33). These results suggest an increase of PKC $\zeta$  active form in the LV of HF-rats validated by the increase of one of its scaffold protein, Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1) levels (Fig. 1d). Immunofluorescence staining showed increased co-localization of desmin with PKC $\zeta$  (Fig. 1e) and with its anchoring protein RACK1 (Supplementary Fig. S1e) in the LV of HF-rats. We observed by transmission electron microscopy (TEM) a stronger alteration of LV structure with sarcomeres disruption and mitochondrial structural abnormalities characterized by a loss of electron-dense matrix at 2 months post-MI (Fig. 1f). Desmin was mainly expressed in the insoluble fraction, suggesting the formation of hyperphosphorylated desmin aggregates, as highlighted by immunofluorescence staining in LV of 2 months post-MI rats (Fig. 1g). Interestingly, the levels of one of its chaperone protein,  $\alpha$ -crystallin B-chain (CryAB), were unchanged in both fractions (Supplementary Fig. S1f). These results suggest that the presence of desmin aggregates may participate to myofilament architecture disruption and local cardiomyocyte function alteration as recently suggested (34).

#### ***Dysregulated autophagy contributes to phosphorylated desmin aggregates in LV of heart failure rats***

We explored the different signaling pathways (*e.g.* macroautophagy, CMA and ubiquitin proteasome pathway) in order to decipher their contribution in phosphorylated desmin clearance in our experimental model of HF. The quantification of macroautophagy markers showed a significant decrease of the macroautophagy turnover quantified by the LC3II/LC3I ratio with no modulation of p62, beclin-1 and LC3II levels in the LV of HF-rats (Fig. 2a and supplemental Fig. 2a). These data are correlated with the absence of double-membrane vesicles (Fig. 1f). We did not observe any modulation of ubiquitinated protein levels between sham- and HF-rats at 2 months post-MI (supplemental Fig. S2b). The two ubiquitin-ligases, TRIM32 (Supplementary Fig. S2c) and ASB2 $\beta$  (Supplementary Fig. S2d), previously shown to be involved in desmin ubiquitination (8,35) were not modulated in LV of post-MI rats. Interestingly, we found 4 KFERQ-like CMA motifs (36) in desmin sequence, conserved between rat, mouse and human species, suggesting that desmin may be a new CMA substrate and we quantified the CMA markers in LV of post-MI rats. We found a significant increase of Hsp90 and hsc70 levels but no modulation of LAMP2a levels in the LV of HF-rats (Fig. 2b). Altogether, our data show an impaired macroautophagy process in LV at 2 months post-MI and activation of CMA during the development of HF. The presence of KFERQ-like CMA

motifs suggests that CMA may be involved in desmin clearance in the heart. This hypothesis was supported by the existence of a partial colocalization of desmin with Hsc70 and of desmin with LAMP2a in basal (sham-rats) and pathological conditions (HF-2 rats months post-MI) (Fig. 2c).

Based on these new *in vivo* data about the potential implication of PKC $\zeta$  on desmin phosphorylation and the modulation of macroautophagy and CMA on clearance of soluble and insoluble forms of desmin, we investigated these mechanisms in primary culture of rat neonatal cardiomyocyte (NCM).

### ***PKC $\zeta$ modulate desmin phosphorylation in in vitro culture of cardiomyocytes***

We investigated the effects of modulation of PKC $\zeta$  on desmin and its phosphorylated forms in NCM. For inhibiting specifically this kinase, we used a cell-penetrating myristoylated (myrPS) peptide derived from the pseudosubstrate domain of PKC $\zeta$  (<sup>114</sup>-IYRRGARRWRKL-<sup>125</sup>) previously described to hold the kinase in an inactive state by its auto inhibitory role (37). Treatment of NCM by myrPS induced significant PKC $\zeta$  inhibition with a decrease of PKC $\zeta$  levels without any modulation of PKC $\zeta$  pT560/ PKC $\zeta$  ratio (Fig. 3a). We observed a significant decrease of soluble desmin levels while insoluble desmin levels were unchanged upon PKC $\zeta$  inhibition (Fig. 2b, top panels). Both soluble and insoluble (but to a lower extent) desmin phosphospecies, visualized by desmin immunoblot of Phos-tag gels, showed a different profile with an increase of the lower bands, corresponding to less phosphorylated desmin detected in myrPS-treated NCM, suggesting less phosphorylation of desmin upon PKC $\zeta$  inhibition (Fig. 2b, bottom panels). Interestingly, we also observed a modulation of GSK3 $\beta$  upon PKC $\zeta$  inhibition with a significant increase of the inactive form of GSK3 $\beta$  (shown by the increased GSK3 $\beta$  pS9/ GSK3 $\beta$  ratio), leading to increased inactive GSK3 $\beta$  (Fig. 2c). Altogether, our *in vitro* results suggest that PKC $\zeta$  may regulate indirectly GSK3 $\beta$  as recently suggested (38) and that both kinases are involved on desmin phosphorylation in cardiomyocytes.

We then used isoproterenol (Iso), phenylepinephrine (PE) and angiotensin II (AngII) for inducing hypertrophy and oxidative stress in cardiomyocytes as previously described (39). We only observed a significant increase of the active form of PKC $\zeta$  (PKC $\zeta$  pT560/ PKC $\zeta$  ratio) upon Iso treatment (Supplementary Fig. S3a), with no modulation of soluble desmin but a significant decrease of insoluble desmin upon Iso and PE treatment (Supplementary Fig. S3b). Interestingly, Iso induced an increase of inactive GSK3 $\beta$  (shown by the increased GSK3 $\beta$  pS9/ GSK3 $\beta$  ratio) (Supplementary Fig. S3a). These data suggest that PKC $\zeta$  and

GSK3 $\beta$  might be not involved in the process of regulating desmin through hypertrophy. In order to understand the role and behavior of the atypical PKC $\zeta$  in cardiomyocytes, we performed subcellular fractionation of cytosol and nuclei of NCM treated or not with Iso. Desmin, PKC $\zeta$ , and its phosphorylated form on T560 were mainly expressed in cytosol of untreated NCM. GSK3 $\beta$  was expressed both in cytosol and nuclei. Interestingly, upon Iso treatment, there is a decreased expression of desmin and GSK3 $\beta$  in the cytosol but only an increased expression of desmin in the nuclei (Supplementary Fig. S3c). These data suggested that PKC $\zeta$  might be not interacted directly with desmin upon Iso treatment but potentially through GSK3 $\beta$ .

#### ***Impact of macroautophagy and CMA modulation on desmin clearance in cardiomyocytes***

Macroautophagy was induced by nutrient starvation with Hank's Balanced Salt Solution (HBBS) treatment with or without a 2 hrs pretreatment with bafilomycin to inhibit macroautophagic flux and thus increase its efficiency (Supplementary Fig. S4). Under HBSS treatment, we found efficient macroautophagy activation quantified by a significant increase of LC3II and LC3II/LC3I ratio which was significantly increased with bafilomycin pretreatment (Supplementary Fig. S4a). Soluble desmin levels were significantly degraded by nutrient starvation-induced autophagy and significantly but only partially prevented by bafilomycin pretreatment (Supplementary Fig. S4b). Interestingly, insoluble desmin levels were not modulated by HBSS treatment (Supplementary Fig. S4c). These results confirmed the efficiency of macroautophagy in the degradation of soluble desmin in cardiomyocytes.

To decipher the contribution of CMA in desmin clearance in cardiomyocytes, CMA was induced by either 2 or 5  $\mu$ mol/L of geldanamycin (GA) for 17 hrs (Fig. 4 and Supplementary Fig. S5a-b) as previously described (24)(24)(24)(24)(24)(24)(24)(24)(Pedrozo et al. 2013)(Pedrozo et al. 2013)(Pedrozo et al. 2013)(Pedrozo et al. 2013). Under GA treatment, we found a significant increase of Hsc70 and Hsp90 (Fig. 4a), with a significant decrease of LAMP2a and soluble desmin levels (Fig. 4b) and no effect on its chaperone, CryAB (Fig. 4c). Interestingly, insoluble desmin levels were not modulated by GA treatment (Fig. 4d). Immunofluorescence staining showed increased colocalization of desmin with LAMP2a in CMA-activated NCM (Fig. 4e), despite the significant decrease of LAMP2a in the whole cell extract (Fig. 4a) that could be explained by its restricted lysosomal localization. To strengthen the demonstration that desmin is a CMA substrate, we isolated lysosomes from H9c2 cells treated or not with GA. In isolated lysosomes, verified by LAMP1 expression, we validated the presence of Hsp90 and showed, as expected, an increase of LAMP2a and Hsc70 in

isolated lysosomes upon GA treatment (Fig. 4f). Interestingly, the classical 53 kDa form and a cleaved form of 39 kDa of desmin were found in the lysosomes, which were strongly increased upon CMA activation (Fig. 4f). We also verified that desmin can interact with Hsc70 by immunoprecipitation of cardiac cells (Fig. 4g), showing the ability of Hsc70 to target desmin to the lysosomes.

We also checked the specificity of CMA activation in cardiomyocytes by analyzing the impact of GA on other protein degradation pathways. We found no modulation of the ubiquitin-proteasome pathway (Supplementary Fig. S5a), but a significant decrease of macroautophagy markers (p62, beclin-1, LC3II levels and LC3II/LC3I ratio) in NCM upon GA treatment (Supplementary Fig. S5b). Then, to ensure the specific contribution of CMA without modulation of macroautophagy to clear desmin, cardiomyocytes were pretreated for 1 hr with 10 mmol/L of 3-methyladenine (3MA), a macroautophagy inhibitor, followed by co-treatment for 18 hrs with 10 mmol/L of 3MA and 10  $\mu$ mol/L of MG132, a proteasome inhibitor (Fig. 5 and Supplementary Fig. S5c). We verified that the co-treatment induced specifically CMA activation by the significant increased Hsc70 levels as previously shown (Fig. 5a) and no modulation of macroautophagy assessed by LC3II/LC3I ratio (Fig. 5a), LC3II, Beclin-1 and p62 levels (Supplementary Fig. S5c). As expected, the inhibition of proteasome induced significant increased levels of ubiquitinated proteins exacerbated upon inhibition of macroautophagy (Fig. 5b). With this other pharmacological treatment, we observed a significant decrease of soluble desmin levels induced by ubiquitination and CMA activation (Fig. 5c). Interestingly, CryAB expression was also significantly decreased (Fig. 5d) as well insoluble desmin levels (Fig. 5e). These data showed the role of desmin co-chaperone, CryAB for the clearance of insoluble desmin in cardiomyocyte. Immunofluorescence stainings confirmed that desmin is a CMA substrate with increased colocalization of desmin with LAMP2a in NCM co-treated with 3-MA and MG132 (Fig. 5f). Our results also confirmed that modulation of macroautophagy by only 3-MA in cardiomyocyte has no impact on clearance of soluble desmin, CryaB and insoluble desmin (Fig. 5).

### ***Dysregulated autophagy associated with the levels of desmin and CryAB in human heart failure patients***

Our studies based on the *in vivo* experimental rat model and the *in vitro* cardiomyocyte model prompted us to assess levels of desmin, as well as the kinases selected to be involved in desmin phosphorylation and the chaperone proteins such as CryAB and CMA markers in the

failing hearts of patients (Fig. 6 and Supplementary Fig. S6). We found significant increased desmin levels with no modulation of CryAB levels in soluble protein fractions in the failing hearts compared to non-failing human hearts (Fig. 6a). On the other hand, both insoluble desmin and CryAB levels were significantly increased in the failing hearts (Fig. 6b). Surprisingly, we showed no significant modulation of PKC $\zeta$  and of active PKC $\zeta$  (PKC $\zeta$  pT560/ PKC $\zeta$  ratio (Fig. 6c), of inactive GSK3 $\beta$  (GSK3 $\beta$  pS9/ GSK3 $\beta$  ratio) (Supplementary Fig. S6a) and, of active CaMKII (CaMKII pT286/CaMKII ratio) (Supplementary Fig. S6e) between the two groups of patients. Among CMA markers (LAMP2a, Hsc70 and Hsc90), despite the low number of human samples analyzed and the inter-individual heterogeneity, LAMP2a levels tended to be increased in failing hearts while the levels of Hsc70 and Hsp90 were unchanged (Fig. 6d). Interestingly, Hsp90 and soluble desmin levels significantly correlate in the failing hearts (Fig. 6d, bottom panel).

However, as in the experimental rat model of HF, we observed a partial colocalization of desmin with PKC $\zeta$  in failing human hearts (Fig. 6e, top panel), supporting the idea that this kinase may be involved in phosphorylation of desmin in human end-stage HF. We also observed a partial colocalization of desmin with Hsc70 and of desmin with its chaperone CryAB in failing human hearts which is increased in non-failing hearts (Fig. 6e, middle and bottom panels and Supplementary Fig. S6c). As also observed in rat model there is only few colocalization between desmin and LAMP2a in human hearts (Supplementary Fig. S6d).

## DISCUSSION

The present study aimed to describe a novel signaling pathway implicating PKC $\zeta$  as an upstream actor of GSK3 $\beta$ , in desmin phosphorylation in ischemic HF and, leading to accumulation and aggregation of desmin.

In the experimental rat model of HF, we have previously shown a modulation of the desmin phospho-species profile of soluble and insoluble desmin levels (4) without modulation of its chaperone, CryAB. Here, we found a significant increase of the desmin levels in hearts of patients with end-stage ischemic HF, as previously shown (10,16,40,41) but also a significant increase of insoluble CryAB. It is well known that desmin is subjected to many PTM such as phosphorylation, that severely impacts its ability to polymerize into myofilaments, resulting in desmin filament depolymerization and even desmin aggregation (10,14,29). Desmin intermediate filament destructure, supported by TEM showing disruption of sarcomeres, could alter the structural and mechanical integrity of the contractile apparatus of cardiomyocytes resulting in the decrease of the cardiac contractile capacity. In this context, we postulated that the phosphorylated forms of desmin could be a key step for downstream maladaptive desmin assembly and thus, for adverse LV remodeling post-MI. We then aimed to identify the molecular mechanisms responsible for the modulation of phosphorylated desmin levels during HF and to understand the defective processes leading to the accumulation of desmin aggregates in failing hearts of rats and patients.

An *in silico* screening of kinases along with an assessment of their activity and/or expression in an experimental rat model of ischemic HF allowed us to highlight the implication of PKC $\zeta$  and GSK3 $\alpha/\beta$  in the modulation of desmin phosphorylation profile. Interestingly, previous publications suggest the involvement of these 2 enzymes (10,42,43). Both were activated when the profile of phosphorylated desmin was modulated in the LV of HF-rats. The role of PKC $\zeta$  in the heart is poorly understood; however PKC $\zeta$  appears to be involved in the hypertrophic response of cardiomyocytes through the regulation of atrial natriuretic factor re-expression (44). The role of GSK3  $\alpha/\beta$  in the heart is however much better understood. Indeed, GSK3 $\beta$  has been shown to be involved in the anti-hypertrophic processes in the heart (45). Its inactivation via the phosphorylation of its serine 9 in response to hypertrophic stimuli promotes cardiac hypertrophy and HF development (46). The complex profile of desmin phospho-species observed in ischemic HF suggests that several kinases, regulated differently, might be involved in desmin phosphorylation. Our *in vitro* experiments using primary cultures of rat neonate cardiomyocytes confirmed that PKC $\zeta$  is able to phosphorylate desmin. This is

in agreement with previous publications showing that PKC $\zeta$  phosphorylates desmin on serine and threonine in the non  $\alpha$ -helical head domain (43). The colocalization of desmin with PKC $\zeta$  was only observed in human failing hearts.

In response to a severe and prolonged stress such as MI, protein homeostasis also called “proteostasis” is disturbed. Loss of proteostasis leads to an accumulation of damaged/misfolded proteins and protein aggregates with consequent proteotoxicity (47). The heart is particularly susceptible to proteotoxicity because sustained and severe proteotoxic stress leads to cell death, due to its limited self-renewal capacity for maintaining cardiomyocyte homeostasis and integrity (18). Autophagy mechanisms and the UPS are the major and complementary proteolytic pathways required to eliminate misfolded proteins and defective organelles in most of cells including cardiomyocytes (48). Alterations of autophagy and/or UPS functions are often associated with the accumulation of proteotoxic species in the heart (49,50). In addition, distinct and metabolic roles of autophagy in the heart have been described that may be protective during ischemia whereas they may be detrimental during reperfusion (51,52). We have therefore explored the dynamics of autophagy (macroautophagy and CMA) and UPS in the rat experimental HF model in order to decipher whether altered autophagy occurs during HF development, leading to desmin aggregation.

As expected, UPS was not modulated in LV of HF-rats and human failing hearts as previously shown in human failing hearts (53). We observed a defect in macroautophagy with a significant decrease of beclin-1 and LC3II/LC3I ratio in LV of HF rats as confirmed by the absence of double-membrane vesicles analyzed by TEM and as previously shown in human failing hearts (53). Our data are in agreement with a previous report in a mouse model of MI with an early activation of macroautophagy after 24 hrs (19) which gradually decreased to become fully inhibited after 14 days (54). Recently, inability of complete autophagy leading to disorganization of cardiomyocyte desmin/mitochondrial network has been described in an experimental rat model of pressure overload-induced HF (34). More interestingly, we demonstrated for the first time an induction of CMA during LVR post-MI, which may be involved in desmin clearance via its 4 KFERQ-like CMA motifs (36), conserved between rat, mouse and human species. Our data showed a switch between macroautophagy and CMA 2 months post-MI as shown during aging process (55).

In vitro experiments in cardiomyocytes were performed to determine the autophagic processes able to eliminate toxic desmin aggregates in order to understand the physiopathological mechanisms during HF development. Several modulators of UPS, macroautophagy and CMA were used to decipher the process of desmin clearance in cardiomyocyte. We observed that



activation of macroautophagy or CMA is sufficient for clearance of soluble desmin without any effect neither on the insoluble form nor in its chaperone-protein, CryAB. To strengthen our data, we verified the increased targeting of desmin in purified lysosomes under CMA activation and the presence of a cleaved form of desmin which may result from a cleavage carried out by cathepsin B (56).

Interestingly, ubiquitination of proteins by UPS inhibition associated with CMA activation are required to prevent desmin aggregates with clearance of both forms of desmin (soluble and insoluble). We observed a decrease of insoluble desmin concomitantly with a decrease of its chaperone, CryAB. This effect is independent of macroautophagy activation as the same effect was observed with combination of UPS and macroautophagy inhibition. Our data are in agreement with recent publications showing cleaved form of desmin in cytoplasmic aggregates (41,57). Our data suggest that despite the ability of CMA to mediate clearance of desmin *in vitro* in cardiomyocytes, in the *in vivo* model of LV remodeling post-MI, CMA is unable to clear phosphorylated desmin which forms aggregates, mainly detected in the insoluble protein fraction, suggesting the difficulty of the KFERQ motifs to be accessible to Hsc70 (55) but also the requirement of ubiquitination of proteins.

We confirmed in human HF heart biopsies a defect in autophagic processes leading to the presence of desmin aggregates in link with the increased expression of CryAB in the insoluble fraction of proteins. Only a trend increase of LAMP2a levels were observed but no modulation of Hsc70 and Hsp90 levels, in accordance with data showing that Hsc70 become limiting when LAMP2a is in excess (55). Interestingly, significant increased levels of insoluble CryAB, were found in failing human hearts, and it has been shown that desmin and its chaperone can interplay in the maintenance of mitochondrial homeostasis and cardiomyocyte survival (58,59)(58). Our data suggests that CryAB as co-chaperone associated to Hsc70, interacts with hyperphosphorylated desmin aggregates and mediates their degradation through a process named chaperone-assisted selective autophagy (CASA) (60). Degradation of damaged components through CASA has been described to be activated when CMA is malfunctioning like in LAMP2 k/o mice leading to accumulation of autophagic vacuoles in cardiac muscles (60). This hypothesis is strengthened by recent publication showing that desmin generate amyloid-like oligomers in a proteotoxic mice model (R120G CryAB) (12). In the failing human hearts, representing end-stage of the disease by comparison of the experimental rat model of HF, CASA through Hsc70 and CryAB may act as compensatory and adaptative autophagic mechanism for hyperphosphorylated desmin aggregates (61).

### *Conclusion and perspectives*

LVR following MI is one of the main causes of cardiac dysfunction leading to HF. HF remains a leading cause of mortality and morbidity and during its development there is a stronger alteration of LV structure with sarcomeres disruption and an accumulation of toxic aggregates in the heart due to a defective autophagy. Our data demonstrate for the first time a novel signaling pathway involved in desmin phosphorylation in ischemic HF and suggest for the first time that desmin is a new substrate of CMA, process involved in the clearance of damaged and toxic molecules and that CMA is able to clear monomeric phosphorylated soluble desmin. Desmin phosphorylation is complex, being an event that participates in the depolymerization of desmin intermediate filaments and in improper desmin assembly into aberrant aggregates (12). In pathophysiological conditions, CMA alone without the cooperation of other proteolytic systems, in particular ubiquitination and CASA, is not sufficient for intracellular clearance of phosphorylated desmin but requires the contribution of its chaperone protein, CryaB. Transient soluble phosphorylated desmin may gradually accumulate as insoluble amyloid-like oligomers after MI and thus participate to contractile dysfunction leading to HF. We could speculate that improving autophagy processes earlier after MI by early CMA activation associated with the contribution of CryAB to stimulate desmin clearance might be a therapeutic approach to fight against desmin aggregates in order to maintain cardiomyocyte survival.

## **Acknowledgments**

We thank Jean-Paul Henry for the surgical induction of MI in rats, Dr Nicolas Malmanche for confocal microscopy and the UMS 2014 – US 41 – PLBS – Plateformes Lilloises en Biologie & Santé for cell imaging.

## **Funding Sources**

This work was supported by grants from the E.U. FP7 HOMAGE (305507), F-CRIN INI-CRT, and the “Agence Nationale de la Recherche” ANR blanc-SVSE1 (ANR-10-BLAN-1104). MB was supported by grants from “Groupe de Reflexion sur la Recherche Cardiovasculaire”, EDD was supported by grants from “Region Hauts de France”, “Institut Pasteur de Lille” and “Fondation Lefoulon Delalande”. AT was supported by grants from “ERA-CVD through “Agence Nationale de la Recherche” and “Fédération Française de Cardiologie”. FP has received a grant by the French Government, managed by the National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’avenir” with the reference ANR-16-RHUS-0003.

None of the funders had any role in study design, data collection, data analysis, interpretation, and writing the report.

## **Declaration of interest**

The authors have no financial and non-financial conflict of interest to disclose for the study performed.

## **Author contribution**

FP, NL, VR and PA designed and supervised the manuscript. MB, EDD, PM, AT, VP, AD, MC and OB performed the experiments. NL provided the human samples. MB, EDD, AT, FP performed the statistical analyses. MB, EDD, AT, and FP wrote the manuscript.

All authors read and approve the final version of the manuscript.

## References

1. Pfeffer M, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81(4):1161–72.
2. St John Sutton M, Pfeffer M, Plappert T, Rouleau J, Moye L, Dagenais G, et al. Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction. The protective effects of captopril. *Circulation*. 1994;89(1):68–75.
3. Dubois E, Richard V, Mulder P, Lamblin N, Drobecq H, Henry J-P, et al. Decreased Serine207 phosphorylation of troponin T as a biomarker for left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2011;32(1):115–23.
4. Bouvet M, Dubois-Deruy E, Alayi TD, Mulder P, El Amrani M, Beseme O, et al. Increased level of phosphorylated desmin and its degradation products in heart failure. *Biochem Biophys Reports*. 2016;6:54–62.
5. Capetanaki Y, Bloch RJ, Kouloumenta A, Mavroidis M, Psarras S. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp Cell Res*. 2007;3:2063–76.
6. Winter DL, Paulin D, Mericskay M, Li Z. Posttranslational modifications of desmin and their implication in biological processes and pathologies. *Histochem Cell Biol*. 2014;141(1):1–16.
7. Diguet N, Mallat Y, Ladouce R, Clodic G, Prola A, Tritsch E, et al. Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end products in dilated cardiomyopathy. *J Biol Chem*. 2011;286(40):35007–19.
8. Thottakara T, Friedrich FW, Reischmann S, Braumann S, Schlossarek S, Krämer E, et al. The E3 ubiquitin ligase Asb2 $\beta$  is downregulated in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy and targets desmin for proteasomal degradation. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;87:214–24.
9. Gavriilidis C, Laredj L, Solinhac R, Messaddeq N, Viaud J. in skeletal muscle. *Nat Cell Biol*. 2018;20:198–210.
10. Agnetti G, Halperin VL, Kirk JA, Chakir K, Guo Y, Lund L, et al. Desmin modifications associate with amyloid-like oligomers deposition in heart failure.

- Cardiovasc Res. 2014;102(1):24–34.
11. Aweida D, Rudesky I, Volodin A, Shimko E, Cohen S. GSK3- $\beta$  promotes calpain-1 – mediated desmin filament depolymerization and myofibril loss in atrophy. *J Cell Biol.* 2018;217(10):3698–714.
  12. Rainer PP, Dong P, Sorge M, Fert-bober J, Holewinski RJ, Foss CA, et al. Desmin Phosphorylation Triggers Preamyloid Oligomers Formation and Myocyte Dysfunction in Acquired Heart Failure. *Circ Res.* 2018;22(10):e75–83.
  13. Paulin D, Huet A, Khanamyrian L, Xue Z. Desminopathies in muscle disease. *J Pathol.* 2004;204(4):418–27.
  14. Clemen CS, Herrmann H, Strelkov S V., Schröder R. Desminopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2013;125(1):47–75.
  15. Capetanaki Y, Papathanasiou S, Diokmetzidou A, Vatsellas G, Tsikitis M. Desmin related disease: a matter of cell survival failure. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;32:113–20.
  16. Pawlak A, Gil RJ, Kulawik T, Pronicki M, Karkucińska-Wieogonekckowska A, Szymańska-Deogonekbińska T, et al. Type of desmin expression in cardiomyocytes - a good marker of heart failure development in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Intern Med.* 2012;272(3):287–97.
  17. Sanbe A, Osinska H, Saffitz JE, Glabe CG, Kayed R, Maloyan A, et al. Desmin-related cardiomyopathy in transgenic mice: A cardiac amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(27):10132–6.
  18. McLendon PM, Robbins J. Proteotoxicity and Cardiac Dysfunction. *Circ Res.* 2015;116(11):1863–83.
  19. Kanamori H, Takemura G, Goto K, Maruyama R, Tsujimoto A, Ogino A, et al. The role of autophagy emerging in postinfarction cardiac remodelling. *Cardiovasc Res.* 2011;91(2):330–9.
  20. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Pedro JMB-S, Cecconi F, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *Embo J.* 2017;36(13):1811–26.
  21. Cieniewski-Bernard C, Mulder P, Henry JP, Drobecq H, Dubois E, Pottiez G, et al. Proteomic analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart

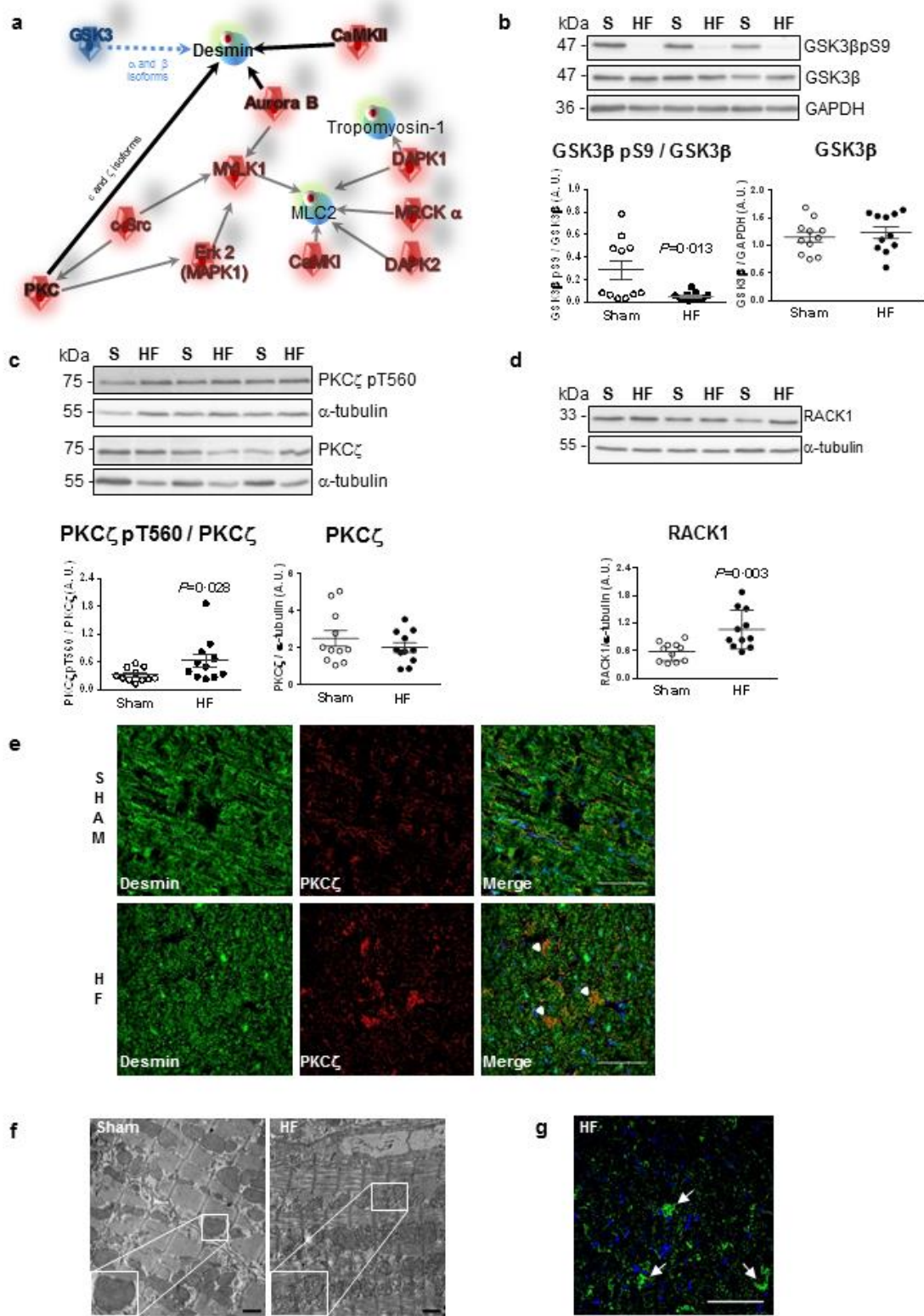
- failure. *J Proteome Res.* 2008;7(11):5004–16.
22. Mulder P, Devaux B, Richard V, Henry J, Wimart M, Thibout E, et al. Early versus delayed angiotensin-converting enzyme inhibition in experimental chronic heart failure. Effects on survival, hemodynamics, and cardiovascular remodeling. *Circulation.* 1997;95(5):1314–9.
  23. Dubois-Deruy E, Belliard A, Mulder P, Bouvet M, Smet-Nocca C, Janel S, et al. Interplay between troponin T phosphorylation and O-N-acetylglucosaminylation in ischaemic heart failure. *Cardiovasc Res.* 2015;107(1):56–65.
  24. Pedrozo Z, Torrealba N, Fernández C, Gatica D, Toro B, Quiroga C, et al. Cardiomyocyte ryanodine receptor degradation by chaperone-mediated autophagy. *Cardiovasc Res.* 2013;98(2):277–85.
  25. Graham J. Isolation of lysosomes from tissues and cells by differential and density gradient centrifugation. In: *Curr Protoc Cell Biol.* 2001. p. 1–21.
  26. Bouvet M, Dubois-deruy E, Dilezitoko T, Mulder P, El M, Beseme O, et al. Increased level of phosphorylated desmin and its degradation products in heart failure. *Biochem Biophys Reports.* 2016;6:54–62.
  27. Mercier T, Bouvet M, Dubois-Deruy E, Dechaumes A, Beseme O, Richard V, et al. Interplay between phosphorylation and O-GlcNacylation of sarcomeric proteins in ischemic heart failure. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:598.
  28. Lubbers E, Mohler P. Roles and regulation of protein phosphatase 2A (PP2A) in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;101:127–33.
  29. Kawajiri A, Yasui Y, Goto H, Tatsuka M, Takahashi M, Nagata K, et al. Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinately with Rho-kinase. *Mol Biol Cell.* 2003;14(4):1489–500.
  30. Lal H, Ahmad F, Woodgett J, Force T. The GSK-3 family as therapeutic target for myocardial diseases. *Circ Res.* 2015;116(1):138–49.
  31. Beurel E, Grieco S, Jope R. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther.* 2015;148:114–31.
  32. Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, et al. Regulation of

- protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol.* 1998;8(19):1069–77.
33. Mayanglambam A, Bhavanasi D, Vijayan KV, Kunapuli SP. Differential dephosphorylation of the protein kinase C-zeta (PKC) $\zeta$  in an integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-dependent manner in platelets. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(5):505–13.
  34. Guichard J, Rogowski M, Agnetti G, Fu L, Powell P, Wei C, et al. Desmin loss and mitochondrial damage precede left ventricular systolic failure in volume overload heart failure. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 2017;313(1):H32–45.
  35. Cohen S, Zhai B, Gygi SP, Goldberg AL. Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *J Cell Biol.* 2012;198(4):575–89.
  36. Dice J. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci.* 1990;15(8):305–9.
  37. Bogard AS, Tavalin SJ. Protein Kinase C ( PKC ) $\zeta$  Pseudosubstrate Inhibitor Peptide Promiscuously Binds PKC Family Isoforms and Disrupts Conventional PKC Targeting and Translocation. *Molecular Pharmacol.* 2015;88(4):728–35.
  38. Tejeda-Muñoz N, González-Aguilar H, Santoyo-Ramos P, Castañeda-Patlán MC, Robles-Flores M. Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Is Positively Regulated by Protein Kinase C  $\zeta$  -Mediated Phosphorylation Induced by Wnt Agonists. 2016;36(5):731–41.
  39. Turkieh A, Fertin M, Bouvet M, Mulder P, Drobecq H, Lemesle G, et al. Expression and Implication of Clusterin in Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Heart Fail.* 2018;11(6):e004838.
  40. Heling A, Zimmermann R, Kostin S, Maeno Y, Hein S, Devaux B, et al. Extracellular Proteins in Failing Human Myocardium. *Circ Res.* 2000;86(8):846–53.
  41. Datta K, Basak T, Varshney S, Sengupta S, Sarkar S. Quantitative proteomic changes during post myocardial infarction remodeling reveals altered cardiac metabolism and Desmin aggregation in the infarct region. *J Proteomics.* 2017;152:283–99.
  42. Wang J, Liu X, Sentex E, Takeda N, Dhalla NS, Liu X, et al. Increased expression of protein kinase C isoforms in heart failure due to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;6:H2277–87.
  43. Wu SC, Solaro RJ. Protein Kinase C: a novel regulator of both phosphorylation and de-

- phosphorylation of cardiac sarcomeric proteins. *J Biol Chem.* 2007;282(42):30691–8.
44. Decock J, Gillespie-Brown J, Parker P, Sugden P, Fuller S. Classical, novel and atypical isoforms of PKC stimulate ANF- and TRE/AP-1-regulated-promoter activity in ventricular cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 1994;356(2–3):275–8.
  45. Hardt S, Sadoshima J. Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res.* 2002;90(10):1055–63.
  46. Matsuda T, Zhai P, Maejima Y, Hong C, Gao S, Tian B, et al. Distinct roles of GSK-3alpha and GSK-3beta phosphorylation in the heart under pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(52):20900–5.
  47. Sala AJ, Bott LC, Morimoto RI. Shaping proteostasis at the cellular, tissue, and organismal level. *J Cell Biol.* 2017;216(5):1231–41.
  48. Kaludercic N, Maiuri MC, Kaushik S, Ferra F, Bruijn J De, Castoldi F, et al. Comprehensive autophagy evaluation in cardiac disease models. *Cardiovasc Res.* 2020;116:483–504.
  49. Wang C, Wang X. The interplay between autophagy and the ubiquitin-proteasome system in cardiac proteotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(2):188–94.
  50. Barac YD, Emrich F, Krutzwald-josefson E, Schrepfer S, Sampaio LC, Willerson JT, et al. The ubiquitin-proteasome system: A potential therapeutic target for heart failure. *J Heart Lung Transpl.* 2017;6(7):708–14.
  51. Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res.* 2007;100(6):914–22.
  52. Loos B, Lochner A, Engelbrecht AM. Autophagy in heart disease: a strong hypothesis for an untouched metabolic reserve. *Med Hypotheses.* 2011;77(1):52–7.
  53. Turkieh A, Porouchani S, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Lamblin N, et al. Increased clusterin levels after myocardial infarction is due to a defect in protein degradation systems activity. *Cell Death Dis.* 2019;10(8):608.
  54. Wu X, He L, Chen F, He X, Cai Y, Zhang G, et al. Impaired Autophagy Contributes to Adverse Cardiac Remodeling in Acute Myocardial Infarction. *PLoS One.* 2014;9(11):1–11.



55. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 2012;22(8):407–17.
56. Baron CP, Jacobsen S, Purslow PP. Cleavage of desmin by cysteine proteases: Calpains and cathepsin B. *Meat Sci.* 2004;68(3):447–56.
57. Shintani-Domoto Y, Hayasaka T, Maeda D, Masaki N. Different desmin peptides are distinctly deposited in cytoplasmic aggregations and cytoplasm of desmin-related cardiomyopathy patients. *BBA - Proteins Proteomics.* 2017;1865(7):828–36.
58. Diokmetzidou A, Soumaka E, Kloukina I, Tsikitis M, Makridakis M, Varela A, et al. Desmin and  $\alpha$  B-crystallin interplay in the maintenance of mitochondrial homeostasis and cardiomyocyte survival. *J Cell Sci.* 2016;129(20):3705–20.
59. Dimauro I, Antonioni A, Mercatelli N, Caporossi D. The role of  $\alpha$  B-crystallin in skeletal and cardiac muscle tissues. *Cell Stress Chaperones.* 2018;23:491–505.
60. Arndt V, Dick N, Tawo R, Dreiseidler M, Wenzel D, Hesse M, et al. Report Chaperone-Assisted Selective Autophagy Is Essential for Muscle Maintenance. *Curr Biol.* 2010;20(2):143–8.
61. Islam M, Diwan A, Mani K, Monte F. Come Together : Protein Assemblies , Aggregates and the Sarcostat at the Heart of Cardiac Myocyte Homeostasis. *Front Physiol.* 2020;11:586.



**Figure 1. Desmin is phosphorylated by active PKC $\zeta$  and GSK3 $\beta$  in the LV of HF-rats 2 months after MI.** **a:** In silico screening of kinases potentially involved in desmin phosphorylation with GeneGo pathways software selected CaMKII, Aurora B and PKC ( $\epsilon$  and

$\zeta$  isoforms). GSK3 was previously described to be involved in desmin phosphorylation (10).

**b:** Representative western blots (top panel) and quantification of inactive GSK3 $\beta$  (GSK3 $\beta$  pS9/GSK3 $\beta$  ratio) (bottom left panel) and GSK3 $\beta$  levels (bottom right panel) in the LV of sham- (n=11) and HF-rats 2 months post-MI (n=11).

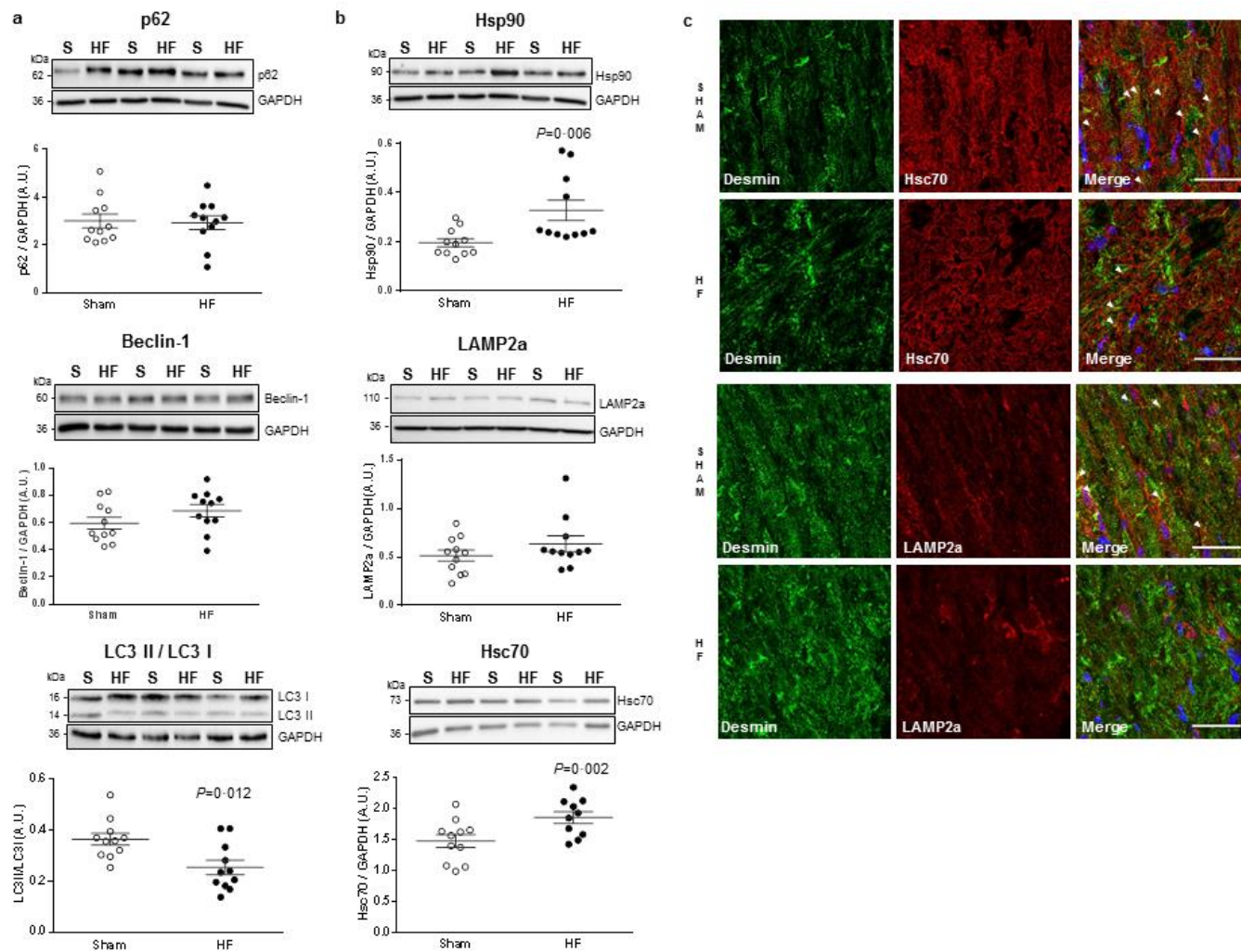
**c:** Representative western blots (top panel) and quantification of active PKC $\zeta$  (PKC $\zeta$  pT560/ PKC $\zeta$  ratio) (bottom left panel) and PKC $\zeta$  levels (bottom panel) in the same samples.

**d:** Representative western blot (top panel) and quantification of RACK1 levels (right panel) in the same samples. The loading controls (GAPDH and  $\alpha$ -tubulin) are indicated on the graphs. Graphs show individual and mean  $\pm$  SEM values expressed in arbitrary units (A.U.). Significant *P* values are indicated on the graphs.

**e:** Double immunofluorescence staining for desmin (green) with PKC $\zeta$  (red) in the LV of sham- and HF-rats 2 months post-MI. Arrows indicates the colocalisation of desmin with PKC $\zeta$ . Scale bar represents 60  $\mu$ m.

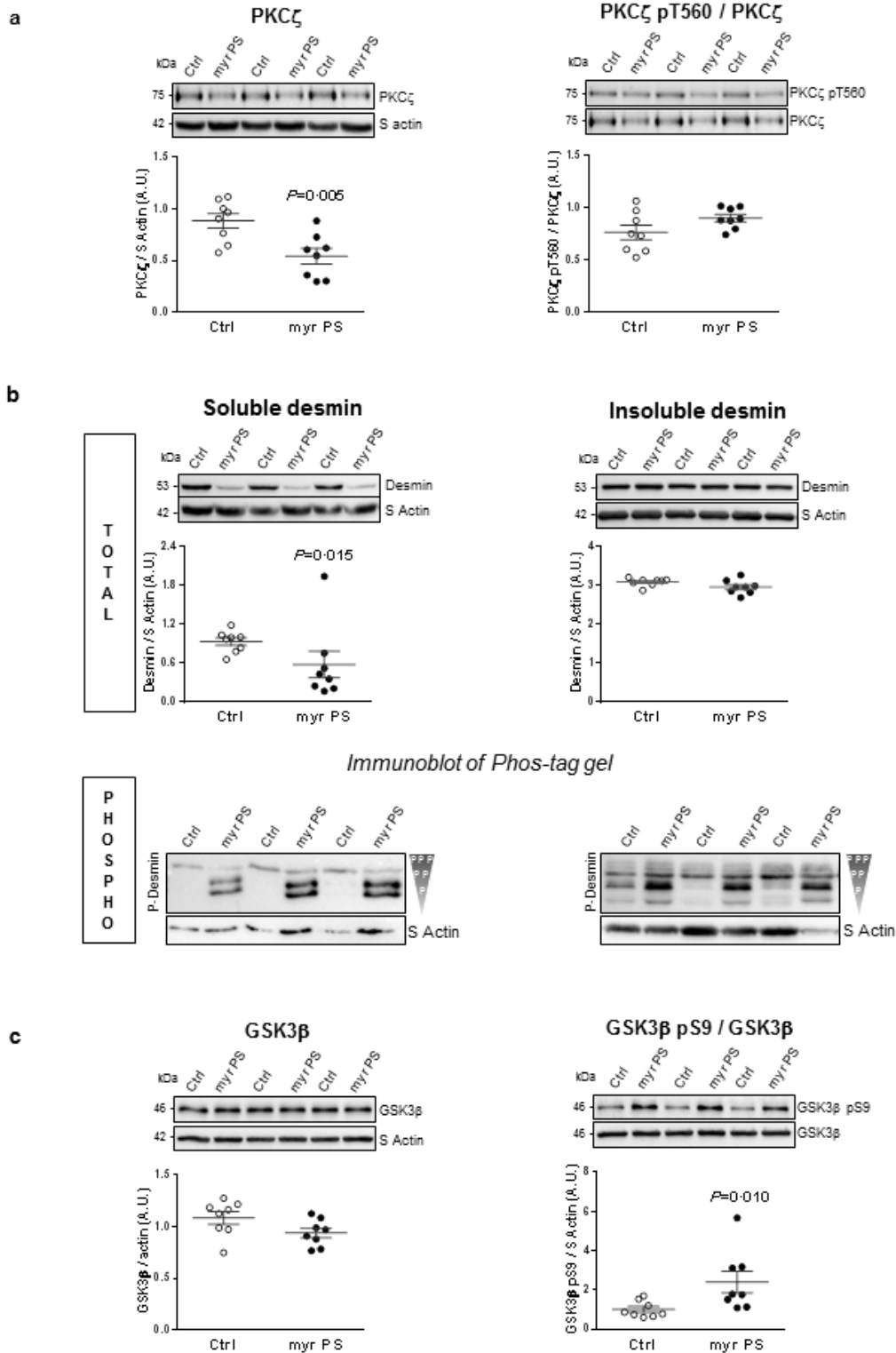
**f:** LV ultrastructure of sham- and 7 days post-MI rats (top panel) and sham- and HF-rats 2 months post-MI (bottom panel). Higher magnifications of mitochondria from LV of 2 months sham- and post-MI rats are shown as insert. Scale bar represents 1  $\mu$ m.

**g:** Immunofluorescence staining for desmin aggregates indicated by arrows in LV of 2 months post-MI rats with nuclei stained in blue. Scale bar represents 60  $\mu$ m.



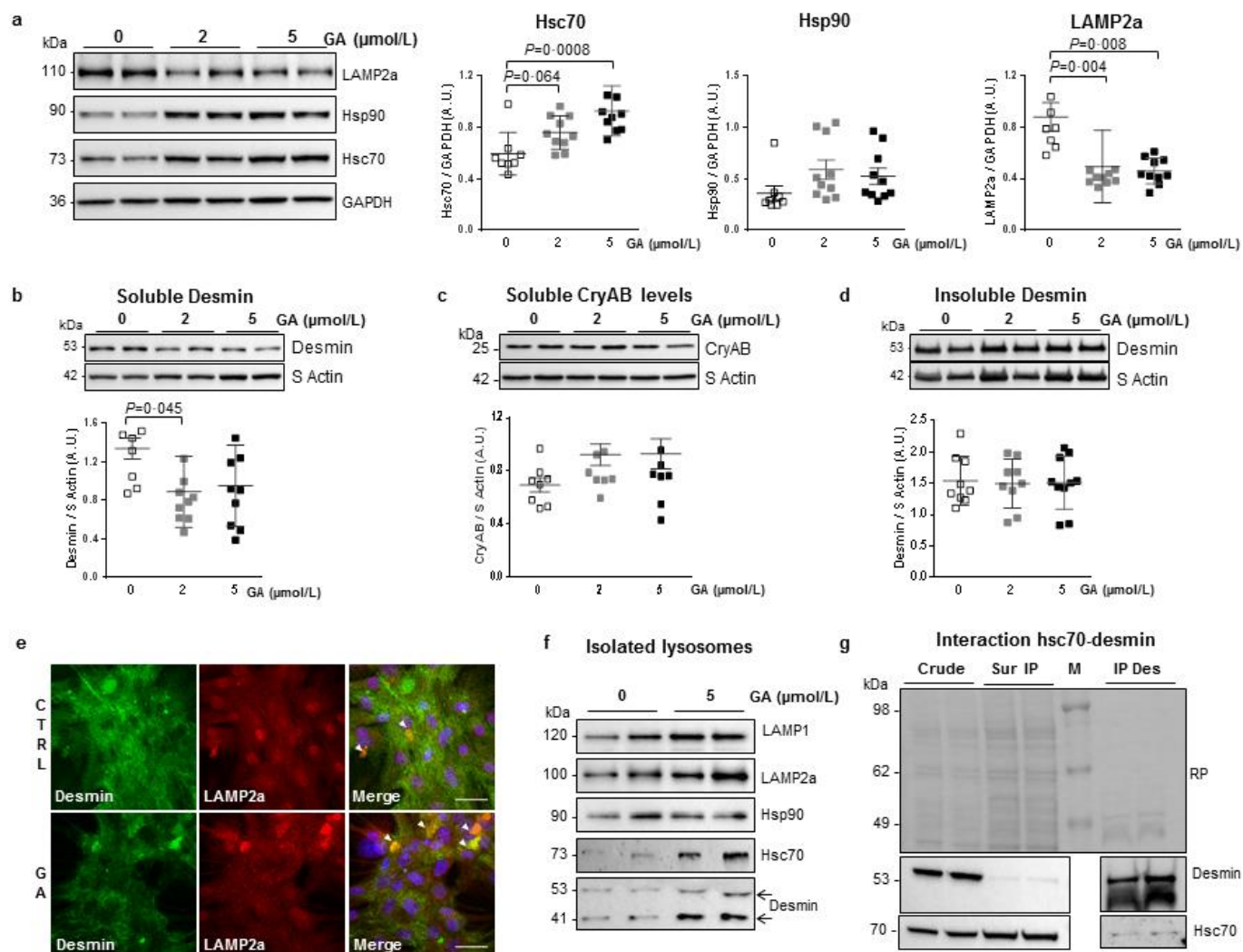
**Figure 2. LV autophagy response to HF following MI. a:** Representative western blots and quantification of macroautophagy markers, p62 (top panel), beclin-1 (middle panel) and LC3 II/LC3 I ratio (bottom panel) in LV of sham- (n=11) and HF-rats 2 months post-MI (n=11). **b:**

CMA markers: Hsp90 (top panel), LAMP2a (middle panel) and Hsc70 (bottom panel) were quantified by western blots in the same samples. The loading controls (GAPDH) are indicated on the graphs. Graphs show individual and mean  $\pm$  SEM values expressed in arbitrary units (A.U.). Significant *P* values are indicated on the graphs. **c**: Double immunofluorescence staining for desmin (green) with Hsc70 (red) (top panels) and for desmin (green) with LAMP2a (red) (bottom panels) in LV of sham- and HF-rats 2 months post-MI. Nuclei are stained in blue. Arrows indicates the colocalization of desmin with respectively Hsc70 and LAMP2a. Scale bar represents 30  $\mu$ m.



**Figure 3. PKC $\zeta$  modulates desmin phosphorylation *in vitro* in cardiomyocytes. a:** Representative western blots and quantification of PKC $\zeta$  levels (left panel) and active PKC $\zeta$  (PKC $\zeta$  pT560/ PKC $\zeta$  ratio) (right panel) in control and NCM treated with 10  $\mu$ mol/L of PKC $\zeta$  inhibitor, myrPS for 1 hr (n=8). **b:** Soluble (top left panel) and insoluble (top right panel) desmin levels and their phosphorylation profiles (Phos-tag gel, bottom panels) were

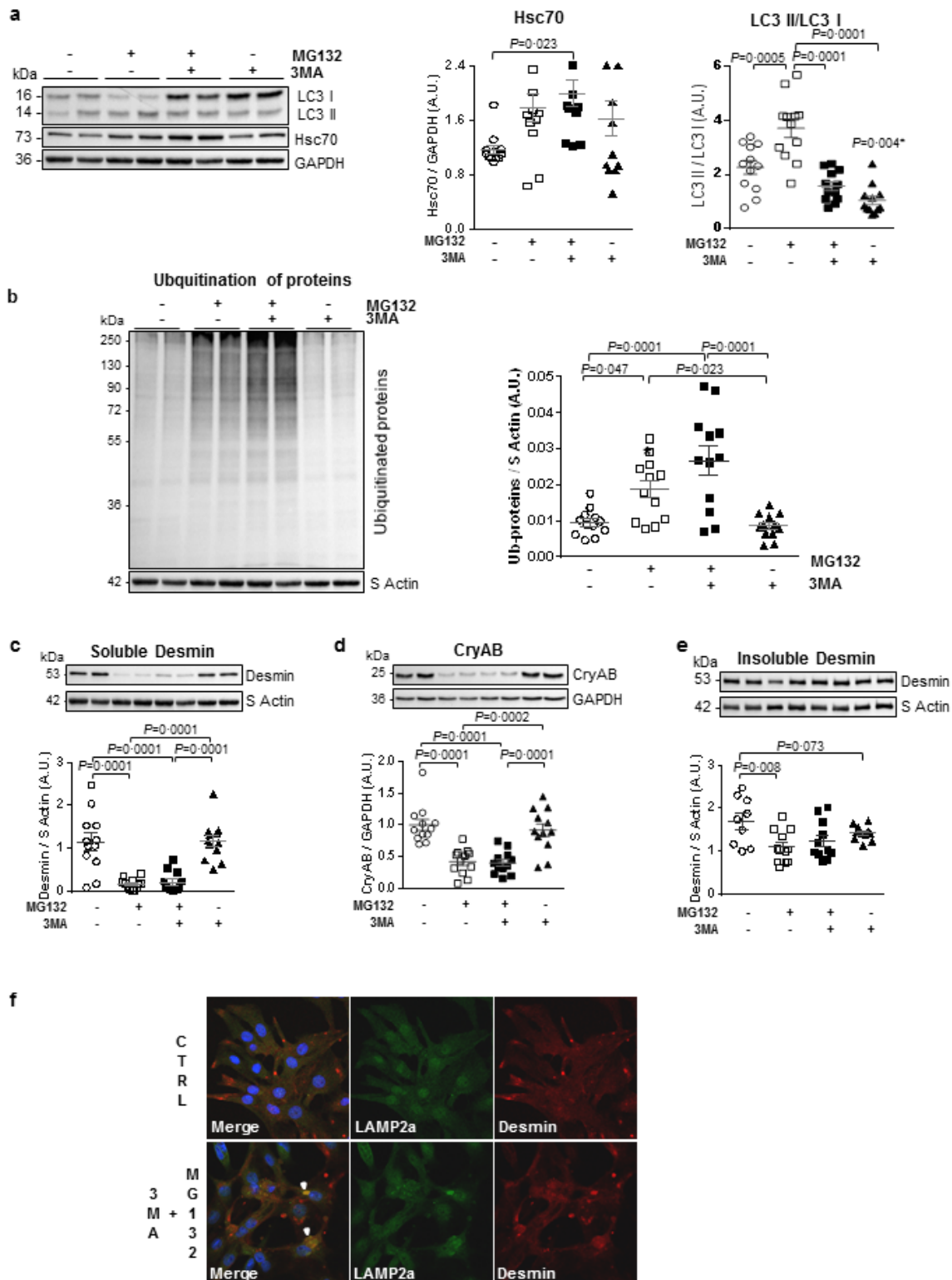
analyzed in response to PKC $\zeta$  inhibition in the same samples. Each band of the desmin immunoblot of Phos-tag gels represents a phosphorylated form of desmin, the upper band being the most phosphorylated and the lower band the less or no phosphorylated form of desmin. c: Representative western blots and quantification of GSK3 $\beta$  levels (left panel) and inactive GSK3 $\beta$  (GSK3 $\beta$  pS9/GSK3 $\beta$  ratio) (right panel) in the same samples. The loading control (*S Actin*) is indicated on the graphs. Graphs show individual and mean  $\pm$  SEM values expressed in arbitrary units (A.U.). Significant *P* values are indicated on the graphs.



**Figure 4. Clearance of soluble desmin by inducing CMA *in vitro* in cardiomyocytes. a:** Representative western blots and quantification of CMA markers: Hsc70 (left panel), Hsp90 (middle panel) and LAMP2a (right panel) in control (n=8) and NCM treated with 2 and 5  $\mu\text{mol/L}$  of

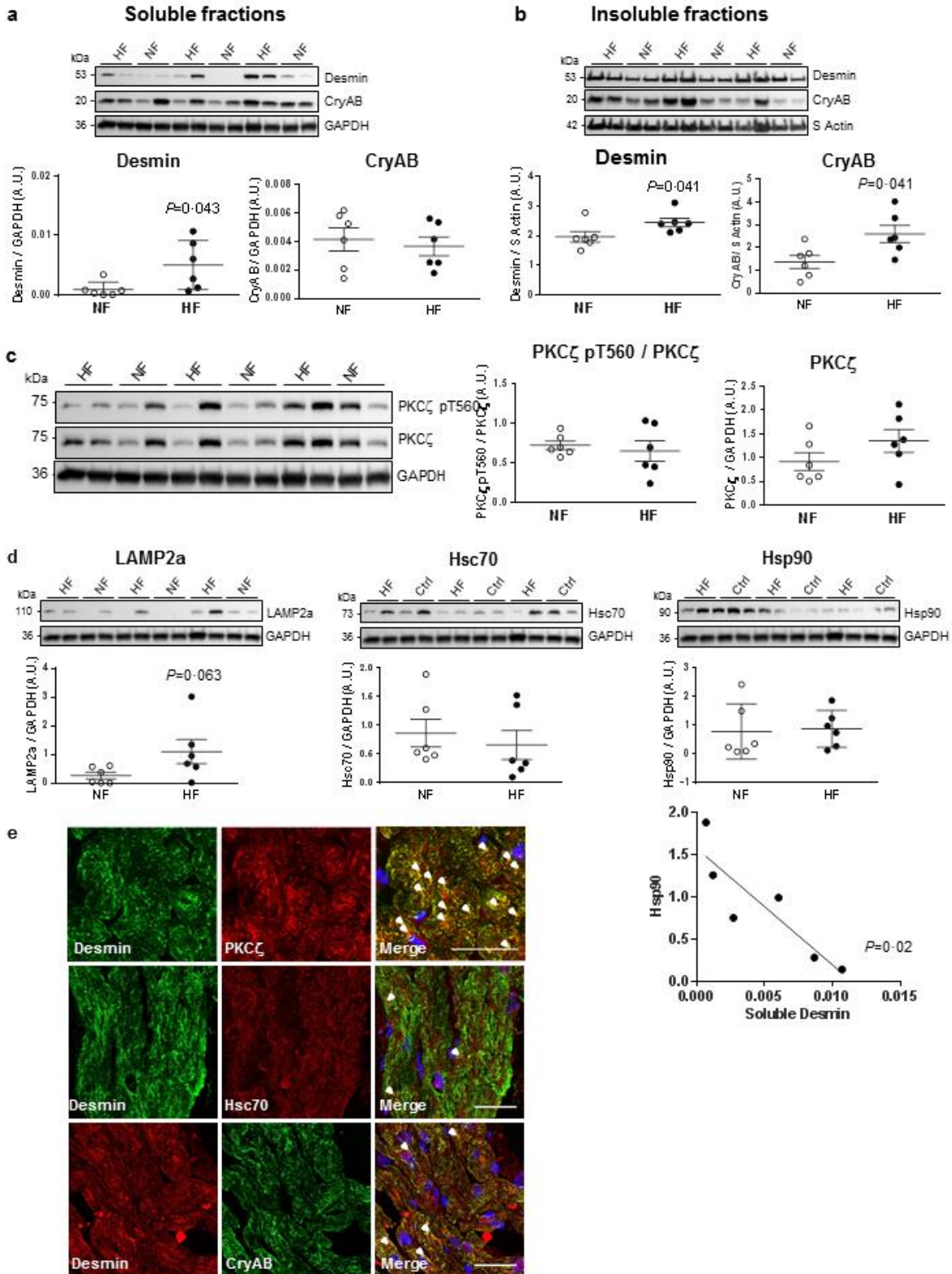


geldanamycin (GA) during 17 hrs (n=10). **b, c:** The impact of CMA induction was evaluated by western blot on soluble protein fractions in the same samples for desmin (**b**) and CryAB (**c**). **d:** The impact of CMA induction on insoluble desmin was evaluated by western blot in the same samples. The loading controls (GAPDH and S Actin) are indicated on the graphs. Graphs show mean  $\pm$  SEM values expressed in arbitrary units (A.U.). Significant *P* values are indicated on the graphs. **e:** Representative immunofluorescence staining of desmin (green) and LAMP2a (red) in control and NCM treated with 5  $\mu$ mol/L of GA during 17 hrs. Nuclei are stained in blue. Arrows show the colocalization points. Scale bar represents 30  $\mu$ m. **f:** Representative western blots of lysosome marker (LAMP1), CMA markers (LAMP2a, Hsc70 and Hsp90) and desmin in isolated lysosomes of H9c2 cells treated or not with 5  $\mu$ mol/L of GA during 17 hrs. Arrows show the different desmin entities. **G:** Detection of interaction between desmin and Hsc70 in H9c2 cells by immunoprecipitation of desmin followed by western blot for desmin and Hsc70. Crude: crude cells sample; Sur IP: supernatant of desmin immunoprecipitation. IP Des: immunoprecipitation of desmin; Efficiency of Des IP was verified with desmin western blot; M: size markers are indicated on the left side of red ponceau (RP) staining membrane.



**Figure 5. Clearance of soluble desmin *in vitro* in cardiomyocytes co-treated with 3MA and MG132.** **a:** Representative western blots and quantification of Hsc70 levels and LC3 II/LC3 I ratio in untreated/control cells (n=12), NCM treated either with MG132 (10  $\mu$ mol/L) (n=12) or 3-MA (10 mmol/L) (n=12) for 18 hrs, and NCM pretreated with 3-MA (10 mmol/L) for 1 hr and then co-treated with 3-MA (10 mmol/L) and MG132 (10  $\mu$ mol/L) for

18 hrs (n=12). **b**: Representative western blots and quantification of ubiquitylated proteins levels in the same samples. **c**: Representative western blots and quantification of soluble desmin levels in the same samples. **d**: Representative western blots and quantification of soluble CryAB levels in the same samples. **e**: Representative western blots and quantification of insoluble desmin levels in the same samples. The loading controls (GAPDH and S Actin) are indicated on the graphs. Graphs show individual and mean  $\pm$  SEM values expressed in arbitrary units (A.U.). Significant *P* values are indicated on the graphs. \*in panel **a** shows the significance of 3MA treatment *vs* untreated cells. **f**: Representative immunofluorescence staining of desmin (red) and LAMP2a (green) in control and NCM pretreated with 3MA (10 mmol/L) for 1 hr and then co-treated with 3MA (10 mmol/L) and MG132 (10  $\mu$ mol/L) for 18 hrs. Nuclei are stained in blue. Arrows show the colocalization points. Scale bar represents 30  $\mu$ m.



**Figure 6. Desmin presents a scaffold defect and accumulates in the failing human hearts.**

**a, b:** Representative western blots and quantification of soluble (**a**) and insoluble (**b**) desmin (left panels) and CryAB (right panels) levels in the heart of non-failing (NF) (n=6) and failing (HF) patients (n=6). **c:** Representative western blots (left panel) and quantification of active

PKC $\zeta$  (PKC $\zeta$  pT560/ PKC $\zeta$  ratio) (middle panel) and PKC $\zeta$  (right panel) in the same samples. **d:** Representative western blots and quantification of LAMP2a (left panel), Hsc70 (middle panel) and Hsp90 (right panel) in the hearts of non-failing (NF) (n=6) and failing (HF) patients (n=6). Correlation analysis of Hsp90 expression levels with soluble desmin expression levels in the heart of failing patients (n=6) is shown (bottom panel). The loading controls (GAPDH and S Actin) are indicated on the graphs. Graphs show individual and mean  $\pm$  SEM values expressed in arbitrary units (A.U.). Significant *P* values are indicated on the graphs. **e:** Double immunofluorescence staining for desmin (green) and PKC $\zeta$  (red) (top panels) in frozen myocardial sections from failing patients. Scale bar represents 30  $\mu$ m. Double immunofluorescence staining for desmin (green) with Hsc70 (red) (middle panels) and for desmin (red) with CryAB (green) (bottom panels) in frozen myocardial sections from failing patients. Scale bar represents 50  $\mu$ m. Nuclei are stained in blue as shown in the merge staining. Arrows indicate colocalization of desmin with PKC $\zeta$ , Hsc70 or CryAB.

## **Supplementary data**

### **Desmin aggregopathy in rat and human ischemic heart failure through protein kinase C $\zeta$ and GSK3 $\beta$ as upstream signaling pathways**

**Short title: Desmin aggregopathy in heart failure**

**Marion Bouvet<sup>1</sup>, Emilie Dubois-Deruy<sup>1#</sup>, Annie Turkieh<sup>1#</sup>, Victoriane Peugnet<sup>1</sup>, Paul Mulder<sup>2</sup>, Arthur Dechaumes<sup>1</sup>, Maggy Chwastyniak<sup>1</sup>, Olivia Beseme<sup>1</sup>, Philippe Amouyel<sup>1</sup>, Vincent Richard<sup>2</sup>, Nicolas Lamblin<sup>1</sup>, Florence Pinet<sup>1\*</sup>**

**Supplemental Table 1. Histomorphometric and echocardiographic parameters of rats at 2 months post-MI**

<b>Parameters</b>	<b>Sham (n=11)</b>	<b>2 months post-MI (n=11)</b>
BW (g)	453 ± 7	444 ± 14
HW (g)	1.38 ± 0.03	1.76 ± 0.11***
LVW (g)	1.02 ± 0.02	1.29 ± 0.07**
(HW/BW)*10 <sup>3</sup>	3 ± 0.1	3.6 ± 0.4**
(LVW/BW)*10 <sup>3</sup>	2.25 ± 0.1	2.65 ± 0.3**
LVEDD (mm)	6.7 ± 0.2	10.1 ± 0.4***
LVESD (mm)	3.6 ± 0.3	8.4 ± 0.6***
FS (%)	47.1 ± 2	18.5 ± 4***
HR (bpm)	434 ± 20	421 ± 13
SV (ml)	0.38 ± 0.2	0.33 ± 0.03
CO (ml/min)	167 ± 12	137 ± 11

MI: myocardial infarction, BW: body weight, HW: heart weight, LVW: left ventricular weight, LVEDD: left ventricular end-diastolic diameter, LVESD: left ventricular end-systolic diameter, FS: fractional shortening, HR: Heart rate, SV: stroke volume, CO: cardiac output. Statistical significance was determined by Wilcoxon-Mann Whitney test. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs sham rats.

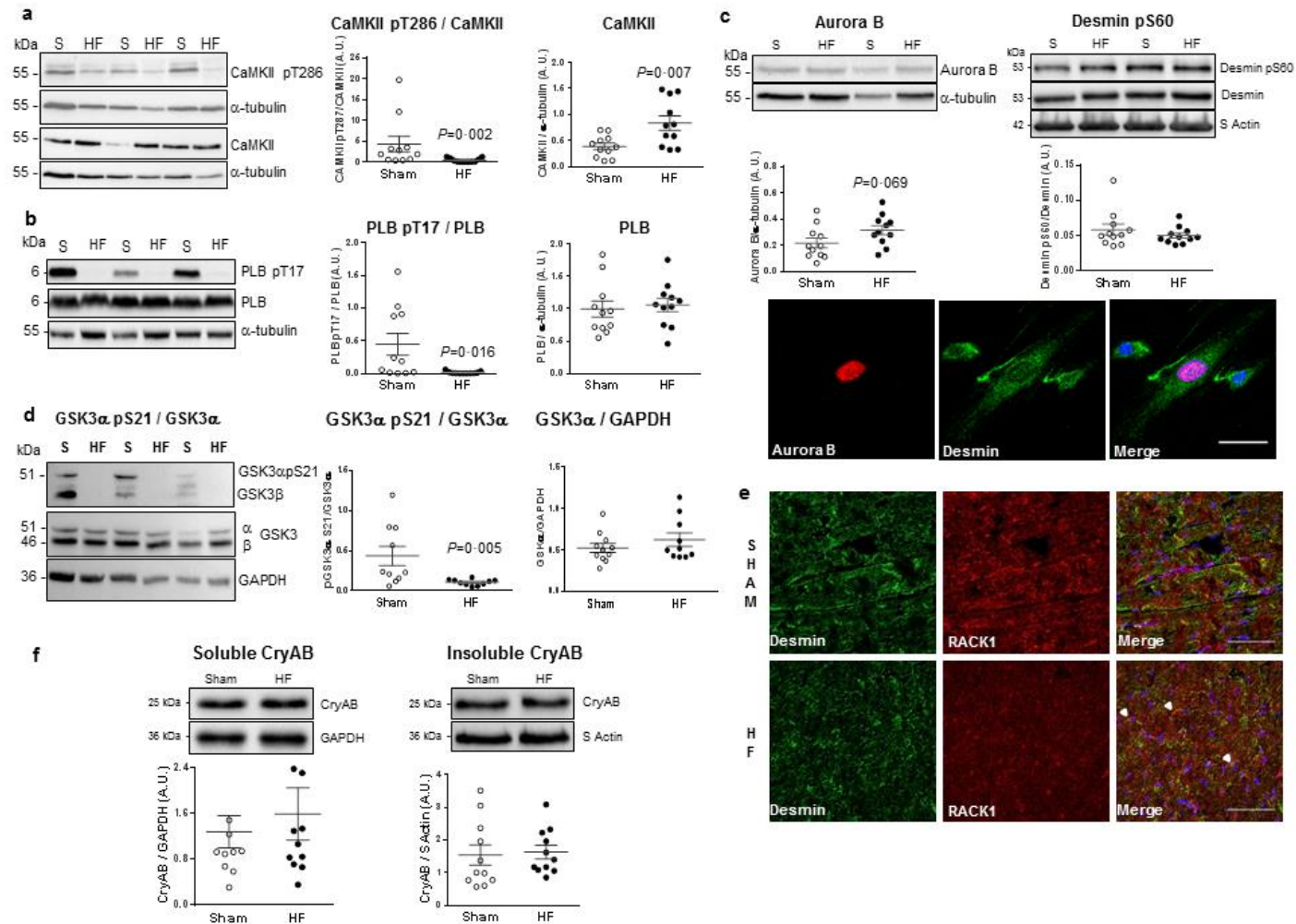
**Supplemental Table 2. List of antibodies**

Protein	Sample*	Reference Company	Dilution	
			Western blot	Immunofluorescence
Aurora B	Heart	611082 BD Transduction Laboratories	1/1000	1/50
Beclin-1	Heart	#3738 Cell Signalling	1/1000	
CaMKII	Heart	ab22609 Abcam	1/1000 (Rat) 1/300 (Human)	
CaMKII pT286	Heart (rat)	PA5-17755 Thermo Scientific	1/1000	
	Heart (human)	ab32678 Abcam	1/500	
CryAB	Heart	ADI-SPA-223-F	1/15000	1/200
	NCM	Enzo Life Sciences	1/20000	
Desmin	Heart	ab32362	1/1000	1/200
	NCM	Abcam	1/5000	1/100
	Heart	D1033		1/100
	NCM	Sigma		
Desmin pS60	Heart	Ab111382 Abcam	1/2000	
GAPDH	Heart/NCM	sc-36562 Santa Cruz	1/5000	
GSK3 $\alpha/\beta$	Heart	# 5676 Cell signalling	1/2000	
GSK3 $\alpha$ pS21	Heart	#9316 Cell signalling	1/1000	
GSK3 $\beta$	Heart	#9315	1/10000	
	NCM	Cell Signalling	1/5000	
GSK3 $\beta$ pS9	Heart/NCM	#9336 Cell Signalling	1/2000	
Hsc70	Heart/NCM	ab2788 Abcam	1/20000	1/200
Hsp90	Heart	ab13492	1/500	
	NCM	Abcam	1/1000	
LAMP1	NCM	ADI-VAM-EN001 Enzo Life Sciences	1/1000	1/50
LAMP2a	Heart	51-2200	1/2000	1/50
	NCM	Invitrogen	1/1000	
LC3B	Heart/NCM	#2775 Cell Signalling	1/1000	
p62	Heart/NCM	610498 BD Transduction Laboratories	1/1000	
Phospholamban	Heart	sc-21923 Santa Cruz	1/500	
Phospholamban pT17	Heart	sc-17024-R Santa Cruz	1/2000	
PKC $\zeta$ C-20	NCM/H9c2	sc-216 Santa Cruz	1/1000	1/100
PKC $\zeta$ N-17	Heart	sc-7262 Santa Cruz	1/2000	
PKC $\zeta$ pT560	Heart/NCM /H9c2	ab62375 Abcam	1/1000	1/100
RACK1	Heart	sc-17754 Santa Cruz	1/1000	1/100



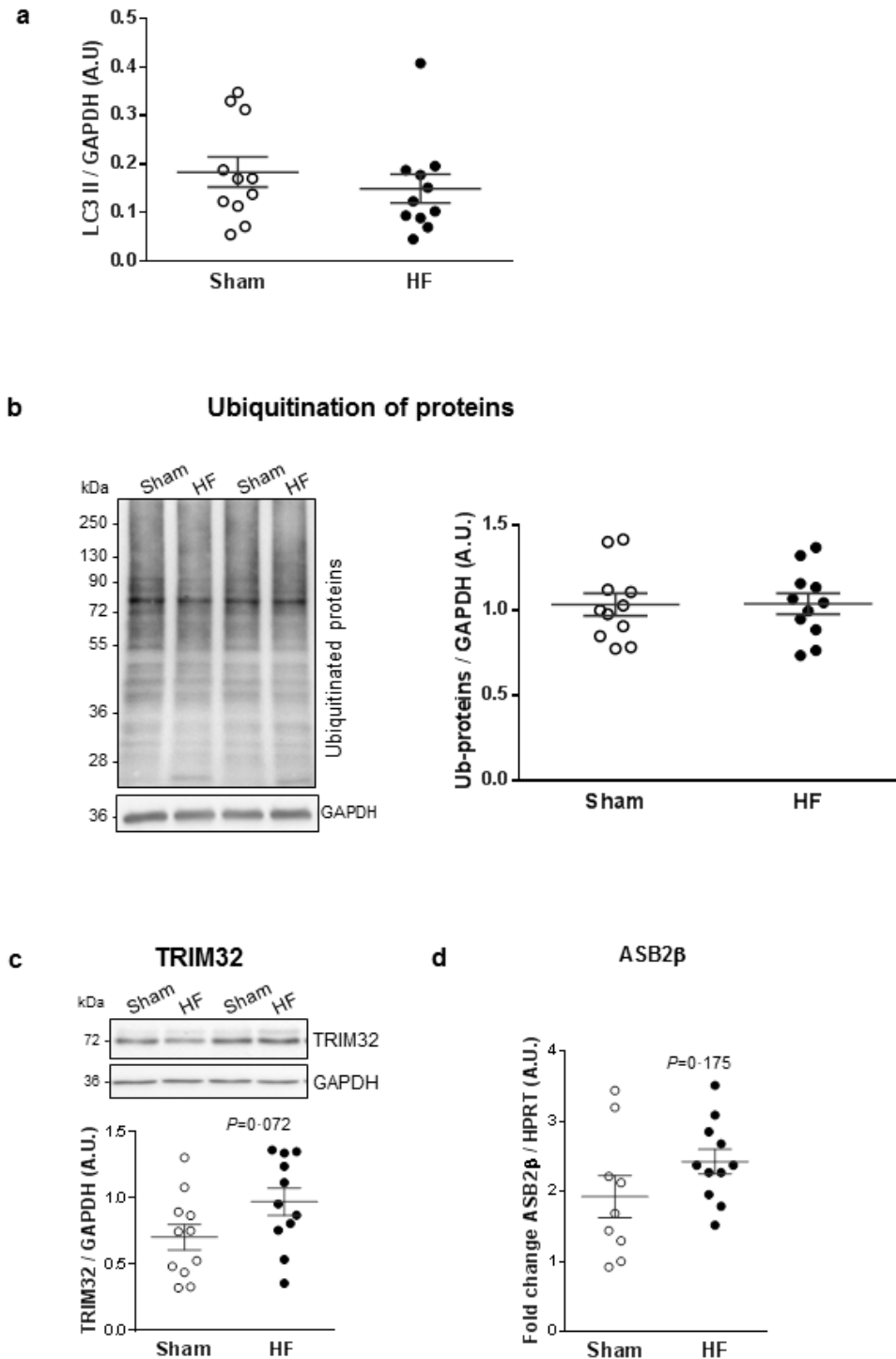
Sarcomeric actin	Heart /NCM	MO874 Dako	1/2000	
TRIM32	Heart	LS-B1105/8586 LifeSpan Biosciences	1/5000	
Mono- and poly-ubiquitin	Heart/NCM	BML-PW8810 Enzo Life Sciences	1/2000	
$\alpha$ -tubulin	Heart	sc-5286 Santa Cruz	1/10000	

\*heart indicates rat species, otherwise it is indicated.

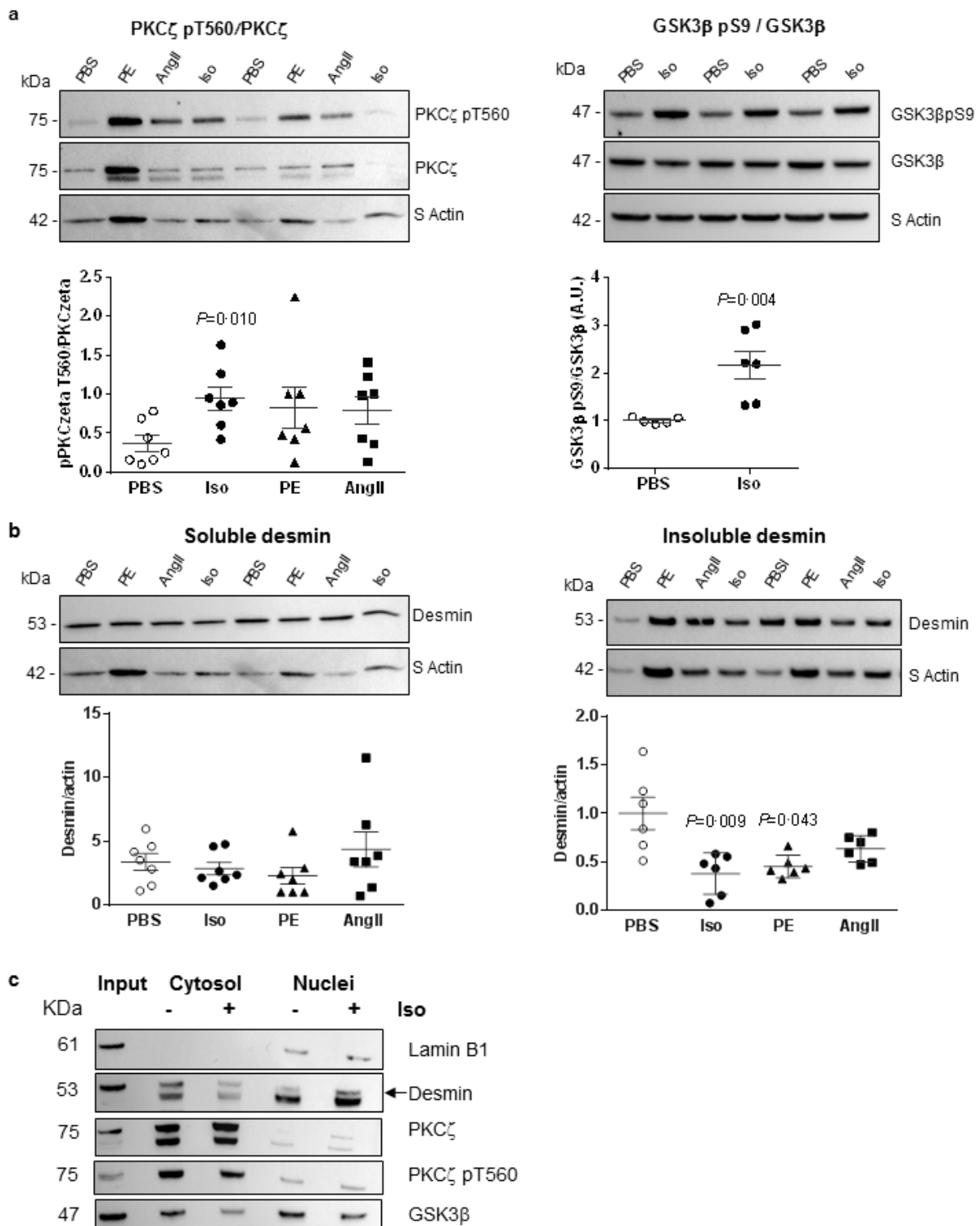


**Supplemental Figure S1. Regulation of kinases potentially involved in desmin phosphorylation, identified by bioinformatic analysis. a:** Representative western blots (left panel) and quantification of active CaMKII (CaMKII pT286/CaMKII ratio) (middle panel) and CaMKII levels (right panel) in LV of sham- (n=11) and HF-rats 2 months

post-MI (n=11). **b:** Representative western blots (left panel) and quantification of phosphorylated phospholamban (PLB) on threonine 17 (PLB pT17/PLB ratio) (middle panel) and PLB levels (right panel) in the same samples. **c:** Representative western blots and quantification of Aurora B (top left panel) and of phosphorylated desmin at S60 (desmin pS60/desmin ratio) (top right panel) in the same samples. Double immunofluorescence staining for desmin (green) with Aurora B (red) in H9c2 cells (bottom panel). Nuclei are stained in blue. Scale bar represents 40  $\mu\text{m}$ . **d:** Representative western blots (left panel) and quantification of inactive GSK3 $\alpha$  (GSK3 $\alpha$  pS21/GSK3 $\alpha$  ratio) (middle panel) and GSK3 $\beta$  levels (right panel) in the same samples. **e:** Double immunofluorescence staining for desmin (green) with RACK1 (red) in the LV of sham- and HF-rats 2 months post-MI. Arrows indicates the colocalisation of desmin with RACK1. Scale bar represents 60  $\mu\text{m}$ . **f:** Representative western blots and quantification of CryaB in soluble (left panel) and insoluble protein fractions (right panel) in the same samples. The loading controls (GAPDH, S Actin and  $\alpha$ -tubulin) are indicated on the graphs. Graphs show individual and mean  $\pm$  SEM values expressed in arbitrary units (A.U.). Significant *P* values are indicated on the graphs.



**Supplemental Figure S2. Ubiquitin proteasome system (UPS) is involved in desmin clearance. a:** Quantification of LC3II levels in LV of sham- (n=11) and HF 2 months post-MI rats (n=11). **b:** Representative western blots and quantification of ubiquitinated proteins in the same samples. **c:** Representative western blots and quantification of TRIM32 levels in the same samples. **d:** ASB2 $\beta$  mRNA expression was quantified in the same samples by qPCR with Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) used as internal control. Graphs show individual and mean  $\pm$  SEM values expressed in arbitrary units (A.U) except for ASB2 $\beta$  expressed as fold change. Significant *P* values are indicated on the graphs.

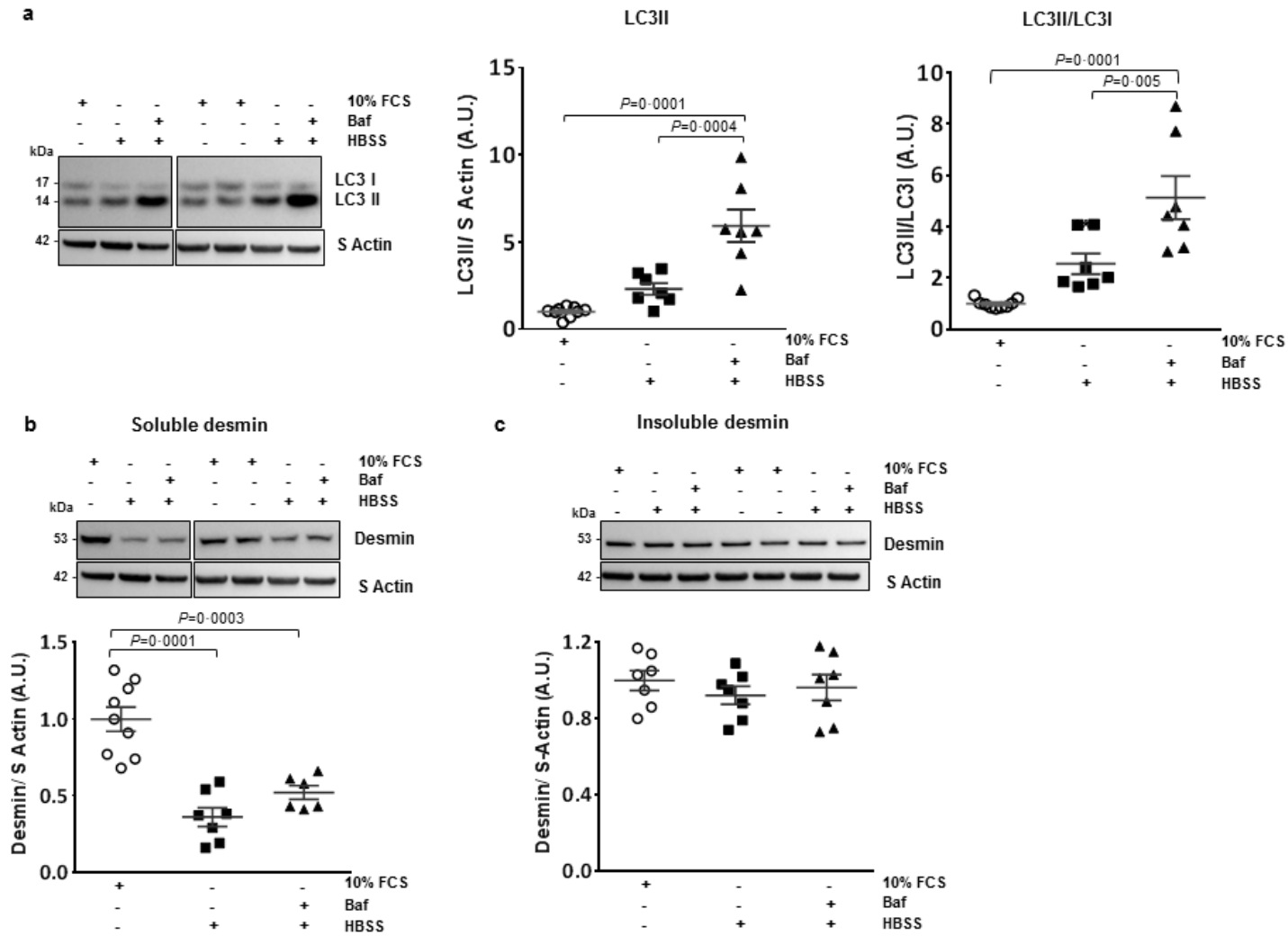


**Supplemental Figure S3. Impact of hypertrophy induction in PKC $\zeta$ , GSK3 $\beta$  and desmin levels in NCMs.**

**a:** Representative western blots and quantification of active PKC $\zeta$  (PKC $\zeta$  pT560/PKC $\zeta$  ratio) (left panel) and active GSK3 $\beta$  (GSK3 $\beta$  pS9/ GSK3 $\beta$ ) (right panel) in control (PBS) and NCM treated with 10  $\mu$ mol/L of Isoproterenol (Iso), 2  $\mu$ mol/L of Angiotensin II (AngII) or 20  $\mu$ mol/L of phenylephrine (PE) for 48 hr (n=7). **b:** Soluble (left panel) (n=7) and insoluble (right panel) (n=6) desmin levels were analyzed in response to hypertrophic treatment in the same samples. The loading control (S Actin) is indicated on the graphs. Graphs show individual and mean  $\pm$  SEM values expressed in arbitrary units (A.U.). Significant *P* values are indicated

on the graphs. **c:** Subcellular fractionation (cytosolic and nuclei) from NCM untreated (PBS) or treated with 10  $\mu\text{mol/L}$  of Isoproterenol (Iso) for 48 hr (n=2). Proteins extracted from cytosol and nuclei were subjected to western blot for lamin B1 (control of nuclear fraction), desmin, PKC $\zeta$ , PKC $\zeta$  pT560, and GSK3 $\beta$ . The specific band for desmin is indicated by an arrow. Inp: Input corresponds to proteins extracted from NCM before subcellular fractionation.

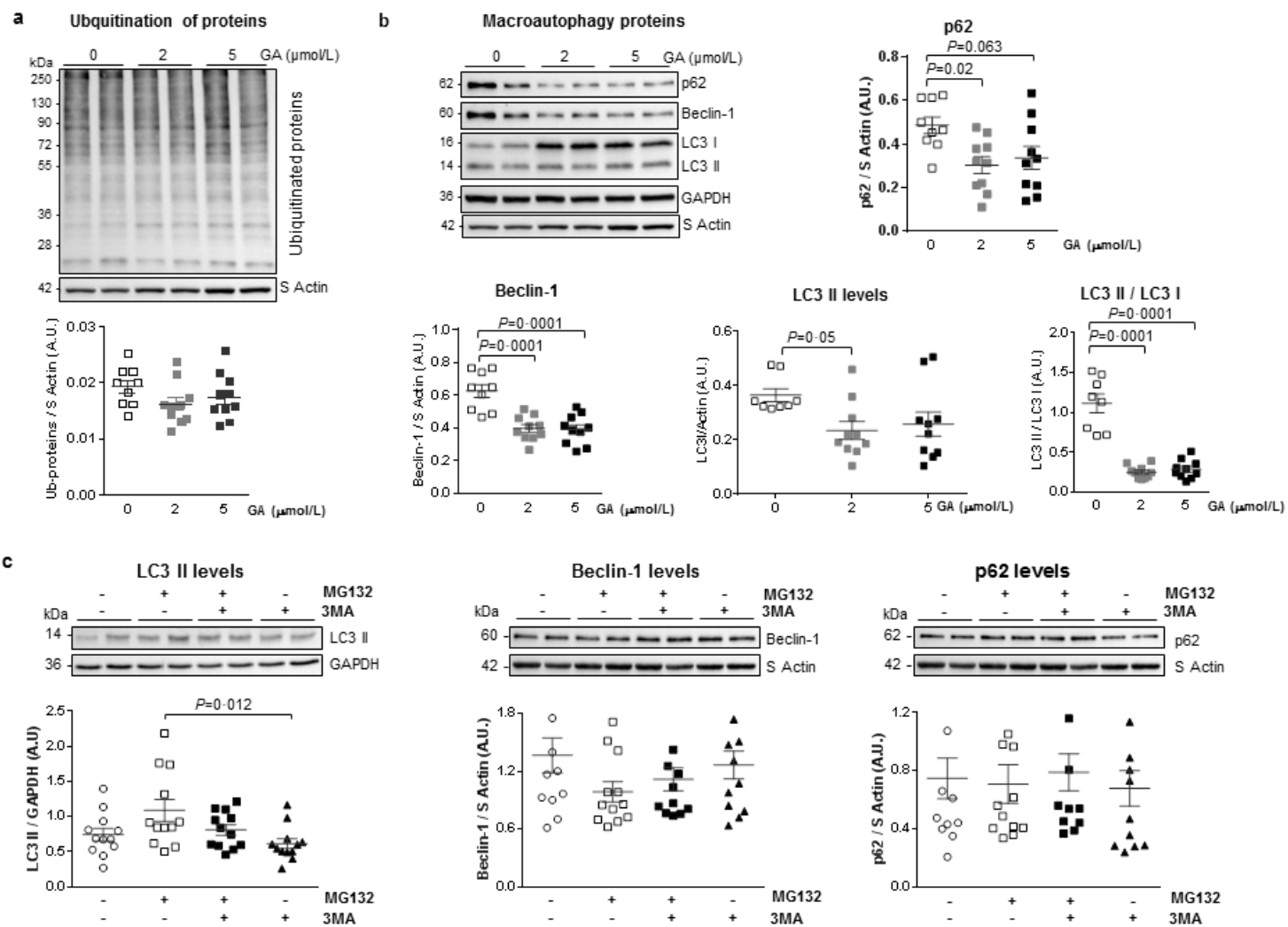




**Supplemental Figure S4. Soluble desmin is degraded by nutrient starvation *in vitro* in cardiomyocytes.** a: Representative western blots (left panel) and quantification (right panels) of LC3II levels and LC3 II/LC3 I ratio in NCM cultured on different conditions: 10% FCS (Fetal Calf Serum) (n=7) and Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

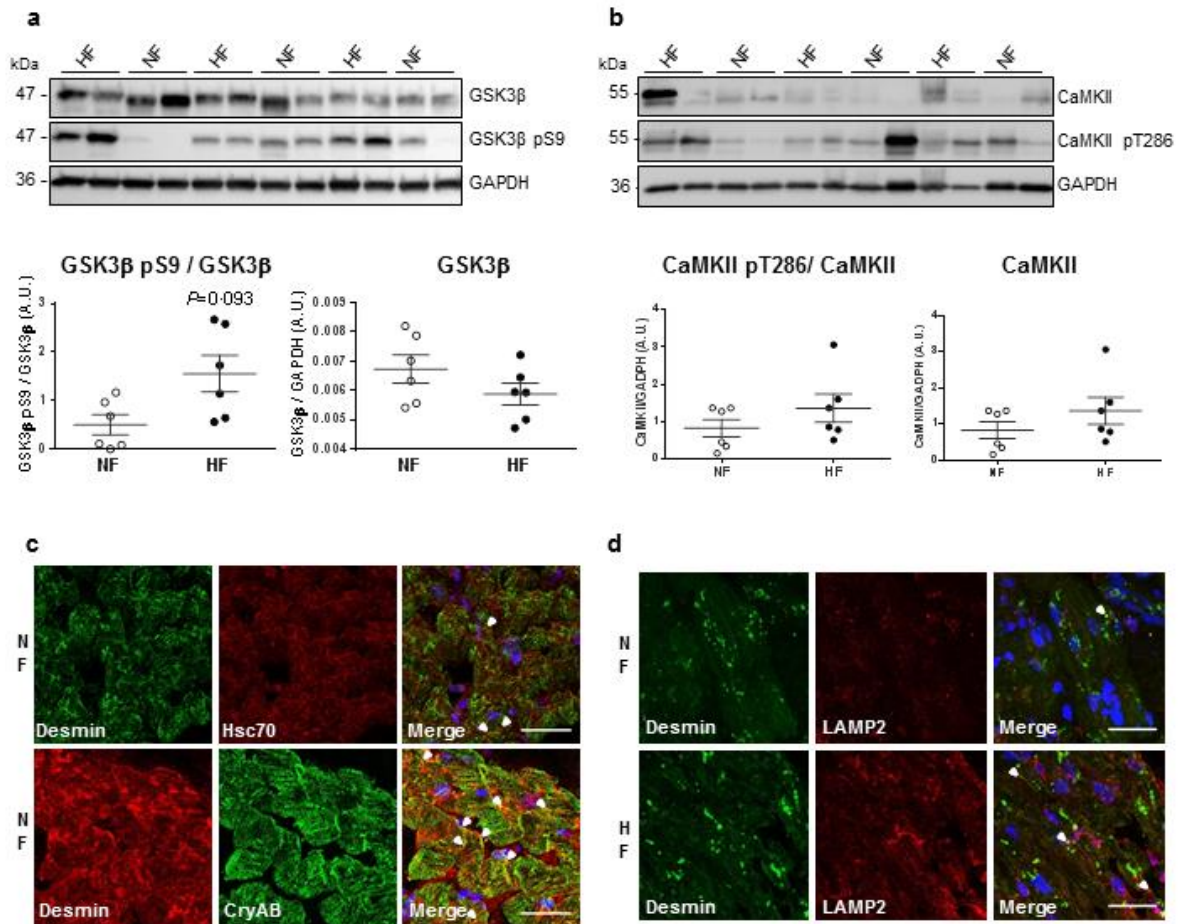


with (n=7) or without (n=7) pretreatment with bafilomycin (Baf, 50 nmol/L) for 2 hrs. **b**: Representative western blots and quantification of soluble desmin levels in the same samples. **c**: Representative western blots and quantification of insoluble desmin levels in the same samples. Graphs show mean  $\pm$  SEM values expressed in arbitrary units (A.U.). Significant *P* values are indicated on the graphs.



**Supplemental Figure S5. Impact of CMA activation by GA (A, B) or MG132 and 3MA (C) on UPS and macroautophagy.** a: Representative western blots (top panel) and quantification (bottom panel) of ubiquitinated proteins levels in control (n=8) and NCM treated with 2 and 5 μmol/L of GA during 17 hrs (n=10). b: Representative

western blots and quantification of macroautophagy markers, p62, beclin-1, LC3II levels and LC3 II/LC3 I ratio in control (n=8) and NCM treated with 2 and 5  $\mu\text{mol/L}$  of GA during 17 hrs (n=10). **c**: Representative western blots and quantification of LC3 II, beclin-1 and p62 levels in control (n=8) and NCM treated either with MG132 (n=12) or 3MA (n=12) for 18 hrs, and NCM pre-treated with 3MA for 1 hr and then co-treated with 3MA and MG132 for 18 hrs (n=12). Graphs show mean  $\pm$  SEM values expressed in arbitrary units (A.U.). Significant *P* values are indicated on the graphs.



**Supplemental Figure S6. Desmin presents a scaffold defect and accumulates in the failing human hearts.**

**a:** Representative western blots (top panel) and quantification of inactive GSK3 $\beta$  (GSK3 $\beta$  pS9/GSK3 $\beta$  ratio) (bottom left panel) and GSK3 $\beta$  levels (bottom right panel) levels in the heart of non-failing (NF) (n=6) and failing (HF) patients (n=6). **b:** Representative western blots (top panel) and quantification of active CaMKII (CaMKII pT286/CaMKII ratio) (bottom left panel) and CaMKII levels (bottom right panel) in the same samples. The loading control (GAPDH) is indicated on the graphs. Significant *P* values are indicated on the graphs. **c:** Double immunofluorescence staining for desmin (green) with Hsc70 (red) (top panels) and for desmin (red) with CryAB (green) (bottom panels) in frozen myocardial sections from non-failing patients. Scale bar represents 50  $\mu$ m. Nuclei are stained in blue as shown in the merge staining. Arrows indicate colocalization of desmin with Hsc70 or CryAB. **d:** Double immunofluorescence staining for desmin (green) with LAMP2a (red) in frozen myocardial sections from non-failing (NF) (top panels) and failing (HF) (bottom panels) patients. Nuclei are stained in blue as shown in the merge staining. Arrows indicate colocalization of desmin with LAMP2a. Arrows indicate colocalization of desmin with LAMP2a. Scale bar represents 50  $\mu$ m.



## *Annexe 4 :*

### **Oxidative stress in cardiovascular diseases.**

Dubois-Deruy E, Peugnet V, Turkieh A, Pinet F.

*Antioxidants, 2020;9(9)1:15*





1 Review

2 **Oxidative stress in cardiovascular disease**3 **Emilie Dubois-Deruy<sup>1</sup>, Victoriane Peugnet<sup>1</sup>, Annie Turkieh<sup>1</sup> and Florence Pinet<sup>1\*</sup>**4 1 Inserm U1167, Institut Pasteur de Lille, Univ. Lille, 59000 Lille, France; emilie.deruy@pasteur-lille.fr  
5 (E.D.D.); victoriane.peugnet@pasteur-lille.fr (V.P.); [ani.turkieh@pasteur-lille.fr](mailto:ani.turkieh@pasteur-lille.fr) (A.T.);  
6 florence.pinet@pasteur-lille.fr (F.P.).7 \* Correspondence: [florence.pinet@pasteur-lille.fr](mailto:florence.pinet@pasteur-lille.fr); Tel.: (+33(0)320877215

8

9 **Abstract:** A single paragraph of about 200 words maximum.

10 **Reactive oxygen species (ROS) are subcellular messengers in signal transductions pathways. In**  
11 **pathological situations, particularly atherosclerosis or hypertension, the release of ROS exceeds**  
12 **endogenous antioxidant capacity, leading to cell death. At cardiovascular levels, oxidative stress**  
13 **is highly implicated in myocardial infarction, ischemia/reperfusion or heart failure. In this**  
14 **review, we will first detail the physiological role of low ROS production in the heart and the**  
15 **vessels. Indeed, ROS are able to regulate multiple cardiovascular functions, such as cell**  
16 **proliferation, migration and death. Second, we will investigate the implication of oxidative**  
17 **stress in cardiovascular diseases. Then, we will focus on ROS produced by NADPH oxidase or**  
18 **during endothelial or mitochondrial dysfunction. Given the importance of oxidative stress at**  
19 **cardiovascular level, antioxidant therapies could be a real benefit. In the last part of this review,**  
20 **we will detail the new therapeutic strategies potentially involved in cardiovascular protection**  
21 **and currently under study.**

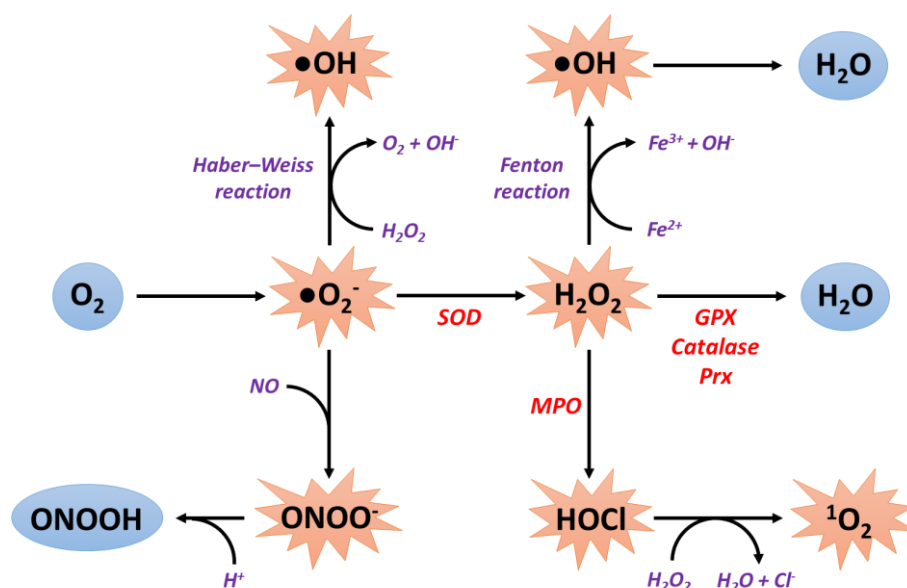
22 **Keywords:** oxidative stress; antioxidant; cardiovascular

23

24 **1. Generalities about reactive oxygen species production**

25 Reactive oxygen species (ROS) have both beneficial as well as deleterious role. Oxidative stress  
26 occurs whenever ROS production is higher than anti-oxidant capacities. ROS are generated as a  
27 by-product of mitochondrial respiration or metabolism or by specific enzymes. Various  
28 environmental factors such as exposure to ultraviolet rays, radiation, smoking or excessive alcohol  
29 consumption promote the production of ROS and contribute to the appearance of numerous  
30 pathologies such as cancer or cardiovascular diseases. At cardiac level, the main sources of ROS are  
31 the mitochondrial electron transport chain, the xanthine oxidase, the NADPH oxidases (NOX) and  
32 the nitric oxide (NO) synthases. Dioxygen (O<sub>2</sub>) is the starting point for the formation of ROS. Indeed,  
33 by capturing an electron, dioxygen causes the formation of superoxide anions (●O<sub>2</sub><sup>-</sup>). These are the  
34 most abundant ROS in cells and are responsible for the formation of all other types of ROS, notably  
35 hydroxyl (●OH) and peroxy (●HO<sub>2</sub>) radicals and other non-radicals species, such as hydrogen  
36 peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) able to form the hydroxyl radical [1] (Figure 1).





37

38

39 **Figure 1.** ROS formation and detoxification.  $^1\text{O}_2$  : singlet oxygen;  $\text{Cl}^-$  : chloride ion;  $\text{Fe}^{2+}$  : iron (II) ion;

40

41  $\text{Fe}^{3+}$  : iron (III) ion ; GPX : glutathione peroxidase ;  $\text{H}^+$  : proton ;  $\text{H}_2\text{O}$  : water ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  : hydrogen

42

peroxyde ;  $\text{HOCl}$  : hypochlorous acid ; MPO : myeloperoxidases ;  $\text{NO}$  : nitri oxyde ;  $\text{O}_2$  : dioxygen ; $\bullet\text{O}_2^-$  : superoxide anion ;  $\bullet\text{OH}$  : hydroxyl radical ;  $\text{ONOO}^-$  : peroxynitrite ;  $\text{ONOOH}$  : peroxynitrous

acid ; Prx : peroxyredoxins ; SOD : superoxide dismutases.

43

44 The superoxide anions can then interact with  $\text{NO}$  to form peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) or to be

45 converted to hydrogen peroxide by the action of superoxide dismutase (SOD) enzymes. Superoxide

46 anions can also interact with hydrogen peroxide according to the Haber-Weiss reaction leading to

47 the production of the hydroxyl radical [2]. Hydrogen peroxide can lead to the production of

48 hydroxyl radicals according to the Fenton reaction in the presence of ferrous ion and to the

49 formation of hypochlorous acid ( $\text{HOCl}$ ) by the action of myeloperoxidases. Finally, hypochlorous50 acid can interact with hydrogen peroxide to form singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ). Finally, hydrogen peroxide is

51 ultimately detoxified in the form of water after the action of the enzymes glutathione peroxidase

52 (GPX), catalase and peroxyredoxins (Prx). Peroxynitrite is detoxified to peroxynitrous acid

(ONOOH) after capture of a proton.

53

54 Several antioxidant defenses protect biological systems from ROS toxicity and include

55 antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase,

56 glutathione-S-transferase and glucose-6-phosphatedehydrogenase) and non-enzymatic antioxidants

57 (bilirubin,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene) [3]. SODs are metalloproteins able to catalyze the

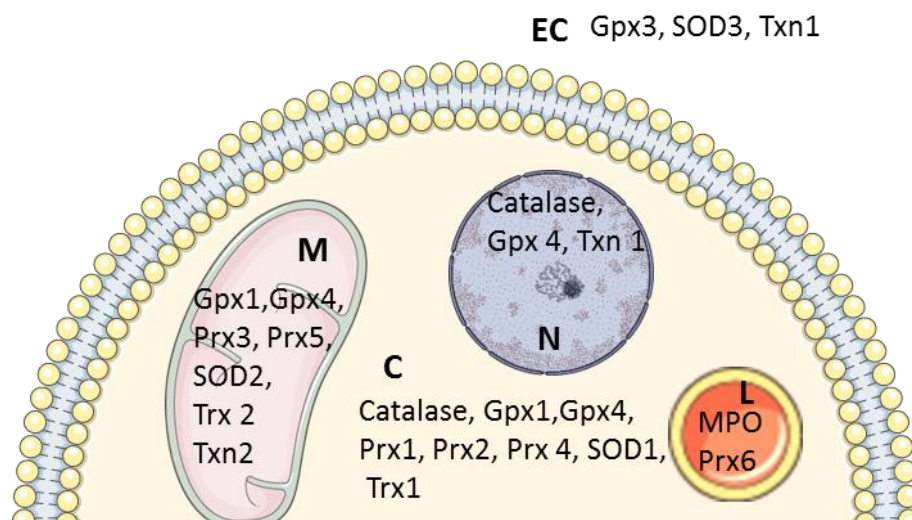
58 transformation of superoxide anions into hydrogen peroxides (Figure 1). It is the most effective

59 antioxidant enzyme in human. Indeed, by detoxifying the superoxide anions, SODs inhibits their

60 reaction with  $\text{NO}$  and prevents the formation of peroxynitrite. Three isoforms of SOD exists with

61 specific sub-cellular localization to be closer to the source of ROS production : cytoslic SOD1,

62 mitochondrial SOD2 and extracellular SOD3 (Figure 2).



63

64

65

66

67

**Figure 2.** Compartmentalization of cardiac anti-oxidant enzymes. EC : Extracellular compartment; M : mitochondria; N : nucleus; L: lysosomes; C: cytosol; GPX : glutathione peroxidase ; SOD : superoxide dismutases; Txn: thioredoxin; Trx: thioredoxine reductase; MPO : myeloperoxidase; Prx : peroxyredoxins.

68

69

70

71

72

Several enzymes are able to detoxify the hydrogen peroxide into water. Among them, catalase has a function that depends on the concentration of hydrogen peroxide: in the case of a high concentration of hydrogen peroxide, the catalytic detoxification activity is the most important whereas in the event of a low concentration of hydrogen peroxide, the peroxidase activity is the majority with the peroxidation of various substrates such as alcohol functions or ascorbic acid [4].

73

## 2. Physiological role of oxidative stress in cardiovascular tissue

74

75

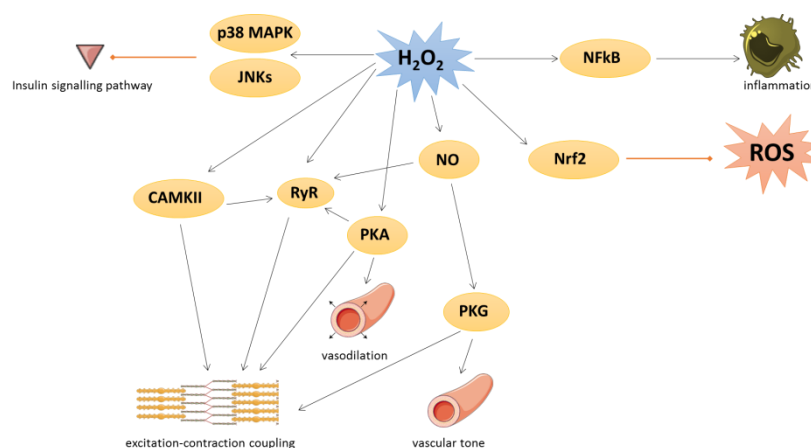
76

77

78

79

Under physiological conditions, the low levels of ROS production is equivalent to their detoxification, that play a major role in cellular signaling and function [5]. This process is called redox signaling and defined as the specific and reversible oxidation/reduction modification of cellular signaling components able to regulate gene expression, excitation-contraction coupling or cell growth, migration, differentiation and death [6,7] (Figure 3).



80

81

82

**Figure 3.** Physiological role of oxidative stress in cardiovascular tissue. Black arrow represents activation and red arrow represents inhibition.

83

84

Several kinases are involved in redox signaling. For instance, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could activate Ca/calmodulin-dependent kinase II (CAMKII) leading to excitation-contraction coupling [7] or p38

85 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and c-Jun N-terminal kinase (JNKs) leading to  
 86 inhibition of insulin signal transduction. cAMP-induced protein kinase A (PKA) is also activate by  
 87 oxidation of its regulatory subunit R1 $\alpha$  and translocate from cytosol to membrane where PKA  
 88 regulates cardiac excitation-contraction coupling in the heart and vasodilation in the vessels [7].

89 Many transcription factors are also regulated by redox-signaling. As an example, the nuclear  
 90 factor-kappa beta (NFkB) is activate when ROS degrade its inhibitor (I $\kappa$ B) and regulates inflammation  
 91 process [8]. The nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) could be induced by lipid  
 92 peroxidation to activated several key antioxidant enzymes containing an antioxidant/electrophile  
 93 response element motif in their promoter such as heme oxygenase 1, glutathione peroxidases, SOD,  
 94 peroxiredoxins, thioredoxins and thioredoxin reductases [9]. In detail, under unstressed conditions,  
 95 Nrf2 is constitutively ubiquitinated by both Kelch-k-like ECH-associated protein 1 (Keap1) and  
 96 Cullin-3 E3 ligase to be degraded [9,10]. The activation of Nrf2 is due to oxidation of Keap1 that  
 97 abrogate its negative control on Nrf2.

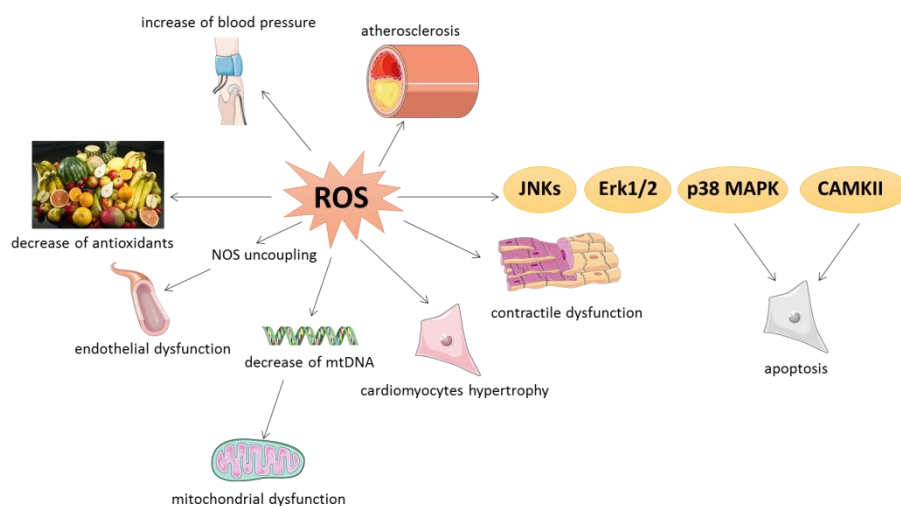
98 NO could exerts its biological effects by binding to soluble guanylate cyclase to produce cyclic  
 99 guanosine monophosphate leading to protein kinase G (PKG) activation [11] or by S-nitrosylation.  
 100 This modification could modulate several protein activity such as pro-caspase 3, myosin heavy chain,  
 101 tropomyosin, peroxiredoxins or ryanodine receptor (RyR). RyR, which mediates Ca<sup>2+</sup> release from  
 102 sarcoplasmic reticulum, is also activate by phosphorylation by PKA and CAMKII, themselves  
 103 redox-regulated [7]. Moreover, PKG is activate by oxidation independently of NO and regulate  
 104 vascular tone and cardiomyocyte contraction or hypertrophy [7].

### 105 3. Pathological implication of oxidative stress in cardiovascular tissue

#### 106 3.1. General aspects

107 In pathological situations, ROS are able to cause oxidative modification of major cellular  
 108 macromolecules (such as lipids, proteins or DNA). These modifications induce modifications in  
 109 subcellular organelles such as sarcolemma, mitochondria, sarcoplasmic reticulum and nucleus. As  
 110 an example, ROS could modulate the contractility by oxidation of sarco/endoplasmic reticulum  
 111 Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA 2A) [12] and contractile proteins such as tropomyosin and actin, leading to  
 112 contractile dysfunction [13] (Figure 4).

113



114

115 **Figure 3.** Pathological roles of oxidative stress in cardiovascular tissue.

116 The toxicity of radical species depends on their half-life (the shorter it is, the more unstable and  
 117 toxic the ROS is) as well as their site of production (the less the ROS diffuse, the more it oxides  
 118 non-specifically surrounding molecules). The toxicity of non-radical ROS depends on their capacity  
 119 to generate radical species. Thus, the hydroxyl radical constitutes the most unstable radical ROS and  
 120 whose toxicity is the strongest [1].

121 At cardiovascular levels, an increase in ROS production has already been described in several  
122 cardiac diseases such as myocardial fibrosis [14], type 2 diabetes [15,16], metabolic syndrome  
123 [17–21], cardiac hypertrophy [22–24], heart failure [25] and myocardial infarction [26,27].

### 124 3.2 Effect NOX-dependent

125 Seven NADPH oxidase (NOX) family members are initially described in neutrophils (NOX  
126 with 1-5 and dual oxidase 1-2) with specific catalytic subunit and partners. Human aortic smooth  
127 muscle cells express NOX1, 4 and 5. NOX2 and 4 are also expressed in several cardiac cell types,  
128 such as cardiomyocytes, fibroblasts, endothelial cells or smooth muscle cells. NOX2 is activated  
129 during cardiovascular stress induced by angiotensin II, endothelin-1, growth factors (e.g.  
130 platelet-derived growth factor (PDGF)), cytokines or mechanical forces whereas NOX2 is  
131 constitutively active but increase with hypoxia, ischemia or pressure-overload [7]. All the vascular  
132 NOX (e.g. NOX1, NOX2, NOX4 and NOX5) are regulate by angiotensin II (AngII) that increase the  
133 blood pressure and NOX-dependent ROS, in turn, activate the angiotensin II receptor type 1 (AT-1)  
134 with an auto amplificatory effect [28]. Furthermore, angII have pro-hypertrophic and pro-fibrotic  
135 effect in cardiac cells, notably by endothelin-1 release [29].

136 Moreover, the level of superoxide anion is highly increase in a rat model of type 2 diabetes and  
137 associated with a decrease of both global SOD and glutathione-peroxidase activities and endothelial,  
138 but not cardiac, dysfunction which could be explained by the fact that NOX constitute the main  
139 source of superoxide anion in vessels [15]. In the other hand, NOX activity is increased in patients  
140 with a metabolic syndrome as well as plasma level of oxidized low density lipoprotein and  
141 nitrotyrosine [17] and a correlation between NOX mRNA expression and the severity of  
142 atherosclerotic lesions has been shown in human coronary arteries [30]. At cardiac level,  
143 NOX-dependent superoxide anion production is increased in left ventricle of guinea pig after 3  
144 weeks of aorta binding leading to activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (erk1/2),  
145 JNKs, and p38 MAPK [22]. Excessive NOXII-derived ROS has been described to activate apoptosis  
146 by ASK-1/p38MAPK and CAMKII proapoptotic pathway after myocardial infarction or angiotensin  
147 II stimulation [31].

### 148 3.3. Endothelial dysfunction

149 Vascular dysfunction, including hypertension and atherosclerosis, are the main risk factors for  
150 stroke, myocardial infarction, and heart failure. Under oxidative stress, ROS are able to mediate  
151 endothelial dysfunction and vascular abnormalities by disrupting the vasoprotective NO signaling  
152 pathway, leading to NO synthase uncoupling. Uncoupled NO synthases switch from NO to  
153 superoxide anion production and peroxynitrite by the association of the two preceding, leading to  
154 reduced bioavailability of NO and vasoconstriction [28].

155 In the other hand, mice submitted to cigarette exposure and low dose of AngII show severe  
156 endothelial dysfunction, particularly regarding the acetylcholine-dependent relaxation, associated  
157 with an inactivation of SOD2 activity [32]. Moreover, heart failure also induces an increase of  
158 superoxide anion produced by NO synthases and NOX in vessels from cardiomyopathic hamsters  
159 [33].

### 160 3.4. Mitochondrial oxidative stress

161 Although different sources contribute to global oxidative stress, the vast majority of cellular  
162 ROS (90%) came from mitochondrial compartment. Indeed, during oxygen consumption, the  
163 transfer of electrons in the electron transfer chain is usually not completed and a small minority  
164 (<1%) of electrons can cause the reduction of dioxygen into superoxide anion. Excessive ROS  
165 production occurs during mitochondrial dysfunction and induces irreversible damage to  
166 mitochondria, becoming significant contributors to the development of cardiovascular disease [34].  
167 For example, an increase in mitochondrial ROS production has been described in a murine model of  
168 myocardial infarction induced by 4 weeks of coronary ligation [26]. In this model, hydroxyl radicals

169 from mitochondria is increased, inducing a significant decrease of mitochondrial DNA (mtDNA) as  
170 well as a significant decrease of mtDNA-encoded gene transcripts for respiratory complex I, III and  
171 IV [26]. Indeed, mitochondria are also a main target of ROS, in particular mtDNA which is highly  
172 sensitive to oxidative damages notably due to its low repair capacity and the proximity with the  
173 electron transfer chain [35]. In the other hand, ROS-generated by AngII stimulation induce  
174 mitochondrial dysfunction, mtDNA lesions, cardiomyocytes hypertrophy, cardiac fibrosis and heart  
175 failure [24]. Mitochondrial ROS also oxidize proteins from complex I and II of electron transfer chain  
176 leading to a decrease of mitochondrial respiration. For example, dysfunctions of the various  
177 complexes of the mitochondrial respiratory chain are also observed in the non-infarcted zone of the  
178 myocardium in *in vivo* models of myocardial infarction, associated with a decrease of mitochondrial  
179 respiration [36]. These disruptions to the mitochondrial respiratory chain are associated with  
180 increased oxidative stress and ROS production, leading to the activation of many protein kinases  
181 and transcription factors involved in hypertrophic signaling [37].

182 Mitochondrial ROS production is also involved in many diabetes-related cardiovascular  
183 complications. Indeed, metabolic syndrome, characterized by diabetes and obesity, is associated  
184 with left ventricular hypertrophy and metabolic and diastolic dysfunction [19,21]. For example, mice  
185 fed with high-fat high sucrose diet develop mitochondrial oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production),  
186 mitochondrial dysfunction (decreased ATP synthesis, complex II activity and mitochondrial  
187 respiration) and cardiac hypertrophy (increased wall thickness) [18,19]. Moreover, an increase in  
188 mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production is also observed in atria from diabetic patients [16]. The level of  
189 oxidative stress as well as apoptosis is also increased in right atrial cardiomyocytes obtained from  
190 obese patients [20].

191 In the other hand, an increase in mitochondrial superoxide anion production during  
192 cardiomyocytes hypertrophy induced by isoproterenol [23] or AngII [24] has already been  
193 described. We also observed that inhibition of SOD2 expression induced both mitochondrial  
194 oxidative stress and cardiomyocytes hypertrophy [23]. Moreover, mice deficient in SOD2 die of  
195 cardiomyopathy within 10 days of birth whereas the heterozygous SOD2(+/-) mice show  
196 ultrastructural damage of the myocard and the mitochondria, associated to an increased oxidative  
197 stress (nitrotyrosine formation and lipid peroxidation) as well as an activation of apoptotic signaling  
198 pathways in the heart [38].

#### 199 4. New therapeutic strategy

200 Since it has been established that oxidative stress plays an important role in cardiovascular  
201 pathology, several studies have been conducted to investigate the therapeutic effects of antioxidant  
202 therapy. If many studies showed a protective effect in animal models, large clinical trials failed until  
203 now to show any benefits.

##### 204 4.1. Vitamins

205 Therapeutic potential of several vitamins have been tested. Indeed, vitamins, notably vitamin C  
206 or folic acid, could prevent NO synthases uncoupling and inhibit endothelial dysfunction leading to  
207 cardioprotection [39]. Some beneficial have been observed in experimental model. For example,  
208 vitamin D improved cardiac oxidative stress and inflammatory markers in obese rats [40].

209 Unfortunately, most of the clinical study failed to show a beneficial at cardiovascular level  
210 [39,41] or even reported an increased incidence of chronic congestive heart failure in human [42].  
211 These negative effects could be explained notably by the absence of site-specificity of these  
212 molecules regarding the source of ROS production (mitochondria as example). Another explanation  
213 could be the reactivity: for example the reaction between vitamin C and superoxide anion is 10 000  
214 lower than between superoxide anion and NO (leading to peroxynitrite), requiring an important  
215 dose to be efficient not compatible with oral administration [39,43].

##### 216 4.2. Polyphenols

217 An important number of mechanistic studies have demonstrated that polyphenols possess  
218 antioxidant or anti-inflammatory properties associated with cardioprotection [44]. For example,  
219 dietary supplementation of red wine polyphenol extract reduced cholesterol and improved glucose  
220 metabolism, cardiac performance and endothelial dysfunction in Zucker fatty (ZF) rats [45].  
221 Polyphenols, such as resveratrol, also induces the expression of antioxidative enzymes and their  
222 substrates, thereby contributing to the overall reduction in oxidative stress [46]. Despite these  
223 promising data; the human clinical studies available so far have shown controversial results  
224 concerning the protective effects of resveratrol, against cardiovascular diseases [47].

#### 225 4.3. Mitochondrial-targeted antioxidant

226 An interesting and promising strategy could be to target mitochondria, the most important  
227 compartment involved in ROS production and several strategies targeting mitochondria, such as  
228 small molecules and mitochondria targeting peptides and antioxidants have been tested in  
229 preclinical and clinical studies in cardiovascular disease [48,49]. To this end, mitoTEMPO, a  
230 mitochondria-targeted superoxide dismutase mimetic, was developed in 2010 [50]. *In vitro*,  
231 mitoTEMPO decrease the mitochondrial superoxide anion and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production induced by AngII  
232 in human aortic endothelial cells [50] or adult mice cardiomyocytes treated with high glucose [51].  
233 Several studies analyze the *in vivo* effect of mitoTEMPO. For example, treatment of mice with  
234 mitoTEMPO reduce hypertension induced by both AngII or DOCA-salt [50], reduce the  
235 mitochondrial superoxide anion and 3-nitrotyrosine, the serum glucose level and the diastolic  
236 dysfunction observed in high-fat diet mice [19], decrease the mitochondrial ROS production and  
237 prevents cardiomyocytes hypertrophy in diabetic mouse hearts [51].

238 In the other hand, mitoquinone, which comprises an exogenous ubiquinone attached to a  
239 triphenylphosphonium lipophilic cation, was developed in 2001 [52] and have been demonstrated to  
240 effectively improve mitochondrial function and attenuate redox-related cardiomyopathies [21,53].  
241 Moreover, some studies, notably in cancer cells, described that mitoquinone could also lead to ROS  
242 production, rapid membrane depolarization and apoptotic cell death [54–56]. Numerous  
243 randomized studies are currently in progress to evaluate the effects of dietary supplementation with  
244 mitoquinone in several conditions, including diastolic dysfunction (NCT03586414), peripheral  
245 arterial disease (NCT03506633) or chronic kidney disease (NCT02364648) [57] and the impact of  
246 mitoquinone supplementation in patients remains to be determined.

## 247 5. Conclusions

248 Increased oxidative stress is one of the potential common etiologies in various cardiovascular  
249 diseases. These diseases are very complex in their pathogenesis, and no single mechanism explains  
250 their physiopathology. Thus, not surprisingly, many clinical trials investigating antioxidants have  
251 been negative whereas improving mitochondrial functionality by using mitochondria-targeted  
252 therapeutics might be an important strategy to enhance the effectiveness of non-pharmacological  
253 therapies, such as exercise. Exercise is a well-known and very effective intervention, improving  
254 cardiac mitochondrial metabolism in both health and disease. These results should encourage  
255 scientists to continue their research in the field of oxidative stress and antioxidants.

256 **Fundings:** EDD was supported by grants from region Hauts de France, CPER “Longévité” of Institut Pasteur de  
257 Lille and “Fondation Lefoulon Delalande”.

258 **Conflicts of Interest:** “The authors declare no conflict of interest.”

## 259 References

- 260 1. Zorov, D.B.; Juhaszova, M.; Sollott, S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced  
261 ROS release. *Physiol. Rev.* 2014, *94*, 909–950.
- 262 2. Tsutsui, H.; Kinugawa, S.; Matsushima, S. Oxidative stress and heart failure. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ.*

- 263            *Physiol.* **2011**, *301*, 2181–2190.
- 264    3.    Liguori, I.; Russo, G.; Curcio, F.; Bulli, G.; Aran, L.; Della-Morte, D.; Gargiulo, G.; Testa, G.; Cacciatore,  
265    F.; Bonaduce, D.; et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging* **2018**, *13*, 757–772.
- 266    4.    Sepasi Tehrani, H.; Moosavi-Movahedi, A.A. Catalase and its mysteries. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2018**,  
267    *140*, 5–12.
- 268    5.    Tsutsui, H.; Kinugawa, S.; Matsushima, S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in  
269    myocardial remodelling. *Cardiovasc. Res.* **2008**, *81*, 449–456.
- 270    6.    Sack, M.N.; Fyhrquist, F.Y.; Saijonmaa, O.J.; Fuster, V.; Kovacic, J.C. Basic Biology of Oxidative Stress  
271    and the Cardiovascular System: Part 1 of a 3-Part Series. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *70*, 196–211.
- 272    7.    Burgoyne, J.R.; Mongue-Din, H.; Eaton, P.; Shah, A.M. Redox signaling in cardiac physiology and  
273    pathology. *Circ. Res.* **2012**, *111*, 1091–1106.
- 274    8.    Moris, D.; Spartalis, M.; Tzatzaki, E.; Spartalis, E.; Karachaliou, G.S.; Triantafyllis, A.S.; Karaolani, G.I.;  
275    Tsilimigras, D.I.; Theocharis, S. The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and  
276    regulation. *Ann. Transl. Med.* **2017**, *5*.
- 277    9.    Lismont, C.; Revenco, I.; Fransen, M. Peroxisomal hydrogen peroxide metabolism and signaling in  
278    health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*.
- 279    10.   Kasai, S.; Shimizu, S.; Tataru, Y.; Mimura, J.; Itoh, K. Regulation of Nrf2 by mitochondrial reactive  
280    oxygen species in physiology and pathology. *Biomolecules* **2020**, *10*.
- 281    11.   Hammond, J.; Balligand, J.L. Nitric oxide synthase and cyclic GMP signaling in cardiac myocytes: From  
282    contractility to remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2012**, *52*, 330–340.
- 283    12.   Lancel, S.; Qin, F.; Lennon, S.L.; Zhang, J.; Tong, X.; Mazzini, M.J.; Kang, Y.J.; Siwik, D.A.; Cohen, R.A.;  
284    Colucci, W.S. Oxidative posttranslational modifications mediate decreased SERCA activity and  
285    myocyte dysfunction in Galphaq-overexpressing mice. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 228–32.
- 286    13.   Steinberg, S.F. Oxidative stress and sarcomeric proteins. *Circ. Res.* **2013**, *112*, 393–405.
- 287    14.   Hermida, N.; Michel, L.; Esfahani, H.; Dubois-Deruy, E.; Hammond, J.; Bouzin, C.; Markl, A.; Colin, H.;  
288    Van Steenberghe, A.; De Meester, C.; et al. Cardiac myocyte  $\beta$ 3-adrenergic receptors prevent  
289    myocardial fibrosis by modulating oxidant stress-dependent paracrine signaling. *Eur. Heart J.* **2018**, *39*,  
290    888–897.
- 291    15.   Serpillon, S.; Floyd, B.C.; Gupte, R.S.; George, S.; Kozicky, M.; Neito, V.; Recchia, F.; Stanley, W.; Wolin,  
292    M.S.; Gupte, S.A. Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in  
293    genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction.  
294    The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*  
295    **2009**, *297*, H153.

- 296 16. Anderson, E.J.; Kypson, A.P.; Rodriguez, E.; Anderson, C.A.; Lehr, E.J.; Neuffer, P.D. Substrate-Specific  
297 Derangements in Mitochondrial Metabolism and Redox Balance in the Atrium of the Type 2 Diabetic  
298 Human Heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2009**, *54*, 1891–1898.
- 299 17. Fortuño, A.; San José, G.; Moreno, M.U.; Belouqui, O.; Díez, J.; Zalba, G. Phagocytic NADPH oxidase  
300 overactivity underlies oxidative stress in metabolic syndrome. *Diabetes* **2006**, *55*, 209–215.
- 301 18. Sverdlov, A.L.; Elezaby, A.; Qin, F.; Behring, J.B.; Luptak, I.; Calamaras, T.D.; Siwik, D.A.; Miller, E.J.;  
302 Liesa, M.; Shirihai, O.S.; et al. Mitochondrial reactive oxygen species mediate cardiac structural,  
303 functional, and mitochondrial consequences of diet-induced metabolic heart disease. *J. Am. Heart Assoc.*  
304 **2016**, *5*.
- 305 19. Jeong, E.M.; Chung, J.; Liu, H.; Go, Y.; Gladstein, S.; Farzaneh-Far, A.; Lewandowski, E.D.; Dudley, S.C.  
306 Role of Mitochondrial Oxidative Stress in Glucose Tolerance, Insulin Resistance, and Cardiac Diastolic  
307 Dysfunction. *J. Am. Heart Assoc.* **2016**, *5*.
- 308 20. Niemann, B.; Chen, Y.; Teschner, M.; Li, L.; Silber, R.E.; Rohrbach, S. Obesity induces signs of premature  
309 cardiac aging in younger patients: The role of mitochondria. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2011**, *57*, 577–585.
- 310 21. Jiménez-González, S.; Marín-Royo, G.; Jurado-López, R.; Bartolomé, M.V.; Romero-Miranda, A.;  
311 Luaces, M.; Islas, F.; Nieto, M.L.; Martínez-Martínez, E.; Cachafeiro, V. The Crosstalk between Cardiac  
312 Lipotoxicity and Mitochondrial Oxidative Stress in the Cardiac Alterations in Diet-Induced Obesity in  
313 Rats. *Cells* **2020**, *9*, 451.
- 314 22. Li, J.M.; Gall, N.P.; Grieve, D.J.; Chen, M.; Shah, A.M. Activation of NADPH oxidase during  
315 progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension* **2002**, *40*, 477–484.
- 316 23. Dubois-Deruy, E.; Cuvelliez, M.; Fiedler, J.; Charrier, H.; Mulder, P.; Hebbbar, E.; Pfanne, A.; Beseme, O.;  
317 Chwastyniak, M.; Amouyel, P.; et al. MicroRNAs regulating superoxide dismutase 2 are new  
318 circulating biomarkers of heart failure. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–10.
- 319 24. Dai, D.F.; Johnson, S.C.; Villarin, J.J.; Chin, M.T.; Nieves-Cintrón, M.; Chen, T.; Marcinek, D.J.; Dorn,  
320 G.W.; Kang, Y.J.; Prolla, T.A.; et al. Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced  
321 cardiac hypertrophy and *gaq* overexpression-induced heart failure. *Circ. Res.* **2011**, *108*, 837–846.
- 322 25. Dai, D.F.; Hsieh, E.J.; Liu, Y.; Chen, T.; Beyer, R.P.; Chin, M.T.; MacCoss, M.J.; Rabinovitch, P.S.  
323 Mitochondrial proteome remodelling in pressure overload-induced heart failure: The role of  
324 mitochondrial oxidative stress. *Cardiovasc. Res.* **2012**, *93*, 79–88.
- 325 26. Ide, T.; Tsutsui, H.; Hayashidani, S.; Kang, D.; Suematsu, N.; Nakamura, K.I.; Utsumi, H.; Hamasaki, N.;  
326 Takeshita, A. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing  
327 hearts after myocardial infarction. *Circ. Res.* **2001**, *88*, 529–535.
- 328 27. Merabet, N.; Bellien, J.; Glevarec, E.; Nicol, L.; Lucas, D.; Remy-Jouet, I.; Bounoure, F.; Dreano, Y.;  
329 Thuillez, C.; Mulder, P. Soluble epoxide hydrolase inhibition improves myocardial perfusion and  
330 function in experimental heart failure. **2011**.



- 331 28. Santillo, M.; Colantuoni, A.; Mondola, P.; Guida, B.; Damiano, S. NOX signaling in molecular  
332 cardiovascular mechanisms involved in the blood pressure homeostasis. *Front. Physiol.* **2015**, *6*, 194.
- 333 29. Weng, X.; Yu, L.; Liang, P.; Li, L.; Dai, X.; Zhou, B.; Wu, X.; Xu, H.; Fang, M.; Chen, Q.; et al. A crosstalk  
334 between chromatin remodeling and histone H3K4 methyltransferase complexes in endothelial cells  
335 regulates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2015**, *82*, 48–58.
- 336 30. Sorescu, D.; Weiss, D.; Lassègue, B.; Clempus, R.E.; Szöcs, K.; Sorescu, G.P.; Valppu, L.; Quinn, M.T.;  
337 Lambeth, J.D.; Vega, J.D.; et al. Superoxide production and expression of Nox family proteins in human  
338 atherosclerosis. *Circulation* **2002**, *105*, 1429–1435.
- 339 31. Erickson, J.R.; Joiner, M. ling A.; Guan, X.; Kutschke, W.; Yang, J.; Oddis, C. V.; Bartlett, R.K.; Lowe, J.S.;  
340 O'Donnell, S.E.; Aykin-Burns, N.; et al. A Dynamic Pathway for Calcium-Independent Activation of  
341 CaMKII by Methionine Oxidation. *Cell* **2008**, *133*, 462–474.
- 342 32. Dikalov, S.; Itani, H.; Richmond, B.; Vergeade, A.; Jamsheer Rahman, S.M.; Boutaud, O.; Blackwell, T.;  
343 Massion, P.P.; Harrison, D.G.; Dikalova, A. Tobacco smoking induces cardiovascular mitochondrial  
344 oxidative stress, promotes endothelial dysfunction, and enhances hypertension. *Am. J. Physiol. - Hear.*  
345 *Circ. Physiol.* **2019**, *316*, H639–H646.
- 346 33. Mollnau, H.; Oelze, M.; August, M.; Wendt, M.; Daiber, A.; Schulz, E.; Baldus, S.; Kleschyov, A.L.;  
347 Materne, A.; Wenzel, P.; et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in an  
348 experimental model of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25*,  
349 2554–2559.
- 350 34. Bhatti, J.S.; Bhatti, G.K.; Reddy, P.H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic  
351 disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta - Mol.*  
352 *Basis Dis.* **2017**, *1863*, 1066–1077.
- 353 35. Niemann, B.; Rohrbach, S.; Miller, M.R.; Newby, D.E.; Fuster, V.; Kovacic, J.C. Oxidative Stress and  
354 Cardiovascular Risk: Obesity, Diabetes, Smoking, and Pollution: Part 3 of a 3-Part Series. *J. Am. Coll.*  
355 *Cardiol.* **2017**, *70*, 230–251.
- 356 36. Bugger, H.; Pfeil, K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochim.*  
357 *Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2020**, *1866*.
- 358 37. Rababa'h, A.M.; Guillory, A.N.; Mustafa, R.; Hijjawi, T. Oxidative Stress and Cardiac Remodeling: An  
359 Updated Edge. *Curr. Cardiol. Rev.* **2018**, *14*, 53–59.
- 360 38. Strassburger, M.; Bloch, W.; Sulyok, S.; Schüller, J.; Keist, A.F.; Schmidt, A.; Wenk, J.; Peters, T.;  
361 Wlaschek, M.; Krieg, T.; et al. Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase results in  
362 severe lipid peroxidation and spontaneous apoptosis in murine myocardium in vivo. *Free Radic. Biol.*  
363 *Med.* **2005**, *38*, 1458–1470.
- 364 39. Gori, T.; Münzel, T. Oxidative stress and endothelial dysfunction: Therapeutic implications. *Ann. Med.*  
365 **2011**, *43*, 259–272.

- 366 40. Farhangi, M.A.; Nameni, G.; Hajiluiian, G.; Mesgari-Abbasi, M. Cardiac tissue oxidative stress and  
367 inflammation after vitamin D administrations in high fat- diet induced obese rats. *BMC Cardiovasc.*  
368 *Disord.* **2017**, *17*, 1–7.
- 369 41. Lee, I.M.; Cook, N.R.; Gaziano, J.M.; Gordon, D.; Ridker, P.M.; Manson, J.A.E.; Hennekens, C.H.;  
370 Buring, J.E. Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer. The women’s  
371 health study: A randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.* **2005**, *294*, 56–65.
- 372 42. Lonn, E. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: A  
373 randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.* **2005**, *293*, 1338–1347.
- 374 43. Münzel, T.; Camici, G.G.; Maack, C.; Bonetti, N.R.; Fuster, V.; Kovacic, J.C. Impact of Oxidative Stress  
375 on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *70*, 212–229.
- 376 44. Banez, M.J.; Geluz, M.I.; Chandra, A.; Hamdan, T.; Biswas, O.S.; Bryan, N.S.; Von Schwarz, E.R. A  
377 systemic review on the antioxidant and anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin, and dietary  
378 nitric oxide supplementation on human cardiovascular health. *Nutr. Res.* **2020**, *78*, 11–26.
- 379 45. Agouni, A.; Lagrue-Lak-Hal, A.H.; Mostefai, H.A.; Tesse, A.; Mulder, P.; Rouet, P.; Desmoulin, F.;  
380 Heymes, C.; Martínez, M.C.; Andriantsitohaina, R. Red wine polyphenols prevent metabolic and  
381 cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa). *PLoS One* **2009**, *4*.
- 382 46. Farkhondeh, T.; Folgado, S.L.; Pourbagher-Shahri, A.M.; Ashrafizadeh, M.; Samarghandian, S. The  
383 therapeutic effect of resveratrol: Focusing on the Nrf2 signaling pathway. *Biomed. Pharmacother.* **2020**,  
384 *127*.
- 385 47. Mankowski, R.T.; You, L.; Buford, T.W.; Leeuwenburgh, C.; Manini, T.M.; Schneider, S.; Qiu, P.; Anton,  
386 S.D. Higher dose of resveratrol elevated cardiovascular disease risk biomarker levels in overweight  
387 older adults – A pilot study. *Exp. Gerontol.* **2020**, *131*, 110821.
- 388 48. Sabbah, H.N. Targeting mitochondrial dysfunction in the treatment of heart failure. *Expert Rev.*  
389 *Cardiovasc. Ther.* **2016**, *14*, 1305–1313.
- 390 49. Senoner, T.; Dichtl, W. Oxidative stress in cardiovascular diseases: Still a therapeutic target? *Nutrients*  
391 **2019**, *11*.
- 392 50. Dikalova, A.E.; Bikineyeva, A.T.; Budzyn, K.; Nazarewicz, R.R.; McCann, L.; Lewis, W.; Harrison, D.G.;  
393 Dikalov, S.I. Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circ. Res.* **2010**, *107*,  
394 106–116.
- 395 51. Ni, R.; Cao, T.; Xiong, S.; Ma, J.; Fan, G.C.; Lacefield, J.C.; Lu, Y.; Tissier, S. Le; Peng, T. Therapeutic  
396 inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic  
397 cardiomyopathy. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *90*, 12–23.
- 398 52. Kelso, G.F.; Porteous, C.M.; Coulter, C. V.; Hughes, G.; Porteous, W.K.; Ledgerwood, E.C.; Smith, R.A.J.;  
399 Murphy, M.P. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells:  
400 Antioxidant and antiapoptotic properties. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 4588–4596.

- 401 53. Kim, S.; Song, J.; Ernst, P.; Latimer, M.N.; Ha, C.M.; Goh, K.Y.; Ma, W.; Rajasekaran, N.S.; Zhang, J.; Liu,  
402 X.; et al. MitoQ regulates redox-related noncoding RNAs to preserve mitochondrial network integrity  
403 in pressure-overload heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2020**, *318*, H682–H695.
- 404 54. Rao, V.A.; Klein, S.R.; Bonar, S.J.; Zielonka, J.; Mizuno, N.; Dickey, J.S.; Keller, P.W.; Joseph, J.;  
405 Kalyanaraman, B.; Shacter, E. The antioxidant transcription factor Nrf2 negatively regulates autophagy  
406 and growth arrest induced by the anticancer redox agent mitoquinone. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*,  
407 34447–34459.
- 408 55. Doughan, A.K.; Dikalov, S.I. Mitochondrial redox cycling of mitoquinone leads to superoxide  
409 production and cellular apoptosis. *Antioxidants Redox Signal.* **2007**, *9*, 1825–1836.
- 410 56. Pokrzywinski, K.L.; Biel, T.G.; Kryndushkin, D.; Rao, V.A. Therapeutic targeting of the mitochondria  
411 initiates excessive superoxide production and mitochondrial depolarization causing decreased mtDNA  
412 integrity. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–22.
- 413 57. Scioli, M.G.; Storti, G.; D’Amico, F.; Rodríguez Guzmán, R.; Centofanti, F.; Doldo, E.; Céspedes  
414 Miranda, E.M.; Orlandi, A. Oxidative Stress and New Pathogenetic Mechanisms in Endothelial  
415 Dysfunction: Potential Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Targets. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1995.
- 416



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## Résumé

De nos jours, les pathologies cardiovasculaires représentent un enjeu de santé publique majeur dans les pays développés. Particulièrement, le remodelage ventriculaire gauche touche 30% des patients suite à un infarctus du myocarde et peut mener à terme à une insuffisance cardiaque. Le remodelage et l'insuffisance cardiaque sont associés au développement d'un stress oxydant, participant aux modifications structurales et fonctionnelles du cœur. L'objectif de ma thèse consistait en l'étude des modifications post-traductionnelle de la protéine anti-oxydante mitochondriale superoxyde dismutase 2 (SOD2), et plus particulièrement de son inactivation par acétylation, dans le contexte des pathologies cardiovasculaires.

J'ai montré que l'inactivation de SOD2 par acétylation de la lysine 68 favorise le stress oxydant et la dysfonction mitochondriale. Parmi les différents isoformes SIRT, la protéine mitochondriale SIRT3 a été identifiée comme responsable de l'activation de SOD2 par désacétylation, tandis que la protéine acetyl transferase P300 serait impliquée dans la régulation transcriptionnelle de SOD2. J'ai également montré que la protéine SIRT3 protège les cardiomyocytes du stress oxydant et de l'hypertrophie induite par stimulation à l'isoprénaline en activant la protéine SOD2. Ces données m'ont permis d'identifier la protéine SOD2 comme cible moléculaire potentielle dans les stratégies thérapeutiques anti-oxydantes.

J'ai donc étudié l'impact des anti-oxydants MitoQuinone (MitoQ, antioxydant mitochondrial) et EUK 134 (mimétique des SOD) sur les cardiomyocytes et montré les effets protecteurs de la MitoQ et du EUK 134 sur le stress oxydant et l'hypertrophie. Cependant, la MitoQ entraîne des dysfonctions mitochondriales et un arrêt de la mitophagie délétères pour les cardiomyocytes, contrairement au EUK 134 qui permet de restaurer la fonction mitochondriale en maintenant l'équilibre de la mitophagie. Ces données mettent en évidence le rôle primordial du métabolisme mitochondrial dans le développement des thérapies anti-oxydantes.

## Abstract

Nowadays, cardiovascular diseases remain a main public health issue in developed countries. Especially, left ventricular remodeling concerns 30% of patients after myocardial infarction and can lead to heart failure. Left ventricular remodeling and heart failure are associated with oxidative stress, contributing to structural and functional modifications of the heart. The aim of my PhD thesis was to study post-translational modifications of the mitochondrial anti-oxidant enzyme superoxide dismutase 2 (SOD2), especially its acetylation that inactivates it, in the pathophysiological context of cardiovascular diseases.

I showed that cardiac SOD2 is inactivated by acetylation on lysine 68, contributing to mitochondrial oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Among SIRT isoforms, the mitochondrial protein SIRT3 was identified as responsible for SOD2 deacetylation and subsequent activation, whereas protein acetyl transferase P300 could be involved in SOD2 transcriptional regulation. I also showed that SIRT3-mediated SOD2 activation protects neonatal cardiomyocytes from isoproterenol-induced oxidative stress and hypertrophy. These data allowed us to identify SOD2 as a potential molecular target in anti-oxidant therapeutic strategies.

I then studied the impact of anti-oxidant molecules MitoQuinone (MitoQ, mitochondrial anti-oxidant) and EUK 134 (SOD mimetic) on cardiomyocytes. I showed that MitoQ and EUK 134 had protective effect on cardiac oxidative stress and hypertrophy. However, MitoQ is associated with mitochondrial dysfunctions and altered mitophagy in cardiomyocytes, contrary to EUK 134 that restore mitochondrial function and maintains mitophagy balance. These data highlight the key role of mitochondrial metabolism in development of anti-oxidant therapeutics.