HAL
open science

Délétion de Tspo chez le rat : caractérisation du phénotype des animaux et effet sur le transport de cholestérol & les fonctions des mitochondries cardiaques

Juliette Bréhat

To cite this version:

Juliette Bréhat. Délétion de Tspo chez le rat : caractérisation du phénotype des animaux et effet sur le transport de cholestérol & les fonctions des mitochondries cardiaques. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ050 . tel-03906053

HAL Id: tel-03906053

https://theses.hal.science/tel-03906053v1

Submitted on 19 Dec 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.

université PARIS-SACLAY

Délétion de *Tspo* chez le rat : caractérisation du phénotype des animaux et effet sur le transport de cholestérol & les fonctions des mitochondries cardiaques

Deletion of Tspo in rats: characterization of animal phenotype and effect on cholesterol transport & functions of cardiac mitochondria

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Sciences pharmacologiques

Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **IMRB (UPEC, INSERM)**

Sous la direction de **M. Didier MORIN**, directeur de recherche CNRS

Thèse soutenue à Créteil, le 28 novembre 2022, par

Juliette BRÉHAT

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Mme Véronique LEBLAIS Professeure, Université Paris-Saclay	Présidente
M. Thierry HAUET Professeur, Université de Poitiers	Rapporteur & Examinateur
M. Jean-Jacques LACAPERE Directeur de recherche CNRS, Sorbonne Université	Rapporteur & Examinateur
M. Jorge BOCZKOWSKI Professeur, Université Paris-Est Créteil	Examinateur
Mme Ghislaine GUILLEMAIN Chargée de recherche INSERM, Sorbonne Université	Examinatrice
M. Mariano OSTUNI Professeur, Université de Paris	Examinateur

THESE DE DOCTORAT

NNT : 2022UPASQ050

université PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique
du fondamental à l'appliqué
(ITFA)

Titre : Délétion de *Tspo* chez le rat : caractérisation du phénotype des animaux et effet sur le transport de cholestérol & les fonctions des mitochondries cardiaques

Mots clés : protéine translocatrice (TSPO), cholestérol, mitochondries

Résumé : Le cholestérol est fondamental pour les cellules eucaryotes et son homéostasie est étroitement régulée. L'hypercholestérolémie est un facteur de risque majeur de l'infarctus du myocarde, qui correspond à la nécrose du myocarde suite à un apport insuffisant en oxygène. La seule option thérapeutique est la restauration de la circulation sanguine mais elle engendre des lésions supplémentaires, dites lésions de reperfusion. Les mitochondries jouent un rôle majeur dans ces lésions qui sont associées à une accumulation massive de cholestérol dans ces organites. Dans les tissus stéroïdogènes, le cholestérol est transporté à la mitochondrie par un complexe multiprotéique spécialisé, composé notamment de la protéine translocatrice (TSPO) et de la protéine de régulation aiguë de la stéroïdogenèse (STAR), dont le rôle dans le myocarde reste à déterminer. Dans ce contexte, des ligands de TSPO ont montré des effets cardioprotecteurs, lié à la préservation des mitochondries. Dans ce travail, nous avons développé une colonie de rats délétés pour *Tspo* et caractérisé leur phénotype, et développé un modèle d'hypoxie-réoxygénation sur des cellules de la lignée AC16. Nous avons ensuite identifié, à l'aide des rats délétés, un mécanisme impliquant TSPO et STAR dans l'accumulation mitochondriale de cholestérol observé lors de la reperfusion d'un myocarde ischémié. Ce mécanisme représente une cible potentielle pour développer des stratégies cardioprotectrices. En revanche, les rats délétés pour *Tspo* ne présentent pas de phénotype altéré, que ce soit au niveau cardiaque, de la stéroïdogenèse et de la biosynthèse de l'hème. La TSPO reste à ce jour une énigme quant à sa fonction.

Title: Deletion of *Tspo* in rats: characterization of animal phenotype and effect on cholesterol transport & functions of cardiac mitochondria

Keywords: Translocator protein, cholesterol, mitochondria

Abstract : Cholesterol is essential for eukaryotic cells and its homeostasis is tightly regulated. Hypercholesterolemia is a major risk factor for myocardial infarction, which corresponds to myocardial necrosis following an insufficient oxygen supply. The only therapeutic option is the restoration of blood circulation but this causes additional lesions, called reperfusion lesions. Mitochondria play a major role in these lesions which are associated with a massive accumulation of cholesterol in these organelles. In steroidogenic tissues, cholesterol is transported to the mitochondria by a specialized multiprotein complex, composed in particular of the translocator protein (TSPO) and steroid acute regulatory protein (STAR), whose role in the myocardium remains to be determined. In this context, TSPO ligands have shown cardioprotective effects, linked to the preservation of mitochondria. In this work, we developed a colony of *Tspo*-deleted rats and characterized their phenotype, and developed a hypoxia-reoxygenation model on cells of the AC16 line. We then identified, using deleted rats, a mechanism involving TSPO and STAR in the mitochondrial accumulation of cholesterol observed during reperfusion of an ischemic myocardium. This mechanism represents a potential target for developing cardioprotective strategies. On the other hand, the rats deleted for *Tspo* do not show an altered phenotype, whether at the cardiac level, steroidogenesis or heme biosynthesis. The TSPO remains to this day an enigma as to its function.

© Lorenzo Mattotti

"Do you ever feel like a plastic bag
drifting through the wind,
wanting to start again?"
Katheryn E. Hudson, 2010

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à **Didier Morin**, qui est un directeur de thèse formidable, de m'avoir fait bénéficier de ses conseils avisés et de m'avoir guidée avec un enthousiasme bienveillant tout au long du M1, du M2 et de la thèse. Merci de votre très grande disponibilité et votre patience sans limite à mon égard malgré les innombrables interrogations et demandes dont je vous ai accablé quotidiennement. Je vous remercie pour votre accompagnement et votre implication tout au long de mon parcours à l'IMRB et pour la suite. Je vous remercie également de la confiance et de la liberté que vous m'avez accordées dans mon projet. Merci pour votre soutien, votre prévenance, votre générosité. Merci pour tout. Merci.

Je remercie chaleureusement **Leeyah Issop** qui s'est impliquée tout au long de ma thèse à la fois d'un point de vue scientifique et personnel. Merci pour ta capacité à me motiver, pour tes critiques constructives qui m'ont permis d'avancer. Merci du temps que tu m'as consacré pour m'aider, m'écouter et me rassurer. C'était un vrai plaisir de travailler sur ton projet, qui m'a donné la chance d'apprendre tant de choses avec toi. Merci d'avoir toujours été positive et combattante, tu as été une source inépuisable de solutions. Merci de t'être si bien occupée de moi.

Je souhaite à tous les doctorants d'avoir la chance d'être entourés de personnes si disponibles, patientes et bienveillantes.

Je remercie les membres du jury : **Thierry Hauet** d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail ; **Jean-Jacques Lacapère** pour son implication dans le suivi de mon projet de thèse et ses nombreux conseils et encouragements ; **Véronique Leblais** qui a accepté de présider le jury de ma thèse ; **Mariano Ostuni** pour son suivi de ce travail ; **Ghislaine Guillemain** pour ses remarques et ses suggestions précieuses et **Jorge Boczkowski** pour son soutien des différentes initiatives du Codopodo et de la CIS, pour sa disponibilité et son écoute.

Je remercie **Bijan Ghaleh**, directeur du laboratoire Pharmacologie et Technologies pour les Maladies Cardiovasculaires (PROTECT), que j'ai intégré pour mes stages de master 1 et 2 et mon doctorat, de m'avoir offert la possibilité de participer à un de ses projets qui a été très enrichissant et pour sa collaboration au projet de thèse. De même, je remercie **Sandrine Pons** pour son implication dans le projet de thèse et l'opportunité qu'elle m'a offerte d'animer des travaux dirigés et pratiques à l'IUT de Créteil.

Je tiens à remercier **Caroline Barau** qui m'a guidée et encouragée dans la mission d'enseignement du poste d'ATER avec une patience infinie. Je remercie **Julien Musman** et particulièrement **Mathieu Panel** qui m'ont formée à mon arrivée au laboratoire, pour le temps qu'ils m'ont consacré et leurs conseils avisés. Je remercie vivement **Sylvie Manin** qui a toujours été disponible pour m'aider et à qui aucun problème ne résiste bien longtemps. Je remercie **Roberta Foresti** et **Roberto Motterlini** pour la gentillesse, la prévenance et les encouragements qu'ils ont eu à mon égard tout au long de mes études à l'IMRB.

Je remercie tous les autres membres de l'équipe PROTECT : **Yara Abi-Zeid-Daou, Juliana Baron, Djamal Eddine Benrahla, Alain Bizé, Emilie Boissady, Paul-Matthieu Chiaroni, Alexandra D'Anglemont de Tassigny, Hubert Dabiré, Jianping Dan, Fatou Dramé, Estelle Faucher, Romain Gallet, Matthias Kolhauer, Cécile Lecointe, Shirin Leick, Adrien Lesage, Fanny Lidouren, Shruti Moran, Laura Rostain, Lucien Sambin, Jin-Bo Su,** et **Renaud Tissier** pour leur accueil, ainsi que les stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer : **Maciej Recko** et **Alexis Nguyen**. Je remercie chaleureusement **Amel Kheyar**, qui fait pratiquement partie de l'équipe, pour son amitié.

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel de l'IMRB, en particulier **Maïté Sansac, Julia Di Donato, Eric Scoazec, Laëtitia Jung, Sophia Balustre, Lila Bendameche, Camille Jajko, Franck Maillochon, Nelly Lebret,** la formidable **Diana Gelperowic, Benjamin Sidhoum, Anthony Ribeiro Da Silva, Lucy Foucher**, **Sylvie Mousky, Marie-Jacqueline Moses, Wilfried Verbecq-Morlot, Christelle Gandolfe** et **Xavier Decrouy.**

Je remercie également tous les occupants du 3ème étage qui ont toujours été disponibles pour m'aider ou bavarder : **Shariq Abid, Delphine Beaulieu, Emmanuelle Born, Thaïs Delmont, Virginie Fourier, Maissa Halfaoui, Amal Houssaini, Hao Liang, Larissa Lipskaia, Elisabeth Marcos, Zaineb Mezdari, Amel Mohamadi, Suzain Naushad-Khan, Anne Pizard, Rachid Souktani, Nora Vienney** et **Yanyan Zhang**.

Je tiens à remercier les membres de la Cellule d'Intégrité Scientifique de l'IMRB (CIS) : **Matthew Borok, Despoina Mademtzoglou**, **Fatima Seddiki**, **Agathe Tarze** et **Corinne Vasseur** pour notre collaboration enrichissante. Je remercie également **Ghislaine Filliatreau** qui nous a beaucoup encouragés et guidés dans nos missions.

Je remercie également les membres du Comité des Doctorants et Post-Doctorants de l'IMRB (Codopodo) : **Allan Thiolat, Margot Morin-Dewaele** et **Cécile Nait-Meddour** pour leur amitié. Je remercie tout particulièrement **Jérôme Gatineau**, pour sa bonne humeur permanente, son aide à toute épreuve et son amitié. Je remercie également **Carole Hénique**, qui nous a accompagnés et encouragés dans nos différentes missions, pour sa gentillesse et sa merveilleuse efficacité. Je tiens à remercier **Shahul Mouhamad** pour son aide précieuse et qui nous a permis d'organiser la journée « Avenir jeunes chercheurs ».

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé à ce travail. Je remercie tout particulièrement **Frank Giton** pour sa collaboration dans ce projet et de m'avoir appris son incroyable technique de prélèvement sanguin. Je remercie **Edouard Reyes Gomez** pour sa collaboration ainsi que **Sophie Lefèvre** et **Hana Manceau** avec qui ce fut un plaisir de travailler. Je remercie également **Alice Tomlinson**, pour le temps qu'elle m'a consacré pour me former.

I thank **Nario Tomishige** and **Toshihide Kobayashi** very much for our collaboration. Thank you for welcoming me to your lab, for the time you kindly took to help me at numerous occasions and for your precious advices. I also thank **Gabor Czibik**, with whom it was a pleasure to work, for his kindness and his unfailing enthusiasm. Thank you for your collaboration and making science fun. Je remercie tout particulièrement **Maria Pini**, pour son amitié, ses conseils avisés et son soutien sans faille tout au long de ma thèse. Merci pour le temps passé ensemble. Je remercie la pétillante **Laura Braud** qui m'est un modèle d'élégance et d'efficacité et une source inépuisable de créativité et d'optimisme. Je remercie tout particulièrement **Gregory Merlen** pour sa disponibilité, son aide, ses encouragements et son soutien.

Je remercie très chaleureusement **Christian** et **Evelyne Clinet** d'avoir posé la première pierre de ce parcours dans lequel j'ai trouvé ma voie. Je remercie mes collègues, **Véronique Ballet**, **Céline Chantoiseau**, **Thierry Carriot**, **Yvan Lopez** et **Jean-Michel Guillon** pour leur soutien et leurs encouragements dans la poursuite de mes études. Je tiens à remercier **Stéphanie Canale**, pour sa bonne humeur et ses encouragements sans faille. Je remercie tout particulièrement **Raphaël Courcoux** et **Azania Abatan** pour les beaux moments passés ensemble et le soutien et la joie qu'ils m'ont apportés.

Je remercie mes amis de toujours **Marie Devillers**, ma complice et confidente, **Etienne Delangre**, **Eléonore Bérenguer** et **Simone Mattotti**, frère d'adoption, pour leur amitié autant dans les moments d'euphorie que de doute, pour leur humour pétillant et leur capacité à retourner les soirées. Merci de mettre des paillettes dans ma vie. Je remercie chaleureusement **Fernanda Diaz** qui a toujours été là pour moi. Je remercie affectueusement les **Lebot**, qui sont pour moi une deuxième famille. Je remercie ma grand-mère, **Maryse**, qui a eu le plaisir de relire ce manuscrit en avant-première pour chasser les dernières fautes d'orthographe.

Je remercie **Emile Torres,** qui fait chanter mon cœur et avec qui j'espère partager le reste des aventures que la vie nous réserve.

Enfin, je remercie ma famille qui m'a entourée et soutenue tout au long de cette thèse (et de ma vie). Mon père **Jean** et ma mère, **Isabelle**, qui ont toujours été disponibles pour m'accompagner au gré de mes besoins et mes sœurs **Brunelle** et **Charlotte** dont je suis si fière et sans qui la vie serait bien nulle. Je leur dédie cette thèse à laquelle ils ont largement contribué.

Fait à Maisons-Alfort, le 11 septembre 2022,

En présence de Moun-Moun, témoin qui n'a pu signer pour n'être qu'un chat.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS ***1***

SOMMAIRE ***5***

LISTE DES ABREVIATIONS ***11***

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES ***16***

INTRODUCTION ***18***

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ***21***

1. LE CHOLESTEROL **21**

1.1. Métabolisme 22

1.1.1. Apports 22

1.1.2. Lipoprotéines & transport sanguin 23

1.1.3. Catabolisme 26

1.1.4. Régulation du métabolisme du cholestérol 26

1.1.5. Régulation pharmacologique du cholestérol 27

1.2. Rôles du cholestérol 28

1.2.1. Structure des membranes 29

1.2.2. Biosynthèse des sels biliaires 30

1.2.3. Biosynthèse des hormones stéroïdes 31

1.2.4. Biosynthèse des oxystérols 34

1.2.5. Biosynthèse d'autres métabolites 36

2. CHOLESTEROL & PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE **38**

2.1. Généralités sur l'infarctus du myocarde 38

2.2. Facteurs de risque & comorbidités de l'infarctus du myocarde 39

2.2.1. Facteurs de risque innés 40

2.2.1.1. Prédispositions 40

2.2.1.2. Sexe 40

2.2.1.3. Vieillissement 42

2.2.2. Facteurs de risque acquis 42

2.2.3. Comorbidités de l'infarctus du myocarde liées aux lipides 43

2.2.3.1. Dyslipidémie 43

2.2.3.2. Diabète de type 2 44

2.2.3.3. Obésité 45

2.3. Implication du cholestérol dans la survenue de l'infarctus du myocarde 45

2.4. Ischémie 46
2.4.1. Altération du métabolisme énergétique 47
2.4.1.1. Arrêt de la phosphorylation oxydative 47
2.4.1.2. Changement métabolique & lipotoxicité 47
2.4.1.3. Acidification du milieu & altération ionique 48
2.5. Reperfusion 48
2.5.1. Lésions de reperfusion 49
2.5.1.1. Paradoxe de l'oxygène 49
2.5.1.2. Paradoxe du calcium 49
2.5.1.3. Paradoxe du pH 50
2.5.1.4. Inflammation 50
2.5.1.5. Lipotoxicité 50
2.5.2. Implication des mitochondries 51
2.6. Stratégies cardioprotectrices 52
2.6.1. Généralités 52
2.6.2. Mitoprotection 53
3. TRANSPORT MITOCHONDRIAL DE CHOLESTEROL 55
3.1. Généralités 55
3.2. Stéroïdogenèse des glandes endocrines 56
3.3. Protéine translocatrice : TSPO 57
3.3.1. Généralités 57
3.3.2. Fonctions 58
3.3.2.1. Stéroïdogenèse & biosynthèse des acides biliaires 58
3.3.2.2. Biosynthèse de l'hème & érythropoïèse 59
3.3.2.3. Stress oxydant mitochondrial 60
3.3.2.4. Inflammation 61
3.3.2.5. Autres 62
3.3.3. Pathologies associées 62
3.3.4. Mutations de TSPO 63
3.3.4.1. Mutations chez l'Homme 63
3.3.4.2. Mutations expérimentales *in vivo* 64
3.3.5. TSPO et cardioprotection 76
OBJECTIFS DE LA THESE 81
MATERIELS & METHODES 82
1. ANIMAUX 82
1.1. Obtention des rats 82
1.2. Génotypage des rats 83

2. CARACTERISATION DE RATS DELETES POUR TSPO 84
2.1. Caractérisation cardiaque 86
2.1.1. Analyse de l'expression génique par RT-qPCR 86
2.1.2. Quantification protéique par Western Blot 87
2.1.2.1. Echantillons 87
2.1.2.2. Dosage protéique 87
2.1.2.3. Immunoblot 87
2.1.3. Échographies cardiaques 89
2.1.4. Sacrifices et prélèvements 89
2.1.5. Fibrose cardiaque 89
2.1.6. Hypertrophie cardiaque 90
2.1.7. Immunohistochimie 90
2.2. Caractérisation du métabolisme glucidique 91
2.2.1. Prise alimentaire 91
2.2.2. Test de tolérance à l'insuline 91
2.2.3. Test de tolérance au glucose 92
2.2.4. Insulinémie à jeun 93
2.2.5. Index HOMA-IR 93
2.3. Caractérisations hématologique et des métabolismes lipidique et hormonal 93
2.3.1. Prélèvements 93
2.3.2. Numération de la formule sanguine 94
2.3.3. Bilan lipidique 94
2.3.4. Dosages des hormones stéroïdes 94
2.3.5. Dosages des stérols 95
2.4. Erythropoïèse de stress 95

3. ETUDE SUR CARDIOMYOCYTES PRIMAIRES ISSUS DE RATS DELETES POUR TSPO 96
3.1. Dissociation de cardiomyocytes primaires 96
3.2. Mesure du stress oxydant par marquages fluorescents 98
3.3. Analyse des lipides par microscopie à fluorescence 99
3.3.1. Gouttelettes lipidiques 100
3.3.2. Cholestérol cellulaire 100
3.3.1. Cholestérol membranaire 100
3.4. Analyse des lipides neutres par chromatographie sur couche mince 101

4. ETUDE SUR MITOCHONDRIES CARDIAQUES ISSUES DE RATS DELETES POUR TPSO 101
4.1. Isolement des mitochondries et des cytosols cardiaques de rats 101

4.2. Mesures des fonctions mitochondriales.....102
4.2.1. Capacité de rétention calcique.....102
4.2.2. Phosphorylation oxydative 103
4.2.3. Production d'espèces réactives de l'oxygène 103
4.3. Analyse des lipides neutres par chromatographie sur couche mince.....106

5. CARDIOMYOCYTES DE LA LIGNEE AC16 106

5.1. Conditions expérimentales.....106
5.2. Mesure de la mortalité cellulaire.....107
5.3. Analyse de l'expression génique par RT-qPCR.....108
5.4. Quantification protéique par Western Blot 108
5.5. Analyse lipidique.....108

6. ANALYSE STATISTIQUE 109

RESULTATS.....110

1. RESULTATS 1 : IDENTIFICATION D'UN MECANISME FAVORISANT L'ACCUMULATION MITOCHONDRIALE DE STEROLS AU COURS DE L'ISCHEMIE-REPERFUSION MYOCARDIQUE : RÔLE DE TSPO ET STAR 110

1.1. Objectif du travail.....110
1.2. Modèles expérimentaux.....110
1.3. Résultats 111
1.3.1. L'inhibition de la biosynthèse du cholestérol diminue son accumulation mitochondriale et protège les mitochondries des lésions de reperfusion cardiaques.....111
1.3.2. L'accumulation mitochondriale de cholestérol à la reperfusion n'est pas liée à un défaut de son catabolisme.....112
1.3.3. L'accumulation mitochondriale de cholestérol à la reperfusion s'accompagne d'une augmentation mitochondriale de STAR 112
1.3.4. L'inhibition de la biosynthèse de cholestérol diminue son accumulation dans les mitochondries cardiaques et l'activation mitochondriale de STAR 112
1.3.5. Le 4'-chlorodiazépam, ligand de TSPO, inhibe l'activation mitochondriale de STAR à la reperfusion 113
1.3.6. La délétion de *Tspo* réduit l'accumulation de stérols à la reperfusion cardiaque sans modifier les fonctions mitochondriales 113
1.3.7. La délétion de *Tspo* annule les effets du 4'-chlorodiazépam sur l'activation mitochondriale de STAR et sur l'accumulation de cholestérol sans modifier la forme cytosolique de STAR.....114
1.4. Résultats complémentaires : caractérisation du modèle de rats délétés pour *Tspo* 115
1.4.1. La délétion de *Tspo* n'altère pas la protéine STAR au niveau cardiaque 115

1.4.2. La délétion de *Tspo* n'altère pas le phénotype cardiaque au cours du vieillissement 115
1.4.3. Effet de la délétion de *Tspo* sur la morphologie au cours du vieillissement....117
1.4.4. La délétion de *Tspo* n'altère pas le métabolisme lipidique au cours du vieillissement 118
1.4.5. La délétion de *Tspo* n'altère pas le métabolisme glucidique au cours du vieillissement 122
1.4.6. Analyse de la diminution du stress oxydant mitochondrial observée chez les rats délétés pour *Tspo* 122
1.4.7. La délétion de *Tspo* n'engendre pas de stress oxydant cytosolique cardiaque....125
1.4.8. La délétion de *Tspo* n'altère pas les paramètres hématologiques au cours du vieillissement 126
1.4.9. Erythropoïèse de stress 126
1.4.10. La délétion de *Tspo* induit une augmentation de la mortalité au cours du vieillissement 128
1.5. Conclusions....129

2. RESULTATS 2 : MISE AU POINT D'UN MODELE CELLULAIRE D'HYPOXIE-REOXYGENATION DE CARDIOMYOCYTES DE LIGNEE 131
2.1. Objectif du travail 131
2.2. Modèles expérimentaux....132
2.3. Résultats 133
2.3.1. Effet de la privation en nutriments sur la viabilité cellulaire 133
2.3.2. Effet de la privation en nutriments sur l'expression de *Tspo* et de *Star*....133
2.3.3. Effet de la privation en nutriments sur le contenu lipidique cellulaire....134
2.3.4. Effet de la privation en oxygène sur la viabilité cellulaire 136
2.4. Conclusions....138

DISCUSSION & CONCLUSION 140

- **Accumulation de cholestérol dans les mitochondries cardiaques et rôle de TSPO et STAR au cours de l'ischémie-reperfusion 140**
- **Caractérisation cardiaque des rats délétés pour *Tspo* au cours du vieillissement 142**
- **Phénotype des rats délétés pour *Tspo* au cours du vieillissement....143**
- **Limites de l'étude du modèle de rats délétés pour *Tspo*....146**
- **Mise au point du modèle d'hypoxie-réoxygénation....147**
- **Conclusion & perspectives....150**

PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS ***152***

BIBLIOGRAPHIE ***154***

LISTE DES ABREVIATIONS

∴

- 3β-HSD : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase
- 5α-EC : Cholestérol-5α,6α-époxide
- 5β-EC : Cholestérol-5β,6β-époxide
- 7-KC : 7-kétocholestérol
- 7α-OHC : 7α-hydroxycholestérol
- 7β-OHC : 7β-hydroxycholestérol
- 11β-HSD1 : 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1
- 19-Atriol : 3,17,19-androsten-5-triol
- 27-OHC : 27-hydroxycholestérol

∴**A**∴

- AA : Antimycine A
- ABC : Transporteur à cassettes liant l'ATP (*ATP binding cassette*)
- ACAT : Acyl co-enzyme A cholestérol acyltransférase
- Acétyl-CoA : Acétyl co-enzyme A
- ACBD3 : Acyl co-enzyme A binding domain containing 3 protein (anciennement appelée PAP7)
- ACTH : Corticotrophine
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADP : Adénosine diphosphate
- ALA : Acide aminolévulinique
- AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
- Amrh2 : Récepteur de type II de l'hormone anti Müllerienne
- ANT : Transporteur d'adénine nucléotide
- ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire et alimentaire (anciennement appelée Afssa)
- AOC : Aire sur courbe (*aera over curve*)
- APAFIS : Autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques
- ARNm : Acide ribonucléique messager
- ATAD3 : ATPase family AAA Domain-containing protein 3
- ATP : Adénosine triphosphate
- AUC : Aire sous courbe (*aera under curve*)

∴**B**∴

- BCA : Acide bicinchoninique (*bicinchoninic acid*)
- BDM : 2,3-butanedione monoxime
- Best1 : Bestrophine 1
- Bodipy™ 493/503 : 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentaméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène

∴ **C** ∴

- Ca^{2+} : Calcium
- $CaCl_2$: Chlorure de calcium
- Camk2a : Protéine kinase 2 alpha dépendante de la calmoduline
- CAT : Carboxyatractyloside
- CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
- CO_2 : Dioxyde de carbone
- CoA : Co-enzyme A
- COMETH : Comité d'éthique de l'UPEC, de l'ENVA et de l'ANSES
- COX-IV : Sous-unité 4 de la cytochrome C oxydase
- CR : Coefficient respiratoire mitochondrial
- CRAC : *Cholesterol Recognition Aminoacid Consensus*
- CRF : Corticolibérine
- Cx3cr1 : Récepteur à l'interleukine-8
- CYP7A1 : 7α-hydroxylase
- CYP11A1 : Cholestérol monooxygénase
- CYP27A1 : 27-hydroxylase
- Cyt C : Cytochrome C

∴ **D** ∴

- DAB : 3,3'-diaminobenzidine
- DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
- DBI : Inhibiteur de liaison au diazépam (*Diazepam Binding Inhibitor* ou ACBD1)
- Ddx4 : Hélicase à ARN dépendante de l'ATP DDX4
- DMEM/F12 : Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12
- DMSO : Diméthyl sulfoxide
- DO : Densité optique

∴ **E** ∴

- e- : Electron
- EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique
- EGTA : Acide éthylèneglycol-tétracétique
- EIM : Espace inter-membranaire mitochondrial
- ELISA : *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*
- ENVA : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

∴ **F** ∴

- FACS : Cytométrie en flux et tri cellulaire activé par fluorescence
- FAD : Flavine adénine dinucléotide
- FC : Fréquence cardiaque
- FR : Fraction de raccourcissement
- FSH : Hormone folliculostimulante

∴ **G** ∴

- GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
- GB : Globule blanc (leucocyte)
- GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
- Gfap : Glial fibrillary acidic protein
- GnRH : Gonadolibérine
- GR : Globule rouge (érythrocyte)
- GSH : Glutathion réduit
- GTT : Test de tolérance au glucose (*Glucose Tolerance Test*)

∴ **H** ∴

- H^+ : Proton
- H_2O_2 : Péroxyde d'hydrogène
- Hb : Hémoglobine
- HCO^{3-} : Ions bicarbonates
- HDL : Lipoprotéine de haute densité
- HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
- Hif1α : Facteur 1-alpha inductible par l'hypoxie (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*)
- HMG-CoA : Hydrocyméthylglutaryl co-enzyme A
- HOMA-IR : Modèle d'homéostasie - évaluation de la résistance à l'insuline (*Homeostasis Model Assessment of Insuline Resistance*)
- HPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
- HRP : (*Horseradish Peroxydase*)
- Ht : Hématocrite
- Hz : Hertz

∴ **I** ∴

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

IMC : Indice de masse corporelle

- IgG : Immunoglobuline G
- IMRB : Institut Mondor de Recherche Biomédicale
- ITT : Test de tolérance à l'insuline (*Insulin Tolerance Test*)
- ITS : Insuline Transferine Selenium

∴ **K** ∴

- KCl : Chlorure de potassium
- kDa : Kilodalton
- $KHCO_3$: Bicarbonate de potassium
- KH_2PO_4 : Phosphate de potassium monobasique

∴ **L** ∴

- LDL : Lipoprotéine de basse densité
- LH : Hormone lutéinisante
- LXR : Récepteurs nucléaires des oxystérols
- LYM : Lymphocyte

∴ **M** ∴

- MAM : Membrane associée aux mitochondries (*Mitochondria-Associated Membrane*)
- Mcat : Mitochondrial malonyl-CoA:ACP acyltransferase
- $MgSO_4$: Sulfate de magnésium
- MME : Membrane mitochondriale externe
- mmHg : Millimètre de mercure
- MMI : Membrane mitochondriale interne
- MMRC : *Mutant Mouse Resource and Research Center*
- MONO : Monocyte
- MTT : Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
- mV : Millivolt

∴ **N** ∴

- N_2 : Azote
- Na : Sodium
- NaCl : Chlorure de sodium
- NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide
- $NaHCO_3$: Bicarbonate de soude
- $NaHPO_4$: Hydrogénophosphate de sodium
- NAPDH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- NEU : Polynucléaire neutrophile
- NFS : Numération formule sanguine
- NO : Monoxyde d'azote
- NPC1L1 : Protéine de Niemann-Pick C 1 like 1
- NPC1 : Protéine Niemann-Pick C de type 1
- NPC2 : Protéine Niemann-Pick C de type 2
- Nr5a1 : Facteur stéroïdogène 1
- ns : non significatif

∴ **O** ∴

- O_2 : Dioxygène
- $O_2^{\bullet -}$: Anion superoxyde
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé

∴ **P** ∴

- P/M : Pyruvate / malate
- pb : Paires de bases
- PBR : Récepteur périphérique aux benzodiazépines (ancien nom de TSPO)
- PBS : *Phosphate-Buffered Saline*
- PCR : Réaction en chaîne par polymérase
- PCSK9 : Proprotéines convertase subtilisin kexin de type 9
- Pct : Plaquettocrite
- PFA : Paraformaldéhyde
- Pgk1 : Phosphoglycerate kinase 1
- pH : Potentiel hydrogène
- PHZ : Phénylhydrazine
- PiC : Transporteur de phosphate mitochondrial
- PKA : Protéinase kinase dépendante de l'AMPc
- PLT : Plaquettes (thrombocytes)
- PPARα : Récepteurs alpha activés par les proliférateurs de péroxysomes
- Prm : Protamine
- PROTECT : Pharmacologie et technologies pour les maladies cardiovasculaires
- PVDF : Difluorure de polyvinylidène

∴ **Q** ∴

- Q : Ubiquinone

∴ **R** ∴

- R : Roténone
- RISK : *Reperfusion Injury Salvage Kinase*
- ROR : *Retinoic acid receptor-related Orphan Rseceptor*
- ROS : Espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)
- Rpm : Rotations par minute
- RT-qPCR : Réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse

∴**S**∴

- SAFE : *Salvage Activating Factor Enhancement*
- SCORE : *Systematic Coronary Risk Estimation*
- SDS : Sodium dodecyl sulfate
- SOD2 : Superoxide dismutase mitochondriale
- SREBP : Protéine de liaison à l'élément de régulation des stérols
- STAR : Protéine de la régulation aiguë de la stéroïdogenèse (Stard1)
- START : Domaine de transfert de lipides apparenté à STAR
- Succ : Succinate
- SVF : Sérum de veau fœtal

∴**T**∴

- TBP : Protéine de liaison à la boîte TATA
- TBS : *Tris-Buffered Saline*
- TBS-T : *Tris-Buffered Saline Tween*
- TCMH : Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
- TLC : Chromatographie sur couche mince (*Thin Layer Chromatography*)
- TSPO : Protéine translocatrice mitochondriale de 18 kDa
- Ttll12 : *Tubulin tyrosine ligase-like family member 12*

∴**U**∴

- u.a. unités arbitraires
- UI : unités internationales
- UPEC : Université Paris Est Créteil
- UV : ultraviolet

∴**V**∴

- V2 : Vitesse de consommation de l'oxygène du stade 2
- V3 : Vitesse de consommation de l'oxygène du stade 3
- VDAC : Canal anionique voltage dépendant
- VGd : Diamètre ventriculaire gauche en diastole
- VGM : Volume globulaire moyen
- VGs : Diamètre ventriculaire gauche en systole
- VLDL : Lipoprotéine de très basse densité
- VPM : Volume plaquettaire moyen

∴**W**∴

- WGA : *Wheat Germ Agglutinine*

∴**Z**∴

- ZFN : Nucléase à doigts de Zinc (*Zinc Fingers Nuclease*)
- ZTU : Unités de temps Zeitgeber (*Zeitgeber Time Units*)

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1 : Structure du cholestérol. 21
Figure 2 : Apports en cholestérol. 22
Figure 3 : Synthèse *de novo* de cholestérol. 23
Figure 4 : Lipoprotéines. 24
Figure 5 : Cycle entéro-hépatique du cholestérol. 25
Figure 6 : Régulation du métabolisme du cholestérol. 27
Figure 7 : Biosynthèse des acides biliaires. 30
Figure 8 : Biosynthèse des hormones stéroïdes. 31
Figure 9 : Synthèse des principaux oxystérols de cette étude. 36
Figure 10 : Métabolisme du cholestérol. 37
Figure 11 : Incidence, prévalence et mortalité des cardiopathies ischémiques dans le monde et en France de 1990 à 2019. 38
Figure 12 : Infarctus du myocarde. 39
Figure 13 : Schéma de l'évolution de l'athérosclérose. 46
Figure 14 : Métabolisme du cholestérol dans la biosynthèse des hormones stéroïdes et des acides biliaires. 56
Figure 15 : Transport mitochondrial du cholestérol dans les tissus stéroïdogènes. 57
Figure 16 : Biosynthèse de l'hème. 60
Figure 17 : Structure de ligands de TSPO et STAR. 80
Figure 18 : Délétion du gène *Tspo*. 82
Figure 19 : Schéma des croisements de la lignée de rats mutés pour *Tspo*. 83
Figure 20 : Protocole expérimental de la caractérisation du modèle de rats. 85
Figure 21 : Test de tolérance à l'insuline. 91
Figure 22 : Test de tolérance au glucose. 92
Figure 23 : Prélèvement de sang intra-jugulaire. 93
Figure 24 : Protocole expérimental de l'érythropoïèse de stress. 95
Figure 25 : Schéma de la perfusion type Langendorff. 97
Figure 26 : Evaluation de la viabilité cellulaire. 98
Figure 27 : Montage du microscope à fluorescence inversée. 99
Figure 28 : Mesure de la capacité de rétention calcique. 102
Figure 29 : Mesure de la respiration mitochondriale. 104
Figure 30 : Mesure de la production mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène. 105
Figure 31 : Conditions expérimentales de la mise au point du modèle d'hypoxie-réoxygénation sur les cardiomyocytes de la lignée AC16. 107

Figure 32 : Effet de la délétion de *Tspo* sur la protéine STAR au niveau cardiaque. 115
Figure 33 : Effet de la délétion de *Tspo* sur le phénotype cardiaque chez des rats âgés. ...116
Figure 34 : Effet de la délétion de *Tspo* sur la fibrose interstitielle cardiaque au cours du vieillissement. 117
Figure 35 : Effet de la délétion de *Tspo* sur le phénotype morphologique. 118
Figure 36 : Effet de la délétion de *Tspo* sur les stérols sériques au cours du vieillissement. 119
Figure 37 : Effet de la délétion de *Tspo* sur la répartition des lipides intracellulaires. 120
Figure 38 : Effet de la délétion de *Tspo* sur le contenu lipidique cellulaire cardiaque.....121
Figure 39 : Effet de la délétion de *Tspo* sur le métabolisme lipidique et glucidique au cours du vieillissement. 123
Figure 40 : Effet de la délétion de *Tspo* sur le stress oxydant mitochondrial.....124
Figure 41 : Effet de la délétion de *Tspo* sur le stress oxydant cytosolique. 125
Figure 42 : Effet de la délétion de *Tspo* sur la réponse à l'injection d'un agent hémolytique. 128
Figure 43 : Effet de la délétion de *Tspo* sur le vieillissement. 129
Figure 44. Comparaison de deux types de cardiomyocytes. 132
Figure 45 : Effet d'une privation en nutriments de 3, 6 et 14 heures sur la viabilité cellulaire. 133
Figure 46 : Effet d'une privation en nutriments de 14 heures sur les protéines TSPO et STAR. 134
Figure 47 : Effet d'une privation en nutriments de 14 heures sur la répartition des lipides intracellulaires. 135
Figure 48 : Effet d'une privation en nutriments de 14 heures sur le contenu lipidique des cellules AC16.....136
Figure 49 : Effet d'une hypoxie de 14 heures sur la viabilité cellulaire et sur l'expression du gène *Hif1α*.....137
Figure 50 : Effet de 24, 48 et 72 heures d'hypoxie sur la viabilité cellulaire et sur l'expression des gènes *Hif1α, Tspo et Star*.....138

Tableau 1 : Programme de PCR pour le génotypage des rats délétés pour *Tspo*.....84
Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés pour la quantification de protéines cardiaques par Western Blot. 88
Tableau 3 : Effet de la délétion de *Tspo* sur les paramètres hématologiques au cours du vieillissement. 127

INTRODUCTION

Le cholestérol est indispensable aux cellules eucaryotes, dans lesquelles il assure de nombreuses fonctions biologiques majeures et sert de précurseur de synthèse à différentes molécules (Moussard 2006). Son métabolisme est étroitement régulé et une altération de son homéostasie, notamment l'hypercholestérolémie, est un facteur de risque pour de nombreuses pathologies (Song *et al.*, 2021). L'hypercholestérolémie peut également être un facteur d'aggravation et s'opposer aux stratégies thérapeutiques développées contre certaines pathologies, comme l'infarctus du myocarde (Ferdinandy *et al.*, 2014). En effet, une augmentation de la cholestérolémie provoque la formation de plaques d'athérome qui représentent le principal facteur de risque de l'infarctus (Glass *et al.*, 2001) mais elle peut aussi avoir des effets délétères sur le myocarde lui-même, en provoquant des altérations structurelles et fonctionnelles des cardiomyocytes. La rupture de ces plaques d'athérome dans une artère coronaire provoque la formation d'un thrombus qui réduit ou arrête l'apport en oxygène et en nutriments aux cellules cardiaques, conduisant à la nécrose du myocarde (Benhabbouche *et al.*, 2011).

Malgré l'amélioration de la prise en charge de cette pathologie qui a permis une forte réduction de la mortalité, l'infarctus reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Actuellement, la seule option thérapeutique consiste à reperméabiliser l'artère coronaire obstruée pour restaurer la circulation sanguine et ainsi reperfuser le myocarde mais cette reperfusion génère des lésions supplémentaires (Hausenloy *et al.*, 2016). Les mitochondries jouent un rôle majeur dans les lésions de reperfusion car elles sont les principaux effecteurs des différentes voies de signalisation mis en œuvre mais sont également leur cible principale (Panel *et al.*, 2017). La reperfusion favorise l'ouverture d'un canal au niveau des membranes mitochondriales appelé « pore de transition de perméabilité mitochondriale ». L'ouverture de ce pore perméabilise la membrane interne et provoque ainsi l'arrêt de la production d'énergie et la libération de facteurs pro-apoptotiques. La perméabilisation des membranes induit le gonflement puis, à terme, la rupture des mitochondries cardiaques (Bernardi *et al.,* 2015). La recherche tente, depuis de nombreuses années, de développer des stratégies cardioprotectrices pour s'opposer à ces lésions et ainsi permettre de préserver la fonction cardiaque en limitant les séquelles qui conduisent à l'insuffisance cardiaque. Malgré de nombreuses études *in vitro*, *in vivo* et cliniques, aucune stratégie cardioprotectrice développée n'a permis d'obtenir des résultats satisfaisants chez l'Homme (Davidson *et al.*, 2019).

Dans ce contexte, l'équipe Pharmacologie et technologies pour les maladies cardiovasculaires (PROTECT) travaille sur des stratégies cardioprotectrices ciblant les dysfonctions mitochondriales intervenant lors de la reperfusion d'un myocarde ischémié et, notamment, l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale. Lorsque le laboratoire a commencé ce projet, la protéine translocatrice de 18 kDa (TSPO), présente au niveau de la membrane mitochondriale externe, était décrite comme un composant du pore de transition de perméabilité mitochondriale (Šileikytė *et al.,* 2011) car ses ligands permettaient d'inhiber son ouverture (Halestrap *et al.,* 1990). Une première étude du laboratoire a démontré les propriétés cardioprotectrices d'un ligand de la TSPO, le 4'-chlorodiazépam, dans un modèle *in vivo* d'ischémie-reperfusion cardiaque. L'administration de ce ligand à la reperfusion permettait de réduire de manière significative la taille de l'infarctus et de préserver la respiration et la perméabilité membranaire des mitochondries (Obame *et al.,* 2007). Une seconde étude a mis en évidence les propriétés cardioprotectrices d'un autre ligand de la TSPO, le TRO40303, qui permettait également de préserver les fonctions mitochondriales après une ischémie-reperfusion expérimentale du myocarde (Schaller *et al.,* 2010). L'implication de la TSPO dans le pore de transition de perméabilité mitochondriale a depuis été invalidée par des modèles expérimentaux de délétion (Šileikytė *et al.,* 2014 ; Thai *et al.,* 2018), ce qui a remis en question le mécanisme par lequel les ligands de TSPO protègent les mitochondries.

La TSPO est une protéine ubiquitaire et bien qu'il n'existe pas de consensus quant à son rôle dans l'organisme, de nombreuses fonctions biologiques lui ont été attribuées, parmi lesquelles la stéroïdogenèse (Papadopoulos *et al.,* 2006). Dans les tissus stéroïdogènes, TSPO fait partie d'un complexe multiprotéique spécialisé dans le transport de cholestérol à la mitochondrie dans laquelle il est métabolisé en prégnénolone, le précurseur de synthèse des hormones stéroïdes (Papadopoulos *et al*., 2015). Ce complexe est constitué de protéines cytosoliques comme la protéine de la régulation aiguë de la stéroïdogenèse (STAR) et de protéines mitochondriales comme le canal anionique voltage dépendant (VDAC) (Rone *et al*., 2012). Dans le cœur, cependant, la présence d'un tel complexe n'a pas été clairement établie.

Le laboratoire a donc étudié les variations du cholestérol mitochondrial lors de l'ischémie-reperfusion cardiaque et a démontré que la reperfusion provoquait une accumulation massive de cholestérol au niveau des mitochondries cardiaques. Ce cholestérol, en présence du stress oxydant généré lors de la reperfusion, est transformé en oxystérols qui sont très toxiques en excès. L'administration des ligands de la TSPO à la reperfusion permet d'abolir l'accumulation mitochondriale de stérols et de protéger les mitochondries cardiaques, ce qui établit une

relation entre l'accumulation de ces stérols et les lésions mitochondriales (Paradis *et al.*, 2013). Par ailleurs, les effets protecteurs mitochondriaux des ligands de la TSPO persistent chez des animaux hypercholestérolémiques, malgré des concentrations mitochondriales basales de stérols significativement augmentées et l'amplification de leur accumulation à la reperfusion (Musman *et al.,* 2017). Des résultats préliminaires du laboratoire montrent une augmentation de la forme mitochondriale de la protéine STAR à la reperfusion, de façon concomitante avec l'accumulation de cholestérol dans les mitochondries (Musman, 2017). Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que l'inhibition de l'accumulation mitochondriale de cholestérol à la reperfusion à l'aide de ligands de la TSPO pourrait expliquer, au moins en partie, leurs effets cardioprotecteurs et constituer une approche intéressante dans le développement de stratégies cardioprotectrices (Morin *et al.*, 2016). En effet, cette approche reste efficace en conditions d'hypercholestérolémie, responsables d'infarctus plus sévères et d'échecs des stratégies thérapeutiques (Andreadou *et al.*, 2017, 2020).

Ce travail de thèse s'inscrit comme une suite logique du projet du laboratoire. Il s'agit, 1) d'étudier le rôle que jouent TSPO et STAR dans l'accumulation de cholestérol dans les mitochondries qui se produit à la reperfusion d'un myocarde ischémié, à l'aide notamment de rats délétés pour *Tspo* pour lesquels nous avons déterminé le phénotype puis, 2) de développer un modèle d'hypoxie-réoxygénation sur des cardiomyocytes de la lignée AC16 afin de pouvoir poursuivre l'étude de ces mécanismes *in vitro* et tester l'effet protecteur de nouveaux ligands de TSPO et de STAR.

Ce manuscrit est divisé en deux parties. La première partie est une synthèse bibliographique analysant les différents aspects du métabolisme du cholestérol, son rôle dans l'infarctus du myocarde et son transport dans la mitochondrie. La seconde partie présente l'ensemble des méthodes utilisées, le travail expérimental, les résultats obtenus et leur discussion.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE CHOLESTEROL

Le cholestérol est une molécule essentielle à la vie cellulaire. La première partie de cette synthèse constitue un rappel du métabolisme du cholestérol ainsi que de ses différentes fonctions au travers de ses métabolites, tout d'abord au niveau de l'organisme, puis plus spécifiquement au niveau cardiaque.

Le cholestérol a été découvert en 1758 par François Poulletier de La Salle dans les calculs biliaires et nommé « cholestérine » (du grec *chole* « bile » et *stereos* « solide ») par Eugène Chevreul en 1814. C'est en 1859 qu'il est rebaptisé « cholestérol » par Marcelin Berthelot à cause de sa fonction alcool (Figure 1). Le cholestérol, molécule de la famille des stéroïdes, est un composant majeur des cellules eucaryotes : il est un élément structural des membranes cellulaires et un précurseur de synthèse de nombreux composés biologiques. En plus de ses multiples fonctions physiologiques, les modifications de son métabolisme sont impliquées dans de nombreuses pathologies. Cette molécule est l'une des plus étudiées et de nombreux prix Nobel ont été attribués à des chercheurs qui lui ont dédié leurs recherches (Bodo 2015).

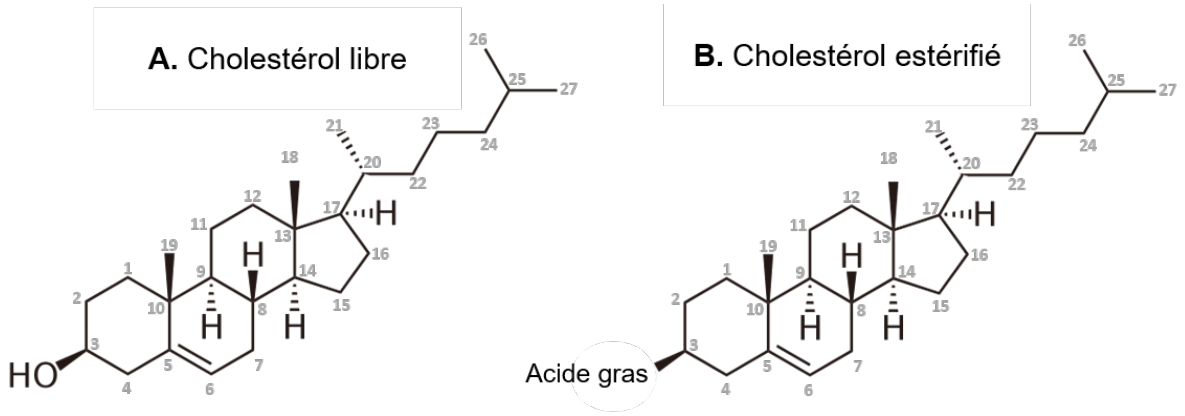


Figure 1 : Structure du cholestérol.
A. Cholestérol libre. Le cholestérol est un stéroïde qui dérive d'un noyau stérane (pentanoperhydrophenanthrène) sur lequel deux groupements méthyle en C10 et C13, une chaîne aliphatique en C17 et une double liaison entre C5 et C6 sont greffés. La fonction alcool (groupement hydroxyle : -OH) en C3 confère au cholestérol une propriété hydrophile : il est légèrement amphiphile.
B. Cholestérol estérifié. Le cholestérol s'estérifie avec un acide gras sur la fonction alcool, ce qui le rend hydrophobe.

Un tiers du cholestérol de l'organisme est issu de l'alimentation, le reste est synthétisé *de novo*. En conditions physiologiques, les apports (endo- et exo-gènes) et l'élimination du cholestérol s'équilibrent. Le cholestérol peut être métabolisé par tous les tissus de l'organisme.

Très hydrophobe, il est transporté dans la circulation sanguine par des complexes protéiques spécialisés : les lipoprotéines. Le cholestérol peut subir des réactions d'estérification ou d'hydrolyse d'esters qui permettent son stockage sous forme de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques et son transport par les lipoprotéines. L'organisme ne peut pas dégrader le cholestérol : il est donc réduit en molécules plus solubles pour être éliminé par la bile (Moussard 2006).

1.1. Métabolisme

1.1.1. Apports

Un tiers de l'apport en cholestérol est issu de l'alimentation, le reste est synthétisé, principalement par le foie (Figure 2) bien que la plupart des tissus puissent aussi en produire (Bloch 1965).

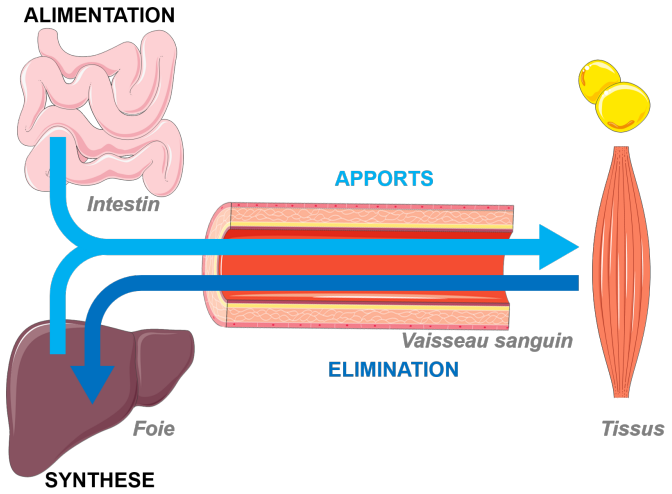


Figure 2 : Apports en cholestérol.
Le cholestérol est issu de l'alimentation et de la synthèse hépatique. Le cholestérol est transporté aux tissus par la circulation sanguine grâce aux lipoprotéines, puis il est éliminé par le foie. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

Dans l'intestin, le cholestérol est sous forme estérifié. L'estérase pancréatique (la Carboxyl Ester Lipase) libère le cholestérol, permettant ainsi aux entérocytes de l'absorber par diffusion simple ou de l'endocyter par des récepteurs Niemann-Pick C 1 like 1 (NPC1L1). Dans les entérocytes, le cholestérol est estérifié par l'acyl co-enzyme A cholestérol acyltransférase (ACAT) et peut être transporté par les lipoprotéines jusqu'aux tissus. Le cholestérol d'origine endogène est synthétisé dans le cytoplasme et le réticulum endoplasmique à partir de l'acétyl co-enzyme A (Acétyl-CoA) issu de la β-oxydation des acides gras (Figure 3).

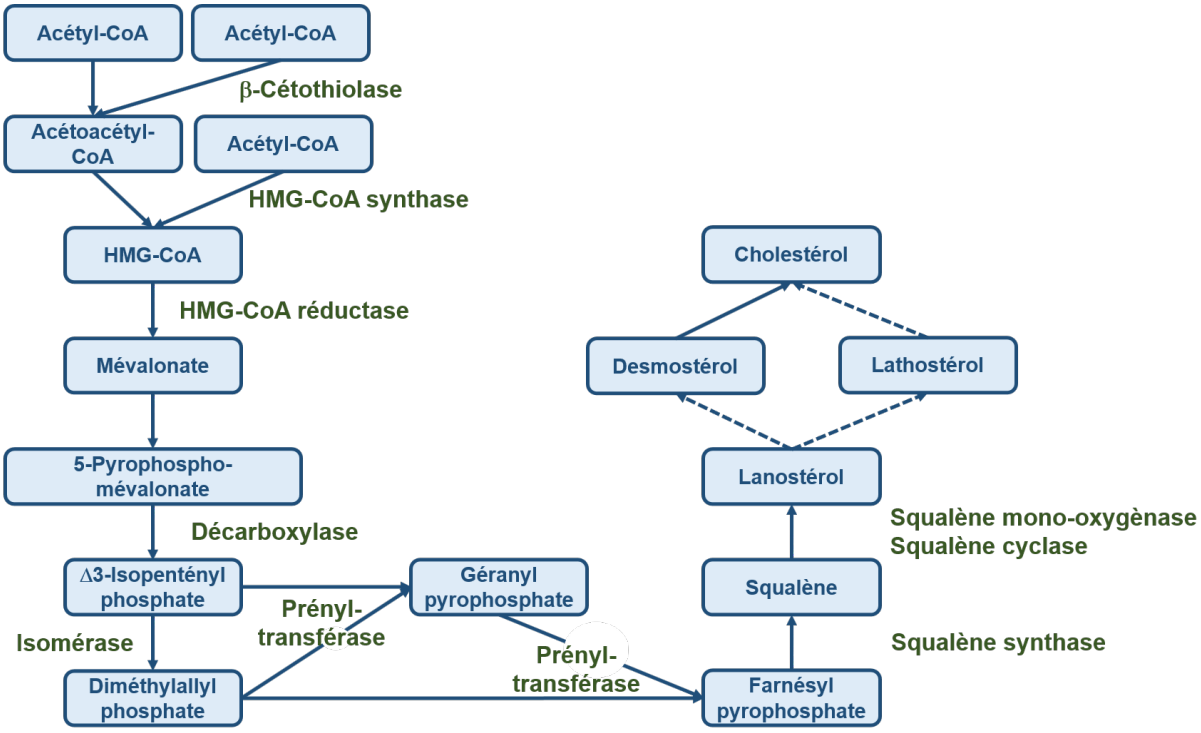


Figure 3 : Synthèse *de novo* de cholestérol.
Les enzymes sont en vert, les substrats et les produits de synthèse sont en bleu. Les flèches pleines représentent une étape directe et les flèches hachées symbolisent une série d'étapes non détaillées. HMG : Hydroxyméthylglutaryl. CoA : co-enzyme A.

1.1.2. Lipoprotéines & transport sanguin

Le cholestérol est une molécule hydrophobe et son transport dans le sang nécessite son association avec des apoprotéines (protéines hépatiques) qui forme des lipoprotéines. Celles-ci assurent le transport du cholestérol jusqu'aux tissus. Les lipoprotéines sont des molécules complexes, constituées d'une partie lipidique et d'une partie protéique. Les lipides (i.e. cholestérol estérifié et triglycérides) forment un cœur hydrophobe, entouré d'une couche de phospholipides, d'apoprotéines et de cholestérol libre, qui confère la nature hydrophile et permet ainsi la solubilité dans le plasma. Les lipoprotéines sont des protéines hépatiques et intestinales ; il en existe différents types en fonction des apoprotéines qui les constituent. Dans les lipoprotéines, le cholestérol (endogène et exogène) est sous forme libre dans la couche externe ou estérifié dans le cœur lipidique (Figure 4A). Les quatre principales lipoprotéines sont : les chylomicrons, les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), les lipoprotéines de basse densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL). La densité des lipoprotéines est déterminée par le rapport entre les lipides (de faible densité) et les protéines (de forte densité) qui les composent (Figure 4B).

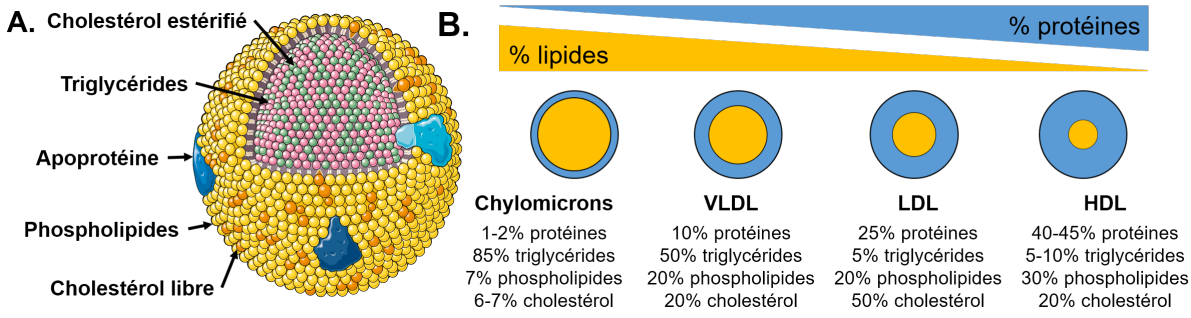


Figure 4 : Lipoprotéines.
A. Les lipoprotéines sont constituées d'une couche hydrophile (partie polaire du cholestérol libre, phospholipides et apoprotéines) et d'un noyau hydrophobe (triglycérides, esters de cholestérol). **B.** Les quatre principales classes de lipoprotéines sont les chylomicrons, les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), les lipoprotéines de basse densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL). Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

Les chylomicrons sont très riches en triglycérides (85%) et sont constitués d'environ 1 à 2% de protéines, de 7% de phospholipides et de 6 à 7% de cholestérol (Figure 4B). Ces lipoprotéines sont présentes dans la circulation sanguine uniquement en période postprandiale, elles sont formées dans les entérocytes et contiennent le cholestérol estérifié. Ce sont les premiers transporteurs des lipides exogènes, elles assurent leur transport depuis l'intestin jusqu'au foie *via* les systèmes lymphatique puis sanguin (Figure 5). Dans les capillaires sanguins, les triglycérides contenus dans les chylomicrons sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase endothéliale. Les acides gras ainsi libérés servent de substrat à la β-oxydation ou sont stockés dans le tissu adipeux. Du glycérol est également libéré, il participe à la néoglucogenèse hépatique. Les chylomicrons sont ensuite métabolisés par les hépatocytes. Les VLDL assurent l'apport d'acides gras libres depuis le foie vers les tissus (principalement les muscles et le tissu adipeux) (Figure 5). Ces lipoprotéines contiennent environ 10% de protéines, 50% de triglycérides, 20% de phospholipides et 20% de cholestérol (Figure 4B). Les VLDL sont métabolisées en LDL à mesure que leurs triglycérides sont hydrolysés en acides gras libres. Les LDL forment une famille de lipoprotéines de densité et de taille variables (plus elles sont petites et denses et plus elles sont athérogènes). Le terme de « mauvais cholestérol » fait référence au pouvoir athérogène de certaines LDL. Les LDL sont constituées de 25% de protéines, 5% de triglycérides, 20% de phospholipides et 50% de cholestérol (Figure 4B). Les LDL assurent le transport de la majorité du cholestérol endogène vers les tissus périphériques : les cellules cibles expriment des récepteurs aux LDL qui leur permettent de les reconnaitre et les endocyter (Figure 5). Ces récepteurs sont régulés par le taux de cholestérol intracellulaire responsable de l'activation ou de l'inhibition de la protéine de liaison à l'élément de régulation des stérols (SREBP), facteur de transcription

qui régule l'expression des récepteurs aux LDL. Les complexes récepteurs-LDL sont pris en charge par des lysosomes où une partie du cholestérol est libéré et acheminé à la membrane et aux organites par les protéines de Niemann-Pick C de type 1 et 2 (NPC1 et NPC2). Les LDL sont éliminées par le foie. Les HDL sont secrétées par le foie, elles dérivent de l'hydrolyse de lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons et VLDL). Les HDL sont composées de 40 à 45% de protéines, 5 à 10% de triglycérides, 30% de phospholipides et 20% de cholestérol (Figure 4B). Les HDL sont libérées par le foie et s'enrichissent en cholestérol à mesure de leur circulation dans le sang. Dans le foie et les cellules stéroïdogènes, le cholestérol cellulaire est catabolisé tandis que dans les autres cellules, il est éliminé par des transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*). Les HDL acceptent le cholestérol libre à la surface des tissus et la lécithine cholestérol acyl transférase l'estérifie. Puis le cholestérol estérifié est stocké dans le noyau lipidique des HDL, laissant ainsi la place à leur surface pour capter de nouveau du cholestérol libre. Ce processus permet de retirer le cholestérol en excès de la circulation sanguine : c'est pourquoi les HDL sont qualifiées communément de « bon cholestérol ». Les HDL sont ensuite reconnues par les hépatocytes, endocytées puis métabolisées et le cholestérol est éliminé par la bile (Figure 5) (Luo *et al.*, 2020 ; Song *et al.*, 2021).

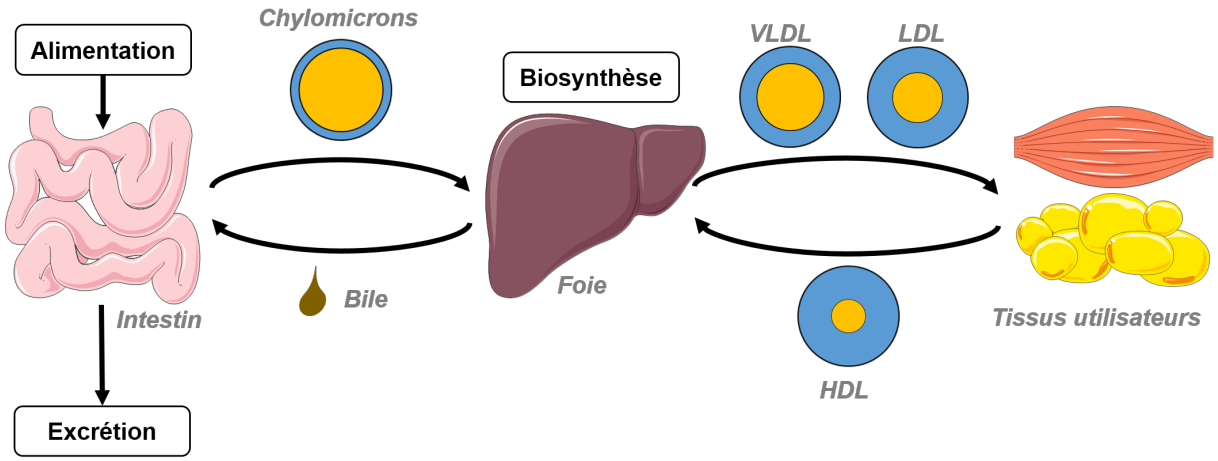


Figure 5 : Cycle entéro-hépatique du cholestérol.
Le cholestérol issu de l'alimentation est transporté jusqu'au foie par les chylomicrons. Le cholestérol (exogène et issu de la synthèse hépatique) est transporté aux tissus par les VLDL et les LDL. Le cholestérol est ensuite rapporté au foie par les HDL pour être transformé en sels biliaires, la bile est déversée dans l'intestin et éliminée par les fèces. Une partie du cholestérol présent dans la bile est réabsorbée par les entérocytes et à nouveau transportée par les chylomicrons jusqu'au foie. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

1.1.3. Catabolisme

L'organisme est capable de synthétiser le noyau stérique du cholestérol mais est incapable de l'éliminer. Le cholestérol est soit éliminé par les fèces après conversion en sels biliaires soit réabsorbé sous forme de stéroïdes neutres au niveau de l'intestin. Ce sont les bactéries intestinales qui forment les sels biliaires secondaires, absorbés par les entérocytes à partir des sels biliaires primaires. Le cholestérol issu de la bile et réabsorbé au niveau intestinal est ensuite transporté au foie par les chylomicrons (Figure 5).

1.1.4. Régulation du métabolisme du cholestérol

La synthèse hépatique de cholestérol est complémentaire à l'apport nutritionnel. Les cellules maintiennent leur homéostasie en équilibrant leur synthèse endogène, leur assimilation et leur élimination du cholestérol. La transformation d'HMG-CoA (Hydroxyméthylglutaryl co-enzyme A) en mévalonate par l'HMG-CoA réductase est l'étape limitante de la synthèse de cholestérol. La régulation du métabolisme du cholestérol à court terme joue sur l'activité de cette enzyme et à long terme sur son expression. La régulation à long terme est également due à l'expression des récepteurs aux LDL et au stockage du cholestérol sous forme de gouttelettes lipidiques, assuré par l'ACAT (Figure 6). Cette régulation est assurée par deux acteurs principaux : la SREBP et les récepteurs nucléaires des oxystérols (LXR). La SREBP régule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol (comme l'HMG-CoA réductase, l'ACAT, ou les récepteurs aux LDL) et est inhibée en présence de fortes quantités de cholestérol intracellulaire. Les LXR servent de détecteurs de cholestérol. Ils sont activés en cas d'excès de cholestérol et induisent l'expression des protéines d'efflux du cholestérol des cellules comme les transporteurs ABC et inhibent l'expression des protéines d'absorption du cholestérol au niveau intestinal (Luo *et al.*, 2020 ; Song *et al.*, 2021).

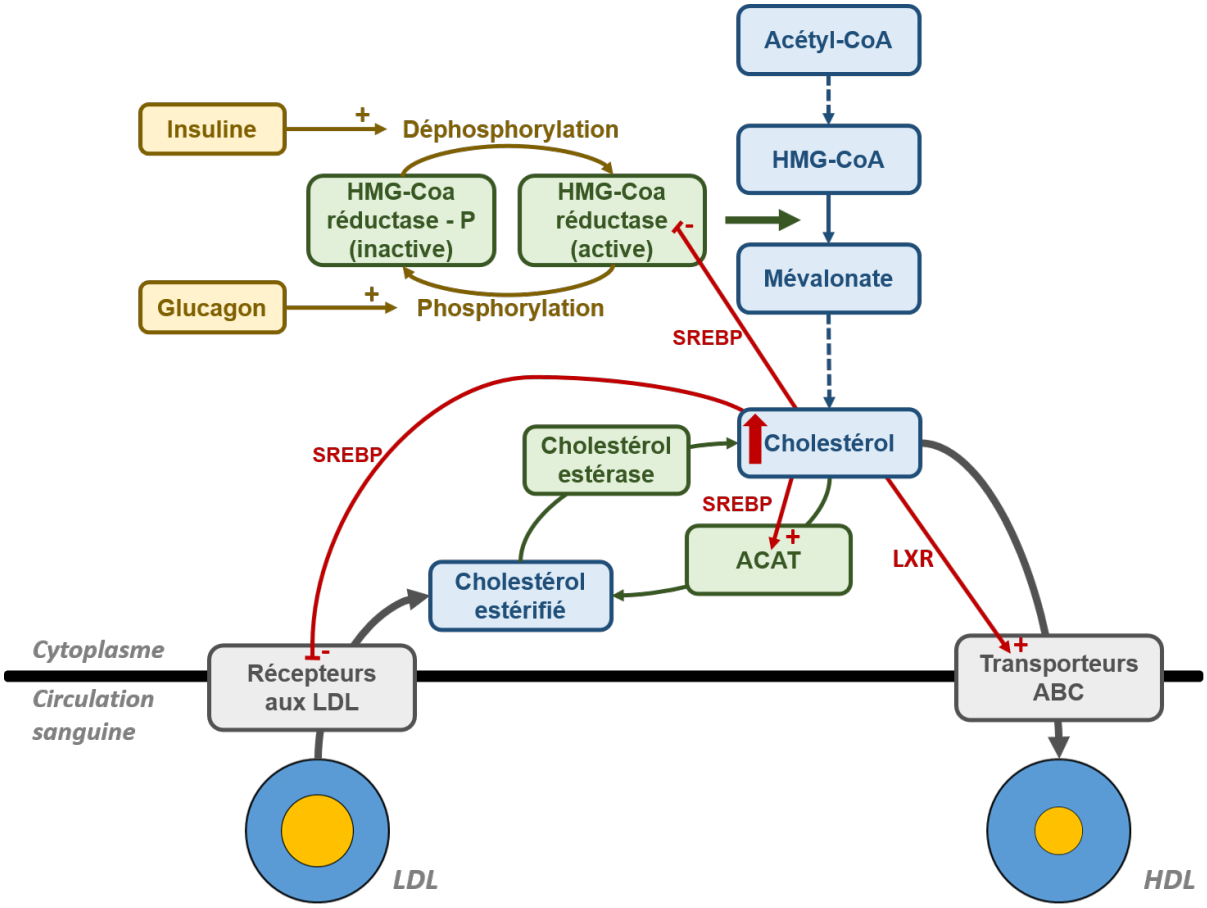


Figure 6 : Régulation du métabolisme du cholestérol.
Le cholestérol est apporté aux cellules par les LDL qui sont endocytées grâce à leurs récepteurs spécifiques. Les esters de cholestérol sont libérés par la cholestérol estérase. Le cholestérol peut à nouveau être estérifié par l'ACAT pour être stocké dans les gouttelettes lipidiques. Il est éliminé par des transporteurs ABC qui le présentent à la surface des cellules afin qu'il soit endocyté par les HDL circulantes. Le taux intracellulaire de cholestérol est le principal acteur de la régulation de son métabolisme. Une augmentation du cholestérol intracellulaire entraîne l'inhibition du facteur de transcription SREBP. Ce dernier induit l'expression des récepteurs aux LDL (influx de cholestérol), de l'HMG-CoA réductase (synthèse *de novo* du cholestérol) et inhibe l'expression de l'ACAT (stockage du cholestérol). En cas d'augmentation du cholestérol intracellulaire, les récepteurs LXR induisent l'expression des transporteurs ABC (efflux de cholestérol). L'activité de l'HMG-CoA est régulée par les hormones pancréatiques impliquées dans le maintien de la glycémie, l'insuline et le glucagon. La première active l'enzyme en la déphosphorylant tandis que la seconde l'inactive en la phosphorylant. Les réactions inverses s'opèrent en cas de réduction du taux intracellulaire de cholestérol. Les flèches pleines symbolisent une étape directe et les flèches hachées représentent une série d'étapes non détaillées. D'après Moussard 2006.

1.1.5. Régulation pharmacologique du cholestérol

L'hypercholestérolémie étant un facteur de risque pour de nombreuses pathologies (l'athérosclérose est la plus largement étudiée, mais également des pathologies osseuses, hormonales, rénales ou hépatiques (Song *et al.*, 2021)), plusieurs thérapies ont été développées pour diminuer le taux de cholestérol sanguin. Celles-ci doivent s'accompagner d'une amélioration du mode de vie, associant un régime alimentaire adapté, une activité

physique suffisante et l'arrêt du tabagisme (Ray *et al.,* 2019). Ces thérapies ciblent différentes étapes du métabolisme du cholestérol. Certaines molécules inhibent l'absorption intestinale du cholestérol en se fixant à un transporteur lipidique de la membrane des entérocytes. La biosynthèse du cholestérol est également la cible de nombreuses molécules. Les statines, par exemple, inhibent l'activité de l'HMG-CoA réductase et certaines molécules inhibent la squalène synthase. D'autres molécules favorisent l'élimination entérale du cholestérol. C'est le cas des résines échangeuses d'ions qui se fixent aux acides biliaires (voir paragraphe 1.2.2, page 30) et entraînent leur élimination du cycle entéro-hépatique en favorisant leur excrétion (Figure 5). Pour pallier cette diminution des acides biliaires, l'organisme en synthétise à nouveau, éliminant ainsi du cholestérol. Il est également possible de cibler le métabolisme des lipoprotéines : les fibrates diminuent les VLDL (composées majoritairement de triglycérides) et les LDL (dont le cholestérol est le principal composant) en se fixant aux PPARα (récepteurs alpha activés par les proliférateurs de péroxysomes) qui modulent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. Le développement des biothérapies a abouti à de nouveaux traitements hypolipémiants, actuellement réservés aux patients atteints d'hypercholestérolémie sévère. Par exemple, la PCSK9 (Proprotéine Convertase Subtilisin Kexin de type 9) se fixe aux récepteurs des LDL au niveau hépatique et induit leur dégradation : des anticorps ont été développés pour inhiber cette protéine et favoriser la captation de LDL par le foie qui permet la dégradation du cholestérol (Béliard-Lasserre 2018 ; Ray *et al.,* 2019).

Ce large panel de thérapies hypocholestérolémiantes souligne le rôle important que joue le cholestérol dans des pathologies en plein essor et le bénéfice thérapeutique majeur qu'apporte la réduction de son taux sanguin.

1.2. Rôles du cholestérol

Le cholestérol est apporté aux cellules *via* les récepteurs aux lipoprotéines (notamment les LDL) et est libéré par la cholestérol estérase cellulaire. Le cholestérol libre est ensuite incorporé aux membranes cellulaires, ou au réticulum endoplasmique, où il induit la séquestration de SREBP, ou bien est utilisé pour la synthèse de biomolécules (Sozen *et al.*, 2018). Par ailleurs, une partie du cholestérol est réestérifié pour être stocké par la cellule sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytosol.

1.2.1. Structure des membranes

Le cholestérol est un composant majeur des membranes plasmiques et des organites cellulaires animaux. En effet, les membranes cellulaires sont constituées principalement de lipides : phospholipides, sphingolipides et stérols. Les phospholipides et le cholestérol s'assemblent en une bicouche lipidique, qui est l'élément structural principal des membranes, les groupements hydrophiles étant à la surface et les groupements hydrophobes enfouis. Le cholestérol et les sphingolipides peuvent également s'assembler en radeaux lipidiques. La fonction de certaines protéines membranaires ou l'interaction entre ces protéines nécessitent la présence de ces radeaux. La quantité et la distribution du cholestérol régulent les propriétés physiques des membranes, notamment la fluidité et la perméabilité membranaire. Le cholestérol membranaire jouerait également un rôle dans la distribution et l'élimination des protéines membranaires. Il influencerait ainsi leur activité, leurs interactions protéiques, avec les autres organites ou avec les autres cellules (Brown *et al.*, 2000 ; Yeagle 1989).

La fonction contractile des cardiomyocytes est liée à des structures membranaires particulières : les tubules-T. Elle est orchestrée par un ensemble de canaux, d'échangeurs et de pompes ioniques, et est régulée par des récepteurs du système sympathique. L'ensemble de ces acteurs est situé au niveau du sarcolemme (membrane plasmique des cardiomyocytes). Bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas encore clairement établis, une modification du cholestérol sarcolemmal conduit à une modification des propriétés membranaires des cardiomyocytes et peut altérer la fonction de certains canaux ioniques, pompes, enzymes et récepteurs situés à la membrane et ainsi altérer la fonction cardiaque. Il a notamment été démontré que l'utilisation d'hypolipémiants permettait de réduire les arythmies cardiaques et la mortalité liée aux pathologies cardiovasculaires (Goonasekara *et al.,* 2010).

Le cholestérol structure également les membranes des organites cellulaires et régule ainsi leur rigidité et leur perméabilité. La distribution et la quantité de cholestérol présent dans ces membranes est très variable selon les organites. Les membranes mitochondriales, par exemple, sont très pauvres en cholestérol et particulièrement la membrane interne (Horvath et *al.*, 2013). Le cholestérol régule les phénomènes de fission et de fusion des mitochondries. Une augmentation du cholestérol mitochondrial, responsable de dysfonctions mitochondriales, a été observée dans de nombreuses pathologies comme les cancers, l'infarctus du myocarde et les maladies neurodégénératives (Elustondo *et al.,* 2017).

1.2.2. Biosynthèse des sels biliaires

La bile, synthétisée par le foie, permet l'excrétion du cholestérol et des oxystérols (voir paragraphe 1.2.4, page 34) et participe à la digestion intestinale des lipides. La bile est constituée de sels biliaires, issus de la dégradation du cholestérol et des oxystérols (Figure 7), et de bilirubine (issue de l'élimination des érythrocytes). Elle est libérée dans l'intestin et permet l'émulsification des gouttelettes lipidiques, ce qui facilite l'activité des enzymes digérant les lipides. Une partie de la bile est excrétée avec les fèces, éliminant le cholestérol du cycle entéro-hépatique (Figure 5).

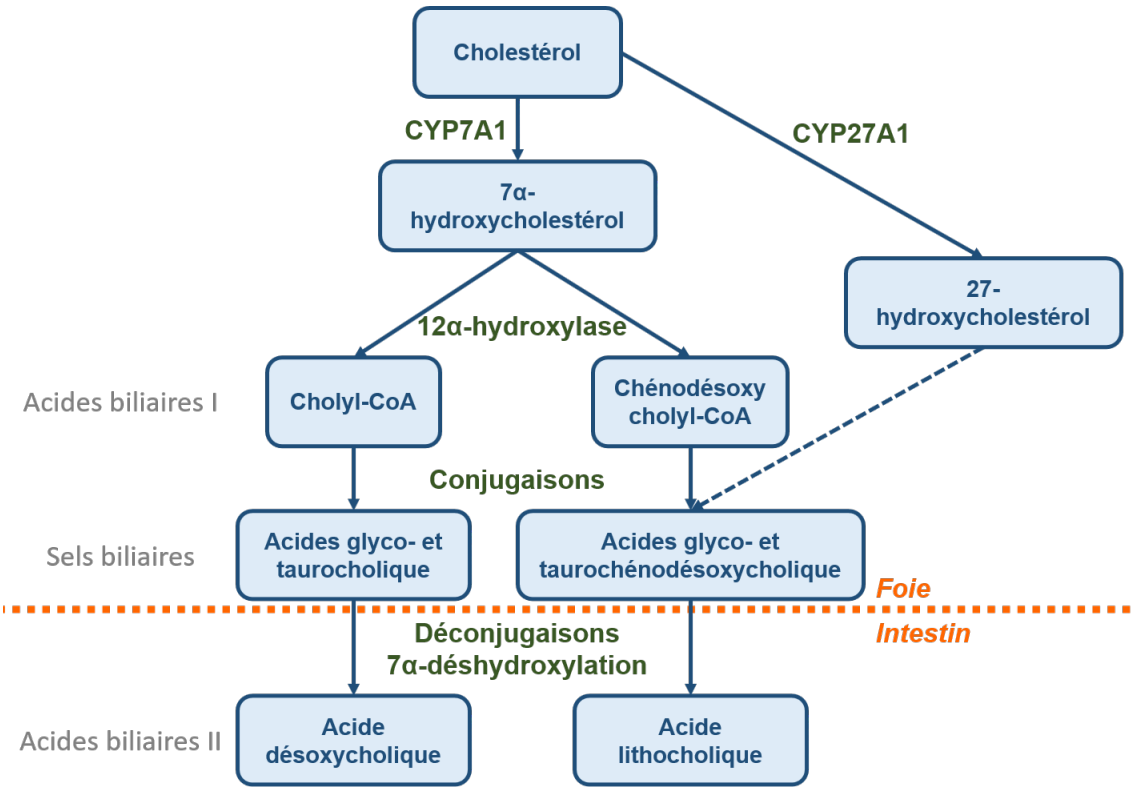


Figure 7 : Biosynthèse des acides biliaires.
Les acides biliaires sont formés au niveau hépatique. La voie majoritaire de leur synthèse débute par la transformation de cholestérol en 7α-hydroxycholestérol par le cytochrome CYP7A1 (7α-hydroxylase). Cette enzyme du réticulum endoplasmique est activée par le cholestérol et inhibée par les acides biliaires. Puis la 12α-hydroxylase le transforme en cholyl-CoA ou en chénodésoxycholyl-CoA, qui sont les acides biliaires primaires. Ces derniers subissent des réactions de conjugaison avec du glycocolle ou de la taurine qui les transforment en sels biliaires. Les sels biliaires sont déversés dans l'intestin par la bile, où ils sont transformés en acides biliaires secondaires suite à une déconjugaison (élimination du glycocolle ou de la taurine) et à l'action de la 7α-hydroxylase. Les bactéries intestinales participent à la formation des acides biliaires secondaires. La voie alternative de biosynthèse des acides biliaires commence par la transformation du cholestérol en 27-hydroxycholestérol par le cytochrome CYP27A1 (27-hydroxylase) dans la mitochondrie. D'après Li *et al.*, 2017.

1.2.3. Biosynthèse des hormones stéroïdes

Le cholestérol est le précurseur de synthèse des hormones stéroïdes. Celles-ci se divisent en cinq groupes : les glucocorticoïdes, les minéralo-corticoïdes, les androgènes, les œstrogènes et les progestatifs. Elles sont majoritairement synthétisées dans les tissus stéroïdogènes sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Figure 8) (Selvaraj *et al.,* 2018).

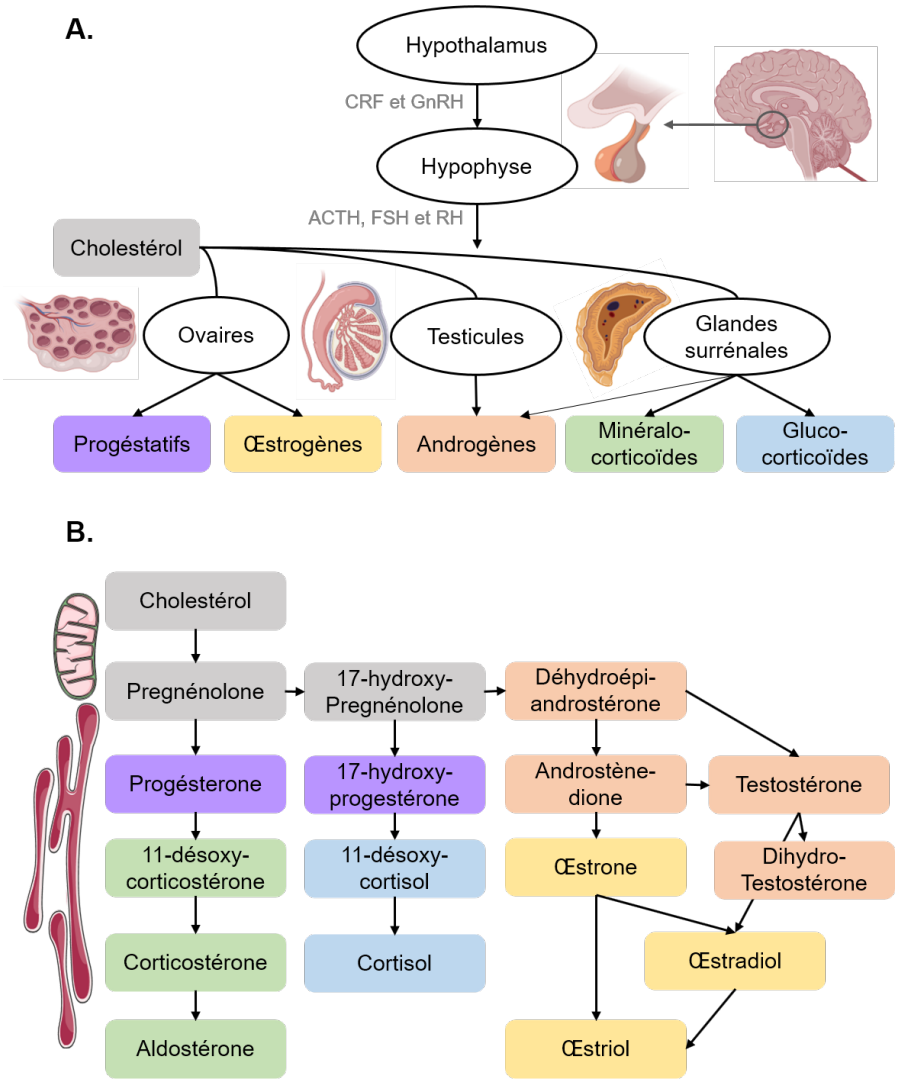


Figure 8 : Biosynthèse des hormones stéroïdes.
A. Suite à la sécrétion de corticolibérine (CRF) ou de gonadolibérine (GnRH) par l'hypothalamus, l'hypophyse libère de la corticotrophine (ACTH), de l'hormone folliculostimulante (FSH) ou de l'hormone lutéinisante (LH) qui induisent la stéroïdogenèse à partir du cholestérol. Les ovaires produisent des progestatifs et des œstrogènes, les testicules produisent des androgènes et les glandes surrénales des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes. **B.** Le cholestérol est le précurseur de synthèse des hormones stéroïdes. Il est transformé dans la mitochondrie en prégnénolone par le CYP11A1 (cholestérol monooxygénase), ce qui constitue la première étape de la stéroïdogenèse, qui se déroule ensuite dans le réticulum endoplasmique. La prégnénolone peut être transformée en progestatifs qui à leurs tours sont transformés en glucocorticoïdes puis minéralocorticoïdes. Elle peut également donner les androgènes dont sont issus les œstrogènes. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art et Biorender et d'après Silbernagl *et* Lang 2015.

Le placenta et le système nerveux central produisent également des hormones stéroïdes qui leur sont spécifiques (Issop *et al.,* 2013).

Les progestatifs et les œstrogènes sont secrétés par les ovaires (Figure 8). La progestérone, l'estradiol et l'œstrogène sont des hormones sexuelles : elles régulent le cycle menstruel et assurent le maintien de la grossesse (Derrickson *et al.,* 2015). La synthèse extra gonadique de l'estradiol se fait à partir de la testostérone et l'enzyme (l'aromatase) qui catalyse cette réaction est exprimée dans le tissu cardiaque (Regitz-Zagrosek *et al.*, 2017). Des études ont montré des effets cardioprotecteurs des œstrogènes : ils préviennent le développement de l'athérome (Billon-Galés *et al.*, 2009) et protègent les coronaires lors d'infarctus du myocarde (Favre *et al.*, 2010).

Les androgènes sont produits en faible quantité par les glandes surrénales et chez l'homme, ils sont sécrétés en forte quantité par les testicules (Figure 8). La testostérone et la dihydrotestostérone, principaux androgènes, sont des hormones sexuelles qui participent à la mise en place des caractères sexuels secondaires à la puberté et à la fonction de reproduction comme les œstrogènes et les progestatifs chez la femme (Derrickson *et al.*, 2015). Le tissu cardiovasculaire exprime des récepteurs aux androgènes et l'enzyme de conversion de la testostérone en dihydrotestostérone qui est bien plus active. Cette enzyme est surexprimée dans les cœurs hypertrophiés (Regitz-Zagrosek *et al.*, 2017). Cependant le rôle des androgènes sur la fonction cardiaque n'est pas encore élucidé.

Les glucocorticoïdes sont secrétés par les glandes surrénales (Figure 8), ils régulent le métabolisme énergétique des cellules et la réponse au stress. Le cortisol, principal glucocorticoïde, accélère le catabolisme des protéines, stimule la néoglucogénèse hépatique et la lipolyse. Les substrats de la synthèse d'ATP ainsi libérés peuvent participer à la réponse de l'organisme à différents stress. Les glucocorticoïdes ont également des effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs (Derrickson *et al.*, 2015). Les glucocorticoïdes, en excès, favorisent les facteurs de risque cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, le diabète et des dyslipidémies (voir paragraphe 2.2, page 39) (Liu *et al.*, 2019).

Comme les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes sont secrétés par les glandes surrénales (Figure 8). Ces hormones régulent l'homéostasie des minéraux. L'aldostérone, principal minéralocorticoïde, contribue à la régulation de la volémie et ainsi à la pression artérielle. Une diminution de la volémie entraîne une baisse de la pression artérielle qui stimule la sécrétion

de la rénine par le foie. Celle-ci transforme l'angiotensinogène en angiotensine I qui est à son tour transformée en angiotensine II et induit la sécrétion d'aldostérone. Cette dernière provoque, au niveau rénal, la réabsorption de sodium, donc d'eau, et ainsi une augmentation de la volémie (Derrickson *et al.*, 2015). L'aldostérone favorise l'hypertension artérielle, facteur de risque majeur des maladies cardiovasculaires, et ainsi l'hypertrophie et la fibrose cardiaque (Weber *et al.*, 1991). L'aldostérone participerait également au remodelage cardiaque post-infarctus (O'Gara *et al.*, 2013).

La fonction cardiaque est étroitement régulée par les corticoïdes par voie endocrine mais le cœur est également capable d'en synthétiser (Gomez-Sanchez, 2001). La stéroïdogenèse cardiaque semble être fortement altérée dans les conditions pathologiques comme l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque. En effet, une première étude a démontré la présence de deux enzymes de la stéroïdogenèse des corticoïdes ainsi que la présence d'aldostérone et de corticostérone au niveau cardiaque. Dans un modèle de cœur isolé chez le rat, la perfusion d'angiotensine II a induit une augmentation des concentrations de ces deux corticoïdes. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* chez le rat : un régime pauvre en sodium et riche en potassium, l'injection d'angiotensine II ou de corticotrophine ont induit une augmentation des corticoïdes cardiaques indépendamment de leurs taux sanguins (Silvestre *et al.*, 1998). Cette équipe a ensuite évalué la stéroïdogenèse cardiaque dans un modèle expérimental d'ischémie-reperfusion chez le rat. L'infarctus a inhibé la synthèse de la 11β-hydroxylase (qui permet la synthèse de corticostérone) et réduit la quantité de corticostérone mais a augmenté la quantité d'angiotensine II, l'expression de l'aldostérone synthase ainsi que la quantité d'aldostérone dans la zone non-infarcie. Les auteurs émettent l'hypothèse que cette synthèse d'aldostérone provoquée par l'infarctus participerait à la fibrose interstitielle (Silvestre *et al.*, 1999). Une autre étude a démontré l'expression de CYP11A1, de 11β-hydroxylase, d'aldostérone synthase et de la STAR au niveau cardiaque dans un modèle murin et sur des échantillons humains. Cette étude a également démontré une augmentation de l'expression des enzymes de synthèse des corticoïdes dans les tissus cardiaques issus de patients atteints d'insuffisance cardiaque (Young *et al.*, 2001). Ces résultats ont été confirmés dans un autre laboratoire : avec un modèle d'insuffisance cardiaque chez le rat et la souris, la protéine STAR, le CYP11A1 et la quantité de corticostérone étaient significativement augmentés au niveau cardiaque. Cette équipe a également développé un modèle de murin transgénique en injectant un plasmide contenant *Star* placé sous le contrôle du promoteur de la myosine : ces souris sur-exprimaient donc STAR au niveau cardiaque. Cette mutation n'a pas eu d'effet au niveau basal mais a induit une hypertrophie et une quantité de corticostérone supérieure dans le modèle

d'insuffisance cardiaque (Ohtani *et al.*, 2009). Le traitement chronique d'angiotensine II chez des rats a induit une augmentation de l'aldostérone et d'aldostérone synthase au niveau des mitochondries cardiaques. L'angiotensine II n'a pas modifié la quantité de CYP11A1 et les auteurs ont émis l'hypothèse que la synthèse cardiaque d'aldostérone serait réalisée à partir du corticostérone circulant (précurseur de synthèse de l'aldostérone) et serait assurée par un complexe multiprotéique composé de la forme mitochondriale de STAR (30 kDa), de Tom22 (une protéine mitochondriale impliquée dans le transport de protéines depuis le cytosol jusqu'à la matrice) et de l'aldostérone synthase (Bose *et al.,* 2021). La majorité des enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse cardiaque sont des cytochromes P450 et ont été proposées comme cibles potentielles dans les stratégies cardioprotectrices (Barau *et al.*, 2015).

1.2.4. Biosynthèse des oxystérols

Les oxystérols sont des dérivés oxydés du cholestérol et de ses précurseurs (Griffiths *et al.*, 2020). D'abord considérées comme métabolites dans le processus d'élimination du cholestérol (Mutemberezi *et al.,* 2016), ces molécules sont maintenant étudiées dans de nombreux processus physiopathologiques (Poli *et al.*, 2013). Les oxystérols sont issus d'une oxydation chimique, en présence d'espèces réactives de l'oxygène, ou d'une oxydation enzymatique du cholestérol. La plupart de ces enzymes sont des cytochromes P450 monooxygénases et certaines participent à la synthèse de la bile, d'autres à la synthèse des hormones stéroïdes. Les oxystérols étant des dérivés oxydés du cholestérol, ils possèdent un groupement supplémentaire contenant de l'oxygène : hydroxyle (—OH), cétone (═O), hydropéroxyle (—OOH) ou époxide ( ) (Brown *et al.*, 2021). Les oxystérols peuvent être transformés en oxystérols secondaires. Ils sont inactivés par estérification par les enzymes qui estérifient le cholestérol. Les oxystérols sont plus hydrophiles que le cholestérol, cette propriété facilite leur transport et ainsi leur élimination hépatique. Les oxystérols sont très étudiés car ils sont présents en très faibles concentrations dans l'organisme (pM à µM) et peuvent être toxiques à ces faibles concentrations. Ils sont très cytotoxiques car ils induisent un stress oxydant capable de provoquer une dysfonction des organites comme la mitochondrie (Vejux *et al.*, 2020). Comme le cholestérol, ces molécules peuvent s'incorporer dans les membranes et modifier leurs propriétés et ainsi altérer les fonctions des protéines membranaires. Les oxystérols ont également des propriétés pro-apoptotiques et pro-inflammatoires (Lemaire-Ewing *et al.,* 2005 ; Vejux *et al.*, 2008). Il existe une multitude d'oxystérols présents dans l'organisme (Brown *et al.,* 1999; Griffiths *et al.,* 2019) et leurs cibles sont nombreuses, ce qui explique l'intérêt croissant qu'on leur porte. Les oxystérols régulent la biosynthèse et ainsi l'homéostasie du cholestérol. En effet, le 25-hydroxycholestérol et le 7-kétocholestérol peuvent

altérer l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol en se fixant à la SREBP par exemple (Schroepfer 2000). Les oxystérols se fixent également aux récepteurs LXR qui régulent l'expression de gènes impliqués dans le transport hépatique, le stockage et le métabolisme du cholestérol (Repa *et al.*, 1999). Ces récepteurs peuvent aussi intervenir dans d'autres processus biologiques comme l'inflammation et l'apoptose. Les oxystérols se lient également à d'autres récepteurs nucléaires : les ROR (*Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor*) qui participent à la réponse immunitaire. Certains oxystérols (le 27-hydroxycholestérol par exemple), sont capables de se fixer aux récepteurs alpha des œstrogènes et ainsi interférer avec leurs effets athéroprotecteurs (Umetani *et al.*, 2014). Actuellement, les oxystérols sont principalement étudiés dans des pathologies neurodégénératives dans lesquelles ils sont fortement impliqués et ces molécules commencent à susciter un certain intérêt dans la recherche contre le cancer (Griffiths *et al.*, 2019). Le 27-hydroxycholestérol est l'oxystérol le plus connu et le plus étudié (Mutemberezi *et al.,* 2016), il est très concentré dans les plaques d'athérome (Vaya *et al.*, 2011). Le 7-kétocholestérol et le 7β-hydroxycholestérol sont les deux oxystérols majoritairement formés par auto-oxydation du cholestérol. Dans le domaine cardiovasculaire, ils sont principalement étudiés dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Chez les patients hypercholestérolémiques et diabétiques (à fort risque de pathologies cardiovasculaires ischémiques), le taux sanguin d'oxystérols augmente par rapport aux volontaires sains (Arca *et al.*, 2007 ; Kawamura *et al.*, 1994). Le développement des plaques d'athérome et l'oxydation des lipoprotéines sont favorisés par les oxystérols, notamment le 7-kétocholestérol et le 7β-hydroxycholestérol, que l'on retrouve en forte concentration dans ces plaques (Song *et al.,* 2017). On y trouve également le 7α-hydroxycholestérol et les cholestérol-5α,6α- et -5β,6β-époxide. Tous ces oxystérols ont démontré une cytotoxicité *in vitro* (Helmschrodt *et al.,* 2013). En plus des effets athérogènes, les oxystérols ont des effets directs sur les cardiomyocytes, favorisant l'hypertrophie et la mort cellulaire. Les mécanismes de ces atteintes cellulaires et de leurs conséquences sont à ce jour encore méconnus. Des études ont cependant révélé qu'une accumulation d'oxystérols entraînait une augmentation de la concentration cytosolique de calcium et inhiberait la recapture du calcium par le réticulum sarcoplasmique. A terme, les oxystérols induisent des altérations morphologiques responsables de dysfonctions cellulaires (Lukyanenko 2009). Bien qu'il existe une multitude d'oxystérols, notre travail expérimental s'est intéressé à un nombre restreint d'entre eux (Figure 9), sélectionnés pour leur implication dans les pathologies cardiovasculaires, leur toxicité et leur métabolisation mitochondriale.

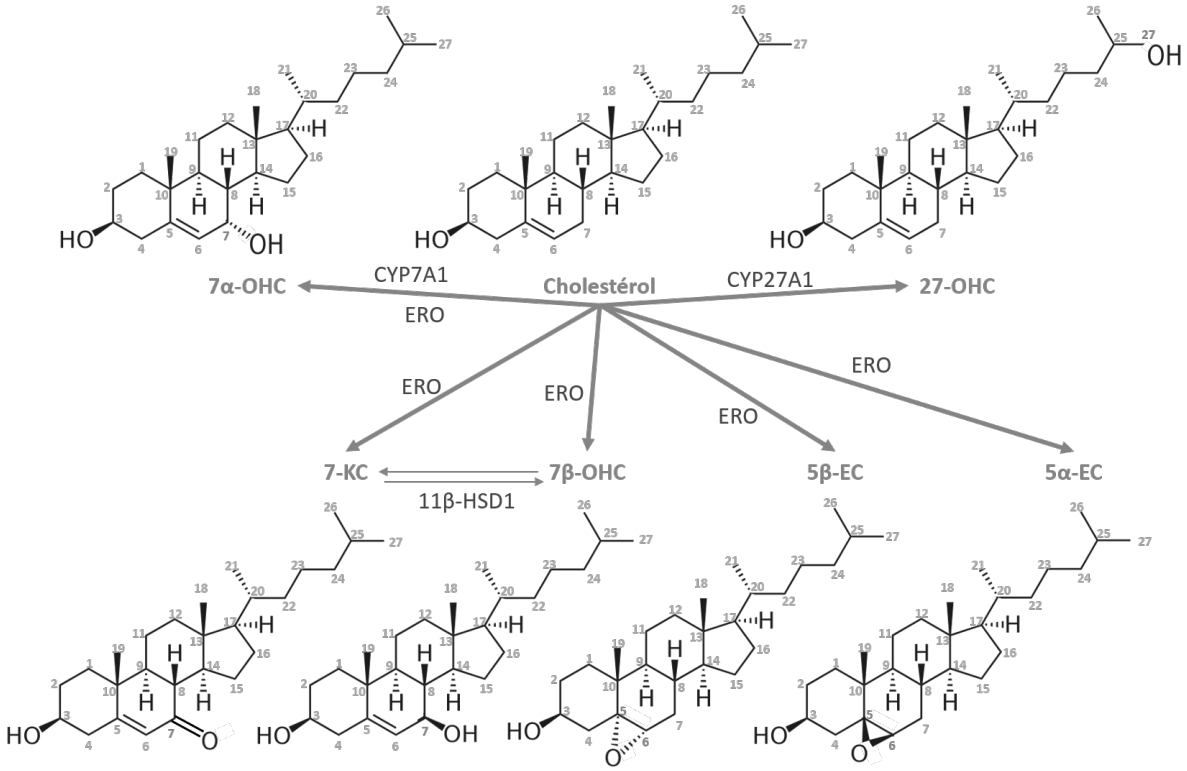


Figure 9 : Synthèse des principaux oxystérols de cette étude.
Les oxystérols sont issus de l'oxydation du cholestérol par des espèces réactives de l'oxygène ou par voie enzymatique. L'oxydation du cholestérol par les espèces réactives de l'oxygène peut former le 7α-hydroxycholestérol (7α-OHC), 7β-hydroxycholestérol (7β-OHC), le 7-kétocholestérol (7-KC), le cholestérol-5α,6α-époxide (5α-EC) ou le cholestérol-5β,6β-époxide (5β-EC). La 27-hydroxylase (CYP27A1) est une enzyme mitochondriale qui forme le 27-hydroxycholestérol (27-OHC). La 7α-hydroxylase (CYP7A1) est une enzyme du réticulum endoplasmique qui forme le 7α-OHC. La 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (11β-HSD1) régule l'équilibre entre le 7-KC et le 7β-OHC. D'après Musman 2017.

1.2.5. Biosynthèse d'autres métabolites

Le cholestérol est le précurseur de synthèse de nombreuses autres molécules que nous ne développons pas dans ce manuscrit : la vitamine D3 (ou cholécalciférol), les protéines prénylées ou farnésylées, l'ubiquinone (ou co-enzyme Q10), le dolichol, le facteur nucléaire NFκB et la protéine Tau.

Le cholestérol est une biomolécule aux nombreuses fonctions biologiques. Il participe à la structure cellulaire et à la biosynthèse de nombreuses molécules impliquées dans différents processus physiopathologiques. Son métabolisme est étroitement régulé (Figure 10) et une altération de l'homéostasie du cholestérol peut donc favoriser le développement de nombreuses pathologies.

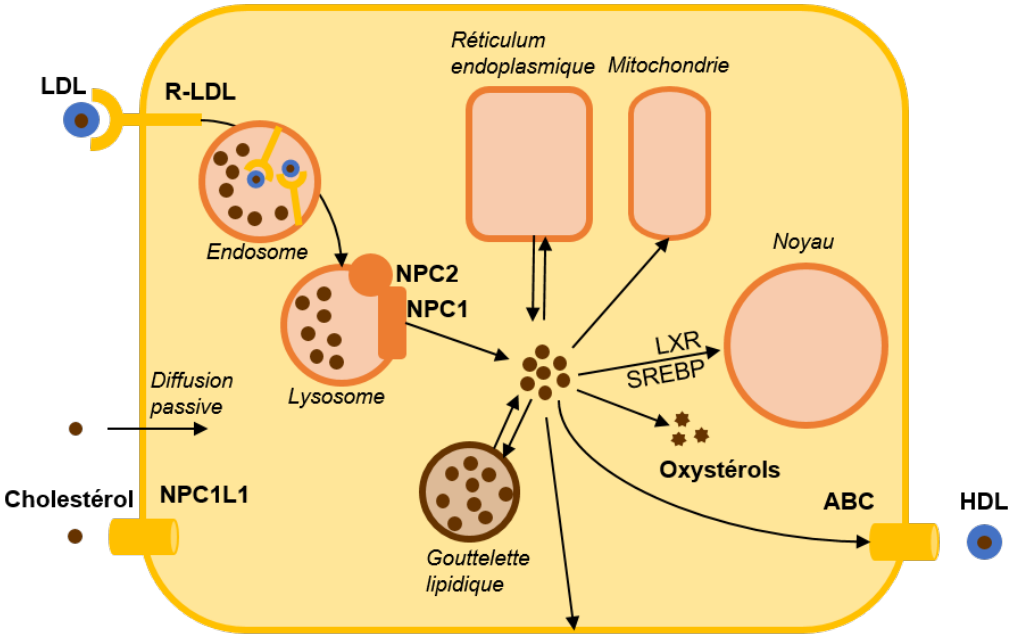


Figure 10 : Métabolisme du cholestérol.
Le métabolisme du cholestérol comprend son influx, sa biosynthèse, son stockage, ses utilisations cellulaires et son efflux. Dans les entérocytes, le cholestérol issu de l'alimentation est endocyté par des récepteurs NPC1L1 ou entre par diffusion passive. Le cholestérol sanguin est apporté aux cellules par les LDL qui se fixent à leurs récepteurs (R-LDL) à la surface des cellules et sont endocytées. Le cholestérol libéré est acheminé par les protéines NPC aux membranes où il participe à leur structure, aux mitochondries où il sert de précurseur de synthèse aux hormones stéroïdes et au réticulum endoplasmique où il permet la synthèse d'acides biliaires. Le réticulum endoplasmique synthétise du cholestérol *de novo*. Le cholestérol est stocké dans les gouttelettes lipidiques sous forme estérifiée. Les oxystérols sont générés par oxydation du cholestérol. Les variations des concentrations intracellulaires de cholestérol induisent des modifications de l'expression de gènes impliqués dans son métabolisme, par le biais de deux facteurs de transcription : le récepteur LXR et la SREBP. Le cholestérol est éliminé de la cellule par les transporteurs ABC et pris en charge par les HDL. D'après Song *et al.*, 2021.

Au niveau cardiaque, le cholestérol est largement étudié en tant que facteur de risque des maladies cardiovasculaires. En effet, l'hypercholestérolémie favorise l'athérosclérose qui provoque, à terme, l'apparition d'infarctus du myocarde. L'implication du cholestérol dans cette pathologie ne se limite cependant pas à la formation de plaques d'athérome. En effet, le cholestérol est à la fois un facteur de risque favorisant la survenue d'infarctus du myocarde, un facteur d'aggravation de la sévérité de l'atteinte cardiaque et un obstacle aux stratégies cardioprotectrices. La seconde partie de cette synthèse détaille ces différents aspects.

2. CHOLESTEROL & PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE

2.1. Généralités sur l'infarctus du myocarde

D'après l'Organisation Mondiale de Santé (OMS), les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde avec 17,7 millions de décès par an (soit 31% de la mortalité mondiale) en 2022. Parmi les maladies cardiovasculaires, la Société Européenne de Cardiologie évalue l'incidence des cardiopathies ischémiques à 3,6 millions de nouveaux cas par an et leur prévalence à 34,9 millions de patients en l'Europe et les pays méditerranéens (soit 56 pays au total) (Timmis *et al.*, 2020). L'incidence, la prévalence et la mortalité de ces pathologies ne cessent d'augmenter, elles représentent ainsi un enjeu économique mondial de santé (Figure 11).

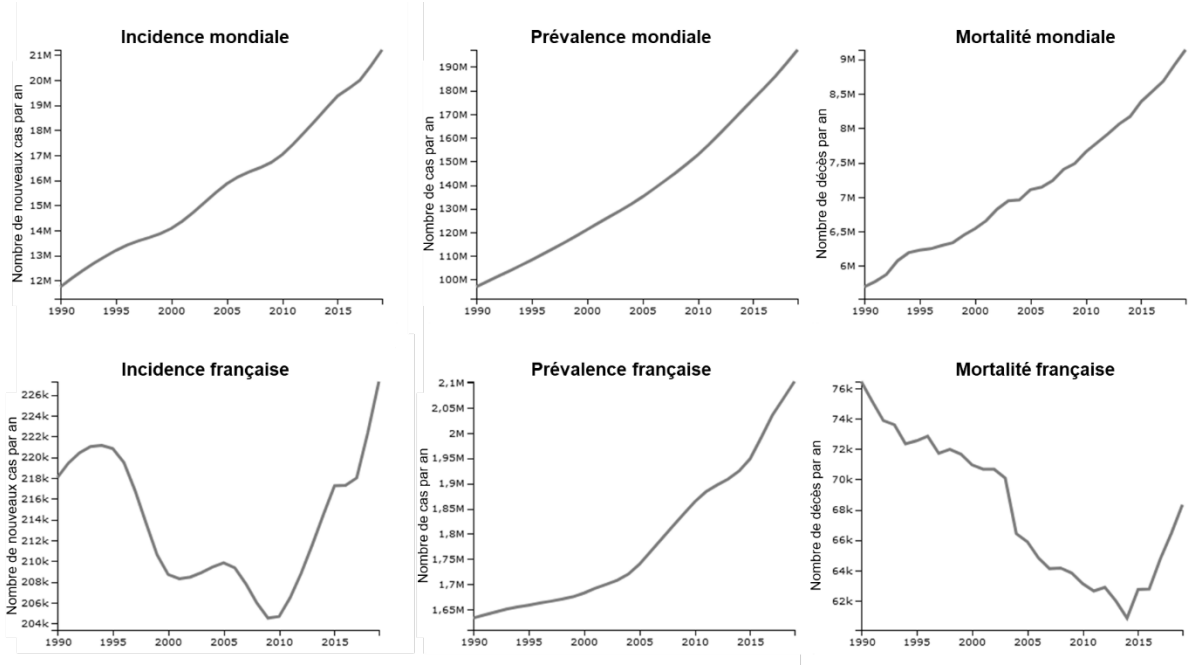


Figure 11 : Incidence, prévalence et mortalité des cardiopathies ischémiques dans le monde et en France de 1990 à 2019.
Données issues de *Global Burden of Disease Collaborative Network, Global Burden of Disease Study 2019 Results. Seattle, United States: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2020* (https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/).

Parmi les cardiopathies ischémiques, la Fédération Française de Cardiologie dénombre 120 000 infarctus du myocarde par an en France, responsables de près de 40 000 décès en 2021. L'infarctus du myocarde correspond à la nécrose partielle ou totale d'une zone du myocarde, causée par l'obstruction de l'artère coronaire qui irrigue cette zone, privant le tissu cardiaque de l'apport en oxygène et en nutriments. Dans la majorité des cas, l'obstruction est provoquée par la rupture d'une plaque d'athérosclérose (Hansson 2005). La reperfusion de l'artère

obstruée, qui permet de restaurer la circulation sanguine, est la seule option thérapeutique. Celle-ci provoque cependant des lésions supplémentaires à celles de l'ischémie, appelées lésions de reperfusion (Benhabbouche *et al.,* 2011) (Figure 12).

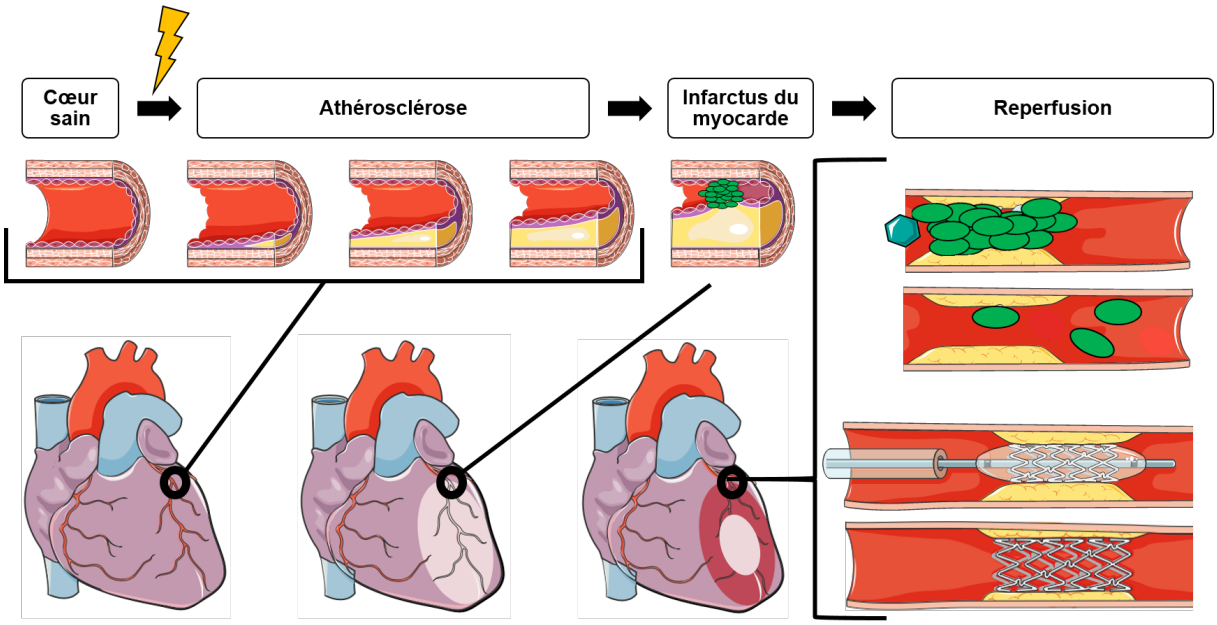


Figure 12 : Infarctus du myocarde.
De nombreux facteurs de risque altèrent les parois vasculaires cardiaques et favorisent ainsi le développement de l'athérosclérose. La rupture des plaques d'athérome et la formation d'un thrombus aboutissent à l'occlusion de l'artère coronaire. L'apport en oxygène et en nutriments est arrêté, provoquant à terme la nécrose du tissu cardiaque. La reperfusion médicale de l'artère occluse (par angioplastie coronaire, thrombolyse ou pontage) permet de restaurer le flux sanguin et rétablir l'apport en nutriments et en oxygène. La zone infarcie correspond à la région du myocarde dans laquelle les cellules sont mortes. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

La mortalité de l'infarctus du myocarde a été réduite de manière significative malgré l'augmentation continue de la prévalence, grâce à l'amélioration de la prise en charge des patients, avec cependant une détérioration de la situation en France durant ces dernières années (Figure 11). Si la mortalité aiguë a fortement diminué, le risque pour les patients est de développer une insuffisance cardiaque causée par le remodelage que subit le cœur pour compenser la région infarcie (Gabriel-Costa 2018). Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies cardioprotectrices pour limiter les séquelles de l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque qui en résulte pour, à terme, réduire la mortalité post-infarctus (Hausenloy *et al.,* 2017).

2.2. Facteurs de risque & comorbidités de l'infarctus du myocarde

Les facteurs de risque d'une pathologie sont associés à une augmentation de l'incidence de la pathologie. L'infarctus du myocarde partage les facteurs de risque de nombreuses pathologies

chroniques telles que le diabète de type II, l'hypertension artérielle et certains cancers : la prévalence de ces comorbidités chez les patients atteints d'infarctus du myocarde est donc élevée (Schmidt *et al.*, 2012). Ces comorbidités influent sur la gravité de l'infarctus du myocarde à cause des modifications des voies de signalisation cellulaires qu'elles induisent. Elles peuvent également altérer l'efficacité des stratégies cardioprotectrices à cause des interactions médicamenteuses potentielles liées à leur traitement (Ferdinandy *et al.,* 2007). La Société Européenne de Cardiologie et la Haute Autorité de Santé préconisent l'utilisation de l'index SCORE (*Systematic Coronary Risk Estimation*) qui évalue le risque d'évènements cardiovasculaires fatals à 10 ans. Cet index prend en compte les principaux facteurs de risque (âge, sexe, tabagisme) et de comorbidités (hypertension artérielle et hypercholestérolémie) (Conroy *et al.*, 2003).

2.2.1. Facteurs de risque innés

2.2.1.1. Prédispositions

Dans la prise en compte du risque, les antécédents familiaux de maladies cardiovasculaires constituent un facteur déterminant car ils reflètent à la fois les prédispositions génétiques et les conditions environnementales (Bachmann *et al.*, 2012). Bien qu'il n'existe pas à ce jour de consensus sur les gènes candidats impliqués dans le risque cardiovasculaire, de nombreuses mutations génétiques ont été identifiées. Certaines équipes commencent à étudier l'effet des mutations épigéniques (variations des modifications post-traductionnelles, comme la méthylation) sur le risque cardiovasculaire *(Piepoli et al.,* 2016 ; Visseren *et al.*, 2021).

2.2.1.2. Sexe

En conditions physiologiques, le cœur des hommes et des femmes présentent des différences significatives au niveau de la contractilité, du métabolisme ou des fonctions mitochondriales (Ostadal *et al.*, 2009). Des études cliniques ont révélé des écarts dans l'épidémiologie, la physiopathologie, la réponse aux traitements et les conséquences des maladies cardiovasculaires entre les hommes et les femmes (Mauvais-Jarvis *et al.*, 2020). A partir de la ménopause, le risque cardiovasculaire des femmes rejoint progressivement celui des hommes, suggérant un rôle des hormones sexuelles dans le risque cardiovasculaire (voir paragraphe 1.2.3, page 31). De plus, les hommes et les femmes développent des pathologies cardiovasculaires ischémiques différentes, les hommes étant plus sujets aux occlusions artérielles tandis que les femmes souffrent de dysfonctions microvasculaires. Les hommes sont plus sujets aux infarctus du myocarde mais avec une mortalité précoce inférieure à celle des femmes. Les quelques études qui ont été réalisées *in vivo* concluent que le sexe modifie la

taille de l'infarctus et la survie post-infarctus, les sujets de sexe féminin présentant une plus forte résistance aux lésions de reperfusion cardiaques et donc au remodelage post-infarctus (Regitz-Zagrosek *et al.*, 2017).

Malgré les études cliniques qui soulignent les différences physiopathologiques liées au sexe dans les pathologies cardiovasculaires, trop peu d'études expérimentales sont réalisées sur des animaux femelles (Lindsey *et al.*, 2018). Ce choix des laboratoires de recherche est motivé par diverses considérations. L'utilisation de mâles et de femelles dans les études impliquerait de doubler toutes les expériences, doublant les frais et la durée des études expérimentales, dans un climat de compétition pour publier et d'accès aux financements (Berthomieu *et al.*, 2019). Les études étant réalisées jusqu'à présent exclusivement sur des mâles, inclure des femelles pourrait modifier les résultats obtenus avec les modèles utilisés couramment dans les laboratoires. Le cycle hormonal des femelles pourrait induire une variabilité et ainsi compliquer l'analyse et l'interprétation des résultats (notons que les hormones chez les mâles varient également fortement avec les comportements de dominance (Machida *et al.*, 1981)). Lors de la validation de procédures expérimentales dans le cadre d'une demande de projet, l'utilisation d'animaux femelles soulève de nombreuses questions et nécessite une justification argumentée tandis que l'utilisation d'animaux mâles est considérée comme la norme (Shansky *et al*,. 2021) et la conséquence de l'utilisation quasi-exclusive des mâles est le sacrifice systématique des femelles dans les animaleries. Ce n'est que très récemment que cette problématique a été soulevée bien que depuis toujours, l'espèce humaine soit composée à moitié de femmes. Par exemple, en 2016, la Société Européenne de Cardiologie publie ses lignes directrices sur la prévention des pathologies cardiovasculaires et une sous-partie est consacrée aux spécificités des femmes mais celle-ci se limite aux cas obstétriques (Piepoli *et al.,* 2016). En 2021, une mise à jour a été publiée : un chapitre est consacré à l'impact du sexe sur la santé cardiaque et ce paramètre est inclus dans les différents aspects de ces nouvelles lignes directrices (Visseren *et al.*, 2021). L'inclusion d'animaux mâles et femelles dans les études pré-cliniques et la prise en compte des différences biologiques entre hommes et femmes dans les études cliniques devraient permettre de produire une science plus éthique, juste et représentative, et de limiter l'inégalité dans la prise en charge médicale des femmes qui s'accompagne d'un retard de diagnostic, d'une augmentation du risque d'effets secondaires et d'inefficacités médicamenteuses.

2.2.1.3. Vieillissement

La prévalence et le taux de mortalité liés aux maladies cardiovasculaires augmentent avec l'âge. La Haute Autorité de Santé considère tous les patients âgés de plus de 65 ans comme étant à risque élevé. Avec l'âge, les cardiomyocytes accumulent des modifications de leur phénotype (dues à des mutations de l'ADN, au raccourcissement des télomères, au stress oxydant, aux glycations, etc.) qui aboutissent à une dégradation de la fonction contractile et à une perte des mécanismes endogènes de protection (Boengler *et al.*, 2009). De plus, le vieillissement s'accompagne souvent de pathologies chroniques dont les mécanismes physiopathologiques et les différents traitements peuvent également interférer avec les stratégies cardioprotectrices (Ferdinandy *et al.*, 2014).

2.2.2. Facteurs de risque acquis

Ces facteurs de risque sont dus à l'environnement, notamment au statut socio-économique et à l'hygiène de vie. Les principaux facteurs de risque sont l'hypercholestérolémie, le diabète de type II, le surpoids, l'hypertension artérielle et le tabagisme (Piepoli *et al.,* 2016 ; Visseren *et al.*, 2021) ; certains de ces facteurs de risque de l'infarctus favorisent le développement d'autres pathologies comme le syndrome métabolique qui est aussi considéré comme un facteur de risque (voir paragraphe 2.2.3, page 43). L'hypertension artérielle provoque un remodelage cardiaque et engendre une contrainte mécanique vasculaire favorisant la rupture des plaques d'athérome (Rakugi *et al.*, 1996). Les constituants de la fumée de tabac fragilisent l'endothélium, provoquent un stress oxydant et une augmentation de la pression artérielle. Ils favorisent donc la formation de plaques d'athérome et le risque thrombotique (Benowitz *et al.*, 2017). Le risque cardiovasculaire est favorisé par la sédentarité. En effet, des études ont montré que l'activité physique permet de diminuer le risque d'infarctus du myocarde (Lobelo *et al.*, 2018). La consommation d'alcool provoque une augmentation de la pression artérielle et favorise le surpoids (Holmes *et al.*, 2014). La nutrition joue également un rôle majeur dans le risque cardiovasculaire : une alimentation riche en sel favorise l'hypertension artérielle, les acides gras saturés induisent la formation de LDL, les acides gras libres favorisent l'insulino-résistance et certains aliments sont riches en oxystérols (Eilat-Adar *et al.*, 2013 ; Vaya *et al.*, 2011). La pratique d'activité physique régulière et un régime alimentaire équilibré permettent de diminuer significativement le risque de pathologies cardiovasculaires et la mortalité associée (Kraus *et al.*, 2019 ; Visseren *et al.*, 2021). D'autres éléments peuvent participer au risque de développer des pathologies cardiovasculaires comme les facteurs psycho-sociaux. La charge psychologique, par exemple, constitue un facteur de risque cardiovasculaire et peut réduire l'efficacité des stratégies cardioprotectrices. Enfin, l'exposition à la pollution de l'air et des sols

augmente dramatiquement, entre autres, le risque cardiovasculaire (Burroughs *et al.*, 2017). De manière générale, le mode de vie « occidental » qui favorise les facteurs de risque et la pollution croissante de l'environnement sont responsables du développement de la prévalence de maladies cardiovasculaires.

2.2.3. Comorbidités de l'infarctus du myocarde liées aux lipides

Certains facteurs de risque des maladies cardiovasculaires sont également responsables d'autres pathologies, favorisant ainsi l'apparition de comorbidités chez les patients atteints d'infarctus du myocarde. Ces pathologies et leurs traitements modifient les voies de signalisation cardioprotectrices endogènes et réduisent ou annulent ainsi les effets des stratégies cardioprotectrices (Lecour *et al.*, 2014). Dans cette partie, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux comorbidités dans lesquels les lipides sont impliqués. En effet, les facteurs de risque de l'infarctus du myocarde favorisent également le développement d'un syndrome métabolique qui prédispose à la survenue de pathologies cardiovasculaires. En 1999, l'OMS a établi la première définition du syndrome métabolique. Celle-ci a depuis été mise à jour mais quatre critères principaux restent inchangés : intolérance au glucose, obésité, dyslipidémie et hypertension artérielle. Le syndrome métabolique est caractérisé par un état pro-thrombotique et pro-inflammatoire (Eckel *et al.*, 2005).

2.2.3.1. Dyslipidémie

Une dyslipidémie correspond à l'altération qualitative ou quantitative d'un ou de plusieurs lipide(s) plasmatique(s). La principale dyslipidémie est l'hypercholestérolémie, définie par une concentration plasmatique de cholestérol supérieure à 2 g/L de sang à jeun. Elle s'accompagne d'une altération au niveau des lipoprotéines avec une réduction des HDL et une augmentation des LDL et notamment des LDL de petites tailles, plus athérogènes (Grundy *et al.*, 2005). L'augmentation de la morbi-mortalité de l'infarctus du myocarde a longtemps été attribuée à ses propriétés athérogènes (Ference *et al.,* 2017). En effet, l'hypercholestérolémie peut, en l'absence d'autres facteurs de risque, provoquer le développement d'athérosclérose, qui est la principale cause d'infarctus du myocarde (Hansson 2005). L'hypercholestérolémie, en plus de son pouvoir athérogène, induit des altérations directes sur le myocarde en altérant les voies de signalisation endogènes d'adaptation à l'ischémie-reperfusion (Varga *et al.,* 2015). Elle s'accompagne d'une augmentation de stress oxydant, d'une inflammation, de dysfonctions mitochondriales et d'une mortalité cellulaire au niveau cardiaque (Andreadou *et al.*, 2017). De nombreuses études ont montré qu'elle induit une aggravation de l'infarctus du myocarde (Ferdinandy *et al.,* 2007). De plus, l'hypercholestérolémie s'oppose aux effets bénéfiques des

stratégies cardioprotectrices de façon variable selon l'importance de l'ischémie et le type de conditionnement. Les effets de l'hypercholestérolémie sur le myocarde sont attribués à l'accumulation et à la modification de la distribution du cholestérol dans les membranes cellulaires et subcellulaires, en particulier des mitochondries et du sarcolemme, influençant leurs propriétés physiques. Ces changements de conformations membranaires altèrent le fonctionnement de certaines protéines et l'expression de certains gènes, notamment ceux codant pour des protéines impliquées dans des voies de signalisation cardioprotectrices (Ferdinandy *et al.*, 2014). De plus, dans un modèle murin, il a été démontré que l'hypercholestérolémie provoque une accumulation de cholestérol et d'oxystérols dans les mitochondries cardiaques, oxystérols qui participent au développement du stress oxydant. Une amélioration du pronostic post-infarctus des patients traités avec des statines (voir paragraphe 1.1.5, page 27) a été démontrée (Mills *et al.*, 2011). Celle-ci est due à la réduction de la cholestérolémie mais les statines pourraient avoir un autre effet en agissant au niveau des voies cardioprotectrices, bien que le mécanisme n'ait pas été clairement établi (Panel *et al.*, 2017).

2.2.3.2. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 correspond à une hyperglycémie chronique, une dysfonction insulinaire et une insulino-résistance (Virally *et al.*, 2007). Cette dernière consiste en l'absence d'effet hypoglycémiant de l'insuline sur les tissus cibles : elle n'est plus capable d'inhiber les glucogenèses hépatique et rénale, ni de réguler l'absorption et le métabolisme du glucose. L'insulino-résistance aboutit à une hyperglycémie, définie par une glycémie à jeun supérieure à 110 mg/dL. Les cellules β des îlots de Langerhans produisent des quantités accrues d'insuline pour tenter de maintenir l'euglycémie. Cependant, l'hyperglycémie chronique induit une toxicité médiée par la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules pancréatiques. A terme, la dysfonction insulinaire qui en résulte aboutit à une intolérance au glucose (Stumvoll *et al.*, 2005). Les patients diabétiques sont plus susceptibles aux infarctus du myocarde, avec des lésions de reperfusion plus importantes (Anon 2010). L'hyperglycémie chronique du diabète de type 2 engendre des atteintes vasculaires qui favorisent le risque d'athérosclérose. De plus, l'insuline favorise la réabsorption rénale de sodium et l'activation du système nerveux sympathique ; elle favorise ainsi l'hypertension artérielle (Poornima *et al.*, 2006). Le diabète induit aussi des altérations métaboliques dans les cardiomyocytes. Les acides gras libres sont leur principale source d'énergie et ils s'accumulent en cas de diabète. L'oxydation de ce surplus d'acides gras augmente la consommation d'oxygène des cellules et génère des dérivés lipidiques qui s'accumulent à leur tour. Le diabète provoque des

modifications du sarcolemme qui se charge en cholestérol et triglycérides ; les structures fonctionnelles comme les tubules-T, les jonctions communicantes et l'activité des protéines membranaires (transporteurs, échangeurs, récepteurs, etc.) sont altérées. Il en résulte des modifications structurales puis des dysfonctions cardiaques (Feuvray *et al.*, 2008 ; Russell *et al.*, 2017). Bien que les mécanismes sous-jacents soient encore inconnus à ce jour, de nombreuses études suggèrent que le diabète serait un obstacle aux stratégies cardioprotectrices. Les traitements antidiabétiques peuvent induire des effets cardioprotecteurs ou à l'inverse s'y opposer. En effet, certaines molécules stimulent les voies de signalisation endogènes de cardioprotection tandis que d'autres en inhibent les effecteurs (Ferdinandy *et al.*, 2014).

2.2.3.3. Obésité

La morbidité et la mortalité de l'infarctus du myocarde sont majorées chez les patients obèses (Anon 2010). L'obésité correspond à un excès de masse grasse. L'OMS la définie par un indice de masse corporelle (IMC = poids / taille^2) supérieur à 30 kg/m^2 et/ou un rapport taille/hanche supérieur à 0,9. L'obésité favorise l'hypertension artérielle (Seravalle *et al.*, 2017), les dyslipidémies et le diabète (Grundy *et al.*, 2005). Elle provoque des altérations cardiaques au niveau métabolique et structural et engendre une inflammation, un fort stress oxydant et une dysfonction cardiaque (Mouton *et al.*, 2020). Ces altérations cardiaques favorisent l'infarctus du myocarde, aggravent les lésions de reperfusion et réduisent l'efficacité des stratégies cardioprotectrices (Abel *et al.*, 2008; Andreadou *et al.*, 2021).

2.3. Implication du cholestérol dans la survenue de l'infarctus du myocarde

La rupture d'une plaque d'athérome dans une artère coronaire est la principale cause d'infarctus du myocarde (Anderson *et al.*, 2017). L'athérosclérose est une inflammation chronique, causée par une accumulation progressive de lipides dans les parois artérielles qui aboutit à une sténose de ces vaisseaux. L'inflammation résulte de l'interaction entre des lipoprotéines, des macrophages et l'intima des artères. L'hypercholestérolémie est la cause principale du développement de l'athérosclérose (Glass *et al.*, 2001) (voir paragraphe 2.2.3.1, page 43). L'athérosclérose aboutit à la formation de plaques d'athérome qui provoquent une sténose des artères. Celle-ci engendre une modification du flux sanguin (normalement laminaire, il devient alors turbulent) aggravée par l'hypertension artérielle, qui fragilise les plaques et conduit à leur rupture. La rupture d'une plaque d'athérosclérose dans une artère coronaire induit la formation d'un thrombus et aboutit à l'occlusion de l'artère, à l'origine de

l'infarctus de la zone du myocarde normalement irriguée (Figure 13) (Glass *et al.*, 2001 ; Hansson 2005).

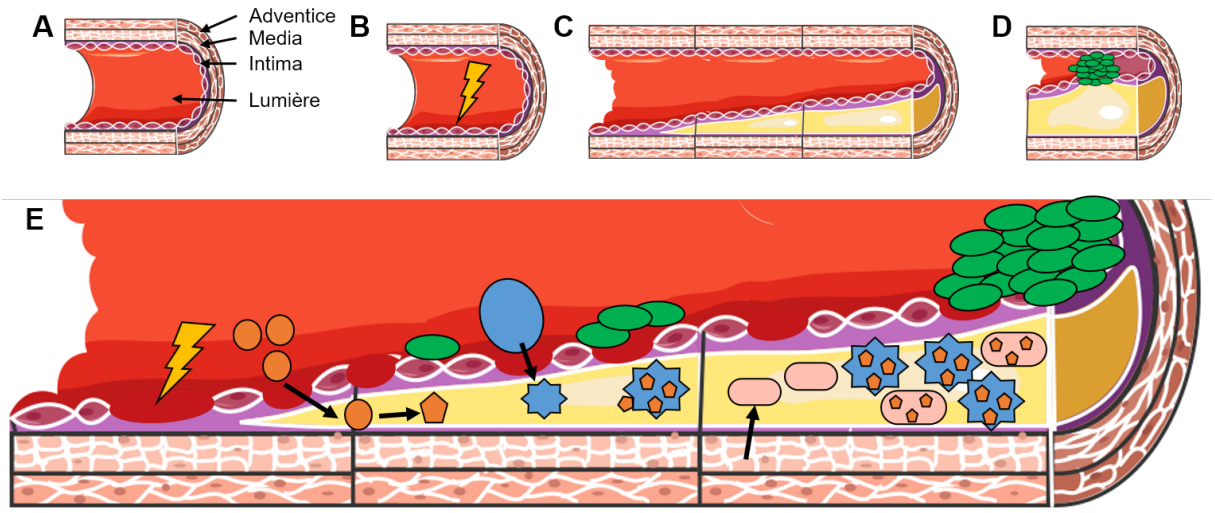


Figure 13 : Schéma de l'évolution de l'athérosclérose.
A-D : Chronologie des évènements aboutissant à l'occlusion d'une artère. **A.** La paroi des artères est composée de trois tuniques : l'intima (cellules endothéliales en contact du sang), la media (cellules musculaires lisses responsables de la vasomotricité artérielle) et l'adventice (tissu conjonctif). **B.** Les facteurs de risque ( ) induisent des lésions au niveau de l'intima et favorisent l'oxydation des LDL. **C.** La progression de l'athérosclérose provoque une sténose progressive du vaisseau. **D.** Lorsque la plaque d'athérome devient instable, elle se rompt et provoque une occlusion de l'artère et l'ischémie des tissus en aval. **E.** Mécanisme conduisant à la formation d'un thrombus. L'endothélium lésé présente une perméabilité augmentée : des LDL petites et denses ( ) s'infiltrent dans l'intima, sont oxydées ( ) et forment une couche graisseuse : c'est la première atteinte endothéliale dans le processus d'athérosclérose. Des monocytes ( ) s'infiltrent dans l'endothélium endommagé et ils se différencient en macrophages ( ) pour éliminer les LDL oxydées. Ce mécanisme est d'abord protecteur mais rapidement, les macrophages s'accumulent et libèrent des espèces réactives de l'oxygène qui participent à la progression des lésions endothéliales. En effet, l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) inactive le monoxyde d'azote (NO) secrété par les cellules endothéliales. Le NO s'oppose à l'adhésion des thrombocytes ( ) et des monocytes à l'endothélium, et a des propriétés vasodilatatrices et antiprolifératives sur la media. De plus, les macrophages phagocytent les LDL oxydées en grande quantité et se transforment ainsi en cellules spumeuses d'origine monocytaire ( ). D'autre part, la lésion de l'endothélium favorise l'agrégation des thrombocytes qui adhèrent aux parois et s'infiltrent dans l'intima. Sous l'effet de molécules secrétées par les macrophages et des thrombocytes, les cellules musculaires lisses de la media ( ) migrent et prolifèrent dans l'intima. Ces cellules produisent de la matrice extracellulaire dans l'intima. Certaines se transforment en cellules spumeuses d'origine musculaire ( ) après avoir accumulé des LDL oxydées. Les plaques d'athérome provoquent progressivement une sténose de l'artère et sont le site de saignements et de thrombus. La sténose provoque une modification du flux sanguin dans l'artère qui fragilise la plaque et favorise sa rupture. Celle-ci provoque la libération de facteurs pro-thrombotiques et pro-coagulants et aboutit à la formation d'un thrombus qui occlut l'artère. Les tissus irrigués par cette artère sont donc soumis à une ischémie. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

2.4. Ischémie

L'ischémie cardiaque correspond à une diminution ou une interruption de la perfusion du myocarde. Elle est provoquée par l'obstruction, partielle ou totale, d'une artère coronaire qui est principalement causée par la rupture de plaques d'athérome (Silbernagl *et al.*, 2015). Il en

résulte un apport insuffisant en oxygène et en nutriments au tissu cardiaque, et un défaut d'élimination des déchets cellulaires. L'ischémie myocardique entraîne des modifications métaboliques et ioniques qui se traduisent par des troubles de la contraction et du rythme cardiaques. Si l'ischémie perdure, elle induit une nécrose du myocarde appelée infarctus du myocarde, dont l'étendue dépend de la zone normalement irriguée par l'artère occluse, de la durée de l'occlusion et d'une éventuelle circulation collatérale (Benhabbouche *et al.*, 2011). L'ischémie conduit à des altérations du myocarde qui deviennent irréversibles en l'absence de prise en charge médicale rapide (Hausenloy *et al.*, 2007).

2.4.1. Altération du métabolisme énergétique

2.4.1.1. Arrêt de la phosphorylation oxydative

Les cardiomyocytes, de par leur fonction contractile permanente, consomment d'importantes quantités d'énergie. La majorité de l'ATP cardiomyocytaire est issue de la phosphorylation oxydative assurée par les mitochondries, nombreuses dans ces cellules. L'apport insuffisant en oxygène lors de l'ischémie est responsable de l'arrêt de la respiration mitochondriale : le potentiel de membrane mitochondriale chute. Les quantités d'ATP s'épuisent jusqu'à atteindre un seuil qui provoque l'hypercontracture des cardiomyocytes (altération irréversible du cytosquelette) (Hausenloy *et al.*, 2016).

2.4.1.2. Changement métabolique & lipotoxicité

En conditions physiologiques, les acides gras libres sont les principaux substrats des cardiomyocytes pour produire de l'ATP (Neely *et al.,* 1974). L'apport insuffisant en nutriments lors de l'ischémie provoque une modification du métabolisme énergétique des cardiomyocytes, qui vont alors consommer du glucose pour alimenter le cycle de Krebs. En effet, le rendement énergétique (c'est-à-dire le rapport entre la production d'ATP et la consommation d'oxygène) de la glycolyse anaérobie est meilleur que celui de la β-oxydation des acides gras. En condition d'ischémie, le glucose utilisé pour la production d'ATP est capté par les cardiomyocytes qui sur-expriment les récepteurs au glucose puis le glycogène intracellulaire est utilisé comme dernière source de substrat. Ce changement métabolique est un processus adaptatif mais une importante modification du métabolisme énergétique cardiomyocytaire est délétère car il induit une lipotoxicité (Augustus *et al.*, 2006). La lipotoxicité est un phénomène pathologique caractérisé par une accumulation de lipides et une suractivation des voies de signalisation lipidiques responsables de stress qui, à terme, provoque des dysfonctions cellulaires (D'Souza *et al.*, 2016). L'ischémie cardiaque provoque une accumulation cardiaque de triglycérides (Bilheimer *et al.,* 1978; Huss *et al.*, 2001). En effet, les acides gras ne sont plus oxydés et

s'accumulent : ils sont stockés sous forme de triglycérides ou métabolisés en dérivés lipidiques toxiques (Drosatos *et al.*, 2013). Le stockage sous forme de triglycérides permet d'abord de gérer l'excès d'acides gras libres mais rapidement les capacités de stockage sous forme de gouttelettes lipidiques sont dépassées. La lipotoxicité cardiaque induit une inflammation, du stress oxydant, des dysfonctions mitochondriales et de l'apoptose et ainsi une altération des voies de signalisation cellulaires, de la structure des cardiomyocytes et de la fonction contractile (Drosatos *et al.*, 2013).

2.4.1.3. Acidification du milieu & altération ionique

La glycolyse anaérobie génère du lactate qui en l'absence de flux sanguin pour l'éliminer, s'accumule dans les cardiomyocytes. Le métabolisme anaérobique et la réduction de l'élimination des déchets métaboliques provoquent une accumulation de protons (H^+) et ainsi une acidification du milieu intracellulaire des cardiomyocytes. Cette acidification s'accompagne d'une altération de l'homéostasie ionique. En effet, afin de rétablir le pH intracellulaire, un échangeur Na^+/H^+ est activé et permet d'éliminer les protons : du sodium entre. L'influx de sodium, à son tour, active un échangeur Na^+/Ca^{2+} pour éliminer le sodium excédentaire. Il en résulte une accumulation de calcium intracellulaire qui induit une altération de la fonction contractile des cardiomyocytes (Hausenloy *et al.*, 2016 ; Murphy *et al.*, 2008).

2.5. Reperfusion

Afin de limiter la mortalité cellulaire et préserver les fonctions cardiaques, il est impératif de rétablir la circulation sanguine le plus précocement possible pour restaurer l'apport en nutriments et en oxygène et éliminer les déchets métaboliques. L'amélioration de la prise en charge de l'infarctus du myocarde, grâce à l'apport des techniques de reperfusion (angioplastie coronaire, thrombolyse et pontage) et à la rapidité d'intervention des secours, a permis de réduire la mortalité post-infarctus (Fröhlich *et al.*, 2013). Cependant, la reperfusion, bien qu'indispensable, provoque des dommages additionnels à ceux provoqués par l'ischémie : les lésions de reperfusion, décrites pour la première fois par Jennings *et al.* (1960). Elles se manifestent sous différentes formes : arythmies ventriculaires, sidération myocardique (dysfonction cardiaque post-reperfusion dans la zone à risque), phénomène de *no-reflow* (obstruction microvasculaire résiduelle s'opposant à la reperfusion d'une zone ischémiée) et nécrose additionnelle (Yellon *et al.,* 2007). Les lésions de reperfusion contribuent à l'étendue de la zone infarcie : elles touchent les cellules qui étaient viables juste avant la reperfusion. Elles participent à la mortalité et au développement d'une insuffisance cardiaque malgré une reperfusion optimale du myocarde et représentent la limite majeure des techniques de

reperfusion. Aujourd'hui, la problématique de l'infarctus du myocarde repose sur la mise en place de stratégies cardioprotectrices pour réduire ces lésions de reperfusion et ainsi limiter les séquelles de l'infarctus que sont le remodelage, l'hypertrophie et à terme l'insuffisance cardiaque (Heusch 2020).

2.5.1. Lésions de reperfusion

La reperfusion restaure rapidement l'apport en oxygène et en nutriments ainsi que le pH cellulaire. Elle s'accompagne d'une génération massive d'espèces réactives de l'oxygène et un fort influx de calcium (Ca^{2+}) (Hausenloy *et al.*, 2016).

2.5.1.1. Paradoxe de l'oxygène

La reperfusion d'un myocarde ischémié restaure la circulation sanguine mais cette restauration est rapide et brutale : elle provoque un afflux massif d'oxygène. La chaîne respiratoire mitochondriale est réactivée et la production aérobie d'ATP reprend. Il en résulte une production massive d'espèces réactives de l'oxygène (Cadenas 2018) amplifiée par le phénomène de *ROS induced ROS released* (Zorov *et al.*, 2014). Ce processus consiste à la génération et la libération d'espèces réactives de l'oxygène, par un compartiment cellulaire, provoquées par la libération d'espèces réactives de l'oxygène d'un autre compartiment cellulaire : ceci entraîne un emballement du stress oxydant. Les espèces réactives de l'oxygène, en plus de leur pouvoir oxydant délétère, s'opposent aux effets cardioprotecteurs du monoxyde d'azote (NO). Le stress oxydant généré à la reperfusion participe largement aux dommages cellulaires des lésions de reperfusion (Granger *et al.,* 2015; Murphy *et al.,* 2008).

2.5.1.2. Paradoxe du calcium

A la reperfusion, les mécanismes de rééquilibration du pH cytosolique entraînent une entrée massive de calcium dans les cardiomyocytes (Murphy *et al.*, 2008). L'excès de calcium cytosolique active différentes enzymes dépendantes du calcium comme les phospholipases ou les endonucléases qui vont dégrader le contenu intracellulaire (Morin *et al.*, 2009). La surcharge calcique peut provoquer une dysfonction de la contraction qui se traduit par des contractions anarchiques et de l'hypercontracture des cardiomyocytes. En outre, en raison de la ré-énergisation et de la restauration du potentiel de membrane mitochondrial, le calcium s'accumule également dans les mitochondries et provoque l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (Bernardi *et al.,* 2015 ; Yellon *et al.*, 2007). Celui-ci induit le gonflement des mitochondries qui peut conduire à leur éclatement et à la libération de facteurs pro-apoptotiques qui participent à la mortalité cellulaire (voir paragraphe 2.5.2, page 51).

2.5.1.3. Paradoxe du pH

La restauration de la circulation sanguine permet de rétablir rapidement le pH physiologique dans les cellules cardiaques d'une part en éliminant les déchets métaboliques, notamment l'acide lactique produit lors de l'ischémie et d'autre part en activant l'échangeur Na^+/HCO_3^-. Il en résulte une alcalose délétère.

2.5.1.4. Inflammation

Suite aux lésions d'ischémie-reperfusion, les cellules cardiaques relarguent des molécules chémo-attractrices et attirent des neutrophiles dans la zone infarcie qui vont migrer dans le myocarde. Ces neutrophiles provoquent des obstructions vasculaires et relarguent des enzymes de dégradation et des espèces réactives de l'oxygène (Vinten-Johansen 2004). Dans un premier temps, l'inflammation favorise la cicatrisation du myocarde mais si elle est excessive, elle peut engendrer des lésions supplémentaires et induire un remodelage délétère pour la fonction cardiaque (Timmers *et al.*, 2012).

2.5.1.5. Lipotoxicité

Plusieurs études cliniques ont révélé un dépôt de lipides dans la zone ischémiée de patients pris en charge pour un infarctus du myocarde (Ahn *et al.* 2009 ; Goldfarb *et al.*, 2009 ; Ichikawa *et al.,* 2009 ; Su *et al.,* 2004). Une étude récente a comparé les lipides de ventricules gauches humains de sujets atteints d'infarctus du myocarde dans les zones non-infarcies et infarcies : ces dernières sont massivement chargées en cholestérol estérifié et en sphingolipides (présents à la membrane et particulièrement au niveau des rafts lipidiques) (Samouillan *et al.*, 2020) or il a été démontré qu'une accumulation lipidique au niveau de la zone infarcie s'accompagnait de dysfonctions contractiles (Sharma *et al.*, 2004). Une autre étude *in vitro* suggère que l'accumulation cardiaque de lipides altérerait l'homéostasie calcique des cardiomyocytes (Castellano *et al.*, 2011). En plus de l'accumulation de triglycérides liée au changement métabolique des cardiomyocytes, des études *in vitro*, *in vivo* et cliniques ont démontré que l'ischémie-reperfusion augmente l'expression des récepteurs aux lipoprotéines et entraîne ainsi une entrée massive de lipides, et notamment de cholestérol, qui s'accumulent dans les gouttelettes lipidiques des cardiomyocytes (Cal *et al.*, 2012a ; 2012b). La délétion des récepteurs aux VLDL chez la souris a permis d'inhiber cette accumulation lipidique et de réduire la taille de l'infarctus dans un modèle d'ischémie-reperfusion et d'améliorer la survie des animaux, en protégeant notamment le réticulum endoplasmique (Perman *et al.*, 2011).

2.5.2. Implication des mitochondries

Les mitochondries sont les centrales énergétiques des cardiomyocytes et produisent l'énergie, sous forme d'ATP, nécessaire à la fonction contractile (Balaban 2012). La chaîne respiratoire mitochondriale est une source importante d'espèces réactives de l'oxygène : une petite partie de l'oxygène utilisé lors de la phosphorylation oxydative est incomplètement réduite et produit des d'espèces réactives de l'oxygène, en particulier l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le péroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les mitochondries sont la principale source des espèces réactives de l'oxygène mais en sont également la cible privilégiée (Muntean *et al.*, 2016). Par ailleurs, les mitochondries jouent un rôle dans la régulation de la concentration calcique du cytosol (avec le réticulum endoplasmique) (Gao *et al.,* 2020) et dans l'apoptose (libération de molécules pro-apoptotiques, notamment le cytochrome C et l'*apoptose inducing factor*) (Nunnari *et al.,* 2012). L'ischémie-reperfusion constitue une forte altération du métabolisme énergétique des cardiomyocytes pendant l'ischémie puis à nouveau lors de la reperfusion et les mitochondries en sont des acteurs majeurs (Zuurbier *et al.*, 2020).

La reperfusion crée des conditions favorables à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale qui joue un rôle majeur dans les lésions de reperfusion et de la mort cellulaire qui y est associée (Bernardi *et al.*, 2015a ; Halestrap *et al.*, 2015). En effet, l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale provoque la perméabilisation de la membrane interne, à l'origine de la dissipation du gradient de protons et de la perte du potentiel de membrane. La pression oncotique de la matrice mitochondriale est supérieure à celle du cytosol : les ions s'équilibrent de part et d'autre de la membrane interne. Des protons et de l'eau entrent ainsi dans les mitochondries et provoquent leur gonflement. La persistance de l'ouverture du pore et du gonflement de la mitochondrie engendre la rupture de sa membrane externe et des facteurs pro-apoptotiques contenus dans l'espace intermembranaire sont libérés dans le cytoplasme (Morin *et al.*, 2009). Les cellules meurent alors par nécrose ou apoptose selon l'ampleur du phénomène. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale est un complexe multiprotéique qui se forme au niveau des zones de contact entre les membranes mitochondriales et dont la limite d'exclusion est de 1,5 kDa. Le mécanisme de formation de ce pore reste aujourd'hui à élucider (Panel *et al.*, 2017a). De nombreuses molécules ont été envisagées comme constituant ou stabilisateur (Bernardi *et al.*, 2015a) et les études plus récentes suggèrent l'implication de l'ATP synthase (complexe V de la chaîne respiratoire mitochondriale) dans la formation de ce pore (Bernardi *et al.,* 2015b). Sa fonction physiologique ainsi que sa composition exacte restent aujourd'hui méconnues mais certains régulateurs ont été identifiés. Le calcium mitochondrial est l'inducteur principal du pore de

transition de perméabilité mitochondriale (Hunter et al., 1979) mais le seuil calcique nécessaire à son ouverture dépend fortement d'autres conditions, comme le stress oxydant, les taux de nucléotides adényliques et de phosphate. La cyclophiline D a été identifiée comme un modulateur essentiel du pore car elle diminue le seuil calcique mitochondrial induisant son ouverture (Javadov *et al.*, 2017). Cependant, des études sur des souris transgéniques délétées pour la cyclophiline D (*Ppif* $^{-/-}$) ont démontré qu'elle n'était pas nécessaire à l'induction du pore de transition de perméabilité mitochondriale en présence de fortes concentrations de calcium. Les espèces réactives de l'oxygène sont des régulateurs du pore de transition de perméabilité mitochondriale car elles augmentent la sensibilité au calcium intramitochondrial (Bernardi *et al.*, 2015a ; Halestrap 2009).

2.6. Stratégies cardioprotectrices

2.6.1. Généralités

La cardioprotection a pour objectif de s'opposer aux lésions de reperfusion et de protéger les cellules encore viables à la fin de l'ischémie qui meurent à la reperfusion : elle est donc complémentaire de la reperfusion. Depuis la description des lésions de reperfusion par Jennings *et al.* (1960), de nombreuses stratégies ont été testées au gré de la compréhension des mécanismes impliqués. Le pré-conditionnement, découvert par Murry *et al.* (1986), représente la plus grande avancée dans ce domaine. Le pré-conditionnement consiste à appliquer plusieurs cycles brefs d'occlusion-revascularisation avant l'ischémie. Il permet de réduire significativement la taille de l'infarctus après reperfusion (Murphy *et al.*, 2008). Bien que cette stratégie ne soit pas transposable en clinique, elle a été très largement étudiée et a permis la compréhension de nombreux mécanismes impliqués dans les lésions de reperfusion (Hausenloy *et al.*, 2016). Trois voies de signalisation principales interviennent dans le processus de cardioprotection du pré-conditionnement : la voie RISK (*Reperfusion Injury Salvage Kinase*) (Yellon *et al.*, 2007), la voie SAFE (*Salvage Activating Factor Enhancement*) (Lecour 2009) et la voie de la protéine kinase G (Inserte *et al.*, 2013). Les mitochondries en sont l'effecteur final car ces voies s'opposent à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (Panel *et al.*, 2017). Plusieurs stratégies thérapeutiques ont ensuite été développées : le post-conditionnement et le conditionnement à distance de la zone ischémiée, l'administration de molécules pharmacologiques et les interventions physiques, comme l'hypothermie corporelle ou la stimulation électrique (Davidson *et al.*, 2019). Actuellement, il est envisagé de combiner ces différentes stratégies pour intervenir à différents temps (juste avant la reperfusion, pendant et après), cibler différentes cellules (cardiomyocytes, autres cellules cardiaques et cellules circulantes) et différentes voies (activer les voies de

cardioprotection et inhiber les voies de mort cellulaire), et ainsi d'additionner, voire de potentialiser les effets cardioprotecteurs de chacune. Cependant, aujourd'hui encore, il n'existe pas de solution thérapeutique efficace pour réduire les lésions de reperfusion. L'une des raisons majeures de cet échec est probablement la nature des modèles expérimentaux utilisés pour développer ces stratégies cardioprotectrices. Par exemple, la plupart des études ont été réalisées sur des animaux jeunes et en bonne santé, malgré les très nombreuses études cliniques démontrant les effets majeurs des comorbidités et de leurs traitements sur la gravité de l'infarctus du myocarde et la réponse aux stratégies thérapeutiques. De plus, les animaux sont généralement sacrifiés à court terme après l'ischémie-reperfusion, ce qui ne permet pas l'étude des mécanismes tardifs d'adaptation. Les anesthésiques utilisés pour réaliser les infarctus expérimentaux, selon leur nature et le modèle animal, peuvent interférer avec les voies de signalisation activées lors de l'ischémie-reperfusion. Par ailleurs, les procédures expérimentales chez les animaux sont très rarement réalisées en aveugle, ce qui induit un risque de biais. Ceci se traduit par un fort taux d'échecs des traitements expérimentaux lorsqu'ils sont testés en clinique (Davidson *et al.*, 2019 ; Hausenloy *et al.*, 2013 ; Lecour *et al.*, 2014). La prise en compte des comorbidités et des traitements associés est également cruciale pour la prise en charge des patients (Davidson *et al.*, 2019).

2.6.2. Mitoprotection

Les différentes voies de signalisation activées lors de l'ischémie-reperfusion convergent au niveau des mitochondries (Heusch 2015) et induisent une perméabilisation membranaire délétère qui joue un rôle central dans les lésions de reperfusion. La perméabilisation mitochondriale représente donc une cible intéressante pour la recherche de stratégies cardioprotectrices (Morin *et al.*, 2009). Les stratégies ciblant les dysfonctions mitochondriales sont nombreuses et malgré des résultats expérimentaux très encourageants, aucune à ce jour n'a permis d'améliorer significativement le pronostic des patients en clinique. Les voies RISK et SAFE ont été ciblées par différents agents pharmacologiques mais les essais cliniques n'ont pas été concluants. Afin de limiter l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale à la reperfusion, ses régulateurs majeurs ont été largement étudiés *in vitro* et *in vivo* (Hausenloy 2003). En raison de la complexité et du caractère essentiel de l'homéostasie calcique dans la fonction cardiaque, il n'y a pas eu à ce jour d'essais cliniques visant à limiter l'accumulation de calcium à la reperfusion. Le stress oxydant mitochondrial est un autre inducteur de l'ouverture du pore mais les stratégies anti-oxydantes testées en clinique n'ont pas été concluantes, une raison évoquée pour ces échecs étant l'absence de sélectivité mitochondriale des molécules anti-oxydantes (Panel *et al.*, 2017 ; Hausenloy *et al.,* 2017). Une

première étude clinique a montré les effets cardioprotecteurs de l'inhibition de la cyclophiline D par la ciclosporine A (Mewton *et al.*, 2010; Piot *et al.*, 2008). Cependant, deux études cliniques de phase III, CIRCUS et CYCLE, n'ont pas confirmé ces résultats (Cung *et al.*, 2015; Ottani *et al.*, 2016). Suite à ces échecs, de nouvelles molécules sont développées pour cibler la cyclophiline D de façon plus spécifique et limiter les effets secondaires toxiques.

L'infarctus du myocarde est un problème de santé majeur avec une forte incidence et des séquelles aboutissant à une insuffisance cardiaque. Le cholestérol joue un rôle majeur dans cette pathologie : à la fois dans l'étiologie, la physiopathologie et la réponse aux traitements. La reperfusion de l'artère occluse est la seule option thérapeutique actuellement disponible mais elle engendre des lésions supplémentaires. Afin de limiter les lésions de reperfusion, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies cardioprotectrices. Les mitochondries sont des acteurs centraux des lésions de reperfusion car elles sont le siège d'altérations ioniques et métaboliques majeures et sont l'effecteur final des voies de signalisation de mort cellulaire mais aussi de survie. C'est pourquoi, elles sont particulièrement ciblées pour élaborer des stratégies cardioprotectrices. Le laboratoire d'accueil s'intéresse, dans le cadre de la cardioprotection, à une protéine mitochondriale qui a fait l'objet de nombreuses études *in vitro*, *in vivo* et cliniques : la protéine translocatrice de 18 kDa, TSPO. A ce jour, le rôle de cette protéine n'est pas clairement élucidé mais elle est impliquée dans le transport mitochondrial de cholestérol qui fait l'objet de la dernière partie de cette synthèse.

3. TRANSPORT MITOCHONDRIAL DE CHOLESTEROL

3.1. Généralités

Les mitochondries utilisent le cholestérol pour la biosynthèse de molécules biologiques mais également pour la structure de leurs membranes. Le cholestérol est transporté par trois mécanismes intracellulaires : au travers de vésicules ; par des protéines de transfert lipidique ou par diffusion entre organites. Le cholestérol mitochondrial est principalement issu de la synthèse *de novo* située dans le réticulum endoplasmique et des esters de cholestérol stockés dans les gouttelettes lipidiques (Kraemer *et al.*, 2013). Les mitochondries et le réticulum endoplasmique interagissent au travers de régions de forte proximité, appelées *Mitochondria-Associated Membranes* (MAM) (Vance 2014), qui sont particulièrement riches en cholestérol et pourraient donc être une source de cholestérol pour les mitochondries. Dans les tissus stéroïdogènes, STAR est la principale protéine de transfert lipidique qui transporte le cholestérol à la membrane externe où il est pris en charge par des complexes multiprotéiques pour permettre son entrée dans la matrice mitochondriale (voir paragraphe 3.2, page 56) (Papadopoulos *et al.*, 2015). Dans les tissus non stéroïdogènes, ce sont des protéines de la famille *STAR-related lipid transfer* qui pourraient permettre le transport de cholestérol à la mitochondrie. Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un domaine de liaison au cholestérol similaire à celui de la protéine STAR. Il existe deux autres familles de protéines qui permettent le transport non vésiculaire de cholestérol intracellulaire : les protéines de liaisons aux oxystérols et la protéine porteuse de stérols 2 mais ces protéines n'ont pas été décrites dans le transport de cholestérol à la mitochondrie (Soffientini *et al.*, 2016). Cependant, les protéines composant les complexes multiprotéiques spécialisés présents dans les organes stéroïdogènes sont ubiquitaires : des complexes similaires pourraient donc être impliqués dans le transport mitochondrial de cholestérol dans les tissus non stéroïdogènes (Martin *et al.,* 2016).

Une augmentation du contenu mitochondrial de cholestérol a été décrite dans plusieurs pathologies : cancer, stéatose hépatique, maladie d'Alzheimer, maladie de Niemann Pick de type C et s'accompagne d'une augmentation du stress oxydant, une altération de la phosphorylation oxydative, une induction de l'apoptose, etc. En effet, en conditions basales, les mitochondries contiennent peu de cholestérol (au niveau de leurs membranes et dans leur matrice) (Horvath *et al.*, 2013) et une importante modification du cholestérol mitochondrial s'accompagne d'altérations membranaires et de dysfonctions (Elustondo *et al.*, 2017 ; Martin *et al.*, 2016).

3.2. Stéroïdogenèse des glandes endocrines

Le transport mitochondrial de cholestérol est principalement étudié dans le cadre de la stéroïdogenèse car c'est la première étape de la synthèse des hormones stéroïdes (voir paragraphe 1.2.3, page 31). C'est également la première étape de la biosynthèse des acides biliaires, bien que cette voie soit minoritaire (voir paragraphe 1.2.2, page 30) (Figure 14). L'apport du cholestérol à la mitochondrie est assuré par des protéines de transfert lipidique, cytosoliques et mitochondriales regroupées en complexes multiprotéiques : le transducéosome et le métabolon.

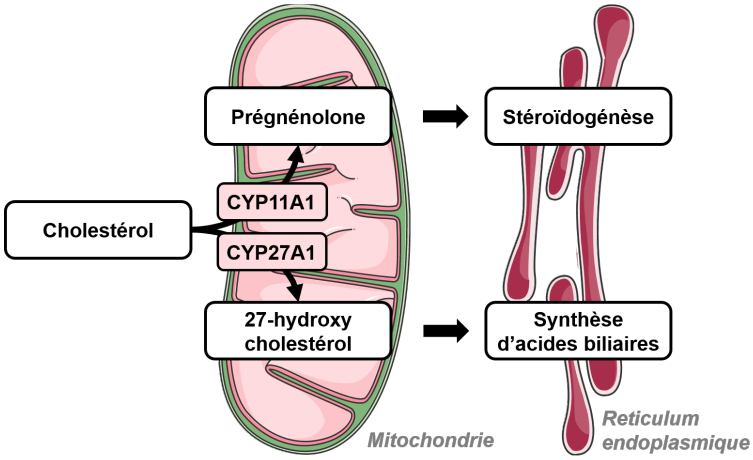


Figure 14 : Métabolisme du cholestérol dans la biosynthèse des hormones stéroïdes et des acides biliaires.
Le cholestérol est apporté à la membrane interne des mitochondries où il est métabolisé par le CYP11A1 en prégnénolone, précurseur de synthèse des hormones stéroïdes ou le CYP27A1 en 27-hydroxycholestérol, précurseur de synthèse des acides biliaires. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art et d'après Lacapère *et al.*, 2003.

Dans les tissus stéroïdogènes, les protéines impliquées dans le transport mitochondrial de cholestérol s'organisent en complexes multiprotéiques qui agissent en coordination sous contrôle hormonal. Le transducéosome, constitué de protéines cytosoliques et mitochondriales, permet l'apport de cholestérol à la membrane mitochondriale externe et le métabolon, constitué de protéines mitochondriales, permet le transfert du cholestérol depuis la membrane mitochondriale externe jusqu'à la matrice intramitochondriale (Issop *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2006 ; Papadopoulos *et al.*, 2015 ; Rone *et al.*, 2012) (Figure 15). Plusieurs études ont montré la présence d'une machinerie cellulaire comparable dans le tissu cardiaque (voir paragraphe 1.2.3, page 31) qui laisse envisager un transport mitochondrial de cholestérol similaire dans les cardiomyocytes, bien que cela reste à démontrer.

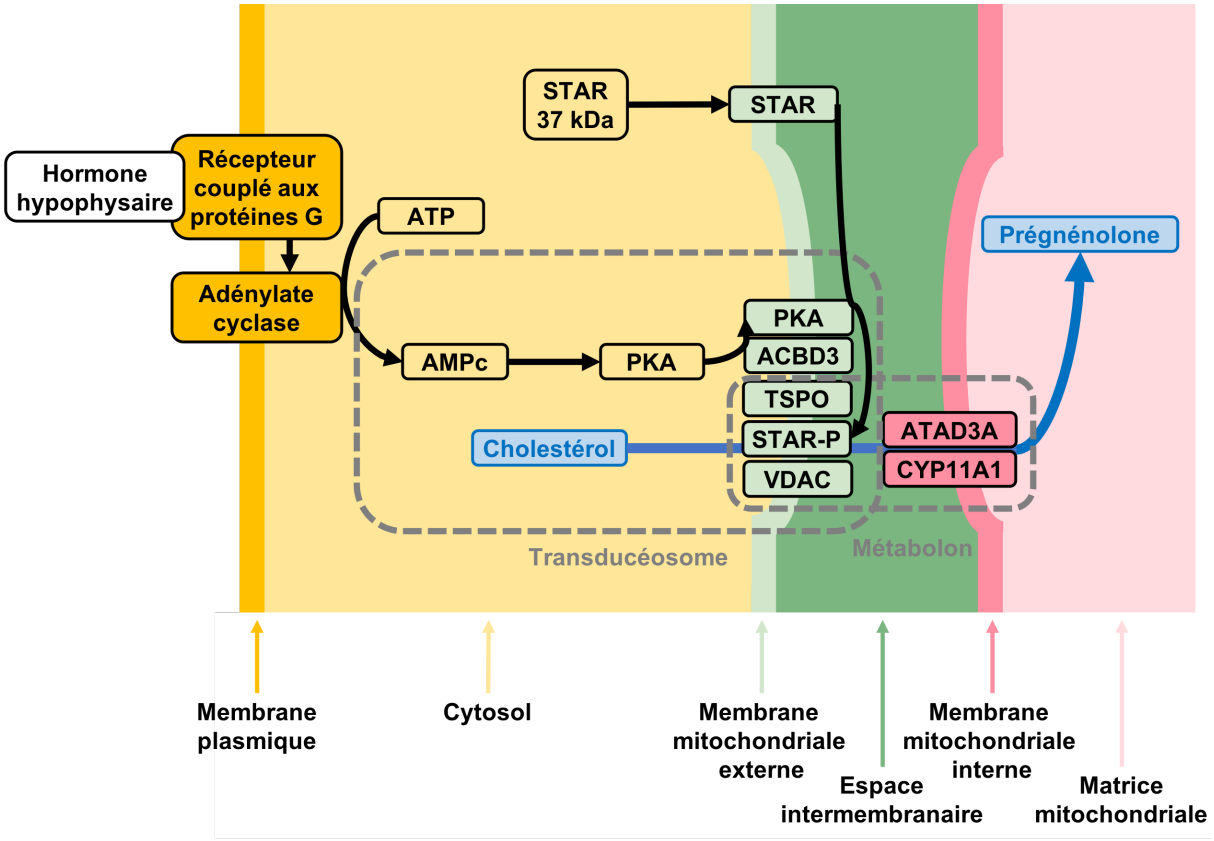


Figure 15 : Transport mitochondrial du cholestérol dans les tissus stéroïdogènes.
L'axe hypothalamo-hypophysaire régule la stéroïdogenèse. La fixation des hormones hypophysaires aux récepteurs couplés aux protéines G active l'adénylate cyclase qui catalyse la transformation d'ATP (adénosine triphosphate) en AMPc (adénosine monophosphate cyclique). L'AMPc libère les sous-unités catalytiques de la PKA (protéine kinase dépendante de l'AMPc) qui s'associe à l'ACBD3 (Acyl-co-enzyme A Binding Domain containing 3 protein), une protéine d'ancrage de la PKA liée à la TSPO (protéine translocatrice) qui permet le recrutement de la PKA au niveau de la membrane mitochondriale externe. La protéine STAR (protéine de la régulation aiguë de la stéroïdogenèse) s'ancre également à la membrane mitochondriale externe où elle est clivée puis phosphorylée par la PKA. Avec STAR phosphorylée, les protéines de la membrane mitochondriale externe, TSPO et VDAC (canal anionique voltage dépendant) participent avec l'ATAD3A (ATPase family AAA Domain-containing protein 3), située au niveau de l'espace intermembranaire et de la membrane interne, au transport mitochondrial du cholestérol. Le cholestérol est métabolisé par le CYP11A1 (cholestérol monooxygénase), situé à la membrane mitochondriale interne, en prégnénolone qui est libéré dans la matrice mitochondriale. Le transducéosome et le métabolon se situent dans des zones particulières où les membranes mitochondriales interne et externe sont proches physiquement.

3.3. Protéine translocatrice : TSPO

3.3.1. Généralités

La découverte de sites de fixation du diazépam au niveau rénal par Braestrup et Squires (1977) a permis de révéler l'existence d'un récepteur périphérique aux benzodiazépines (*Peripheral Benzodiazepine Receptor* : PBR), maintenant connu sous le nom de protéine translocatrice de 18 kDa (TSPO) (Papadopoulos *et al.,* 2006). La TSPO est une protéine à cinq domaines transmembranaires, constituée de 169 acides aminés, soit environ 18 kDa. Elle est exprimée au niveau de la membrane externe des mitochondries, plus précisément au niveau des zones

de contact entre les membranes mitochondriales interne et externe (O'Beirne *et al.,* 1990). La TSPO est une protéine ancienne et fortement conservée dans l'évolution. En effet, on la retrouve dans la plupart des organismes vivants (archées, eucaryotes et bactéries) avec une forte homologie entre les espèces (Fan *et al.*, 2012). Le promoteur du gène *Tspo* est caractéristique des gènes de ménage (gènes constitutifs de protéines essentielles à l'organisme) (Batarseh *et al.*, 2010). La TSPO est une protéine ubiquitaire, mais elle est particulièrement exprimée dans les tissus stéroïdogènes (glandes surrénales et gonades) (Austin *et al.*, 2013) et également dans les tissus riches en mitochondries comme le myocarde. Au sein d'un même organe, la TSPO peut être exprimée de façon hétérogène selon les régions anatomiques, par exemple dans les glandes surrénales, TSPO est exprimée dans le cortex et presque pas dans la médullaire (Senicourt 2016). Son expression variable selon les tissus et sa capacité à fixer de nombreux ligands suggèrent son implication dans de nombreux processus physiopathologiques qui sont exposés dans cette section.

Il existe une isoforme de TSPO, la TSPO2 mais il n'en sera pas question dans les parties suivantes. Cette isoforme de la TSPO, exprimée uniquement chez les oiseaux et les mammifères, a été découverte en 2009 par l'équipe du Pr. Papadopoulos. La TSPO2 est localisée à la membrane du réticulum endoplasmique et nucléaire des tissus hématopoïétiques et des cellules de la lignée érythrocytaire (Fan *et al.*, 2009). Cette isoforme serait impliquée dans l'érythropoïèse car elle est associée à la synthèse des protéines de l'hémoglobine et jouerait un rôle dans la distribution cellulaire de cholestérol qui est déterminante pour la rigidité membranaire et ainsi pour la phase de maturation qui consiste en l'expulsion du noyau.

3.3.2. Fonctions

La plupart des fonctions attribuées à TSPO ont été identifiées à l'aide de ligands spécifiques de cette protéine, ce qui conduit à de nombreux débats quant à l'exactitude de ces conclusions (Papadopoulos *et al.*, 2006) et les fonctions de TSPO présentées dans cette partie sont remises en question par le développement de modèles *in vivo* de délétion du gène *Tspo* (voir paragraphe 3.4.4.2, page 63). Malgré l'implication de TSPO dans divers mécanismes biologiques, son rôle exact reste à éclaircir (Selvaraj *et al.*, 2015).

3.3.2.1. Stéroïdogenèse & biosynthèse des acides biliaires

La TSPO participe au transport mitochondrial de cholestérol au sein du transducéosome ce qui constitue la première étape de la stéroïdogenèse et de la biosynthèse mitochondriale d'acides biliaires. La TSPO est fortement exprimée dans les tissus stéroïdogènes (Lacapère *et al.*, 2003)

et possède une très forte affinité pour le cholestérol. Elle contient une région spécialisée : le domaine CRAC (*Cholesterol Recognition Aminoacid Consensus*) au niveau de l'extrémité N-terminale de sa cinquième hélice transmembranaire (Lacapère *et al.*, 2001). Les ligands de TSPO sont capables de stimuler la production de prégnénolone et la stéroïdogenèse *in vitro, in vivo* et en clinique (Lacapère *et al.*, 2003). Dans certains modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*, la délétion de TSPO réduit la stéroïdogenèse bien que ce ne soit pas le cas dans toutes les études (voir paragraphe 3.4.4.2, page 63). Enfin, les hormones stéroïdes et l'axe hypothalamo-hypophysaire semblent être impliqués dans le rétrocontrôle de l'expression de TSPO (Senicourt 2016).

Le DBI (*Diazepam Binding Inhibitor*), un polypeptide naturel, a été identifié comme ligand endogène de TSPO. Le DBI est capable de stimuler l'entrée de cholestérol dans les mitochondries isolées et c'est le précurseur d'un autre ligand endogène de TSPO : le TriakontaTétraNeuropeptide. Tous les deux sont impliqués dans la stéroïdogenèse et participent à sa régulation (James *et al.,* 2006). Des modèles expérimentaux *in vivo* de délétion de DBI ont été développés et semblent indiquer que ce peptide est essentiel au développement embryonnaire et qu'il régule la synthèse de cholestérol hépatique. Ces études n'ont pas évalué l'impact de sa délétion sur la stéroïdogenèse (Landrock *et al.,* 2010 ; Neess *et al.*, 2011). Comme la protéine du transducéosome ACBD3 (anciennement appelée PAP7), le DBI contient le domaine de liaison de l'acyl-CoA (ACBD) : il a donc été renommé ACBD1. Cela suggère que l'acyl-CoA pourrait réguler la fonction mitochondriale de TSPO (Mokrov *et al.*, 2021).

3.3.2.2. Biosynthèse de l'hème & érythropoïèse

Le transport du dioxygène des érythrocytes est assuré par l'hémoglobine. Cette métalloprotéine est constituée de quatre chaînes peptidiques associées à un groupement d'hème. Ce dernier est constitué de protoporphyrines IX liées à du fer ; la protoporphyrine IX étant la principale porphyrine chez les mammifères. Ces molécules sont synthétisées en majorité dans la moelle osseuse où TSPO est fortement exprimée. La biosynthèse des porphyrines est initiée par une enzyme mitochondriale, les intermédiaires de synthèse sont ensuite métabolisés dans le cytoplasme puis la synthèse se termine dans la mitochondrie (Figure 16). L'hème, la protoporphyrine IX et dans une moindre mesure le coproporphyrinogène III sont des ligands naturels de TSPO (Verma *et al.*, 1987 ; Taketani *et al.*, 1995). Ces éléments ont abouti à l'hypothèse que TSPO pourrait être impliquée dans la translocation mitochondriale du précurseur des porphyrines et ainsi dans la biosynthèse de l'hème (Zhuo *et al.*, 2011).

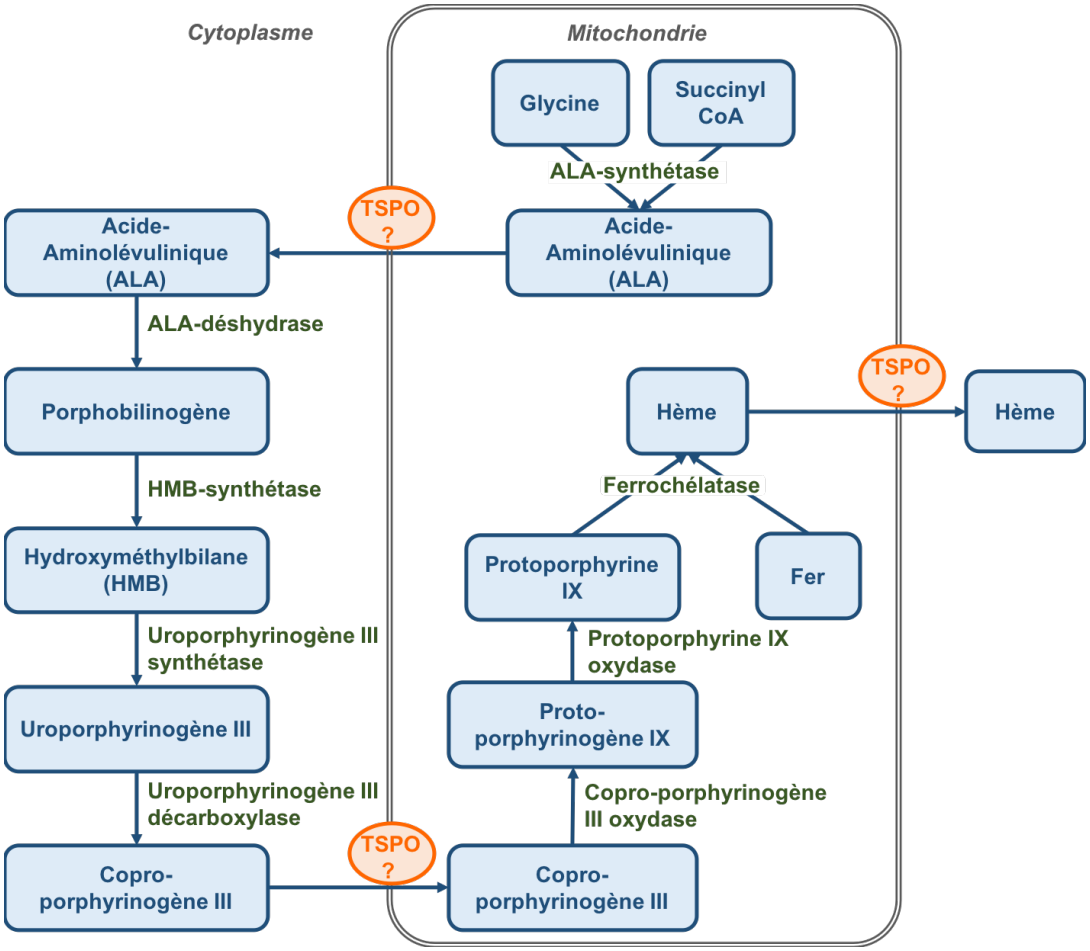


Figure 16 : Biosynthèse de l'hème.
Les enzymes sont en vert, les substrats et les produits de synthèse sont en bleu. Au niveau mitochondrial, de l'acide aminolévulinique (ALA) est synthétisé par l'ALA synthase à partir de glycine et de succinyl CoA. Dans le cytoplasme, l'ALA subit une suite de réactions qui aboutit à la formation de coproporphyrinogène III qui est transporté dans la mitochondrie où les dernières étapes de formation de l'hème se déroulent.

3.3.2.3. Stress oxydant mitochondrial

La superoxyde dismutase mitochondriale (SOD2) est une enzyme centrale dans le maintien de l'homéostasie redox cellulaire : elle transforme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Elle est synthétisée dans le cytosol sous forme de précurseur puis est transportée dans la mitochondrie. Une étude expérimentale a montré que des ligands de TSPO augmentent l'import mitochondrial de SOD2 (Wright *et al.*, 1999). De plus, la TSPO interagit avec le VDAC (McEnery 1992) et le rapport cellulaire TSPO/VDAC semble être un indice de stress oxydant mitochondrial : la liaison entre VDAC et TSPO réduirait le couplage mitochondrial et favoriserait une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (Gatliff *et al.*, 2014 ; Morin *et al.*, 2019). En effet, une étude a démontré que la phosphorylation de VDAC par la PKA induit une altération de l'homéostasie calcique cellulaire médiée par TSPO. Ce

mécanisme n'est pas totalement élucidé, mais il est possible que, comme dans le transducéosome, la PKA soit encrée à la membrane mitochondriale interne au travers des protéines ACBD3 et TSPO pour réguler VDAC par phosphorylation. Ce dernier participe au transport mitochondrial de calcium, en association avec l'uniporteur mitochondrial de calcium, mais peut également avoir un impact sur la phosphorylation oxydative en contrôlant le taux d'échange de nucléotides adényliques à travers la membrane mitochondriale externe (Vander Heiden *et al.*, 2000). La régulation de VDAC par la PKA pourrait donc être à l'origine de la génération d'espèces réactives de l'oxygène en altérant la phosphorylation oxydative et en activant la NADPH oxydase dépendante du calcium (Gatliff *et al.*, 2017). Pendant longtemps l'association de TSPO avec le VDAC mais aussi avec le transporteur d'adénine nucléotide (ANT) a été considérée comme la structure du pore de transition de perméabilité mitochondriale (Hiser *et al.*, 2021; Zorov *et al.*, 2009). Celle-ci a depuis été actualisée et ces trois protéines ne semblent plus en faire partie (Bernardi *et al.*, 2021). Cependant l'implication de TSPO dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène n'a pas été remise en question.

3.3.2.4. Inflammation

La protéine TSPO est surexprimée en cas de neuro-inflammation, caractéristique des pathologies neurologiques et psychiatriques (Meyer *et al.*, 2020). De ce fait, les ligands de TSPO sont très étudiés dans ces pathologies (Rupprecht *et al.*, 2010). En effet, TSPO est un marqueur d'activation des macrophages et de la microglie. Ce paramètre permet d'ailleurs d'évaluer cette inflammation en clinique par tomographie par émission de positons grâce à des ligands radiomarqués de TSPO (Schain *et al.,* 2017). On retrouve également une forte expression de TSPO dans les plaques d'athérome, qui sont le siège d'une forte inflammation et dans lesquelles les macrophages activés s'infiltrent (Bird *et al.*, 2010). Bien que de nombreuses études aient clairement établi une surexpression de TSPO en cas d'inflammation, son rôle exact dans l'inflammation reste à définir. Cependant, une revue récente implique l'inflammasome NLRP3 dans l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque, ce qui en fait une cible particulièrement intéressante dans les pathologies cardiovasculaires (Abbate *et al.*, 2020). L'inflammasome NLRP3 joue un rôle majeur dans l'inflammation, notamment dans la production d'interleukine-1β, et des études récentes ont mis en évidence le lien entre la TSPO et cet inflammasome (Feng *et al.*, 2020 ; Scaini *et al.*, 2019 ; Wang *et al.*, 2022).

3.3.2.5. Autres

La TSPO pourrait également être impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique. En effet, certains ligands de TSPO induisent une forte libération de calcium. La TSPO jouerait également un rôle dans la mort cellulaire et notamment dans l'apoptose. Cette fonction a été attribuée à TSPO en raison des propriétés anti- et pro-apoptotiques de ses ligands (Veenman *et al.,* 2007) et son implication dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène, responsable de la libération de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux (Veenman *et al.*, 2008). Cependant, le rôle précis que joue TSPO dans ce processus est à ce jour inconnu. Enfin la TSPO serait impliquée dans d'autres processus biologiques comme la prolifération et la différenciation cellulaire (Papadopoulos *et al.*, 2006).

3.3.3. Pathologies associées

La TSPO est impliquée dans de nombreuses pathologies comme les maladies cardiovasculaires (voir paragraphe 3.3.5, page 76), les atteintes du système nerveux central (troubles psychiatriques et maladies neurodégénératives) et également dans certains cancers (Papadopoulos *et al.,* 2006).

Certains troubles psychiatriques s'accompagnent d'une altération de l'expression de TSPO. Par exemple, les patients dépressifs sur-expriment TSPO au niveau cérébral (Setiawan *et al.*, 2015) tandis qu'une sous-expression a été observée dans les cellules circulantes. Chez les patients atteints d'anxiété ou de stress post-traumatique, l'expression de TSPO est fortement réduite dans les cellules circulantes (Arbo *et al.*, 2015). De plus, de nombreux troubles psychiatriques sont liés à un polymorphisme de TSPO (voir paragraphe 3.3.4.1, page 63). Plusieurs ligands de TSPO ont été testés en clinique et aujourd'hui, seule l'étifoxine est autorisée en France pour le traitement des troubles de l'anxiété (Nguyen *et al.*, 2006). De même, le XBD173 (ou emapunil ou AC-5216) possède des propriétés anxiolytiques chez l'Homme (Rupprecht *et al.*, 2009). Ces effets seraient liés à la stimulation de la neurostéroïdogenèse (Nothdurfter *et al.*, 2012). La TSPO est également sur-exprimée dans les cellules gliales dans de nombreuses maladies neurodégénératives, comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington et la sclérose en plaques (Rone *et al.,* 2009), qui sont caractérisées par la présence d'une neuro-inflammation (James *et al.,* 2006). De nombreuses études in *vitro* et *in vivo* ont permis de mieux comprendre les mécanismes neurodégénératifs impliquant TSPO comme l'altération de la neurostéroïdogenèse, la libération de cytokines et la génération d'espèces réactives de l'oxygène. Cependant, à l'heure actuelle, aucune stratégie ciblant TSPO dans ces pathologies n'est testée en clinique (Tremolanti *et al.*, 2022). Dans certains cancers, comme le cancer

colorectal, du sein et de la prostate, la protéine TSPO est surexprimée, ce qui a été associé à une plus forte agressivité des tumeurs (Galiègue *et al.*, 2004 ; Hardwick *et al.,* 1999 ; Maaser *et al.*, 2005) et certains ligands de TSPO semblent avoir des propriétés antiprolifératives. C'est pourquoi la TSPO a été proposée comme cible potentielle pour le développement de chimiothérapies (Austin *et al.,* 2013).

3.3.4. Mutations de TSPO

3.3.4.1. Mutations chez l'Homme

Une équipe japonaise a mis en évidence une augmentation de la TSPO dans le cerveau de patients schizophrènes (Kurumaji *et al.,* 1997) puis a identifié deux polymorphismes mononucléotidiques chez ces patients : *Ala147Thr* (substitution de l'alanine par une thréonine en position 147 de la chaîne peptidique de TSPO) et *Arg162His* (substitution de l'arginine par une histidine en position 162). Cependant, une étude menée sur une population plus importante n'a pas montré d'augmentation significative de ces mutations chez les patients schizophrènes par rapport aux volontaires sains (Kurumaji *et al.*, 2000). Une autre équipe japonaise a mis en évidence une corrélation entre le niveau d'anxiété des patients et l'expression de TSPO (Nakamura *et al.,* 2002) et a démontré une augmentation significative de la prévalence de la mutation *Arg162His* chez les patients atteints de trouble panique (Nakamura *et al.*, 2006). Le polymorphisme mononucléotidique *Ala147Thr* a été étudié chez des individus sains. Les individus porteurs de cette mutation présentaient une diminution de la prégnénolone dans les leucocytes circulants et une augmentation des LDL riches en cholestérol (Costa *et al.,* 2009a). La même équipe a ensuite étudié les polymorphismes *Ala147Thr* et *Arg162His* chez des patients atteints de dépression et d'anxiété. Ces derniers étaient plus porteurs de la mutation *Ala147Thr* et celle-ci était associée à un phénotype plus anxieux.

L'alanine est un acide aminé non polaire alors que la thréonine est polaire : cette substitution pourrait donc avoir des effets fonctionnels notamment sur la liaison du cholestérol à TSPO. La mutation *Arg162His* n'était corrélée ni au phénotype dépressif ni au phénotype anxieux (Costa *et al.*, 2009b). De nombreux troubles psychiatriques ont été associés à de faibles niveaux d'hormones stéroïdes, faisant de TSPO une cible d'intérêt pour ces pathologies (Pozzo *et al.,* 2012). Une étude a établi une corrélation entre le polymorphisme *Ala147Thr* et les troubles bipolaires et a émis l'hypothèse que ce polymorphisme altère la régulation de la stéroïdogenèse par l'axe hypothalamo-hypophysaire (Colasanti *et al.,* 2013). L'équipe du Pr. Papadopoulos a démontré *in vitro* une diminution de l'affinité de TSPO porteuse du polymorphisme *Ala147Thr*

pour le cholestérol et que cette mutation réduisait la production de cortisol stimulée par la corticotrophine chez des patients sains (Owen *et al.*, 2017).

L'ensemble de ces résultats indiquent que le polymorphisme *Ala147Thr* modifie l'affinité de TSPO pour le cholestérol donc altère la stéroïdogenèse, notamment au niveau cérébral, et est associé à des troubles psychiatriques.

3.3.4.2. Mutations expérimentales *in vivo*

Pendant longtemps, le développement de modèles murins de délétion totale de *Tspo* n'a pas abouti car les tentatives pour générer des souris délétées pour *Tspo* se sont soldées par leur mort au stade embryonnaire (Papadopoulos *et al.,* 1997). Cet article, cité dans chaque publication concernant la génération de modèles murins de délétion de *Tspo*, n'indique cependant aucune démarche expérimentale, ni de résultats concrets et ne se réfère pas à d'autres articles pour appuyer l'affirmation que la délétion de *Tspo* est létale à un stade embryonnaire. Le Pr. Papadopoulos nous a apporté des informations complémentaires à ce sujet. A l'époque, son équipe travaillait en collaboration avec le laboratoire Sanofi : ils ont tenté de générer des souris délétées pour *Tspo* en utilisant la méthode de recombinaison homologue en insérant de l'ADN artificiel dans les chromosomes contenus dans les noyaux des cellules souches embryonnaires *in vitro*. Cette technique n'a pas permis d'obtenir d'animaux à cause d'une forte mortalité embryonnaire. Au cours des dernières décennies, des progrès importants ont été effectués dans les techniques permettant la modification du génome, et des modèles d'animaux délétés pour *Tspo*, de façon tissu-spécifique ou totale, ont été développés. Cette partie résume de manière chronologique le développement de ces modèles, les résultats qu'ils ont permis d'obtenir et le débat sur le rôle physiologique potentiel de TSPO qu'ils ont généré. Seuls les modèles animaux sont présentés dans cette partie, les modèles expérimentaux de délétions de *Tspo* sur des bactéries, des levures et des cellules ne sont pas abordés.

- <u>Modèles non murins</u>

La première délétion *in vivo* du gène *Tspo* a été réalisée chez le poisson zèbre lors d'une étude portant sur le développement. Des embryons de poissons zèbres ont été traités avec des morpholinos spécifiques de *Tspo*. Ces embryons présentaient une forte mortalité liée à une altération de leurs cellules sanguines de la lignée érythrocytaire avec une diminution de leur hémoglobine (Rampon *et al.*, 2009).

Un autre modèle de délétion totale de *Tspo* a été développé chez la drosophile dans le cadre d'une étude sur l'apoptose. Les drosophiles mutées avaient un développement identique à celui des drosophiles sauvages, mais les mâles présentaient une protection contre l'apoptose et le stress oxydant, ainsi qu'une longévité prolongée. Cependant, au cours du vieillissement, les fonctions mitochondriales des drosophiles *Tspo*$^{-/-}$ étaient altérées avec une diminution de la respiration mitochondriale et de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire (sans toutefois de diminution de la quantité globale d'ATP dans l'organisme) et une augmentation du stress oxydant mitochondrial (Lin *et al.*, 2014). Cette même équipe a utilisé ce modèle pour étudier les mécanismes de prédisposition aux troubles liés à la consommation d'alcool (Lin *et al.*, 2015). En raison de l'implication décrite de TSPO dans les processus mitochondriaux (bioénergétiques, production d'espèces réactives de l'oxygène et apoptose), de son utilisation pour le diagnostic de pathologies impliquant une neuro-inflammation et de sa capacité à lier les benzodiazépines, les auteurs ont émis l'hypothèse que TSPO pourrait être impliquée dans la dépendance à l'alcool. Ils démontrent que la délétion de *Tspo* chez les drosophiles induit une augmentation de la sédation et de la tolérance à l'éthanol, médiée notamment par l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Cette étude révèle également une différence significative d'expression de TSPO entre les mâles et les femelles (Lin *et al.*, 2015).

En 2015, une étude s'est intéressée au rôle de TSPO et de VDAC dans la réponse immunitaire innée et la cicatrisation (Cho *et al.*, 2015). Les drosophiles délétées pour *Tspo* présentaient une une réponse altérée aux infections et aux lésions. Les auteurs en concluent que le complexe mitochondrial TSPO-VDAC pourrait interagir avec Parkin (une ligase d'ubiquitine E3 associée à la maladie de Parkinson) dans la réponse immunitaire et la cicatrisation (Cho *et al.*, 2015).

- <u>Modèles murins de délétions tissu-spécifiques</u>

Le premier modèle murin de délétion de *Tspo* était une délétion conditionnelle du gène dans les cellules stéroïdogènes des testicules (cellules de Leydig et Sertoli). Ces souris ont été obtenues grâce au système *Cre/LoxP*, utilisé pour induire une délétion entre les exons 2 et 3 du gène *Tspo* en plaçant la *Cre* sous le contrôle du promoteur de l'*Amrh2* (récepteur de type II de l'hormone anti Müllerienne). La délétion de *Tspo* au niveau testiculaire n'induisait pas d'altération morphologique, de spermatogénèse ou de production d'hormones stéroïdes (i.e. testostérone, estradiol, progestérone). La reproduction de ces animaux n'était pas affectée. De même, l'expression des gènes de protéines considérées comme partenaires de

TSPO (i.e. *Star*, *Cyp11a1* et 3-bêta-hydroxystéroïde déshydrogénase (*3β-HSD*)) n'était pas modifiée. Les auteurs s'étaient assurés que la délétion de *Tspo* n'était pas compensée par l'expression de *Tspo2*. Leur conclusion était que TSPO n'est pas indispensable à la stéroïdogenèse (Morohaku *et al.*, 2014).

Ces travaux ont immédiatement fait l'objet d'une critique pointant leurs biais, leurs limites et leurs raccourcis. En effet, ils concluaient à une absence de rôle de TSPO dans la stéroïdogenèse alors que l'étude portait uniquement sur les cellules de Leydig et de Sertoli. De plus, toutes les protéines identifiées dans les différentes étapes de la stéroïdogenèse fonctionnent en complémentarité au sein de complexes multiprotéiques. Il est donc difficile d'affirmer que TSPO n'est pas impliquée dans la stéroïdogenèse surtout que les résultats de plusieurs études majeures dans le domaine, menées sur de nombreux modèles, confirment sa participation au transport du cholestérol mitochondrial et à la stéroïdogenèse (Papadopoulos 2014).

Ces expériences de délétion (Morohaku *et al.*, 2014) ont été reproduites dans une autre étude, mais un faible pourcentage d'animaux délétés a été obtenu (4% contre les 25% attendus ; Fan *et al.,* 2015). Les auteurs ont émis l'hypothèse qu'à un stade embryonnaire précoce, l'*Amrh2* serait exprimée et ainsi *Tspo* serait délétée, de façon ectopique et non spécifique des tissus stéroïdogènes, entraînant la mort des embryons. Ils ont également observé une délétion incomplète de *Tspo* au niveau testiculaire chez les souris *Tspo*$^{-/-}$. Ils ont donc décidé de développer un modèle de délétion similaire mais avec la *Cre* sous le contrôle du promoteur d'un autre gène que l'*Amrh2* : le *Nr5a1* (facteur stéroïdogène 1). Les portées suivaient alors les lois de Mendel pour la répartition des sexes et des génotypes. Dans ce modèle, les souris délétées avaient des taux sanguins d'hormones stéroïdes (testostérone, progestérone, corticostérone) et une expression de protéines du transducéosome similaire aux souris sauvages. La production de corticostérone par stimulation hormonale des souris délétées était significativement réduite, contrairement à la testostérone qui n'était pas affectée par la délétion de *Tspo*. Une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les glandes surrénales des souris délétées était observée, associée à une réduction du stock lipidique dans les testicules et les ovaires : le métabolisme lipidique de ces animaux serait donc altéré (Fan *et al.,* 2015).

Dans ce modèle, les croisements hétérozygotes ont généré des souriceaux homozygotes délétés de petite taille, avec une croissance plus faible que les autres souriceaux de la même portée. A l'âge adulte, les taux sanguins de HDL et de triglycérides des souris délétées étaient comparables aux souris sauvages. Cependant, les souris délétées présentaient un phénotype

prédiabétique avec une hyperglycémie, une hypercholestérolémie, une augmentation de la glycation de l'hémoglobine A1c et une augmentation de la sécrétion d'insuline (Fan *et al.*, 2019). Approfondissant leur recherche sur l'embryogénèse des souris délétées, cette équipe a démontré que les embryons *Tspo*$^{+/-}$ et *Tspo*$^{-/-}$ présentaient un retard de croissance par rapport aux embryons *Tspo*$^{+/+}$ et a conclu que TSPO est nécessaire pour le développement embryonnaire précoce (Fan *et al.*, 2020). Ce modèle de délétion de *Tspo* est à présent commercialisé par le *Mutant Mouse Resource and Research Center* (MMRRC) de l'Université de Californie (MMRRC_067168-UCD). La description du phénotype des souris *Tspo*$^{-/-}$ par le MMRRC indique que leur développement embryonnaire préimplantatoire est retardé, que l'homéostasie des lipides neutres et la stéroïdogenèse sont altérées, et que ces souris présentent des modifications du transcriptome qui pourraient refléter des mécanismes compensatoires en réponse à la perte de fonction de TSPO.

Les modèles de délétion de *Tspo* au niveau des organes stéroïdogènes, utilisant la *Cre* sous le contrôle du promoteur de l'*Amrh2* (Morohaku *et al.*, 2014 ; Fan *et al.*, 2015), ont été discutés dans une étude qui a conclu que ce sont des modèles de délétions globales et non spécifiques des tissus stéroïdogènes (Fan *et al.*, 2020). En effet, l'*Amrh2* est exprimée à un stade précoce de l'embryogénèse et serait responsable d'une délétion totale de *Tspo*. Dans ce modèle « *Amrh2* » de délétion de *Tspo*, Fan *et al.* (2020) montrent que la délétion n'est que partielle au niveau testiculaire mais qu'elle induit une altération de l'homéostasie lipidique et une diminution des taux de testostérone. Pourtant, dans leur modèle « *Nr5a1* » qui permet une délétion spécifique et complète, il n'y a pas d'effet sur la testostérone. De même, le modèle « *Amrh2* » entraînait une altération de l'expression de certaines protéines impliquées dans la liaison et le transport du cholestérol qui serait le reflet de mécanismes compensatoires à l'absence de TSPO.

Ce dernier article a fait l'objet d'une critique contredisant les conclusions tirées (Selvaraj *et al.*, 2020). Les auteurs rappellent que plus d'une centaine de publications ont été basées sur le système *Cre/LoxP* sous contrôle du promoteur de l'*Amrh2* afin de générer des délétions spécifiques des tissus stéroïdogènes. Ils précisent qu'il est capital de n'utiliser que des mâles portant la *Cre* et non des femelles car cela peut conduire à des délétions totales et non tissu-spécifiques. Ils émettent l'hypothèse que Fan *et al.* (2015) auraient pu ne pas suivre cette recommandation, ce qui expliquerait l'obtention d'une délétion totale dans leur étude et pointent les incohérences entre les résultats des différentes études de l'équipe. La conclusion de cette publication est donc que TSPO n'est pas impliquée dans la stéroïdogenèse *de novo*,

appuyée par une revue des différents modèle de délétion de *Tspo* (Selvaraj *et al.*, 2020). A ce jour, il n'y a pas de consensus sur le rôle de TSPO dans la stéroïdogenèse.

Un modèle de souris délétées pour *Tspo* a également été développé pour étudier son rôle dans l'induction du pore de transition de perméabilité mitochondriale aux niveaux hépatique et cardiaque (Šileikytė *et al.*, 2014). La délétion entre les exons 2 et 3 du gène a été obtenue grâce au système *Cre/LoxP* avec la *Cre* du promoteur de l'albumine pour le modèle de délétion hépatique et de l'α-actine pour le cœur. La délétion hépatique de *Tspo* n'a pas entrainé de modification des protéines partenaires hypothétiques constituants le pore de transition de perméabilité mitochondriale (i.e. ANT, VDAC, cyclophiline D, transporteur de phosphate mitochondrial (PiC) et la sous-unité beta de l'ATPase). De même, les souris délétées ne présentaient pas de phénotype particulier, notamment en termes de longévité et de morphologie hépatique. La délétion de *Tspo* n'engendrait pas d'altérations mitochondriales au niveau morphologique ni fonctionnel (respiration, potentiel de membrane, capacité de rétention calcique, induction du pore de transition de perméabilité mitochondriale). De plus, dans un modèle d'hypoxie-réoxygénation sur cœur isolé, la délétion de *Tspo* ne modifiait pas l'étendue des lésions de reperfusion, mesurées par un dosage de la lactate déshydrogénase. Les auteurs ont conclu que TSPO n'est pas nécessaire à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale. Étonnamment, les différents ligands de TSPO testés au cours de cette étude (PK-11195, 4'-chlorodiazépam et protoporphyrine IX) diminuaient la capacité de rétention calcique de façon similaire sur des mitochondries issues de souris sauvages et de souris délétées pour *Tspo*. Notons que les auteurs s'étaient préalablement assurés que les mitochondries des souris délétées ne fixaient pas le [^{3}H]PK-11195. Ces résultats remettaient en question l'implication de TSPO dans l'effet de ces ligands mais également les conclusions obtenues avec leur utilisation. En effet, TSPO a été identifiée comme étant un acteur de nombreux processus physio-pathologiques (prolifération, oncologie, inflammation, neurodégénérescence, etc.) grâce aux effets de ses ligands dans ces processus. Cette étude tendait à démontrer que les effets des ligands de TSPO étaient dus à leur interaction avec d'autres cibles (Šileikytė *et al.,* 2014). Ce modèle murin est depuis commercialisé par les laboratoires Jackson (JAX:024976) qui décrivent le phénotype de ces souris comme « normal ». Ce modèle a été utilisé par d'autres équipes pour générer des modèles de délétion tissu-spécifiques (Kim *et al.*, 2020 ; Wolf *et al.*, 2020).

Un autre modèle de délétion de *Tspo*, cardiaque et conditionnelle, s'est intéressé à l'effet cardioprotecteur de TSPO dans un modèle murin d'insuffisance cardiaque (Thai *et al.*, 2018).

Deux régions *LoxP* ont été ajoutées avant l'exon 2 et après l'exon 3 du gène *Tspo* et le gène *Cre* a été placé sous le contrôle du promoteur de la myosine, inductible par le tamoxifène. Chez les souris sauvages, l'expression cardiaque de *Tspo* était augmentée par la réalisation d'une constriction aortique transverse, un modèle de surcharge de pression aortique. Les souris délétées pour *Tspo* étaient protégées des effets de la constriction aortique transverse avec une progression limitée vers l'insuffisance cardiaque. En effet, ces souris possédaient une fraction d'éjection significativement préservée ainsi qu'une dilatation, une hypertrophie et un remodelage réduits par rapport aux souris sauvages. Ces dernières présentaient une altération de l'absorption du calcium mitochondrial, préservée par la délétion de *Tspo* sans modification du pore de transition de perméabilité mitochondriale, que ce soit en conditions basales ou en conditions d'insuffisance cardiaque. La constriction aortique transverse provoquait une diminution de la production d'ATP chez les souris sauvages alors qu'elle était conservée chez les souris délétées pour *Tspo*. En outre, le potentiel redox mitochondrial et la production d'espèces réactives de l'oxygène étaient réduits chez les souris délétées pour *Tspo* alors que l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, le potentiel de membrane mitochondriale et la mitophagie étaient préservés. Notons que pour la majorité des paramètres étudiés, il n'y avait aucune différence entre les souris sauvages et délétées pour *Tspo* en conditions basales ; c'est l'application d'un stress, la constriction aortique transverse, qui révélait dans cette étude, l'implication de TSPO dans ces différents mécanismes (Thai *et al.,* 2018).

Parallèlement aux recherches réalisées dans le domaine de la stéroïdogenèse et de la cardioprotection, des expériences de délétions ont été menées pour étudier TSPO au niveau cérébral (Daugherty *et al.*, 2016). Le premier travail a consisté à induire une délétion neuro-spécifique sous le contrôle du promoteur de *Gfap* (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), qui n'a pas engendré d'altération du développement ni de perte d'activité neuronale des souris. Dans un modèle expérimental de sclérose en plaques, les souris *Tspo*$^{-/-}$ étaient protégées par rapport aux souris sauvages, faisant de TSPO une cible thérapeutique pour le traitement de cette pathologie (Daugherty *et al.,* 2016).

Un autre modèle de délétion de *Tspo* au niveau cérébral, spécifique de la microglie (sous le contrôle du promoteur de *Cx3cr1* (récepteur à l'interleukine-8)) a été développé (Wolf *et al.*, 2020) à partir de la souche générée par Šileikytė *et al.* (2014). Les souris délétées ne présentaient pas de phénotype altéré de la microglie, avec une ramification et un réseau comparables aux souris sauvages. De plus, les fonctions mitochondriales des cellules

microgliales de la rétine (production d'ATP, potentiel de membrane mitochondrial) n'étaient pas altérées par la délétion de *Tspo*. Celle-ci réduisait cependant significativement l'inflammation liée aux dommages vasculaires de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, avec une diminution de la capacité phagocytaire des monocytes et de la néo-angiogenèse. Les auteurs démontraient aussi que TSPO était responsable de la production microgliale d'espèces réactives de l'oxygène *via* son effet sur le calcium cellulaire et sur la NADPH oxydase 1 (Wolf *et al.,* 2020).

La souche de souris délétées de Šileikytė *et al.* (2014) a également été utilisée dans une étude sur l'obésité pour générer un modèle de souris délétées pour *Tspo* au niveau hypothalamique (Kim *et al.,* 2020). Les souris délétées consommaient moins de nourriture et dépensaient plus d'énergie que les souris sauvages lorsqu'elles étaient soumises à un régime riche en graisses. La délétion de *Tspo* a induit une lipophagie, libérant les acides gras contenus dans les gouttelettes lipidiques. Les auteurs concluent que TSPO permet la détection des lipides au niveau hypothalamique, participant ainsi à la régulation de l'homéostasie énergétique (Kim *et al.,* 2020).

- <u>Modèles murins de délétion totale</u>

Deux études indépendantes ont généré les premières souris mutées pour *Tspo* en 2014. Le premier modèle de souris appelé *Guwiyang Wurra* (« souris de feu » en dharawal, langue aborigène australienne) a été obtenu par une délétion entre les exons 2 et 3 du gène *Tspo* grâce à un système *Cre/LoxP* sous le contrôle du promoteur de *Pgk1* (Phosphoglycerate kinase 1) (Banati *et al.*, 2014). La délétion de *Tspo* n'entraînait pas d'altération de la reproduction de ces souris, ni de leur développement et, de manière globale, leur santé et leurs comportements n'étaient pas affectés. De même, le catabolisme mitochondrial du cholestérol par le CYP11A1, la concentration sérique de prégnénolone (précurseur de la biosynthèse des hormones stéroïdes, issu du cholestérol) et le métabolisme de l'hème, notamment la concentration de porphyrine IX, étaient comparables chez les souris $Tspo^{+/+}$ et $Tspo^{-/-}$. Contrairement à l'étude sur les poissons zèbres (Rampon *et al.,* 2009), la composition sanguine des souris n'était pas altérée par la délétion de *Tspo*. Les auteurs ont cependant mis en évidence une diminution de l'activité mitochondriale associée à une réduction de la production d'ATP dans des cellules primaires de la microglie de ces souris (Banati *et al.*, 2014). Par ailleurs, une seconde étude sur ce modèle a permis de confirmer la spécificité de la liaison de certains de ses ligands (Middleton *et al.*, 2015) qui avait été remise en question précédemment (Šileikytė *et al.,* 2014).

Le second modèle de délétion totale de *Tspo* chez la souris a également été obtenu grâce au système *Cre/LoxP*, mais sous le contrôle du promoteur de *Ddx4* (*ATP-dependent RNA helicase DDX4* ; Tu *et al.,* 2014). Comme les « souris de feu » (Banati *et al.*, 2014), ces souris ne présentaient pas de phénotype altéré et étaient fertiles. En effet, la morphologie des organes stéroïdes (gonades, glandes surrénales), la structure mitochondriale, la production d'hormones stéroïdes (glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes, androgènes, œstrogènes, progestatifs) et la fécondité étaient comparables chez les souris sauvages et délétées. La délétion de *Tspo* n'entraînait pas de modification de l'expression génique des autres protéines impliquées dans la stéroïdogenèse (*Star, Cyp11a1, Hsd3b1, Vdac, Ant, Hxk2, Pap-7, Acpb*). De même que pour les souris porteuses de la délétion testiculaire de *Tspo* (Morohaku *et al.*, 2014), ces souris ne présentaient pas d'augmentation de *Tspo2*. Les gènes dont l'expression était modifiée par la délétion de *Tspo* étaient majoritairement impliqués dans l'immunomodulation et le transport de lipides. Les auteurs ont conclu que TSPO n'est pas nécessaire à la stéroïdogenèse et ont émis l'hypothèse que les effets des ligands de TSPO étaient dus à un changement de conformation de la protéine induisant soit un relargage de cholestérol, ainsi disponible pour la stéroïdogenèse, soit une modification de la conformation de la membrane permettant des interactions entre les protéines de la stéroïdogenèse. Le rôle de TSPO pourrait donc être principalement lié à des situations de stress biologiques plutôt qu'à des mécanismes physiologiques (Tu *et al.,* 2014). Ce modèle de souris a également permis de réaliser une étude sur le rôle de TSPO dans la biosynthèse de l'hème. Les souris *Tspo*$^{-/-}$ ne présentaient pas d'altération de leur érythropoïèse, ni de leurs concentrations en hème et en protoporphyrine IX. Les auteurs en concluent que TSPO n'est pas essentielle à la biosynthèse de l'hème (Zhao *et al.*, 2016).

Ces deux premiers modèles de délétion totale n'ayant pas permis d'aboutir à des conclusions définitives concernant le rôle de TSPO dans la stéroïdogenèse, l'équipe du Pr. Papadopoulos a généré deux nouveaux modèles chez le rat : une délétion de TSPO et une mutation de TSPO au niveau du domaine de liaison du cholestérol à la protéine, CRAC (Owen *et al.*, 2017). Ces deux modifications génétiques ont été effectuées en injectant, à des embryons de rats, des nucléases à doigt de zinc (ZFN) ciblant le gène *Tspo*. Les rats délétés pour *Tspo* ont été obtenus en induisant une délétion entre l'exon 3 et l'intron 3 du gène *Tspo* (voir paragraphe 1.1, page 82). Les rats délétés pour le domaine CRAC ont été obtenus par une troncature du gène au niveau de l'exon 4 qui aboutit à l'expression d'une protéine TSPO tronquée sans domaine de liaison CRAC. L'obtention de ces rats a été difficile puisque sur 474 embryons transfectés, seuls deux rats délétés sont nés avec une délétion totale de TSPO et un seul rat

sur 130 embryons avec une mutation du domaine CRAC. Il semblerait que la technique de transfert d'ADN par recombinaison homologue engendre une forte mortalité qui n'est pas retrouvée avec la génération d'animaux délétés par le système *Cre/LoxP*. Les rats mutés pour *Tspo* (délétion totale ou du domaine CRAC) ne présentaient pas de phénotype particulier. Cependant, une accumulation de gouttelettes lipidiques (source du cholestérol utilisé pour la stéroïdogenèse) a été observée dans les tissus stéroïdogènes des deux modèles de rats. La testostéronémie des rats délétés pour *Tspo* était significativement inférieure à celle des rats sauvages. Les rats délétés pour *Tspo* ne répondaient pas, ou que partiellement, à la stimulation de synthèse de corticostérone par la corticotrophine. L'équipe du Pr. Papadopoulos en a conclu que la stéroïdogenèse est altérée en l'absence de TSPO (Owen *et al.*, 2017).

Le rôle de TSPO dans la stéroïdogenèse étant toujours sujet à débat, Barron *et al.* (2018) ont récemment développé leur propre modèle de délétion totale sous le contrôle du promoteur de *Camk2a* (protéine kinase II α dépendante de la calmoduline). Chez les souris *Tspo*$^{-/-}$ âgées de la nouvelle lignée, la stéroïdogenèse totale était réduite, avec une diminution de la concentration plasmatique de progestérone et de corticostérone, et un déficit d'hormones stéroïdes androgènes. Cette étude a conclu que TSPO n'est pas nécessaire pour la stéroïdogenèse basale mais que sa délétion affecterait ce processus, notamment au cours du vieillissement (Barron *et al.*, 2018).

Les différents modèles de délétion totale de *Tspo*, tout comme les modèles de délétion tissu-spécifique, n'ont pas permis de conclure, à ce jour, quant au rôle potentiel de TSPO dans le processus de stéroïdogenèse.

Des modèles de délétions totales de TSPO ont également été développés dans d'autres domaines de recherche que la stéroïdogenèse, notamment pour étudier le rôle de cette protéine dans différentes pathologies neurologiques. Ainsi, une étude utilisant des souris et le même système de délétion totale utilisant *Cre/LoxP*, mais sous le contrôle du promoteur de *Prm* (protamine), a également conclu à l'absence d'altération de la reproduction et du phénotype et à un développement normal des principaux organes. L'analyse RNAseq de ces souris a également révélé que la délétion de *Tspo* n'induisait pas de modification de l'expression génique des partenaires de *Tspo*, notamment *Star*, *Vdac* et *Cyp11a1* (Wang *et al.*, 2016). Dans ce modèle, la délétion de *Tspo* était associée à une inhibition de l'activation microgliale. Le métabolisme mitochondrial des cellules de la microglie était altéré, avec une réduction significative du potentiel de membrane mitochondrial, de la phosphorylation

oxydative et de la glycolyse (Yao *et al.,* 2020). Dans un modèle expérimental de maladie d'Alzheimer, ces souris présentaient une altération de la phagocytose microgliale, une forte neuro-inflammation et ainsi, une accumulation cérébrale de peptide amyloïde β. De nombreuses études ayant montré une surexpression de TSPO dans la maladie d'Alzheimer, les auteurs en ont conclu que TSPO jouerait un rôle neuroprotecteur dans cette pathologie (Zhang *et al.*, 2021).

Un autre modèle de délétion totale *Cre/LoxP* de *Tspo* sous le contrôle du promoteur de *Best1* (bestrophine 1) a été généré chez la souris (Klee *et al.,* 2019), dans le cadre d'une étude sur la dégénérescence rétinienne, maladie au cours de laquelle TSPO est surexprimée. Les souris délétées pour *Tspo* ne présentaient pas de phénotype anormal au niveau de la rétine, dont la morphologie et la fonction étaient similaires aux souris sauvages. De même, la délétion de *Tspo* n'avait pas d'effet sur la sensibilité à la dégénérescence rétinienne. Les auteurs ont émis l'hypothèse que TSPO a besoin de ses partenaires pour certaines de ses fonctions et que l'interaction de TSPO avec ses ligands peut être nécessaire pour moduler la dégénérescence rétinienne (Klee *et al.,* 2019). Une autre étude, réalisée avec le modèle de souris développé par Tu *et al.* (2014) s'est penchée sur cette pathologie (Farhan *et al.*, 2021) et a confirmé l'absence d'altération du phénotype rétinien. Cependant, des modifications des lipides (cholestérol, triglycérides et phospholipides) et de l'efflux de cholestérol ont été démontrées dans les cellules de la rétine des souris délétées. Ces effets s'accompagnaient d'une production de cytokines pro-inflammatoires et d'une activation de la microglie. Les auteurs en concluent que TSPO pourrait être une cible potentielle dans le développement de stratégies thérapeutiques pour la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Farhan *et al.*, 2021).

Le modèle de souris développé par Barron *et al.* (2018) a été utilisé dans une étude sur l'encéphalopathie septique (Giga *et al.*, 2021). Celle-ci a été reproduite *in vivo* par l'injection d'une toxine bactérienne, induisant une neuro-inflammation avec une activation de la microglie et une libération de cytokines associée à une inhibition comportementale. L'ensemble de ces effets était significativement réduit chez les souris délétées. Les auteurs concluent que TSPO jouerait un rôle majeur dans l'encéphalopathie septique dont les mécanismes restent à élucider (Giga *et al.*, 2021).

Une équipe britannique a généré un nouveau modèle de délétion totale de *Tspo* utilisant le système *Cre/LoxP* (Morrissey *et al.,* 2021) qui remet en question les résultats obtenus par Kim *et al.* (2020) et Fan *et al.* (2019). En effet, dans ce modèle, l'absence de TSPO ne modifie ni

la masse corporelle, ni la prise alimentaire des animaux. Un régime alimentaire altéré (jeun prolongé ou riche en graisse) n'a pas de conséquence sur l'homéostasie énergétique des souris délétées et n'induit pas de phénotype prédiabétique (Morrissey *et al.*, 2021).

Récemment, le laboratoire du Pr. Papadopoulos a mené une étude sur la stéatose hépatique non alcoolique (Li *et al.,* 2021) à l'aide de leurs modèles murins délétés pour *Tspo* chez la souris (Fan *et al.*, 2020) et chez le rat (Owen *et al.*, 2017). En effet, l'expression de TSPO augmente en fonction du stade d'évolution de la pathologie, notamment de la stéatose simple vers la stéatohépatite non alcoolique. De plus, comme pour la neuro-inflammation, le radio-marquage de TSPO est étudié afin d'être utilisé comme outil de diagnostic de la stéatose hépatique non alcoolique. Dans cette étude, la délétion de *Tspo* induit des mécanismes cellulaires antioxydants adaptatifs et diminue l'expression de l'ACAT, favorisant l'accumulation de cholestérol libre dont l'excès provoque la perte des mécanismes adaptatifs et ainsi un stress du réticulum endoplasmique. Dans le modèle expérimental de stéatohépatite non alcoolique, la délétion de *Tspo* s'accompagne d'une diminution des cytochromes CYP7A1 et CYP27A1. Les auteurs concluent que TSPO régule la stéatose et la synthèse des acides biliaires dans la stéatose hépatique non alcoolique. Cette étude souligne la complexité de l'étude de TSPO, dont le rôle évolue au cours de cette pathologie : sa délétion favorise la progression de la stéatose simple mais améliore la fibrose de la stéatohépatite non alcoolique (Li *et al.,* 2021).

- <u>Modèles murins d'induction tissus-spécifiques</u>

A ce jour, deux modèles *in vivo* d'induction, utilisant deux techniques différentes, ont été publiés. Zhang *et al.* (2016) ont induit une surexpression de *Tspo* en injectant, dans le gyrus denté de l'hippocampe, un lentivirus avec un plasmide contenant le gène *Tspo*. Cette surexpression de *Tspo* au niveau cérébral a induit une augmentation de la neurostéroïdogenèse et protégé de neuro-inflammations induites par différents modèles expérimentaux de déficits cognitifs (Zhang *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2016). La surexpression de *Tspo* a provoqué des effets anxiolytiques et antidépresseurs, qui étaient associés à une augmentation de la neurostéroïdogenèse (Li *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.*, 2018).

Le second modèle d'induction de *Tspo* a été généré à partir d'un modèle murin de délétion totale de *Tspo* (Barron *et al.,* 2018). Ce dernier a été couplé à l'injection d'un transgène pour n'exprimer *Tspo* qu'au niveau neuronal. La délétion totale de *Tspo* a induit une accentuation de comportements anxieux et une réduction de la stéroïdogenèse cérébrale mais sans modifier les comportements dépressifs. La surexpression neuronale de *Tspo* a diminué les

comportements dépressifs, un effet dépendant de la neurostéroïdogenèse, et a partiellement inversé le comportement anxiogène chez les souris délétées pour *Tspo*. Les auteurs ont conclu que TSPO est nécessaire à la stéroïdogenèse cérébrale et serait ainsi impliquée dans les comportements anxieux et dépressifs (Barron *et al.*, 2021), ce qui rejoint les conclusions obtenues avec le premier modèle d'induction de *Tspo* (Zhang *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.*, 2018).

- Conclusions

Pendant longtemps, la délétion du gène *Tspo* chez les rongeurs a été considérée comme létale à un stade embryonnaire, conférant donc à TSPO un caractère vital. Cependant, l'amélioration récente des techniques permettant d'induire des délétions de gènes, a permis d'obtenir des animaux délétés pour *Tspo* viables et au développement normal. L'absence de phénotype altéré par la délétion de *Tspo* n'est pas synonyme d'inanité de cette protéine. En effet, l'approche expérimentale de délétion de gènes, même lorsqu'ils sont essentiels, peut aboutir à des phénotypes normaux et ne révéler une altération qu'en cas de stress (Gut *et al.*, 2015). Par exemple, la délétion de FoxO1 n'entraîne aucun phénotype particulier chez les souris mâles et jeunes (classiquement utilisées dans les études) mais, chez les femelles multipares et les mâles âgés, cette délétion provoque une hyperglycémie et une réduction de la masse des cellules β (Talchai *et al.*, 2012). De plus, bien que les gènes anciens et fortement conservés soient considérés de manière générale comme « essentiels » pour des mécanismes physiologiques fondamentaux, une étude a démontré que ces gènes sont principalement associés à des pathologies et seraient plus fréquemment impliqués dans les mécanismes de réponse aux stress (Domazet-Loso *et al.*, 2008). TSPO, qui est très conservée, pourrait ne pas avoir de fonction physiologique *per se* mais intervenir dans certains processus pathologiques ou d'adaptation à un stress cellulaire. En effet, la majorité des études réalisées en conditions « basales » n'ont pas montré d'effet majeur de la délétion de *Tspo*. En revanche, la présence d'un stress (vieillissement, modèles de maladies neurodégénératives et d'insuffisance cardiaque) provoque des différences significatives chez ces animaux.

La variabilité des modèles (espèces et souches animales, schémas de reproduction, techniques de modification génétique, etc.) pourrait être à l'origine de la disparité des résultats obtenus suite à la délétion de *Tspo*. Par exemple, l'expression de la *Cre* est sous le contrôle de promoteurs différents et ceux-ci pourraient être activés à différents stades du développement embryonnaire : la délétion de *Tspo* serait donc plus ou moins précoce selon les modèles. Une autre hypothèse est la proximité physique du gène *Tspo* avec deux autres gènes : *Ttll12*

(*Tubulin tyrosine ligase-like family member 12*) qui serait impliquée dans la méthylation des histones et l'assemblage des microtubules et *Mcat* (*Mitochondrial malonyl-CoA:ACP acyltransferase*) qui participerait à la biosynthèse mitochondriale d'acides gras. Selon la technique de délétion, ces gènes pourraient potentiellement être altérés et participer aux différences de phénotypes observées (Papadopoulos *et al.*, 2015).

Ces études de délétion et d'induction de *Tspo* ont permis de profondément améliorer nos connaissances fondamentales sur cette protéine mais la disparité des phénotypes obtenus et les résultats contradictoires des différentes études ont alimenté un débat sur les fonctions physiopathologiques de TSPO, remis en question la spécificité des effets obtenus avec ses ligands et ses interactions avec les protéines partenaires (au sein du transducéosome et du pore de transition de perméabilité mitochondriale notamment). Malgré ces avancées, la protéine TSPO reste à ce jour une énigme quant à sa fonction.

3.3.5. TSPO et cardioprotection

Les dysfonctions mitochondriales sont impliquées dans de nombreuses pathologies, c'est pourquoi les molécules ciblant les fonctions mitochondriales ont été sujets de recherche pour développer des stratégies thérapeutiques (Panel *et al.,* 2017). La protéine TSPO est un candidat pour ce type de stratégies pour plusieurs raisons. Sa localisation à la membrane mitochondriale la rend relativement accessible pour des molécules pharmacologiques ; elle possède de nombreux ligands (chimiques et endogènes) qui indiquent une structure protéique propice aux interactions ligand-protéine et son expression est affectée par différentes pathologies, suggérant une implication dans la réponse cellulaire au stress (Gut 2015). Différents ligands de TSPO ont été étudiés dans la recherche de stratégie cardioprotectrice (Figure 17) car il a été démontré que ses ligands étaient capables de réduire l'apoptose (Bono *et al.*, 1999), notamment en réduisant le stress oxydant mitochondrial (Carayon *et al.,* 1996) qui est un acteur majeur de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale et des lésions de reperfusion (voir paragraphe 2.5.2, page 51 et paragraphe 3.3.2.3, page 60).

Une première étude expérimentale a évalué les effets cardioprotecteurs d'un nouveau ligand de TSPO, le SSR180575, aux propriétés neuroprotectrices (Ferzaz *et al.*, 2002). Cette molécule était capable d'inhiber les effets du péroxyde d'hydrogène (H_2O_2) *in vitro* (i.e. altérations du potentiel de la membrane mitochondriale et de la phosphorylation oxydative, libération de cytochrome C, activation de la caspase 3 et fragmentation de l'ADN). De même, le SSR180575 permettrait de préserver la contractilité et de réduire significativement la taille d'infarctus *in*

vivo (Leducq *et al.*, 2003). Cette étude a démontré le potentiel thérapeutique des ligands de TSPO dans les lésions de reperfusion.

Une étude expérimentale chez le cochon d'Inde a démontré les propriétés cardioprotectrices d'un autre ligand de TSPO, le 4'-chlorodiazépam. Celui-ci inhibe les altérations des potentiels d'action, l'inexcitabilité membranaire et les arythmies induites par l'ischémie-reperfusion en bloquant la dépolarisation du potentiel de membrane interne mitochondrial. Cette étude postule que le 4'-chlorodiazépam est un antagoniste de TSPO et les auteurs ont utilisé un autre ligand de TSPO qu'ils considèrent comme un agoniste, le FGIN-1-27. En effet, dans cette étude, le FGIN-1-27 induit des effets opposés à ceux du 4'-chlorodiazépam en favorisant la dépolarisation du potentiel de membrane interne mitochondrial, les altérations électrophysiologiques et les arythmies induites par l'ischémie-reperfusion cardiaque (Akar 2005). Cette équipe a reproduit ces résultats chez le lapin dans un modèle *in vitro* d'ischémie-reperfusion (Brown *et al.*, 2008). Une troisième étude a confirmé les effets cardioprotecteurs du 4'-chlorodiazépam chez le rat puisqu'il réduit significativement la taille d'infarctus dans un modèle *in vivo* d'ischémie-reperfusion cardiaque. Les effets du 4'-chlorodiazépam ciblent les altérations mitochondriales : la libération de facteurs pro-apoptotiques, les altérations mitochondriales membranaires et respiratoires, la sensibilité à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale et l'apoptose (Obame *et al.,* 2007). Ces résultats sont confortés par une autre étude qui démontre la capacité du 4'-chlorodiazépam à préserver la fonction contractile en diminuant, notamment, le stress oxydant dans un modèle d'ischémie-reperfusion cardiaque *ex vivo* (Xiao *et al.*, 2010). Une étude chez le porc a reproduit les effets cardioprotecteurs du 4'-chlorodiazépam, avec une réduction de la taille d'infarctus et une amélioration de la fonction contractile (Tsamatsoulis *et al.,* 2016). En 2021, une étude réalisée chez le rat soumis à un infarctus du myocarde induit par traitement à l'isoprénaline a démontré que le 4'-chlorodiazépam permettait de protéger le cœur et que ces effets protecteurs étaient partiellement inhibés par l'injection d'un inhibiteur de NO synthase, impliquant cette enzyme dans le mécanisme du 4'-chlorodiazépam (Ilic *et al.*, 2021).

Un nouveau ligand de TSPO, le TRO40303, a été développé par le laboratoire Trophos. Dans le cadre de la recherche sur la maladie de Charcot (caractérisée par la perte progressive des neurones moteurs), cette *start-up* biopharmaceutique a réalisé un *screening* de molécules de faibles poids moléculaires pour sélectionner celles ayant des propriétés neuroprotectrices. Les molécules identifiées par cette méthode se liaient à TSPO et VDAC (Bordet *et al.*, 2007). Le TRO40303 se fixe au domaine CRAC (site de liaison au cholestérol de TSPO) et ses propriétés

cardioprotectrices ont été évaluées dans une étude expérimentale *in vitro* et *in vivo*. L'injection de TRO40303 permet de réduire significativement la taille d'infarctus dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat. Comme le 4'-chlorodiazépam, le TRO40303 limite la libération de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux. En revanche, ce nouveau ligand de TSPO n'améliore pas la résistance à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale dans les mitochondries isolées alors qu'il présente cet effet sur les cardiomyocytes isolés. Cet effet serait lié à la réduction significative de la production d'espèces réactives de l'oxygène et à une surcharge calcique (Schaller *et al.,* 2010). Suite à ces résultats prometteurs, obtenus sur des modèles animaux, le TRO40303 a fait l'objet d'une étude clinique de Phase I (test de toxicité) (Le Lamer *et al.*, 2014), puis d'une étude clinique pluricentrique de phase II : MITOCARE (Atar *et al.,* 2015). Pour cette étude, 163 patients atteints d'infarctus du myocarde sévères ont été inclus. Les patients ont reçu de manière aléatoire et en double aveugle un placebo ou le TRO40303 en bolus intraveineux quelques minutes avant la reperfusion (Atar *et al.,* 2015). Cette étude s'est soldée par un échec : l'injection de de TRO40303 n'a pas permis de limiter les lésions de reperfusion induites par infarctus du myocarde. En effet, aucun des critères (marqueurs biologiques d'atteinte cardiaque, paramètres échographiques de contractilité et de morphologie) n'a été amélioré par ce ligand de TSPO. De plus, un plus grand nombre d'effets indésirables a été mesuré chez les patients traités avec le TRO40303, comme une augmentation des troubles cardiaques (Atar *et al.*, 2015). L'échec de cette étude a été attribuée à plusieurs éléments : des modifications par rapport aux conditions pré-cliniques comme la formulation ou les doses de TRO40303 et l'interaction de comorbidités et de co-médications chez les patients inclus (Bøtker 2015).

En parallèle de ces recherches, une étude s'est intéressée à la fonction de transport mitochondrial de cholestérol de TSPO au niveau cardiaque et a démontré *in vivo* chez le rat une accumulation massive de cholestérol et d'oxystérols dans les mitochondries cardiaques à la reperfusion. L'administration de ligands de TSPO, le TRO40303 et le 4'-chlorodiazépam, a permis de réduire significativement cette accumulation de stérols. Cette étude révèle un nouveau mécanisme impliquant TSPO et le cholestérol dans les lésions de reperfusion (Paradis *et al.*, 2013). L'hypercholestérolémie étant un facteur de risque majeur de l'infarctus du myocarde, à l'origine d'aggravations de la sévérité de l'infarctus et d'une altération des stratégies thérapeutiques (voir paragraphe 2.2.3.1, page 43), les propriétés cardioprotectrices du 4'-chlorodiazépam ont été testées chez des animaux hypercholestérolémiques soumis à un modèle d'ischémie-reperfusion. Le 4'-chlorodiazépam conserve ses effets chez ces animaux et

notamment sa capacité à inhiber l'accumulation mitochondriale de cholestérol et à protéger les mitochondries à la reperfusion (Musman *et al.,* 2017).

Ces nouvelles découvertes et les résultats expérimentaux obtenus avec des ligands de TSPO font de cette protéine une cible intéressante dans la cardioprotection (Morin *et al*., 2016 ; Qi *et al*., 2012). L'équipe du Pr. Papadopoulos, qui travaille sur la stéroïdogenèse, a développé plusieurs inhibiteurs de TSPO et de STAR, spécifiques de leurs sites de liaison au cholestérol : les domaines CRAC et START, respectivement. Grâce à des études de modélisation moléculaire et de *Structure-Based Design* (*screening* de chimiothèques sur un modèle moléculaire des domaines CRAC et START), différentes molécules ont été identifiées comme potentiels inhibiteurs. Ces molécules ont ensuite été sélectionnées par le score d'amarrage qui permet d'évaluer la force de la liaison avec le domaine d'intérêt. Pour les inhibiteurs de CRAC, les molécules identifiées ont été classées en trois catégories chimiques : les substituts de stéroïdes, les adduits de stéroïdes et les aromatiques (benzoates et benzamides). Parmi le premier groupe, un ligand, le 19-Atriol (3,17,19-androsten-5-triol), a été sélectionné pour sa capacité à inhiber la stéroïdogenèse induite par stimulation hormonale *in vitro*, notamment en inhibant la liaison au cholestérol et l'import mitochondrial de STAR. Le 19-Atriol ne modifiait pas la liaison du PK-11195 à TSPO (Midzak *et al*., 2011, 2012). Pour les inhibiteurs de STAR, la capacité de ces molécules à réduire la stéroïdogenèse induite par stimulation hormonale *in vitro* a été évaluée et deux substituts de stéroïdes ont réduit la synthèse de prégnénolone de 50%. Cette étude constitue la première étape de la conception et du développement de molécules capables d'inhiber la stéroïdogenèse en ciblant STAR (Akula *et al*., 2012). Ces molécules ont été capables d'inhiber la stéroïdogenèse dans un modèle *in vitro* de stimulation hormonale (Midzak *et al*., 2015 ; Venugopal *et al.,* 2016) (Figure 17). Ces nouveaux ligands de TSPO et de STAR pourraient représenter une nouvelle opportunité dans le développement de stratégies cardioprotectrices ciblant les dysfonctions mitochondriales notamment en inhibant l'accumulation massive de cholestérol et d'oxystérols à la reperfusion.

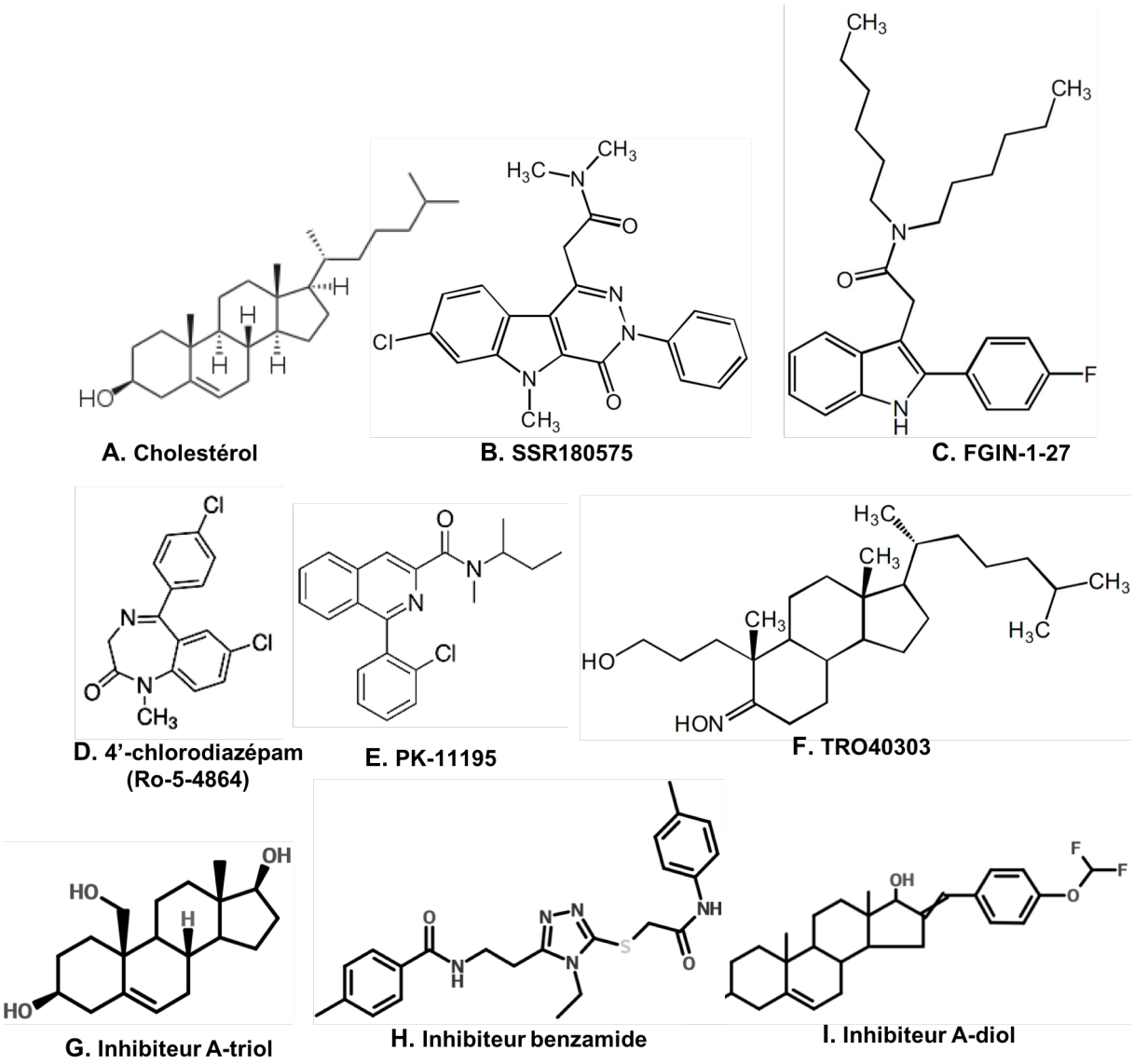


Figure 17 : Structure de ligands de TSPO et STAR.
A. Cholestérol (stéroïde), ligand endogène de TSPO et de STAR. **B.** SSR180575 (pyridazino-indole), ligand de TSPO. **C.** FGIN-1-27 (indole), ligand de TSPO. **D.** 4'-chlorodiazépam ou Ro-5-4864 (benzodiazépine), ligand de TSPO et de VDAC. **E.** PK-11195 (isoquinoline carboxamide), ligand de TPSO. **F.** TRO40303 (analogue synthétique de cholestérol), ligand de TSPO et de VDAC. **G.** Inhibiteur A-triol du domaine CRAC (substitut de stéroïde), ligand de TSPO. **H.** Inhibiteur benzamide du domaine CRAC (benzamide), ligand de TSPO. **I.** Inhibiteur A-diol du domaine START (substitut de stéroïde), ligand de STAR. D'après Mokrov *et al.* (2021), Midzak *et al.* (2011) et Akula *et al.* (2012).

OBJECTIFS DE LA THESE

La synthèse bibliographique souligne la nécessité de développer des thérapies cardioprotectrices afin de limiter les lésions de reperfusion. Le laboratoire d'accueil travaille sur le développement de stratégies pour protéger les mitochondries cardiaques et a montré que la protéine TSPO constitue une cible pharmacologique intéressante. En effet, certains ligands de cette protéine limitent les atteintes mitochondriales et réduisent la taille d'infarctus dans des modèles expérimentaux d'ischémie-reperfusion cardiaque. Ces propriétés protectrices sont associées à une inhibition de l'accumulation massive de stérols dans les mitochondries cardiaques mais le mécanisme de cette accumulation et le rôle qu'y joue TSPO ne sont pas connus.

Dans ce contexte, le laboratoire a développé une colonie de rats délétés pour *Tspo* qui constitue un outil précieux pour analyser le rôle physiopathologique de TSPO dans le myocarde. Ces animaux doivent aussi permettre d'étudier le mécanisme d'accumulation des stérols mitochondriaux impliquant une éventuelle interaction entre TSPO et STAR. Ils doivent également permettre de confirmer *in vivo* la spécificité des effets des ligands de TSPO, notamment celle du 4'-chlorodiazépam.

Les objectifs de ce travail ont été :

- De caractériser le phénotype des rats délétés pour *Tspo* au niveau cardiaque, et de façon plus globale, chez des animaux jeunes puis au cours de leur développement ;

- D'étudier le rôle de TSPO dans l'accumulation mitochondriale des stérols grâce au modèle de rats délétés ;

- De développer un modèle cellulaire d'hypoxie-réoxygénation afin de pouvoir étudier plus précisément *in vitro*, la distribution et la dynamique du cholestérol cellulaire cardiaque et l'effet d'inhibiteurs spécifiques de TSPO et de STAR.

MATERIELS & METHODES

1. ANIMAUX

1.1. Obtention des rats

L'équipe du Pr. Papadopoulos du Research Institute of the McGill University Health Center à Montréal a créé une lignée de rats de la souche Sprague Dawley mutés pour la protéine TSPO (Figure 18) (voir paragraphe 3.3.4.2, page 64) (Owen *et al.,* 2017).

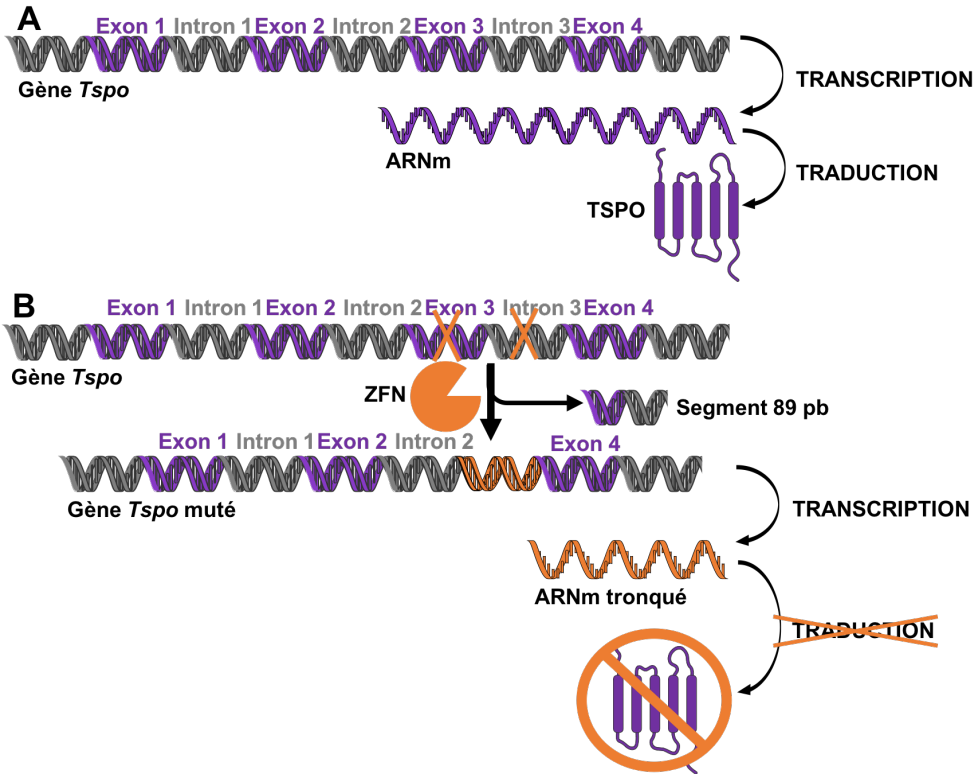


Figure 18 : Délétion du gène *Tspo*.
A. L'allèle sauvage du gène *Tspo* comprend 4 exons et 3 introns. Il est transcrit en ARNm qui est traduit et aboutit à la synthèse de la protéine TSPO. **B.** La lignée de rats délétés pour *Tspo* a été générée par transfection d'embryons de Sprague Dawley par des nucléases à doigt de zinc (ZFN) ciblant le gène *Tspo*. Ces enzymes de restriction ont provoqué une délétion de 89 pb au niveau de la jonction entre l'exon 3 et l'intron 3 : l'ARNm transcrit à partir de l'allèle du gène *Tspo* muté est donc tronqué et n'est pas traduit en protéine. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

Le **Pr. Papadopoulos** nous a fourni un couple de rats hétérozygotes *Tspo*$^{+/-}$ qui nous a permis de développer une colonie. Des croisements homozygotes entre rats *Tspo*$^{+/+}$ et rats *Tspo*$^{-/-}$, issus du couple initial, ont été réalisés : les mâles homozygotes ont été inclus dans les différentes procédures et les femelles ont été sacrifiées. Les rats issus des croisements homozygotes n'ont pas été utilisés pour la reproduction pour éviter des dérives de lignées

Tspo$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$: l'élevage a été maintenu par croisements hétérozygotes entre rats *Tspo*$^{+/-}$ (Figure 19). Pour chaque portée, le nombre de ratons, la répartition des sexes et des génotypes ont été mesurés.

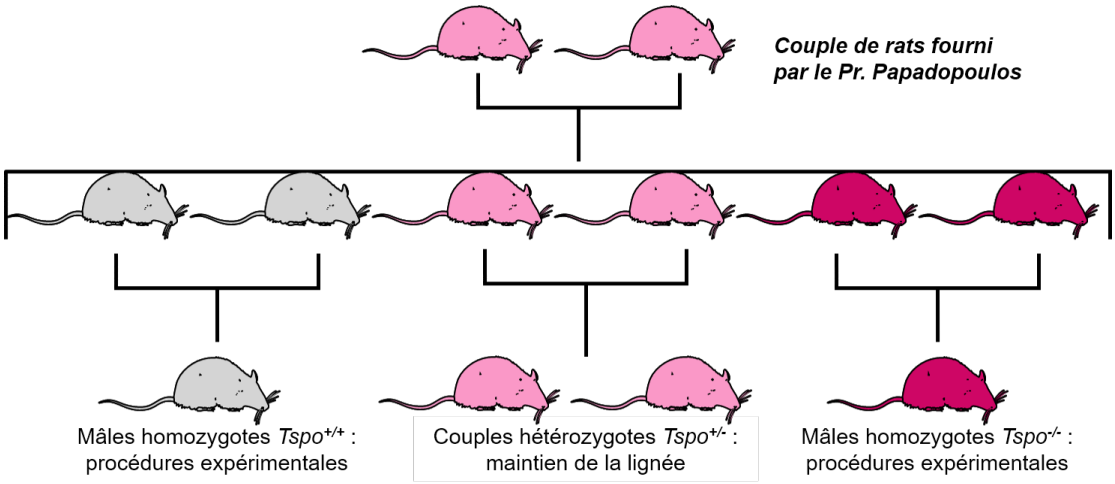


Figure 19 : Schéma des croisements de la lignée de rats mutés pour *Tspo*.
Le schéma ne respecte pas la répartition des portées : les croisements hétérozygotes donnent en théorie 25% de rats homozygotes *Tspo*$^{+/+}$ (), 50% de rats hétérozygotes *Tspo*$^{+/-}$ () et 25% de rats homozygotes *Tspo*$^{-/-}$ () avec 50% de mâles et 50% de femelles (Mendel 1865). Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

Les rats ont été hébergés dans une animalerie conventionnelle (agrément D94-028-28), climatisée, avec un cycle jour/nuit de 12 heures. Ils ont reçu une alimentation pour rongeurs standard (SAFE A03)et de l'eau *ad libitum*. Les rats ont eu à leur disposition des balles de coton, des feuilles de papier pour jouer, des huttes et des tunnels en carton pour se cacher et des baguettes de bois à ronger. Les procédures expérimentales décrites dans cette thèse entrent dans le cadre de deux projets qui ont été soumis à l'évaluation du COMETH (comité d'éthique de l'UPEC, de l'ENVA et de l'ANSES : Afssa/ENVA/UPEC, N° 16). Celui-ci est chargé de s'assurer de la pertinence scientifique, du respect de l'éthique animale et de la conformité légale (Directive 2010/63/UE) des projets d'expérimentation animale. Les projets ont été validés : N° APAFIS 13504-201820130912402v3 et 23908- 2020012712028279v4.

1.2. Génotypage des rats

Les rats ont été genotypés à partir des protocoles de **Sylvie Manin** (équipe Relaix, IMRB). Des biopsies de quelques millimètres, prélevées à l'extrémité de la queue des ratons âgés de deux semaines par **Diana Gelperowic** (plateforme EP3, IMRB), ont été conservées à -20°C. L'ADNc a été extrait en incubant les biopsies dans un tampon de lyse (Euromedex) contenant 1% de protéinase K (Euromedex) pendant une nuit à 55°C. La protéinase K a ensuite été

inactivée par une incubation d'une heure à 85°C. Avec les extraits d'ADNc ainsi obtenus, les réactions en chaîne par polymérase (PCR) ont été réalisées avec le kit Mytaq d'après les instructions du fournisseur (Meridian). Les amorces sens (ACT-CCT-AAA-GGG-GTT-GCA-GG – 6182,1 g/mol - Tm = 62°C) et antisens (AGA-GCA-TAC-TCT-TGC-CGT-CG – 6093,0 g/mol - Tm = 62°C) ont été ajoutées à une concentration finale de 0,5 µM. Au terme de la PCR (Tableau 1), les échantillons ont été déposés sur un gel d'agarose 2% (0,06% bromure d'éthidium) et soumis à une migration d'1h30 à 135 V. L'allèle non muté du gène *Tspo* fait 362 pb tandis que l'allèle muté fait 273 pb (délétion de 89 pb). Les rats homozygotes non mutés (*Tspo*$^{+/+}$) présentent donc une seule bande à 362 pb au terme de la migration, les rats homozygotes mutés (*Tspo*$^{-/-}$) présentent une bande à 273 pb et les rats hétérozygotes (*Tspo*$^{+/-}$) présentent deux bandes : une à 362 pb et une à 273 pb.

Tableau 1 : Programme de PCR pour le génotypage des rats délétés pour *Tspo*.

Etape	Durée	Température
Dénaturation	1 minute	95°C
Dénaturation	15 secondes	95°C
Hybridation	15 secondes	56°C
Elongation	10 secondes	72°C
Elongation	1 minute	72°C

35 cycles

2. CARACTERISATION DE RATS DELETES POUR TSPO

TSPO est impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques et les études réalisées avec différents modèles de délétion aboutissent à des conclusions contradictoires (voir paragraphe 3.3.4.2, page 64). Comme pour toute lignée mutée génétiquement, nous avons évalué l'effet de la délétion sur la reproduction, la viabilité et le développement des animaux. Cette colonie de rats mutés pour TSPO ayant été développée pour étudier les mécanismes de cardioprotection au niveau mitochondrial dans le cadre d'ischémie-reperfusion cardiaques, une grande partie de la caractérisation s'est concentrée sur le phénotype cardiaque. L'effet de la délétion de *Tspo* a également été étudié dans les fonctions biologiques dans lesquelles TSPO a été impliquée, notamment la stéroïdogenèse et le métabolisme de l'hème, mais aussi les métabolismes lipidique et glucidique. Des paramètres glucidiques, hématologiques, lipidiques et hormonaux ont donc également été analysés chez les rats *Tspo*$^{-/-}$ issus de notre colonie. Cette caractérisation a été effectuée tout au long de la vie des rats, selon le protocole expérimental décrit à la Figure 20.

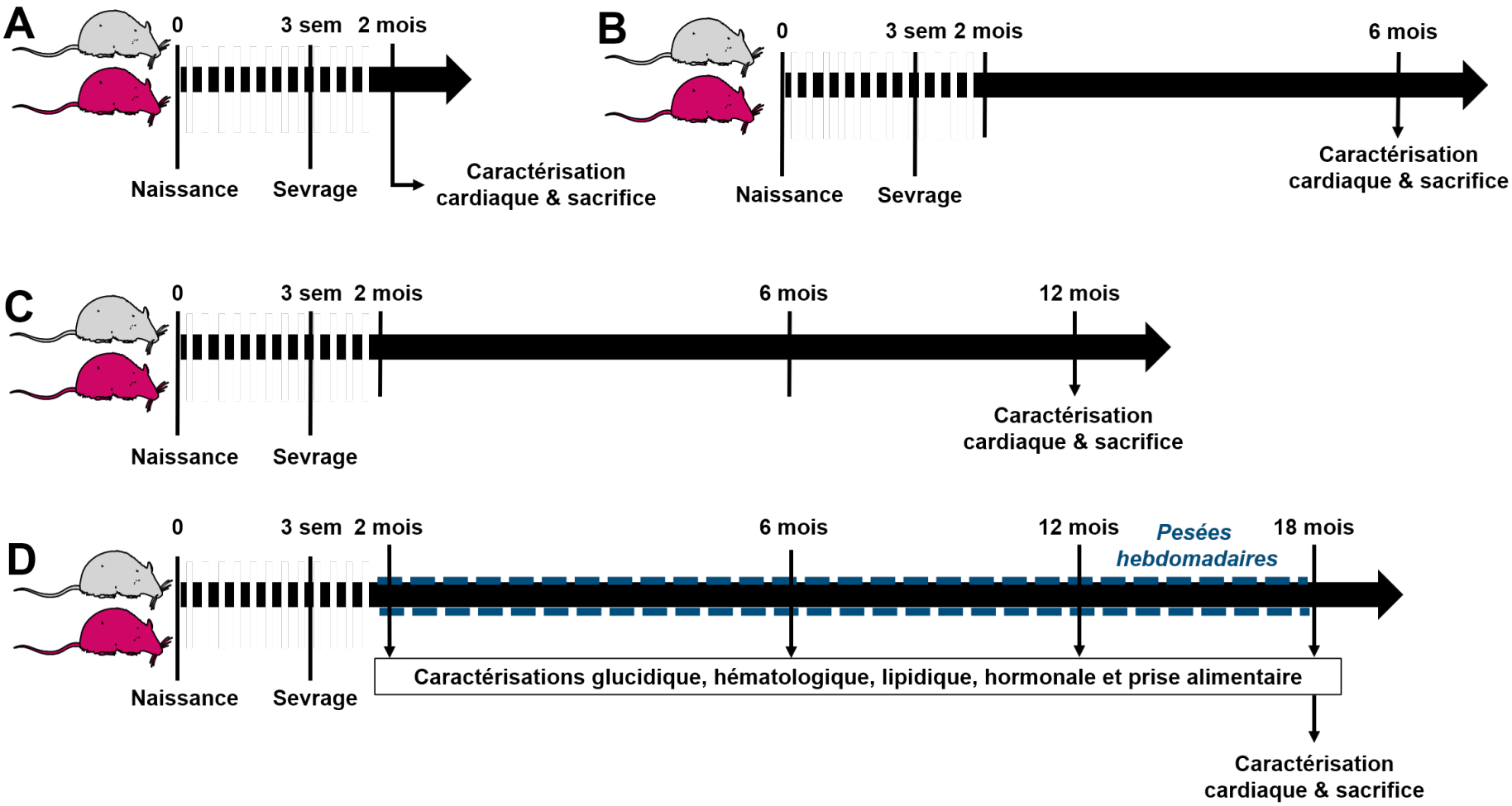


Figure 20 : Protocole expérimental de la caractérisation du modèle de rats.

Dans chaque groupe les rats *Tspo*$^{-/-}$ ( ) sont comparés aux rats *Tspo*$^{+/+}$ ( ) de l'élevage. **A.** Protocole de 2 mois. **B.** Protocole de 6 mois. **C.** Protocole de 12 mois. **D.** Protocole de 18 mois. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

Différents groupes ont été inclus : des rats âgés de 2 mois (âge auquel les animaux sont inclus dans les différentes procédures expérimentales) et des rats âgés de 6, 12 et 18 mois pour poursuivre la caractérisation au cours du vieillissement. Les rats inclus dans le groupe de caractérisation à 18 mois ont été pesés toutes les semaines depuis leur sevrage (à 3 semaines) jusqu'à 18 mois. Certains sont décédés naturellement, d'autres ont été euthanasiés en raison de points limites (perte de poids, tumeur, etc.) et les rats restants ont été sacrifiés à 18 mois pour réaliser des prélèvements, après les différentes procédures de caractérisation.

2.1. Caractérisation cardiaque

Les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (90 mg/kg). Une thoracotomie a été réalisée et le cœur a été excisé et plongé dans du NaCl 0,9% froid. Rapidement, les oreillettes et le ventricule droit ont été retirés. En effet, de par l'hétérogénéité de leurs fonctions (remplissage pour les oreillettes et éjection du sang pour les ventricules) et de leurs contraintes (circulation pulmonaire pour le ventricule droit, systémique pour le gauche), les quatre compartiments du cœur sont sujets à des physiopathologies différentes. Cette étude s'est intéressée uniquement au ventricule gauche car les infarctus y sont majoritairement localisés (Tibaut *et al.*, 2017)**.** Environ 30 mg de ventricule gauche ont été prélevés au niveau de l'apex pour les analyses d'expression génique et le reste du ventricule gauche a été utilisé pour les analyses protéiques.

2.1.1. Analyse de l'expression génique par RT-qPCR

Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le **Dr. Leeyah Issop** (équipe Ghaleh, IMRB). Les ARNs totaux ont été extraits à partir de prélèvements de ventricules gauches de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ avec le kit RNeasy Fibrous kit (Qiagen) en suivant les instructions du fournisseur. Les ARNs ont été élués avec de l'eau pure sans RNase et ont ensuite été dosés par spectrophotométrie (NanoDrop One, ThermoScientific). Les ARN ayant une pureté comprise entre 1,8 et 2,2 pour le rapport 260/230 et de 2 pour le rapport 260/280 ont été utilisés. Les ARNs totaux (1 µg) ainsi obtenus ont été reverse transcrits en brins d'ADN complémentaires (ADNc) avec le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) en suivant les instructions du fournisseur. Les étapes de la reverse transcription (RT) : l'activation de la reverse transcriptase (10 minutes à 25°C), la reverse transcription (2 heures à 37°C) et l'inactivation de la reverse transcriptase (5 minutes à 85°C) ont été réalisées avec un thermocycleur Biometra Tone (Analytik Jena). Les échantillons d'ADNc obtenus ont été dilués dans de l'eau pure sans DNAse et conservés à -20°C. Les échantillons d'ADNc (25 ng) ont été soumis à une réaction en chaîne par polymérase

quantitative (qPCR) avec l'appareil QuantStudio® 6 Flex (Applied Biosystems). Des amorces taqman (ThermoFisher) ont été utilisées pour mesurer l'expression de *Star* (Rn00580695) et *Tbp* (Rn01455646). La quantification des qPCR a été réalisée avec la méthode $\Delta\Delta CT$ (CT : *cycle thershold*).

2.1.2. Quantification protéique par Western Blot

2.1.2.1. Echantillons

Les ventricules gauches ont été finement découpés en morceaux au scalpel à 4°C. Les morceaux obtenus ont été suspendus dans du tampon d'homogénéisation (220 mM mannitol, 70 mM saccharose, 10 mM HEPES, 2 mM d'EGTA, pH 7,4 à 4°C) puis dilacérés aux ciseaux avant d'être homogénéisés à l'aide d'un ULTRA TURRAX® T25 basic (IKA Labortechnic) pendant 5 secondes environ puis d'un Potter-Elvehjem® motorisé (1500 tours/min) par deux séquences de 5 allers-retours lents, espacées de 2 minutes environ. L'homogénat été centrifugé à 1000 g pendant 5 minutes à 4°C (rotor Sorval SM-24, Sorval RC 5 plus) puis le surnageant a été supplémenté avec 0,5 % d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma) avant d'être dosé.

2.1.2.2. Dosage protéique

Les échantillons ont été dosés avec le kit BiCinchoninic Acid (BCA, Sigma) en suivant les instructions du fournisseur. Les protéines réduisent le cuivre (II) en cuivre (I) et le BCA forme un complexe violet avec le cuivre (I) dont l'absorbance est proportionnelle à la concentration protéique. Les échantillons ont donc été incubés 30 minutes à 37°C avec le réactif contenant le cuivre (II) et le BCA, puis la densité optique (DO) a été mesurée à 562 nm. La quantification a été réalisée par méthode linéaire grâce à une gamme étalon d'albumine de sérum bovin de 0 à 1 mg/mL.

2.1.2.3. Immunoblot

L'analyse des protéines par immunoblot a été réalisée à partir des protocoles du **Dr. Leeyah Issop**. Les échantillons ont été dilués au ¾ dans du Bleu de Laemmli (4X). Les protéines ont ensuite été dénaturées à 95°C pendant 5 minutes. Un marqueur de poids moléculaires et les échantillons (40 µg de protéines) ont été déposés dans un gel d'acrylamide 4-20% pré-coulé (Biorad). Les protéines ont été séparées par électrophorèse à température ambiante pendant 45 minutes à 150 V dans un tampon de migration (2,5 mM Trisbase, 19 mM Glycine, 0,05% SDS). Les protéines ont ensuite été transférées par électrophorèse sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) (Amersham HybondTM-P, GE Healthcare) dans un tampon

de transfert commercial (Biorad) pendant 7 minutes à 25 volts dans un système de transfert (Trans-Blot® Turbo™, Biorad). Les membranes ont été incubées dans une solution de saturation (5% lait, 0,1% Tween, 1 mM Trisbase, 10 mM NaCl) pendant 1h30 à température ambiante sous agitation (20 rpm). L'anticorps primaire (dilué au 1/1000, Tableau 2) a ensuite été incubé sur la nuit à 4°C sous agitation (20 rpm). Après lavages au TBS-T (0,1% Tween, 1 mM Trisbase, 10 mM NaCl), l'anticorps secondaire (dilué au 1/4000, Tableau 2) a été incubé 1 heure à température ambiante sous agitation (20 rpm). Après lavages au TBS-T, les protéines ont été révélées par chimioluminescence avec le kit Western Bright Sirius (Advansta) à l'aide d'un système d'imagerie (Azure 600, Azure Biosystem). Afin de quantifier les échantillons déposés, les membranes ont subi un décapage de 10 minutes avec du Stripping Buffer (Biorad) avant d'être saturées puis incubées avec un nouvel anticorps primaire (dilué au 1/1000, Tableau 2) ciblant la protéine de ménage en suivant la même procédure jusqu'à l'étape de révélation. L'analyse quantitative des membranes a été réalisée à l'aide du logiciel Image J et la quantité de protéine d'intérêt de chaque échantillon a été exprimée par rapport à la quantité de protéine de ménage.

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés pour la quantification de protéines cardiaques par Western Blot.

Anticorps	Cible	Poids moléculaire	Espèce	Référence	Fournisseur	Dilution
Primaire	TSPO	18 kDa	Lapin	ab154878	Abcam	1/1000
Primaire	STAR cytosolique	37 kDa	Lapin	MBS3223061	MyBioSource	1/1000
Primaire	*Rat :* STAR mitochondriale	30 kDa	Souris	ab58013	Abcam	1/1000
Primaire	*AC16 :* STAR mitochondriale	30 kDa	Lapin	E-AB-60150	ElabScience	1/1000
Primaire	VDAC	32 kDa	Lapin	4866	Cell Signaling	1/1000
Primaire	SOD2	25 kDa	Lapin	ab13533	Abcam	1/1000
Primaire (ménage mitochondrial)	COX IV	16 kDa	Lapin	4844	Cell Signaling	1/1000
Primaire (ménage cytosolique)	GAPDH	35 kDa	Lapin	5174	Cell Signaling	1/1000
Secondaire	IgG souris	x	Cheval	7076	Cell Signaling	1/4000
Secondaire	IgG lapin	x	Chèvre	7074	Cell Signaling	1/4000

2.1.3. Échographies cardiaques

Les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 2, 6, 12 et 18 mois ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine et xylazine (60 mg/kg et 6 mg/kg, respectivement). Lorsque les rats étaient anesthésiés, la longueur tibiale et la longueur totale ont été mesurées. Les échographies cardiaques ont été réalisées par le **Dr. Jin-Bo Su** (équipe Ghaleh, IMRB) et avec l'aide de **Shirin Leick** (équipe Ghaleh, IMRB) avec une sonde d'échographie émettant à 13 MHz et le système d'ultrason digital Vivid 7 (GE Medical Systems, Little Chalfont, Royaume-Uni). Des paramètres morphologiques (diamètre et épaisseur des parois du ventricule gauche) et fonctionnels (fréquence cardiaque (FC), rapport des ondes E/A et fraction de raccourcissement) ont été mesurés. La fraction de raccourcissement (FR) a été calculée à partir des diamètres ventriculaires en systole (VGs) et en diastole (VGd) (Zacchigna *et al.*, 2021) :

$$FR = ((VGd - VGs) / VGd) * 100.$$

2.1.4. Sacrifices et prélèvements

Au terme des échographies cardiaques, les rats ont reçu une nouvelle dose de kétamine et xylazine (60 mg/kg et 6 mg/kg, respectivement) par injection intrapéritonéale. Une thoracotomie a été réalisée et le cœur a été excisé et plongé dans du NaCl 0,9% froid. Le cœur a été rapidement pesé puis les oreillettes ont été retirées et les ventricules ont été pesés. Les rapports masse ventricule gauche/masse corporelle ont ensuite été calculés. Le ventricule gauche a été placé dans un moule à cœur et coupé en 6 tranches de 2 mm. La 3ème coupe (en partant de la base) a été fixée dans de la formaline 10% puis incluse en bloc de paraffine. Des coupes transversales de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées par la plateforme d'histologie de l'IMRB. Certains organes ont été fixés dans de la formaline 10% puis le laboratoire d'Anatomocytopathologie & Autopsies de l'ENVA les a inclus en paraffine afin de réaliser des coupes puis des analyses histologiques. Celles-ci ont été réalisées par le **Dr. Edouard Reyes-Gomez** (Unité d'Histologie et d'Anatomie Pathologique, ENVA).

2.1.5. Fibrose cardiaque

Les coupes de ventricule gauche montées sur lame ont d'abord subi un déparaffinage : deux bains successifs de toluène (10 et 5 minutes), deux bains successifs d'éthanol pur (5 minutes), un bain d'éthanol 95° (5 minutes), puis un bain d'éthanol 70° (3 minutes). Les lames ont ensuite été rincées à l'eau courante (3 minutes) avant coloration par le rouge sirius (0,1% dans une solution d'acide picrique 4%, 30 minutes) qui colore les fibres de collagène (Junqueira *et al.*, 1979). Après un rinçage abondant à l'eau distillée, les lames ont été

déshydratées par des bains successifs d'éthanol (70°, 90° et pur) puis de toluène (3 minutes chacun). Des lamelles ont ensuite été montées à l'aide du milieu de montage Eukitt. Les lames ont été observées avec un microscope Zeiss (Axioplan 2) au grossissement 200, dix champs par coupe ont été pris en photo avec le logiciel Zen 2012 (Zeiss). La fibrose a été quantifiée avec l'extension Fiji du logiciel Image J et de l'outil d'analyse développé par Gabriel Landini (http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Fibrosis_Tool). La fibrose est exprimée en pourcentage de l'aire de la coupe.

2.1.6. Hypertrophie cardiaque

En plus des paramètres échographiques et morphologiques, l'hypertrophie cardiaque a été évaluée sur les coupes de ventricule gauche. Les lames ont d'abord subi un déparaffinage puis une réhydratation par trois bains successifs de toluène (5 minutes) suivis de trois bains successifs dans de l'éthanol pur (5 minutes). Les lames ont ensuite été rincées dans de l'eau distillée (3 minutes), puis trois fois avec du *Phosphate Buffered Saline* (PBS, 5 minutes) avant d'être incubées avec de la *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) couplée au fluorochrome AlexaFluor 488 (λex : 495 nm / λem : 519 nm) (10 µg/mL dans du PBS, 45 minutes). La WGA est une lectine qui se fixe aux glucides (N-acetylglucosamine) de la membrane plasmique des cellules. Après incubation, les lames ont été rincées trois fois avec du PBS (5 minutes). Les lamelles ont ensuite été montées avec du milieu contenant du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, abcam ab104139). Les lames ont été observées avec un microscope Zeiss (Axioplan 2) au grossissement 200, dix champs par coupe ont été pris en photo avec le logiciel Zen 2012 (Zeiss). La surface d'au moins 30 cardiomyocytes (en coupe transversale) par photo a été quantifiée à l'aide du logiciel Image J. Les résultats correspondent à la moyenne des surfaces des cardiomyocytes (μm^2).

2.1.7. Immunohistochimie

En plus du génotypage et des immunoblots, nous nous sommes assurés que TSPO n'était pas exprimée au niveau cardiaque par immunohistochimie sur des coupes de ventricules gauches. Ces marquages ont été réalisés à partir des protocoles du **Dr. Gabor Czibik** (équipe Derumeaux, IMRB) (Czibik *et al.*, 2021). Les lames ont subi la même préparation que celle décrite pour l'hypertrophie : un déparaffinage puis une réhydratation (voir paragraphe 2.1.6, page 89). Les lames ont ensuite été incubées dans du tampon citrate chaud pour bloquer les antigènes. Après le blocage de la peroxydase endogène (H_2O_2 3% 15 min) suivi d'une saturation d'une heure dans du sérum de chèvre (30% dans du PBS), les coupes ont été incubées avec des anticorps primaires (TSPO, chèvre ab154878 1:180) pendant une nuit à

4°C). Le lendemain, les lames ont été lavées et incubées avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (Abcam; ab97051 1:200) pendant 30 minutes à température ambiante. Les coupes ont été à nouveau lavées et incubées avec de la 3,3'-diaminobenzidine (DAB ; Vector Laboratories) sous observation visuelle jusqu'à l'apparition du signal. La réaction a été stoppée par immersion des lames dans l'eau. Les lames ont été observées avec un microscope à fluorescence inversée (Axioplan 2, Zeiss) équipé du logiciel Zen 2012 (Zeiss).

2.2. Caractérisation du métabolisme glucidique

2.2.1. Prise alimentaire

La prise alimentaire des rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ a été mesurée à 2, 6, 12 et 18 mois (Figure 20D). Les croquettes des rats, placés en cage individuelle pour ces mesures, ont été pesées tous les jours pendant une semaine. La prise alimentaire quotidienne moyenne a été calculée et exprimée en fonction de la masse corporelle des rats.

2.2.2. Test de tolérance à l'insuline

Les tests métaboliques ont été réalisés à partir des protocoles du **Dr. Etienne Delangre** (Laboratoire de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, UMR 8251) (Pitasi *et al.*, 2020).

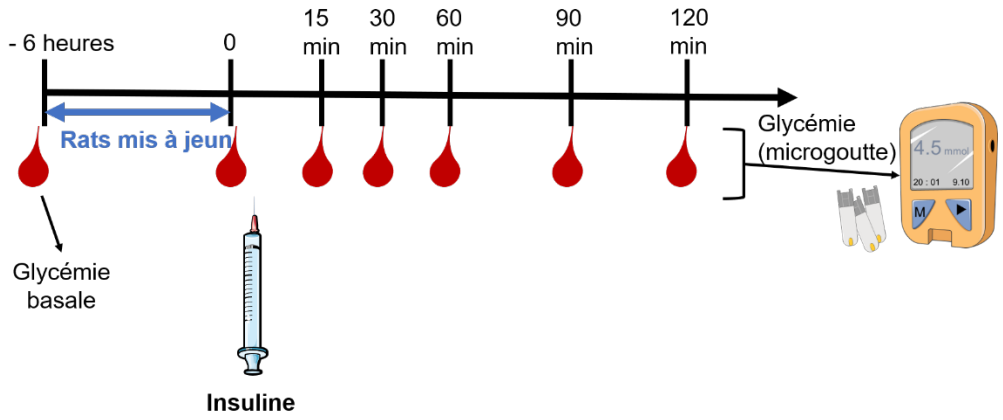


Figure 21 : Test de tolérance à l'insuline.
Un millimètre de queue a été coupé à l'extrémité de la queue pour prélever du sang et effectuer la première mesure de glycémie (basale) avec un glucomètre, puis le caillot formé a été retiré pour effectuer les mesures suivantes : juste avant l'injection intrapéritonéale d'insuline puis 15, 30, 60, 90 et 120 minutes après cette injection. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

Les tests de tolérance à l'insuline (ITT) ont été réalisés chez les rats âgés de 2, 6, 12 et 18 mois (Figure 20D). Ce test permet d'évaluer la sensibilité des organes cibles (i.e. muscles, foie, tissu adipeux) à l'insuline. Il consiste à mesurer les glycémies des rats à l'état basal, à jeun (retrait

des croquettes pendant 6 heures, eau *ad libitum*) et 15, 30, 60, 90, 120 minutes après injection intrapéritonéale d'insuline (1 UI/kg) (Figure 21).L'aire sous courbe de l'évolution de la glycémie en fonction du temps (de t=0 à t=120 minutes) a été mesurée à l'aide du logiciel Graphpad Prism. Puis l'aire sur courbe corrigée (AOC) a été calculée d'après la formule suivante :

*AOC (en mg/dL/min) = (glycémie à t0 * 120 min) - aire sous courbe*

2.2.3. Test de tolérance au glucose

Les tests de tolérance au glucose (GTT) ont été réalisés une semaine après les tests de tolérance à l'insuline chez les rats âgés de 2, 6, 12 et 18 mois (Figure 20D). Ce test permet d'évaluer la capacité du pancréas à sécréter de l'insuline en réponse à une surcharge en glucose. Il consiste à mesurer les glycémies des rats à l'état basal, à jeun (retrait des croquettes pendant 6 heures, eau *ad libitum*) et 15, 30, 60, 90, 120 minutes après injection intrapéritonéale de glucose (1 mg/kg) (Figure 22).

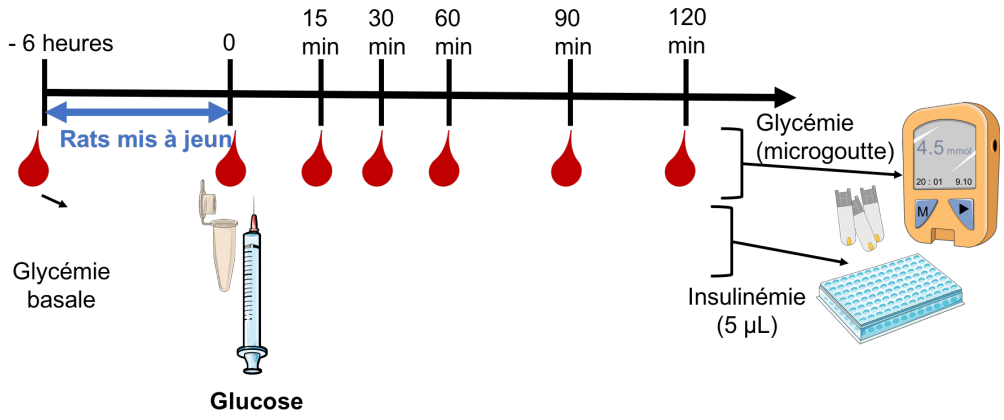


Figure 22 : Test de tolérance au glucose.
La croute formée après le test d'ITT a été coupée pour effectuer la première mesure de glycémie (basale). Un prélèvement de sang pour déterminer l'insulinémie à jeun a été réalisé en même temps que la mesure de glycémie à jeun : un capillaire hépariné a été placé au bout de la queue pour récupérer du sang. Puis le caillot formé a été retiré pour effectuer les mesures suivantes : juste avant l'injection intrapéritonéale de glucose puis 15, 30, 60, 90 et 120 minutes après cette injection. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

L'aire sous courbe de l'évolution de la glycémie en fonction du temps (de t=0 à t=120 minutes) a été mesurée à l'aide du logiciel Graphpad Prism. Puis l'aire sous courbe corrigée (AUC) a été calculée d'après la formule suivante :

*AUC (en mg/dL/min) = aire sous courbe – (glycémie à t0 * 120 min)*

2.2.4. Insulinémie à jeun

L'insulinémie à jeun a été mesurée sur les prélèvements de sang réalisés après 6 heures de jeûne, juste avant l'injection intrapéritonéale de glucose. Les prélèvements de sang ont été centrifugés à 2000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les plasmas ainsi obtenus ont été conservés à -80°C. L'insulinémie a été quantifiée avec 5 µL de plasma par dosage ELISA avec le kit « Rat Ultrasensitive Insulin ELISA » de Alpco en suivant les indications du fournisseur et les conseils du **Dr. Maria Pini** (équipe Derumeaux, IMRB) (Braud *et al.*, 2021).

2.2.5. Index HOMA-IR

L'index HOMA-IR (HOmeostasis Model Assessment of Insuline Resistance) est un indice de la résistance à l'insuline. Plus cet index est élevé et plus les rats sont résistants à l'insuline. Il a été calculé d'après la formule suivante, adaptée aux rongeurs (Lee *et al.*, 2008) :

*HOMA-IR = [(glycémie à jeun (mg/dL) / 18) * (insulinémie à jeun (ng/mL)/0,0347)] /108,24*

2.3. Caractérisations hématologique et des métabolismes lipidique et hormonal

2.3.1. Prélèvements

Les prélèvements sanguins ont été réalisés sur les rats âgés de 2, 6, 12 et 18 mois. Les rats ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane : l'induction a été réalisée à 4% et le maintien à 2%, avec un débit d'oxygène de 2 L/min. Les prélèvements ont tous été réalisés par voie intra jugulaire (Figure 23) à la même heure : ZTU6 (Zeitgeber Time Units) qui correspond à 6 heures d'éclairage dans l'animalerie.

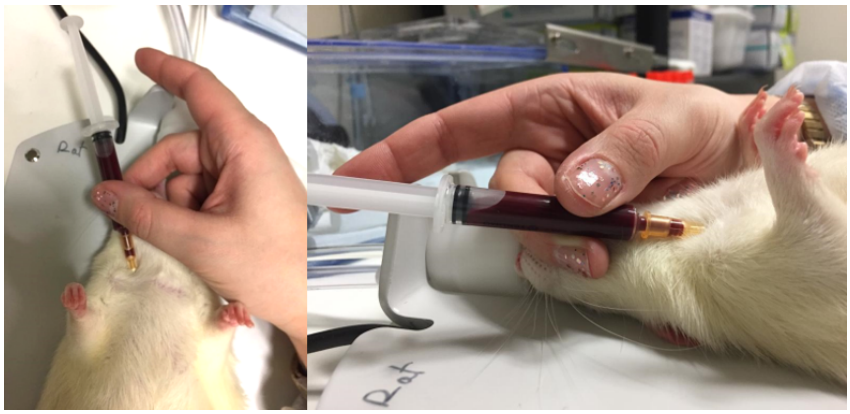


Figure 23 : Prélèvement de sang intra-jugulaire.
Une aiguille (26 G) a été introduite entre la clavicule et l'omoplate du rat (en décubitus dorsal) jusqu'à atteindre la jugulaire. Les rats ont été placés sur un tapis chauffant tout au long du prélèvement et jusqu'à leur réveil pour prévenir le risque d'hypothermie.

Une partie du sang total prélevé a été recueilli sur un microtube traité avec de l'éthylènediaminetétraacétique (EDTA), retournée délicatement huit fois puis conservée à température ambiante pour la numération de la formule sanguine (NFS). Le reste du sang prélevé a été déposé dans un tube sans anticoagulant et a été laissé pendant 30 minutes à température ambiante avant d'être centrifugé à 2000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le sérum ainsi obtenu a été conservé à -80°C avant la réalisation des différents dosages.

2.3.2. Numération de la formule sanguine

La NFS a été réalisée au maximum une heure après le prélèvement du sang. L'hémogramme (VetScan HM5, Abaxis) a permis de mesurer les paramètres suivants :

- Numérations leucocytaire, érythrocytaire et plaquettaire totales
- Nombre et pourcentage de lymphocytes, de monocytes et de neutrophiles
- Hémoglobine
- Hématocrite, plaquettocrite
- Volumes globulaire (VGM) et plaquettaire (VPM) moyens
- Teneur (TCMH) et concentration (CCMH) corpusculaires moyennes en hémoglobine

2.3.3. Bilan lipidique

Le bilan lipidique des rats a été réalisé à la plateforme biochimie du Centre de Recherche sur l'Inflammation de l'hôpital Bichat avec l'aide de **Nicolas Sorhaindo**. Cette plateforme est équipée d'un automate Olympus AU 400 initialement conçu pour les dosages biochimiques en clinique humaine et adapté aux dosages sur de faibles volumes pour une utilisation en recherche sur les petits animaux. Les dosages du cholestérol total, des HDL, des triglycérides et des acides gras libres ont été réalisés par méthodes enzymatiques colorimétriques. Les valeurs des VLDL et LDL ont été calculées d'après les formules suivantes :

VLDL = triglycérides / 5 *LDL = cholestérol total – HDL – VLDL*

2.3.4. Dosages des hormones stéroïdes

Les dosages sériques d'hormones stéroïdes de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$, âgés de 2, 6 et 12 mois ont été effectués par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Ces dosages ont été réalisés par le **Dr. Frank Giton** (plateforme spectrométrie de masse, IMRB).

2.3.5. Dosages des stérols

Les concentrations du cholestérol, de ses précurseurs et des oxystérols, dans le sérum, les mitochondries et les cytosols de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$, ont été mesurées par GC-MS. Ces dosages ont été réalisés par le **Pr. Valério Léoni** (Hôpital de Desio, Université de Milano-Bicocca, Monza, Italie).

2.4. Erythropoïèse de stress

Cette partie du travail a été réalisée en collaboration avec le **Dr. Sophie Lefèvre** (INSERM UMRS 1134 Biologie intégrée du globule rouge) et le **Dr. Hana Manceau** (Laboratoire de Biochimie, Hôpital Bichat).

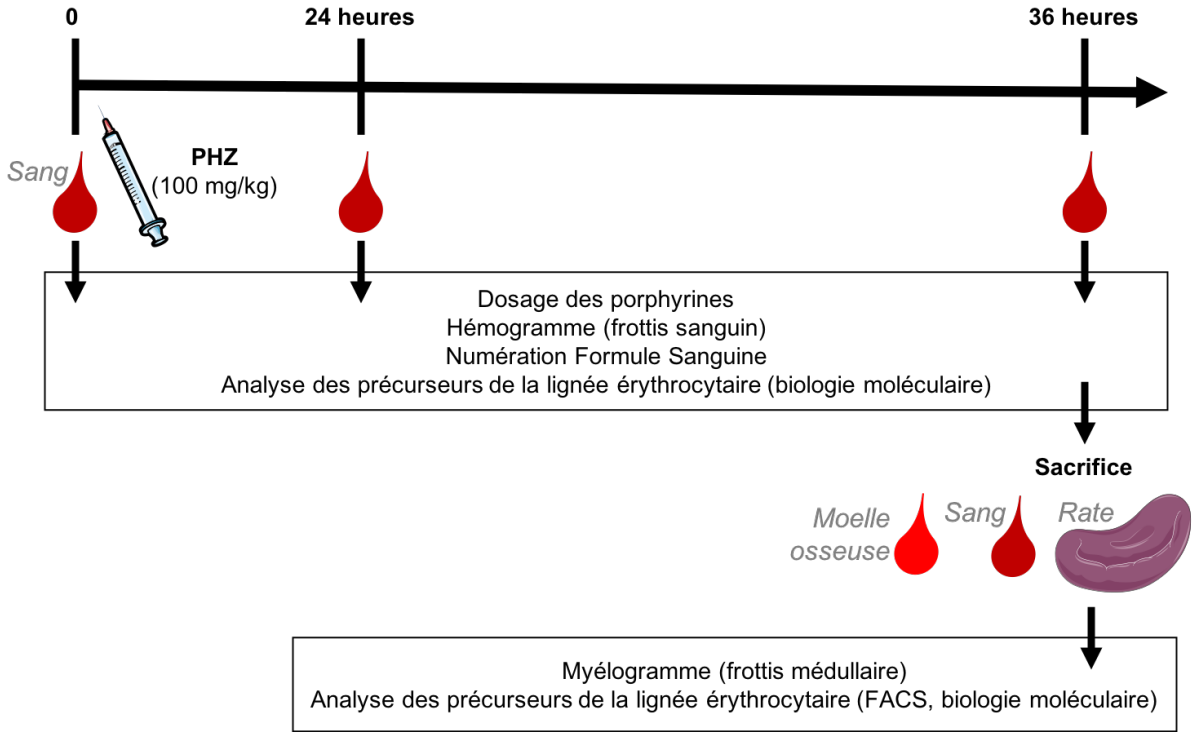


Figure 24 : Protocole expérimental de l'érythropoïèse de stress.
Après un prélèvement sanguin, une injection de phénylhydrazine a été réalisée chez des rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$. 24 heures après, un nouveau prélèvement sanguin a été réalisé. Puis à 36 heures, les rats ont été sacrifiés et le sang, la moelle osseuse fémorale et la rate ont été prélevés. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

Pour cette procédure, des rats mâles *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 12 semaines ont été inclus. L'érythropoïèse de stress a été induite par injection intrapéritonéale de phénylhydrazine (PHZ, 100 mg/kg, diluée extemporanément dans du PBS à 50 mg/mL), agent hémolytique qui induit une anémie et qui stimule ainsi l'érythropoïèse (Zhang *et al.*, 2019). Des prélèvements sanguins ont été réalisés (voir paragraphe 2.3.1, page 93) avant, 24 heures et 36 heures après

l'injection de PHZ. Le sang, récupéré sur tubes EDTA, a servi à réaliser une NFS et un frottis sanguin. Le reste du sang a été conservé pour doser les porphyrines et pour réaliser des analyses de biologie moléculaire (RT-qPCR, western blot, etc.). Après le prélèvement sanguin à 36 heures, les rats ont été sacrifiés. Un nouveau prélèvement de sang, récupéré sur tubes EDTA, a servi à réaliser une analyse des progéniteurs des érythrocytes (réticulocytes) par FACS. La moelle osseuse fémorale a été prélevée : les fémurs ont été coupés au niveau des épiphyses et centrifugés à 2000 g pendant 10 minutes à 4°C. La moelle osseuse a été re-suspendue dans un tampon (2 mM d'EDTA, 2% SVF dans du PBS) et un frottis médullaire a permis de réaliser une numération de la formule médullaire avec une coloration de May-Grünwald Giemsa. La rate a également été prélevée dans un tampon (2 mM d'EDTA dans du PBS) et une partie a été fixée pour des analyses histologiques. Différents marqueurs de l'érythropoïèse (comme le taux d'énucléation des progéniteurs et le pourcentage des cellules souches différenciées) ont été mesurés par FACS dans les suspensions de moelle osseuse et de rate. Celles-ci ont ensuite été congelées pour réaliser des analyses de biologie moléculaire en fonction des résultats du FACS (Figure 24).

3. ETUDE SUR CARDIOMYOCYTES PRIMAIRES ISSUS DE RATS DELETES POUR TSPO

3.1. Dissociation de cardiomyocytes primaires

Les rats mâles homozygotes *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 2 mois ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'un mélange de Zolétil® (tiletamine et zolazépam 80 mg/kg), de xylazine (5 mg/kg) contenant de l'héparine (100 UI/kg). La dissociation des cardiomyocytes a été réalisée selon le protocole du laboratoire (Panel *et al.,* 2017a). Une thoracotomie a été réalisée puis le cœur a été excisé et plongé dans un tampon de perfusion dépourvu de calcium à 4°C (113 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 0,6 mM KH_2PO_4, 0,6 mM $NaHPO_4$, 1,2 mM $MgSO_4$, 12 mM $NaHCO_3$, 10 mM $KHCO_3$, 10 mM HEPES, 30 mM taurine, 0,032 mM de rouge de phénol, 10 mM 2,3-butanedione monoxime (BDM) et 5,5 mM de glucose, pH 7,4 à 37°C). Le tampon de perfusion a préalablement été oxygéné par l'apport de carbogène (95% O_2 et 5% CO_2). La présence de BDM et l'absence de calcium dans le tampon de perfusion empêchent le cœur de se contracter. Rapidement, l'aorte a été dégagée et canulée à un montage de type Langendorff. Le cœur a été perfusé à pression constante (80 mmHg) de manière rétrograde par le tampon de perfusion maintenu à 37°C (Figure 25). Après environ 2 minutes de rinçage, le tampon de perfusion a été remplacé par un tampon de digestion (tampon de perfusion contenant 0,1 mg/mL de libérase, 0,14 mg/mL de trypsine EDTA et 12,5 µM de $CaCl_2$, pH 7,4). Ce tampon a été perfusé pendant 6 à 8 minutes, jusqu'à ce que le cœur prenne une

consistance gélatineuse. Le cœur a ensuite été détaché du montage de type Langendorff et placé dans un tampon d'arrêt (tampon de perfusion contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 12,5 µM de $CaCl_2$, pH 7,4) permettant de stopper la digestion enzymatique.

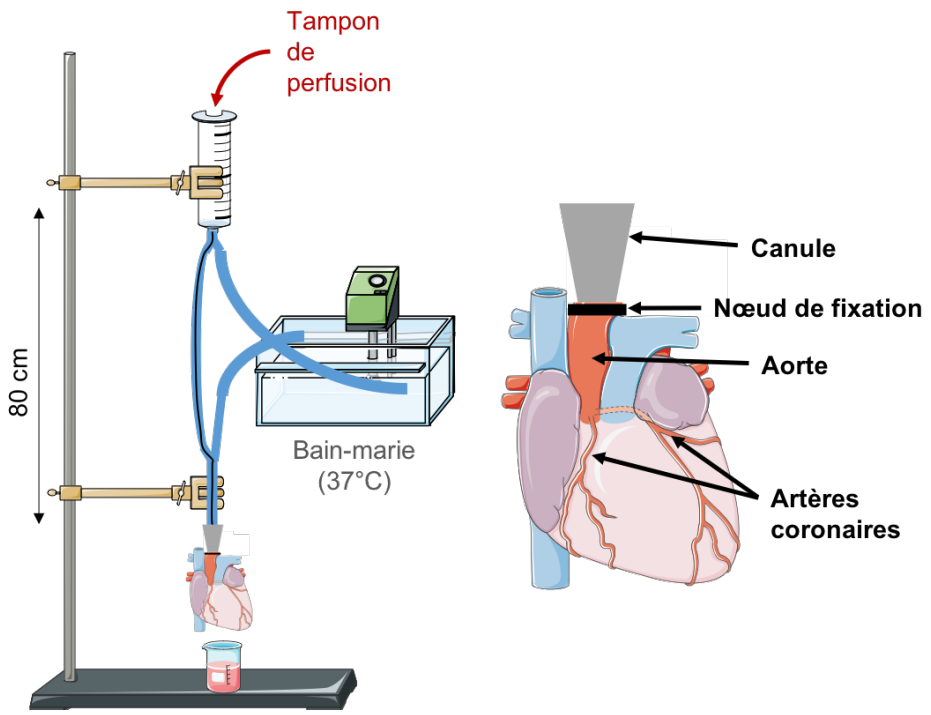


Figure 25 : Schéma de la perfusion type Langendorff.
Le cœur est canulé par l'aorte et le tampon de perfusion circule dans les coronaires mais la valve tricuspide s'oppose à l'entrée du tampon de perfusion dans le ventricule gauche. Seules les artères coronaires sont perfusées. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

Les oreillettes et le ventricule droit ont été retirés et le ventricule gauche découpé en petits morceaux. Ces derniers ont ensuite été dilacérés par aspiration-reflux à l'aide d'une pipette Pasteur afin de compléter la digestion enzymatique par une dissociation mécanique. Le surnageant a été filtré (250 µm) puis laissé à décanter pendant 10 minutes à 37°C au cours desquelles les cellules vivantes ont sédimenté. Après 10 minutes de sédimentation, le surnageant contenant les cellules mortes a été éliminé. Le culot cellulaire a été re-suspendu dans un tampon contenant du calcium (tampon de perfusion contenant 5% de SVF et 12,5 µM de $CaCl_2$, pH 7,4) puis la suspension cellulaire a sédimenté pendant 10 minutes à 37°C. Ce processus de sédimentation/re-suspension a été renouvelé avec des concentrations croissantes de calcium (62, 112, 212, 500 µM puis 1 mM de $CaCl_2$). Après avoir réintroduit la plus forte concentration de calcium (1 mM), la viabilité des cardiomyocytes a été évaluée grâce à une coloration au bleu trypan. C'est une coloration d'exclusion qui permet de marquer en bleu les cellules mortes : les cellules vivantes relarguent le bleu et restent incolores. Un

comptage sur cellule de Malassez des cardiomyocytes (Figure 26) permet de déterminer le pourcentage de viabilité, qui est exprimé selon la formule suivante :

% viabilité = (nombre de cellules vivantes / nombre de cellules totales) x 100.

Seules les préparations présentant plus de 40% de viabilité ont été incluses. Une partie des cardiomyocytes a été utilisée pour des analyses lipidiques et pour des expériences de microscopie à fluorescence.

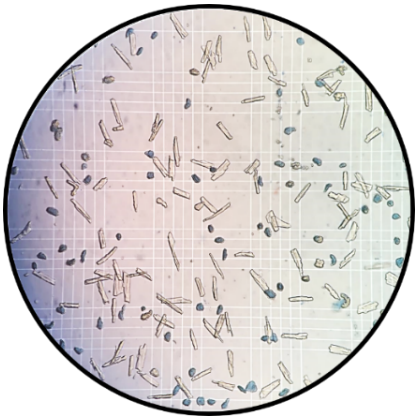


Figure 26 : Evaluation de la viabilité cellulaire.
Comptage des cardiomyocytes sur cellule de Malassez, coloration bleu trypan, microscopie optique (Olympus CKX41).

3.2. Mesure du stress oxydant par marquages fluorescents

Les cardiomyocytes ont été ensemencés dans des boites de Pétri de 35 mm à raison de 150 000 cellules par boite dans du milieu M199 (ThermoFisher) contenant 0,1% d'Insuline Transferine Selenium (ITS). Les boites, préalablement coatées avec de la laminine (2,5 µg dans du NaCl 0,9%), ont été placées dans un incubateur (37°C, 5% CO_2) (HERACell 150, Thermo Scientific) pendant deux heures afin que les cellules adhèrent avant de procéder aux marquages fluorescents. Les différents marqueurs fluorescents ont été pré-incubés 30 minutes à 37°C dans un tyrode glucosé (130 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 10 mM d'HEPES, 1 mM de $MgCl_2$, 1,36 mM de $CaCl_2$, 5,5 mM de glucose, pH 7,4, 37°C). Le stress oxydant cytoplasmique a été mis en évidence par la sonde fluorescente CellROX (2,5 µM / λex : 640 nm / λem : 665 nm). Cette sonde devient fluorescente en présence d'espèces réactives de l'oxygène. Le stress oxydant mitochondrial a été mis en évidence par le MitoSOX (2 µM / λex : 510 nm / λem : 580 nm). Le MitoSOX s'accumule dans les mitochondries et devient fluorescent lorsqu'il est oxydé par l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$). Enfin, le statut redox des cardiomyocytes a été évalué avec du ThiolTracker (20 µM / λex : 505 nm / λem : 526 nm). Cette sonde fixe le glutathion réduit (GSH) qui est un des principaux anti-oxydants cellulaires. Après cette période d'incubation, les cardiomyocytes ont subi deux rinçages avec du tyrode glucosé avant d'être

observés au microscope. Les cardiomyocytes ont été placés sur la platine d'un microscope à fluorescence inversé (Olympus IX81, Olympus, Rungis, France) équipé d'un micro-incubateur thermostaté à 37°C (Warner Instruments). Tout au long de l'expérience, les cardiomyocytes ont été stimulés électriquement par une électrode (6 mV, 0,5 Hz) afin d'induire leur contraction. Ils ont été perfusés avec du tyrode glucosé, à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit de 0,5 mL/min et ont été soumis à un flux continu d'un mélange gazeux normoxique (5% CO_2, 21% O_2, 94% N_2) (Figure 27). Des photos ont été prises toutes les 10 minutes pendant une heure. Les images obtenues ont été analysées avec le logiciel Xcellence (Olympus). Chaque champ expérimental contient 25 à 40 cardiomyocytes. La fluorescence des différentes sondes a été intégrée dans chaque cardiomyocyte sur une surface de 80 μm^2, aux différents temps de mesure.

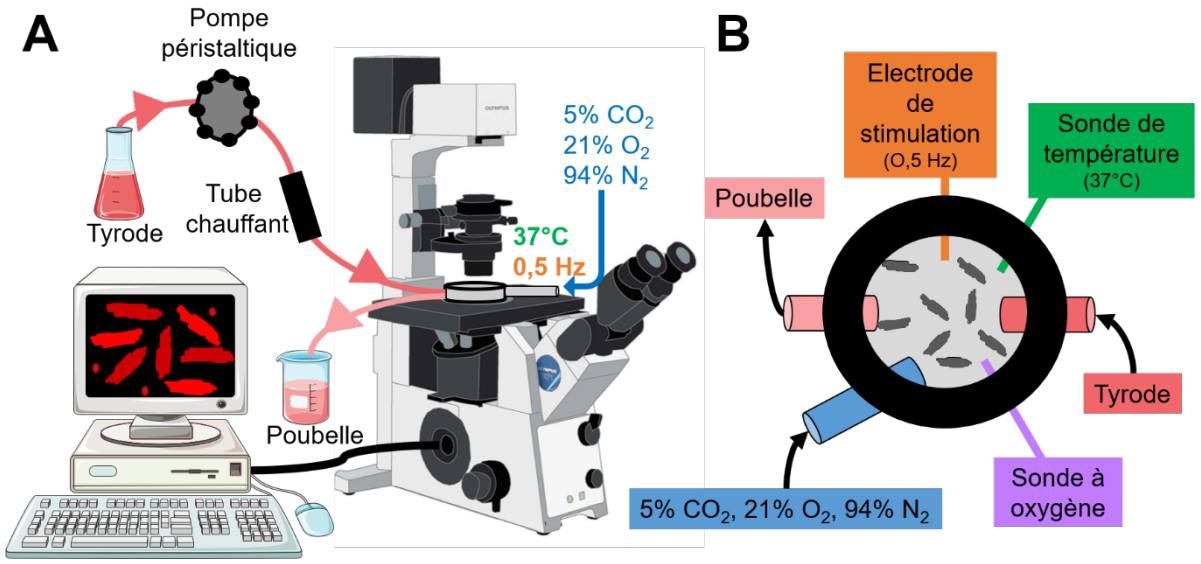


Figure 27 : Montage du microscope à fluorescence inversée.
A. Vue d'ensemble du montage. La boite de Pétri contenant les cardiomyocytes est placée sur le microscope dans le micro-incubateur thermostaté. Le microscope est relié à un ordinateur qui permet la visualisation des cellules en temps réel et la prise de photo à des temps précis. Une pompe péristaltique reliée à un tube chauffant assure le renouvellement du milieu (tyrode) dans le micro-incubateur. **B.** Dispositif du micro-incubateur thermostaté. Celui-ci est relié à un système d'apport en milieu à 37°C et d'élimination du milieu usé. La température du milieu est ajustée par une sonde de température reliée au tube chauffant. Les cardiomyocytes sont stimulés à l'aide d'une électrode pour induire leur contraction. Un mélange gazeux est perfusé et une sonde à oxygène permet de mesurer son taux dans le micro-incubateur. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

3.3. Analyse des lipides par microscopie à fluorescence

Les cardiomyocytes ont été ensemencés à raison de 15 000 cellules par puits, sur des lames (Nunc® Lab-Tek®) préalablement coatées à la laminine, dans du milieu M199 contenant 0,1% d'ITS. Les cellules ont été placées dans un incubateur (37°C, 5% CO_2) pendant deux heures.

3.3.1. Gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques intracellulaires ont été visualisées avec une sonde fluorescente qui devient fluorescente en phase lipophile : le Bodipy™ 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentaméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène). Les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes à 37°C puis incubées 1 heure à 37°C avec du Bodipy™ (7,6 µM / λex : 480 nm / λem : 515 nm). Les noyaux ont été marqués avec du Hoechst 33342 (2 µM / λex : 350 nm / λem : 461 nm). Les lamelles ont ensuite été montées sur des lames avec du glycérol et les cellules observées avec un microscope confocal (LSM 900 Airyscan 2) au grossissement 400, dix champs par puits ont été pris en photo. Les gouttelettes lipidiques ont été quantifiées à l'aide du logiciel Image J.

3.3.2. Cholestérol cellulaire

Le cholestérol libre des cellules a été visualisé grâce à une toxine bactérienne fluorescente issue de *Streptomyces filipinensis* : la Filipin III (λex : 360 nm / λem : 385-470 nm) (Maxfield *et al.*, 2012). Les cellules ont subi deux lavages avec du PBS froid. Elles ont ensuite été fixées avec 4% de paraformaldéhyde pendant 10 minutes à 37°C et perméabilisées avec du Triton 0,1%. Après deux lavages au PBS, les cellules ont été marquées avec de la Filipin III (100 µg/mL) 30 minutes à température ambiante sous agitation lente (Wilhelm *et al.,* 2019). Les lamelles ont ensuite été montées sur des lames avec du glycérol et les cellules observées avec le microscope à fluorescence inversé (Olympus IX81) au grossissement 200, dix champs par puits ont été pris en photo.

3.3.1. Cholestérol membranaire

Le D4-mCherry (λex : 587 nm / λem : 610 nm) est une sonde fluorescente développée par l'équipe du **Dr. Toshihide Kobayashi** (Venugopal *et al.*, 2016). Le D4 correspond au quatrième domaine de la perfringolysin O, une toxine bactérienne produite par *Clostridium perfringens*, qui se lie aux membranes cellulaires riches en cholestérol (Maekawa 2017). Les cellules ont été fixées avec 4% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 10 minutes à 37°C. Après deux lavages au PBS, les cellules ont été marquées avec D4-mCherry (dilué au 1:12 dans du PBS ; λex : 586 nm / λem : 610 nm) et 1 µM de Hoechst 33342 (λex : 350 nm / λem : 461 nm) pendant 15 minutes à 37°C. Après trois lavages, les lamelles ont été montées avec du glycérol. Les lames ont été observées avec un microscope confocal (LSM 900 Airyscan 2) au grossissement 400, dix champs par puits ont été pris en photo.

3.4. Analyse des lipides neutres par chromatographie sur couche mince

Les cardiomyocytes primaires (1500000 cellules) ont subi deux lavages avec du PBS froid puis ont été centrifugés pendant 10 minutes à 2000 g à 4°C. Les culots secs ont été conservés à -80°C. Les chromatographies sur couche mince (*Thin Layer Chromatography*, TLC) ont été réalisées dans le laboratoire du **Dr. Toshihide Kobayashi**, avec l'aide de **Nario Tomishige** (Laboratoire de bio-imagerie et pathologies, Université de Strasbourg). Les culots ont été lysés dans du SDS 0,1% par aspirations/reflux et les protéines obtenues ont été dosées par dosage BCA (voir paragraphe 2.1.2.2, page 87). Les lipides ont été extraits en plaçant les échantillons (150 µg de protéines) dans un mélange de chloroforme:méthanol (1 volume : 2 volumes), auquel du chloroforme (1 volume) puis de l'eau (1 volume) ont été ajoutés. Après une centrifugation de 640 g pendant 10 minutes à température ambiante, la phase aqueuse a été éliminée et la phase organique a été séchée pendant 30 minutes sous un flux d'azote. Le culot a été re-suspendu dans 50 µL de chloroforme et déposé à l'aide d'un capillaire sur une plaque de silice. La migration a été réalisée à l'aide d'un éluant pour lipides neutres (80% hexane, 20% Diéthyléther, 2% acide acétique). Les lipides ont d'abord été visualisés sous lumière UV après vaporisation de primuline 0,005% à l'aide d'un imageur biomoléculaire (ImageQuant™ LAS 4000 mini, GE Healthcare). La quantification des lipides a été réalisée à l'aide du logiciel Image J.

4. ETUDE SUR MITOCHONDRIES CARDIAQUES ISSUES DE RATS DELETES POUR TPSO

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec **Shirin Leick** et **Dr. Laura Rostain**.

4.1. Isolement des mitochondries et des cytosols cardiaques de rats

Les échantillons (ventricules gauches de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$) ont été préparés en suivant les procédures décrites aux paragraphes 2.1, page 86 et 2.1.2.1, page 87. Le surnageant obtenu après la première centrifugation de 5 minutes à 1000 g à 4°C a été de nouveau centrifugé pendant 10 minutes à 10 000 g (rotor Sorval SM-24, Sorval RC 5 plus, ThermoFisher). Le culot contenant les mitochondries a été re-suspendu dans 200 µL de tampon de reprise (220 mM mannitol, 70 mM saccharose, 10 mM HEPES, 10 µM sEGTA, pH 7,4 à 4°C). Le surnageant a été centrifugé pendant 1 heure à 4°C à 100 000 g (rotor 50 Ti, Optima L-80 XP Ultracentrifuge, Beckman) et le surnageant obtenu, la fraction cytosolique, a été conservé. La préparation mitochondriale a été dosée par une méthode turbidimétrique. Cette méthode, mise au point au sein du laboratoire, évalue l'absorbance du milieu contenant

les mitochondries à 340 nm, qui est corrélée à l'absorbance obtenue par la méthode classique de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Elle permet de déterminer rapidement la concentration protéique de la suspension mitochondriale : l'extrait mitochondrial a été dilué au 1/10ème dans le tampon de reprise. Puis cette solution a été diluée au 1/100ème dans du NaCl 0,9% (en triplicat). Le blanc a été réalisé en diluant au 1/100ème le tampon de reprise dans du NaCl 0,9%. L'absorbance de ces solutions a été mesurée à une longueur d'onde de 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Ultraspec 500 pro (Biochem Ltd., Cambridge, Royaume-Uni). La concentration protéique de la préparation mitochondriale a été calculée avec la formule suivante :

*Concentration protéique (mg/mL) = moyenne DO – DO blanc * 1000 / 0,011*

4.2. Mesures des fonctions mitochondriales

4.2.1. Capacité de rétention calcique

Les mitochondries (1 mg de protéines/mL) ont été incubées dans un tampon de respiration (100 mM KCl, 50 mM sucrose, 10 mM HEPES, 5 mM KH_2PO_4, pH 7,4 à 30°C) sous agitation dans la cuve d'un spectrofluorimètre Jasco FP-6300 (Jasco, Lisses, France) et énergisées par des substrats du cycle de Krebs (5 mM malate, 5mM pyruvate) ajoutés au milieu en présence de Calcium-Green 5-N (1 µM, λex : 506 nm / λem : 532 nm).

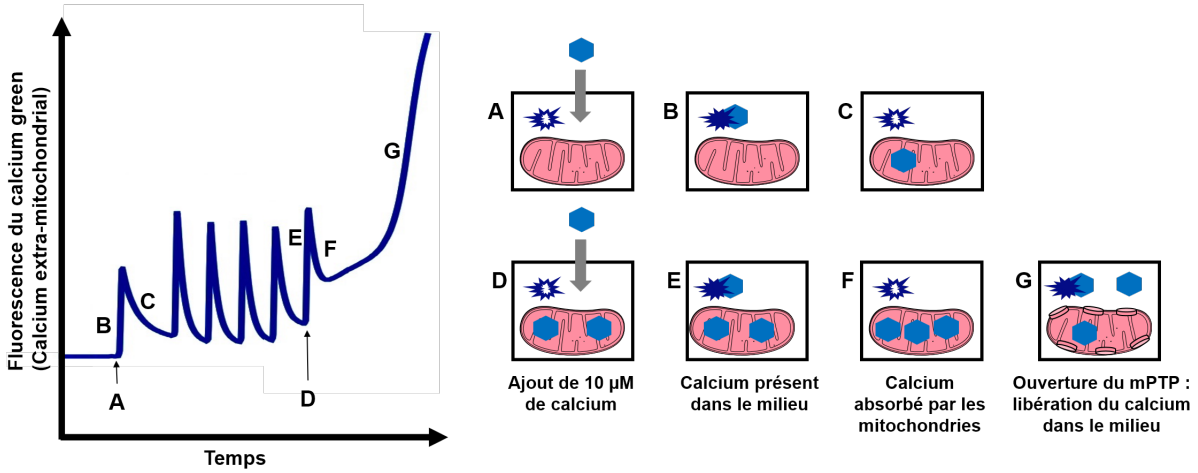


Figure 28 : Mesure de la capacité de rétention calcique.
A. Du calcium ( ) est ajouté dans du tampon de respiration. **B.** Le calcium green ( ) devient fluorescent ( ) en présence de calcium. **C.** Les mitochondries absorbent le calcium : le calcium green perd sa fluorescence. **D.** Du calcium est rajouté au milieu dès que la fluorescence atteint sa valeur basale. **E.** La fluorescence du calcium green augmente **F.** Les mitochondries se chargent progressivement en calcium. **G.** L'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale est observée lorsque les mitochondries ont absorbé une quantité de calcium suffisante pour déclencher l'ouverture de ce pore : elles libèrent dans le milieu le calcium accumulé et la fluorescence du calcium green augmente fortement. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

Cette sonde devient fluorescente en présence de calcium et ne pénètre pas dans les mitochondries. Toutes les 30 secondes environ, 10 µM de calcium ont été ajoutés dans le milieu jusqu'à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (Figure 28). La capacité de rétention calcique (CRC) correspond à la concentration de calcium accumulé dans les mitochondries nécessaire pour déclencher l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale.

4.2.2. Phosphorylation oxydative

Les mitochondries (0,4 mg de protéines/mL) ont été incubées à 30°C dans du tampon de respiration sous agitation dans la cuve d'un oxygraphe (Hansatech, Cergy, France). La concentration d'oxygène présent dans le milieu a été mesurée avec une électrode de Clark (Hansatech, Cergy, France) tout au long de l'incubation. Des substrats du cycle de Krebs (5 mM malate, 5 mM pyruvate) ont été ajoutés au milieu afin de déclencher la respiration basale (ou stade 2). Puis, 1 mM d'ADP a été ajouté au milieu pour induire la synthèse d'ATP (ou stade 3). Enfin, l'entrée d'ADP dans les mitochondries a été inhibée par l'ajout de carboxyatractyloside (1 µM, CAT, un inhibiteur de l'ANT) : ceci bloque l'entrée de l'ADP et donc la synthèse d'ATP et provoque le retour de la consommation d'oxygène à l'état basal (stade 4) (Figure 29). Les vitesses de consommation de l'oxygène des stades 3 (V3) et 4 (V4) ont été évaluées avec le logiciel Oxyg32 et le coefficient respiratoire mitochondrial (CR) a été calculé selon la formule suivante :

$$CR = V3/V4.$$

4.2.3. Production d'espèces réactives de l'oxygène

Les mitochondries (0,2 mg de protéines/mL) ont été incubées dans du tampon de respiration à 30°C sous agitation dans la cuve d'un spectrofluorimètre (LS 50 B, Perkin Elmer) en présence de péroxydase de raifort (HRP, 1 U/mL) et d'Amplex red (10 µM) (Figure 30A). Deux protocoles permettant d'évaluer la production d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet -}$) à différents niveaux de la chaîne respiratoire ont été réalisés et les vitesses de génération d'anions superoxydes ont été analysées avec le logiciel FL WinLab. Des substrats du cycle de Krebs (2,5 mM malate et 2,5 mM pyruvate ou 5 mM succinate) ont été ajoutés au milieu. Ces substrats alimentent en électrons la chaîne respiratoire par l'intermédiaire du NADH (complexe I) ou du FAD (complexe II). Le complexe I de la chaîne respiratoire a ensuite été inhibé par l'ajout de 2 µM de roténone. Puis, le complexe III a été inhibé par l'ajout de 2 µM d'antimycine A (Figure 30).

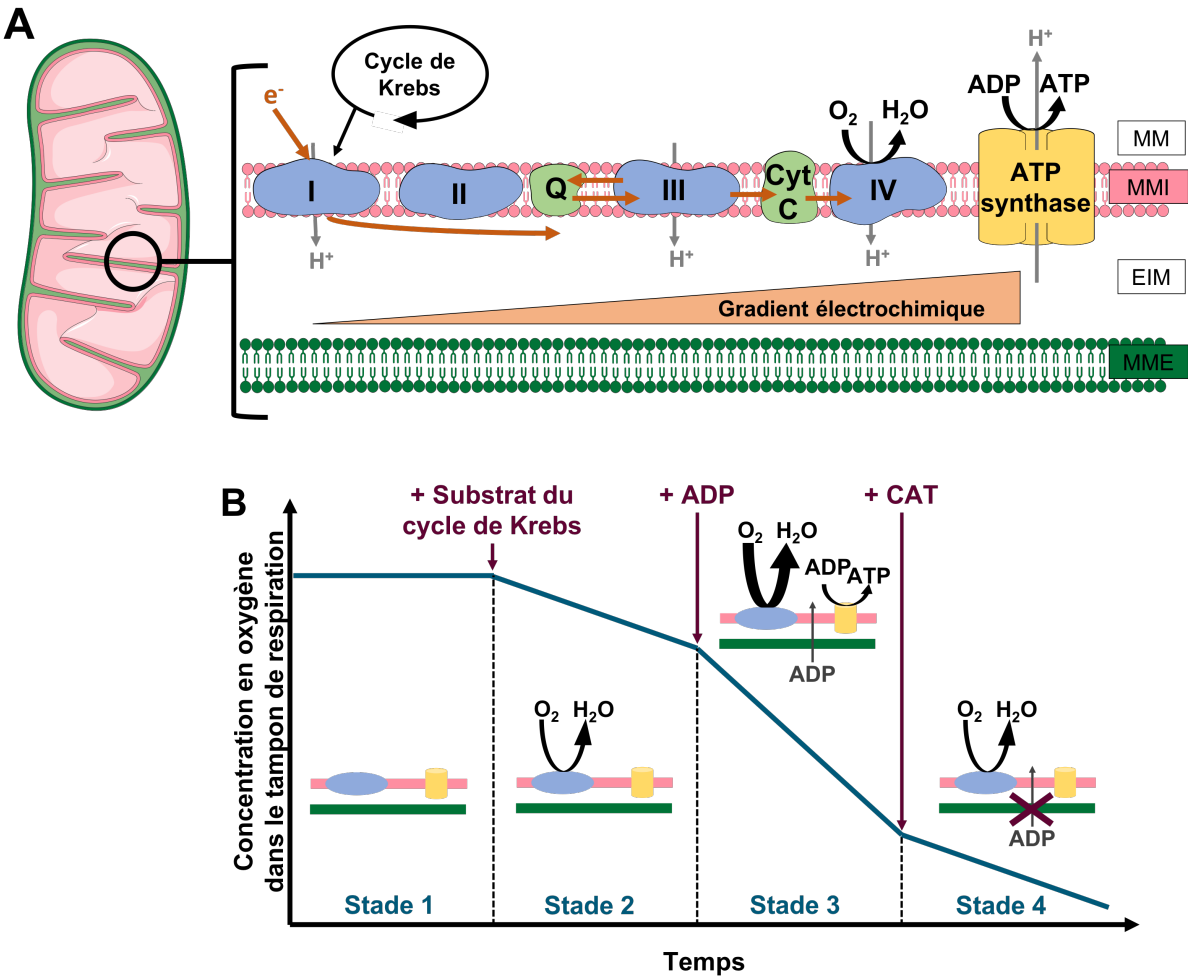


Figure 29 : Mesure de la respiration mitochondriale.
A. Chaîne respiratoire mitochondriale (ou chaîne de transport d'électrons). Celle-ci est située au niveau de la membrane mitochondriale interne (MMI). Elle est formée de cinq complexes enzymatiques et de deux transporteurs d'électrons. Le cycle de Krebs génère des électrons (e-), portés par NADH,H^+ et $FADH_2$. Les électrons portés par NADH,H^+ sont transférés au complexe I ; ceux portés par $FADH_2$ au complexe II. Les électrons sont transférés par l'ubiquinone (Q) des complexes I et II au complexe III, qui à son tour transfère les électrons au complexe IV par l'intermédiaire du cytochrome C (Cyt C). Le complexe IV assure le transfert des électrons à l'oxygène moléculaire, accepteur final des électrons. Le transport d'électrons apporte aux complexes de la chaîne respiratoire l'énergie nécessaire pour transférer des protons (H^+) de la matrice mitochondriale (MM) vers l'espace intermembranaire (EIM), créant ainsi un gradient électrochimique. Ce gradient fournit à l'ATP synthase (complexe V) l'énergie nécessaire pour générer un flux de protons transmembranaire (de l'EIM vers la MM) qui catalyse la phosphorylation de l'ADP en ATP. **B.** Mesure de la respiration de mitochondries cardiaques isolées. L'ajout de pyruvate/malate active la chaîne respiratoire et entraîne une consommation d'oxygène. L'ajout d'ADP permet la synthèse d'ATP par la phosphorylation oxydative : les mitochondries consomment de l'oxygène pour la production d'énergie. La CAT inhibe l'entrée d'ADP dans les mitochondries et bloque ainsi la synthèse d'ATP. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

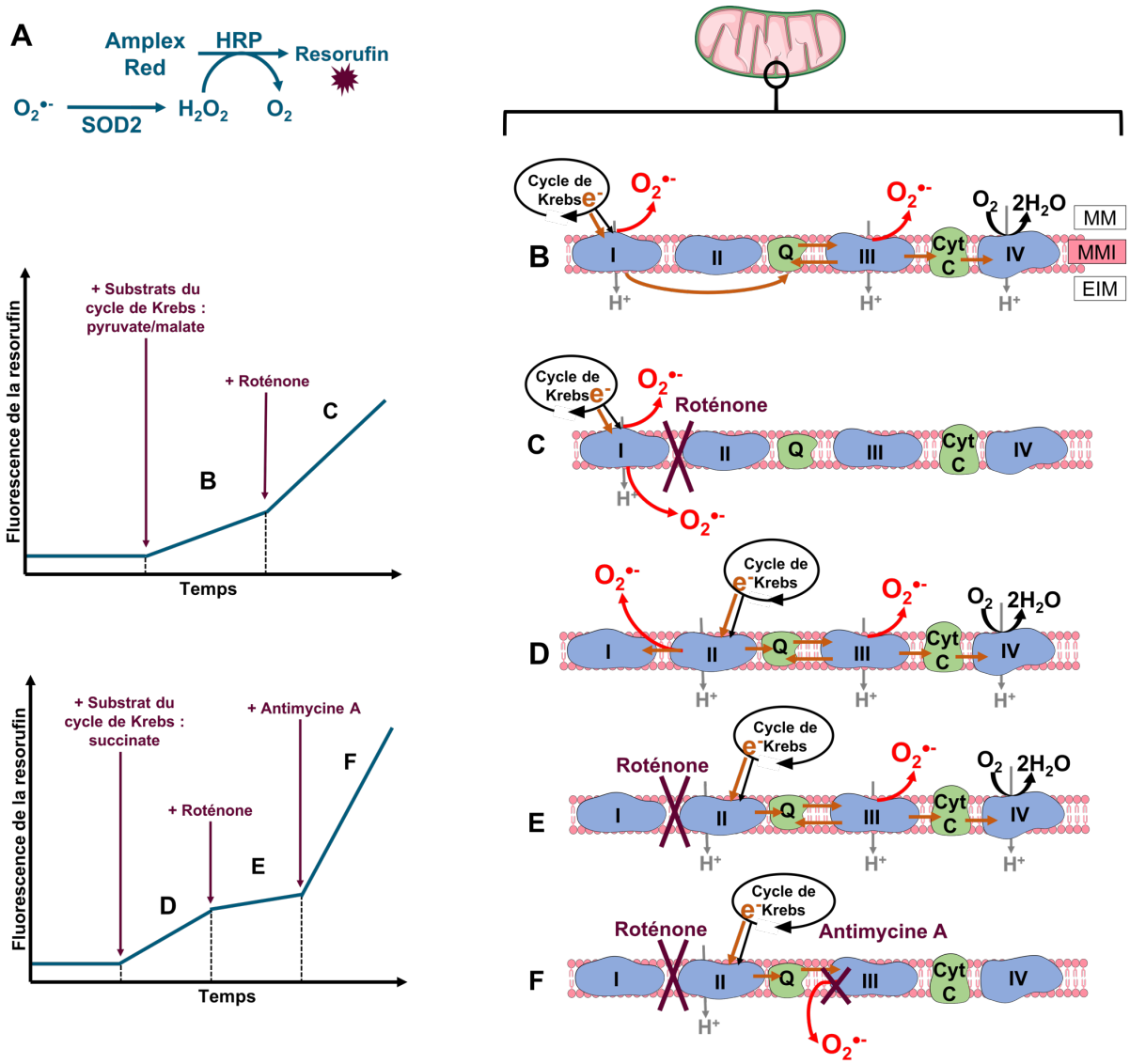


Figure 30 : Mesure de la production mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène.
A. Dès sa formation, l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase mitochondriale (SOD2). En présence d'H_2O_2, la péroxydase de raifort (HRP) catalyse la transformation d'amplex red en résorufine (λex : 573 nm / λem : 587 nm). La fluorescence de cette dernière reflète donc la production d'anions superoxydes par les mitochondries. **B.** L'ajout de pyruvate et de malate alimente le cycle de Krebs qui génère des électrons (e-), portés par NADH,H^+. Les électrons sont transférés du complexe I au complexe III par l'ubiquinone (Q), qui à son tour transfère les électrons au complexe IV par le cytochrome C (Cyt C). Le complexe IV assure le transfert des électrons à l'oxygène moléculaire, accepteur final des électrons. **C.** La roténone inhibe le complexe I : les électrons ne sont plus transférés à l'ubiquinone ; ils s'échappent de la chaîne de transport et génèrent des anions superoxydes en réagissant avec l'oxygène. **D.** L'ajout de succinate alimente le cycle de Krebs qui génère des électrons (e-) portés par $FADH_2$. Une partie des électrons portés par $FADH_2$ est transférée du complexe II au complexe I. Ce phénomène appelé « retour électronique » génère des anions superoxydes. L'autre partie des électrons portés par $FADH_2$ est transférée du complexe II au complexe III par la Q, qui à son tour transfère les électrons au complexe IV par l'intermédiaire du Cyt C. **E.** La roténone inhibe le complexe I et bloque ainsi le retour électronique et la génération d'anions superoxydes associée. **F.** L'antimycine A inhibe le complexe III et bloque donc le transfert des électrons entre le complexe III et le cytochrome C. Ces électrons s'échappent de la chaîne de transport et génèrent des anions superoxydes. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

4.3. Analyse des lipides neutres par chromatographie sur couche mince

Les lipides neutres mitochondriaux ont été analysés selon le protocole décrit pour les cardiomyocytes primaires (voir paragraphe 3.4, page 101) sur les préparations mitochondriales et cytosoliques supplémentées avec 0,5 % d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et conservées à -80°C .

5. CARDIOMYOCYTES DE LA LIGNEE AC16

Les expériences *in vitro* ont été réalisées avec des cellules de la lignée AC16. Celle-ci a été développée à partir de cardiomyocytes ventriculaires humains fusionnés avec des fibroblastes d'une lignée humaine, privés d'ADN mitochondrial (Davidson *et al.*, 2005).

5.1. Conditions expérimentales

Les cellules AC16 ont été utilisées entre le 3ème et le 9ème passage, comme préconisé par le fournisseur (Merk Millipore) pour éviter le risque de dérive phénotypique. Les cellules ont été cultivées dans des flasques de 25 cm^2 avec du milieu complet (DMEM/F12, 10% SVF, 200 UI/mL streptomycine-pénicilline). Les cellules ont été détachées de leur support grâce à l'ajout de trypsine-EDTA qui digère les protéines de la matrice extracellulaire du tapis cellulaire. Les cellules ainsi dissociées ont été reprises dans du milieu complet puis centrifugées pendant 5 minutes à 300 g à température ambiante. Le culot cellulaire obtenu a été re-suspendu dans du milieu complet. Un comptage des cellules AC16 sur cellule de Malassez après coloration au bleu trypan a été réalisé pour mesurer la concentration cellulaire. Les cellules AC16 ont été ensemencées dans du milieu complet la veille des expériences à raison de 4.10^4 cellules pour les plaques 24 puits ; 2.10^5 dans les plaques 6 puits et 3.10^6 dans les flaques de 75 mm^2.

Les cellules ont été soumises à différents protocoles expérimentaux : elles ont été incubées dans du DMEM/F12 en normoxie (21% O_2) dans les conditions contrôles, la privation en nutriments a été induite par une incubation dans du PBS et l'hypoxie (1%) par une incubation dans un incubateur trois gaz (MCO-5M, Sanyo Biomedical Europe) (Figure 31).

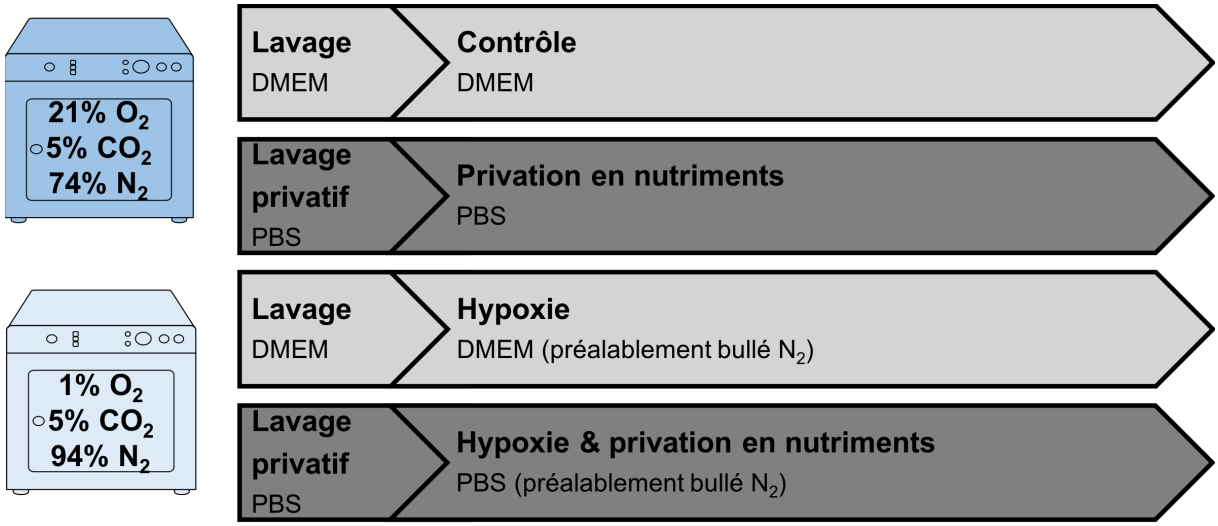


Figure 31 : Conditions expérimentales de la mise au point du modèle d'hypoxie-réoxygénation sur les cardiomyocytes de la lignée AC16.
Les cellules ont subi un premier lavage : le milieu complet a été éliminé et remplacé par du DMEM seul (DMEM/F12, pH 7,4 à 37°C) pour les conditions contrôles ou du PBS (pH 7,4 à 37°C) pour la privation en nutriments. Les cellules ont été incubées pendant 10 minutes (21% O_2, 5% CO_2 à 37°C) au terme desquelles le milieu (DMEM ou PBS) a été renouvelé. En conditions d'hypoxie, ce milieu a préalablement été bullé à l'azote (N_2) pendant 10 minutes. Les cellules ont ensuite été incubées pendant des durées différentes en normoxie (21% O_2, 5% CO_2 à 37°C) ou en hypoxie (1% O_2, 5% CO_2, 94% N_2, à 37°C). Au terme de ces incubations, différentes analyses ont été réalisées. Schéma réalisé à l'aide d'illustrations de Servier Medical Art.

5.2. Mesure de la mortalité cellulaire

Deux méthodes complémentaires ont été utilisées pour évaluer la mortalité cellulaire, la coloration au cristal violet et le test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium), à partir des protocoles du **Dr. Leeyah Issop**.

La masse cellulaire a été déterminée au moyen de la coloration au cristal violet. Le cristal violet est un colorant qui se fixe aux noyaux : la coloration est proportionnelle à la quantité de cellules. Les cellules AC16 étant adhérentes, lorsqu'elles meurent, elles se détachent : la coloration permet de mesurer la masse cellulaire encore adhérente lors de la fixation. Les cellules ont été fixées avec de l'éthanol 70% pendant 2 minutes à 37°C dans un incubateur (21% O_2, 5% CO_2). Les plaques de culture ont ensuite séché à l'air libre pendant au moins une heure avant l'ajout de cristal violet 0,08% pendant 3 minutes à température ambiante. Après deux lavages à l'eau courante et un séchage manuel, le cristal violet, incorporé dans les cellules, a été solubilisé par l'ajout d'acide acétique à 33%. Après homogénéisation, la DO des plaques a été mesurée à 595 nm avec un spectrophotomètre (Multiskan Sky, ThermoFisher).
La mortalité a également été évaluée avec le test MTT. Dans les cellules vivantes, la succinate deshydrogénase du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale précipite le MTT en

formazan, de couleur violette. Les cellules ont été incubées pendant 30 minutes avec 0,5 mg/mL de MTT, puis le milieu a été éliminé et remplacé par du diméthyl sulfoxide (DMSO) pur. Les cellules ont été incubées pendant 45 minutes à 37°C dans un incubateur (21% O_2, 5% CO_2) et la DO à 550 nm, obtenue pour chaque condition, a été mesurée avec le spectrophotomètre. Le test MTT nécessite une demi-heure d'incubation : c'est pourquoi ce test a été réalisé uniquement en conditions de normoxie. En effet, l'ajout de MTT implique l'ouverture de l'incubateur et provoque donc une réoxygénation ce qui exclut la possibilité de réaliser ce test dans les conditions d'hypoxie.

5.3. Analyse de l'expression génique par RT-qPCR

Ces analyses ont été réalisées à partir des protocoles du **Dr. Leeyah Issop**. Les cellules ont subi deux lavages avec du PBS froid puis ont été lysées dans 400 µL de tampon RLT-Plus (Kit RNeasy, Qiagen) supplémenté avec 1 % de β-mercapto-éthanol pendant 3 minutes sur de la glace. Les lysats ont été conservés à -80°C. Les ARNs totaux ont été extraits avec le kit RNeasy mini kit de Qiagen en suivant les instructions du fournisseur et la procédure décrite précédemment (voir paragraphe 2.1.1, page 86). Des amorces taqman (ThermoFisher) ont été utilisées pour mesurer l'expression de *Tspo* (Hs00559362), *Star* (Hs00986559), *Sod2* (Hs00167309_m1), *Hif1α* (Hs00153153) et *Hprt* (Hs02800695). La quantification des qPCR a été réalisée avec la méthode *ΔΔCT* (CT : *cycle threshold*).

5.4. Quantification protéique par Western Blot

Les cellules ont subi deux lavages avec du PBS froid puis ont été centrifugées pendant 10 minutes à 2000 g et 4°C. Les culots ont été lysés à l'aide d'un tampon commercial (RIPA, Cell Signaling) supplémenté avec 0,5 % d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases pendant 10 minutes sur de la glace. Les lysats ont ensuite été soniqués pendant 30 secondes puis centrifugés (10 minutes à 14 000 g à 4°C) et les surnageants conservés à -20°C. Le contenu protéique de ces surnageants a été dosé puis quantifié par immunoblot (voir paragraphe 2.1.2.3, page 87).

5.5. Analyse lipidique

Les lipides cellulaires ont été analysés par chromatographie sur couche mince (voir paragraphe 3.4, page 101) et par microscopie à fluorescence (voir paragraphe 3.3, page 99).

6. ANALYSE STATISTIQUE

La normalité de la distribution des valeurs de chaque groupe a été évaluée par un test de Shapiro-Wilk. La comparaison de deux groupes a été réalisée par un test t pour des valeurs à la distribution normale et par un Mann-Whitney pour les valeurs à la distribution non normale. Pour la comparaison de plus de deux groupes, une Anova à un ou deux facteurs puis un post-test de Bonferonni ont été réalisés pour des valeurs à la distribution normale et par un modèle mixte dans le cas où certaines valeurs étaient manquantes. La comparaison de deux courbes de survie a été réalisée avec un test de Log-rank. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Graphpad (prism) et sont indiquées dans la légende des figures. Les résultats sont exprimés sous la forme *moyenne ± S.E.M.*.

RESULTATS

1. RESULTATS 1 : IDENTIFICATION D'UN MECANISME FAVORISANT L'ACCUMULATION MITOCHONDRIALE DE STEROLS AU COURS DE L'ISCHEMIE-REPERFUSION MYOCARDIQUE : RÔLE DE TSPO ET STAR

Ce travail est le fruit de trois thèses : celles de **Julien Musman** (UPEC, soutenue le 7 novembre 2017), de **Shirin Leick** (UPEC, soutenue le 27 avril 2022) et celle-ci, et d'un master 2, celui de **Nicolas Eychenne**. Il fait l'objet d'un manuscrit soumis à la revue *Cardiovascular Research*. Ce chapitre résume l'ensemble de ces travaux en y ajoutant des résultats complémentaires.

1.1. Objectif du travail

Le laboratoire a précédemment démontré que la reperfusion d'un myocarde ischémié s'accompagne d'une accumulation massive de cholestérol et d'oxystérols dans les mitochondries, potentialisé par l'hypercholestérolémie, et que l'inhibition de cette accumulation par des ligands de TSPO permet une protection mitochondriale (Paradis *et al.*, 2013). L'objectif de cette étude était d'identifier les mécanismes impliqués dans cette accumulation mitochondriale de stérols lors de la reperfusion. Dans un premier temps, l'effet de l'inhibition pharmacologique de la biosynthèse de cholestérol a été étudié dans un modèle d'ischémie-reperfusion cardiaque. Puis, le catabolisme mitochondrial du cholestérol et le rôle de la protéine STAR dans le mécanisme d'accumulation des stérols dans la mitochondrie cardiaque ont été analysés. Enfin, l'implication de TSPO dans ce mécanisme a été évaluée à l'aide d'un modèle de rats délétés pour cette protéine et par un ligand pharmacologique : le 4'-chlorodiazépam. Les rats utilisés dans cette étude ont fait l'objet d'une caractérisation de leur phénotype.

1.2. Modèles expérimentaux

Les fonctions mitochondriales (phosphorylation oxydative et sensibilité à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale), le contenu cellulaire en stérols, l'activité et l'expression de protéines (i.e. CYP11A1, CYP27A1, TSPO et STAR) ont été étudiés à l'état de base et dans un modèle d'ischémie-reperfusion cardiaque chez des rats sauvages ou délétés pour *Tspo* préalablement traités ou non avec de la pravastatine et en présence ou non du 4'-chlorodiazépam. Le phénotype global (morphologie et reproduction), cardiaque (fonctionnel

et histologique) et métabolique (glucidique, lipidique et hormonal) des rats *Tspo*$^{-/-}$ a été caractérisé.

Dans un premier temps, la délétion de *Tspo* des rats a été confirmée par génotypage, immunohistochimie et Western Blot au niveau cardiaque (Figure 1 des suppléments du manuscrit). Les échographies cardiaques réalisées à 2, 6 et 12 mois indiquent que la délétion de *Tspo* ne modifie pas les paramètres morphologiques ni la fonction contractile chez les rats *Tspo*$^{-/-}$ au cours du vieillissement. Il en est de même des analyses histologiques qui montrent l'absence d'effet de la délétion de *Tspo* sur l'hypertrophie cardiaque (Figure 2 des suppléments du manuscrit). L'effet de la délétion de *Tspo* sur la fonction de reproduction des rats a été évalué : le nombre de ratons correspond à la moyenne des portées de la souche Sprague Dawley (Alemáan *et al.*, 1998) et la répartition des sexes et des génotypes suit les lois de Mendel (Mendel 1865). En accord avec une fonction reproductive non-altérée, le dosage des hormones stéroïdes n'a révélé aucun effet de la délétion de *Tspo* au cours du vieillissement. En revanche, avec des longueurs corporelles comparables, la masse corporelle des rats *Tspo*$^{-/-}$ est significativement inférieure à celle des rats *Tspo*$^{+/+}$ à 12 mois (Figure 3 des suppléments du manuscrit). La délétion de *Tspo* n'induit pas d'altération du métabolisme lipidique des rats au cours du vieillissement. Le bilan lipidique des rats révèle l'absence d'effet de la délétion de *Tspo* sur la concentration des lipides circulants (cholestérol, lipoprotéines, acides gras libres et triglycérides) au cours du vieillissement. De même, le métabolisme glucidique des rats n'est pas altéré par la délétion de *Tspo*. La glycémie basale est comparable entre les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ jusqu'à 12 mois. Les tests métaboliques de tolérance au glucose et à l'insuline indiquent que la délétion de *Tspo* n'altère pas la réponse à une surcharge en glucose ni la sensibilité des tissus à l'insuline. Seul le vieillissement induit une altération physiologique de ces paramètres quel que soit le génotype (Figure 4 des suppléments du manuscrit).

1.3. Résultats

1.3.1. L'inhibition de la biosynthèse du cholestérol diminue son accumulation mitochondriale et protège les mitochondries des lésions de reperfusion cardiaques

Ces résultats ont été obtenus par **Nicolas Eychenne**. La pravastatine, une statine, a été utilisée pour réduire la biosynthèse du cholestérol chez des rats (voir paragraphe 1.1.5, page 27). Bien qu'elle n'ait pas réduit la cholestérolémie ni le contenu en stérols du cytosol, elle a induit une diminution du cholestérol mitochondrial sans modifier le contenu en

oxystérols. La pravastatine a significativement réduit l'accumulation mitochondriale cardiaque de cholestérol et d'oxystérols à la reperfusion. Cet effet était accompagné d'une préservation des fonctions mitochondriales (phosphorylation oxydative et résistance à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale) (Figure 1 et Tableau 1 du manuscrit).

1.3.2. L'accumulation mitochondriale de cholestérol à la reperfusion n'est pas liée à un défaut de son catabolisme

Ces résultats ont été obtenus par **Julien Musman** et **Nicolas Eychenne**, en collaboration avec l'UMR CNRS 7182 de l'UPEC. Le mécanisme d'accumulation du cholestérol au niveau mitochondrial a ensuite été étudié. Les protéines responsables du catabolisme mitochondrial du cholestérol, les cytochromes 11A1 et 27A1, ont été étudiées. L'ischémie-reperfusion n'a pas modifié la quantité ni l'activité de ces enzymes au niveau cardiaque (Figure 2 du manuscrit). L'accumulation mitochondriale de cholestérol à la reperfusion n'est donc pas liée à un défaut de son catabolisme. L'influx du cholestérol au niveau mitochondrial a donc été évalué.

1.3.3. L'accumulation mitochondriale de cholestérol à la reperfusion s'accompagne d'une augmentation mitochondriale de STAR

Ces résultats ont été obtenus par **Julien Musman**. Dans les tissus stéroïdogènes, le transport mitochondrial de cholestérol est assuré par le transducéosome, un complexe multiprotéique constitué notamment des protéines TSPO et STAR (voir paragraphe 3.2, page 56). L'ischémie-reperfusion cardiaque n'a pas altéré le niveau de la protéine TSPO mais l'expression de *Star* a significativement été réduite, ainsi que son niveau cytosolique (STAR 37 kDa), tandis que son activation mitochondriale (clivage de STAR 37 kDa en STAR 30 kDa à la membrane mitochondriale externe) a fortement été augmentée (Figure 2 du manuscrit). Ces résultats indiquent que l'accumulation de cholestérol dans les mitochondries à la reperfusion est liée à une augmentation de son transport mitochondrial.

1.3.4. L'inhibition de la biosynthèse de cholestérol diminue son accumulation dans les mitochondries cardiaques et l'activation mitochondriale de STAR

Ces résultats ont été obtenus par **Julien Musman**. L'effet de la pravastatine a été étudié afin de déterminer si sa capacité à inhiber l'accumulation mitochondriale de cholestérol à la reperfusion est liée à une inhibition de son transport. Bien que la pravastatine ne modifie pas la forme cytosolique de STAR (37 kDa), cette statine réduit la forme mitochondriale de STAR (30 kDa) en conditions basales et l'inhibe totalement à la reperfusion (Figure 3 du manuscrit). L'inhibition de la synthèse de cholestérol entraîne donc une inhibition de son accumulation

mitochondriale lors de la reperfusion et cette inhibition est dépendante de l'activation mitochondriale de STAR.

1.3.5. Le 4'-chlorodiazépam, ligand de TSPO, inhibe l'activation mitochondriale de STAR à la reperfusion

Le laboratoire a précédemment démontré que la génération massive d'oxystérols, résultant d'une accumulation de cholestérol au niveau mitochondrial, est inhibée par l'injection de ligands de TSPO (Paradis *et al.*, 2013). L'effet du 4'-chlorodiazépam sur l'activation mitochondriale de STAR à la reperfusion a donc été étudié. Ces résultats ont été obtenus par **Julien Musman**. Le 4'-chlorodiazépam inhibe significativement l'augmentation de la forme mitochondriale de STAR à la reperfusion (Figure 3 du manuscrit). Pour confirmer le rôle de TSPO dans l'activation mitochondriale de STAR et l'accumulation de cholestérol à la reperfusion, les rats délétés pour *Tspo* ont été utilisés.

1.3.6. La délétion de *Tspo* réduit l'accumulation de stérols à la reperfusion cardiaque sans modifier les fonctions mitochondriales

Ces résultats ont été obtenus en collaboration avec **Shirin Leick**. Le dosage des stérols dans les mitochondries cardiaques a révélé des concentrations d'oxystérols chez les rats *Tspo*$^{-/-}$ systématiquement inférieures à celles des rats *Tspo*$^{+/+}$ avec des concentrations similaires de cholestérol, leur précurseur (Figure 4 du manuscrit). De même, la production mitochondriale d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) est significativement réduite dans les cardiomyocytes isolés de rats *Tspo*$^{-/-}$ (Figure 5 du manuscrit). Cette diminution d'oxystérols et d'espèces réactives de l'oxygène chez les rats *Tspo*$^{-/-}$ n'est observée que dans les mitochondries. En effet, les concentrations cytosoliques de cholestérol et d'oxystérols ne diminuent pas dans les cytosols de myocarde issus de rats *Tspo*$^{-/-}$ (Tableau 1 des suppléments du manuscrit). En revanche, ces diminutions d'oxystérols et de production d'anions superoxydes n'ont aucune conséquence sur les fonctions mitochondriales cardiaques (phosphorylation oxydative et sensibilité à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale) en conditions basales (Figure 5 du manuscrit). Par ailleurs, la délétion de *Tspo* n'empêche pas l'accumulation mitochondriale de stérols après ischémie-reperfusion (Figure 4 du manuscrit).

1.3.7. La délétion de *Tspo* annule les effets du 4'-chlorodiazépam sur l'activation mitochondriale de STAR et sur l'accumulation de cholestérol sans modifier la forme cytosolique de STAR

Ces résultats ont été obtenus par **Shirin Leick**. La délétion de *Tspo* ne modifie pas l'activation mitochondriale de STAR (30 kDa), ce qui est en accord avec le maintien de l'accumulation de cholestérol dans les mitochondries à la reperfusion chez ces animaux. Ceci suggère un transport mitochondrial indépendant de TSPO. En revanche, la délétion de *Tspo* abolit les effets protecteurs du 4'-chlorodiazépam puisque aucune inhibition de l'accumulation mitochondriale de cholestérol et de STAR et aucune amélioration des fonctions mitochondriales n'ont été observées à la reperfusion chez ces rats délétés (Figure 6 du manuscrit).

Identification of a mechanism promoting mitochondrial sterol accumulation during myocardial ischemia-reperfusion: role of TSPO and STAR.

Juliette Bréhat[1,#], Shirin Leick[1,#], Julien Musman[1], Jin Bo Su[1], Nicolas Eychenne[2], Frank Giton[1], Michael Rivard[3], Louis-Antoine Barel[3], Chiara Tropeano[4], Claudio Caccia[5], Valerio Leoni[4], Bijan Ghaleh[1], Sandrine Pons[1] and Didier Morin[1,*]

[1]Inserm U955-IMRB, team Ghaleh, UPEC, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Créteil, France.

[2]CHIV, Villeneuve-Saint-Georges, France

[3]UPEC, CNRS, ICMPE, UMR 7182, Thiais, France.

[4]Laboratory of Clinical Chemistry, Hospital Pio XI Desio, ASST-Brianza Department of Medicine and Surgery, University of Milano Bicocca, Monza, Italy

[5]Unit of Medical Genetics and Neurogenetics. Fondazione IRCCS – Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italy

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: Didier MORIN, PhD, INSERM U955, Team Ghaleh, Faculté de Santé, 8 rue du général Sarrail, 94000, Créteil, France, E-mail : didier.morin@inserm.fr.

Running title: TSPO, STAR and myocardial ischemia-reperfusion

Category of the manuscript: original article

Word count: 8257

ABSTRACT

***Aims*:** hypercholesterolemia is a major risk factor for coronary artery diseases and for cardiac ischemic events. Observations indicate that cholesterol per se could also have negative effects on the myocardium, independently from hypercholesterolemia. Previously, we reported that myocardial ischemia-reperfusion induces a deleterious build-up of mitochondrial cholesterol and oxysterols, which is potentiated by hypercholesterolemia and prevented by translocator protein (TSPO) ligands. Here, we studied the cellular mechanism by which sterols accumulate in cardiac mitochondria and promotes mitochondrial dysfunction.

***Methods and Results*:** we performed myocardial ischemia-reperfusion in rats to evaluate mitochondrial function, the cytosolic and mitochondrial levels of TSPO and of the steroidogenic acute regulatory protein (STAR) and the related mitochondrial concentrations of cholesterol and oxysterols. Rats were treated or not with the inhibitor of cholesterol synthesis pravastatin or the TSPO ligand 4'-chlorodiazepam. We used wild-type and *Tspo* deleted rats which were phenotypically characterized.
Inhibition of cholesterol synthesis with pravastatin reduced mitochondrial sterol accumulation and protected mitochondria during myocardial ischemia-reperfusion. We found that cardiac mitochondrial sterol accumulation is the consequence of enhanced influx of cholesterol and not of the inhibition of its mitochondrial metabolism during ischemia-reperfusion. Mitochondrial cholesterol accumulation at reperfusion was related to the increase in mitochondrial STAR but not to changes in TSPO levels. However, the TSPO ligand 4'-chlorodiazepam inhibited this mechanism and prevented mitochondrial sterol accumulation and mitochondrial ischemia-reperfusion injury, underlying the close cooperation between STAR and TSPO. Conversely, *Tspo* deletion, which did not alter cardiac phenotype, abolished all the effects of 4'-chlorodiazepam.

Conclusion: This study reveals a novel mitochondrial interaction between TSPO and STAR to promote cholesterol and deleterious sterol mitochondrial accumulation during myocardial ischemia-reperfusion. This interaction regulates mitochondrial homeostasis and plays a key role during mitochondrial injury.

Translational Perspective

The role of the steroidogenic acute regulatory protein (STAR) and of the translocator protein (TSPO) in the myocardium is poorly known. This study provides new insight into their role and the dysregulation of myocardial mitochondrial sterols during ischemia-reperfusion. It shows that sterols accumulation into mitochondria is the consequence of enhanced influx of cholesterol, which is mediated by mitochondrial STAR increase. A TSPO ligand prevents STAR and sterol accumulations and protects mitochondria. Thus, controlling mitochondrial cholesterol trafficking could constitute a novel approach for cardiovascular therapies and STAR, like TSPO, appears as a target for the development of mitochondrial protective drugs.

Keywords: myocardial ischemia-reperfusion, mitochondria, translocator protein, steroidogenic acute regulatory protein

1. Introduction

Ischemic heart disease is a leading cause of morbidity and mortality worldwide with a constant increasing prevalence and development of novel cardioprotective strategies remains necessary[1]. Although numerous studies have shown their ability to confer cardioprotection in animal models, the translation of these promising results into clinical setting has been disappointing. The global lack of consideration of co-morbidities in preclinical studies is considered as one of the reasons for this large-scale failure[2].

Hypercholesterolemia is considered as a principal risk factor for coronary artery diseases. High circulating levels of cholesterol contribute to the formation of atheroma plaques and thus to the induction of ischemic pathologies. Thereby, patients with high hypercholesterolemia have an elevated risk of ischemic events[3] and lipid-lowering therapy is associated with delayed cardiovascular events and prolonged survival in these patients[4,5]. This elevated risk is attributed to the development of atherosclerosis as a result of hypercholesterolemia. However, during the last decades, several experimental and clinic observations have shown that hypercholesterolemia per se could also exerts direct negative effects on the myocardium, inducing alterations of the structure and the function of the cardiomyocytes[6,7]. It may interfere with cardioprotective mechanisms[8]. The molecular mechanisms by which hypercholesterolemia directly alters cardiac cells are ill known. Some data indicate that hypercholesterolemia induces oxidative stress[9,10], apoptosis[11] and favors opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP)[10,12] which is a key event contributing to myocardial reperfusion injury[13].

The mitochondrial translocator protein (18 kDa; TSPO) is a high affinity cholesterol binding protein primarily located in the outer mitochondrial membrane and is expressed in a wide variety of species and ubiquitously distributed with a predominantly expression in steroid-synthesizing tissues[14]. TSPO is also abundant in kidney and heart. In steroidogenic tissues, TSPO seems to be part of a dynamic complex including outer mitochondrial membrane proteins such as the voltage-dependent anion channel (VDAC) and cytosolic proteins such as the steroidogenic acute regulatory protein (STAR) which is the principal mean pathway of cholesterol transport from lipid droplets to mitochondria[15,16]. STAR is synthesized as a 37-kDa protein, targeted to mitochondria, through its mitochondrial signal, where it is processed by proteases in the outer mitochondrial membrane to a mature 30-kDa form [17,18]. The role of TSPO in

mPTP opening was largely discussed but its participation in mPTP formation was dismissed using a cardiac mouse *Tspo* gene deleted model[19]. However, a body of evidence suggests that TSPO plays a critical role in regulating physiological cardiac function and that TSPO ligands may represent interesting drugs to protect the heart during ischemia-reperfusion[14]. Indeed, several TSPO ligands such as SSR180575, 4'-chlorodiazepam or TRO40303 demonstrated cardioprotective effects by reducing infarct size in different animal models of myocardial infarction[20-22]. This effect was associated with a protection of mitochondrial function and a limitation of the increase in mitochondrial membrane permeability.

We previously demonstrated that the reperfusion of an ischemic myocardium causes a large increase in mitochondrial cholesterol content and a subsequent strong generation of auto-oxidized oxysterols resulting from the oxidation of cholesterol by reactive oxygen species (ROS). Oxysterols, whether formed endogenously or brought in certain foods, have major cytotoxic properties[23]. This mitochondrial accumulation of sterols at reperfusion was dramatically enhanced in hyper-cholesterolemic animals[12]. Interestingly, TSPO ligands inhibited cholesterol and concomitant auto-oxidized oxysterol accumulation, limited the increase in mitochondrial membrane permeability and protected mitochondrial function both in normo- and hyper-cholesterolemic animals[12,21,24]. Although some genetic experiments questioned the involvement of TSPO in the mitochondrial transport of cholesterol[25,26], the inhibition of cholesterol and oxysterol accumulation could represent a promising approach to limit mitochondrial injury during myocardial ischemia-reperfusion and, thus, could participate to the cardioprotective effect of TSPO ligands.

Here, to verify this hypothesis, we examined whether the inhibition of cholesterol synthesis led to the inhibition of mitochondrial cholesterol and oxysterol accumulation and concomitantly protected mitochondrial functions during myocardial ischemia-reperfusion. Then, we investigated the mechanism by which cholesterol accumulates into mitochondria during myocardial reperfusion by determining whether this accumulation results from an increase in cholesterol influx and/or a decrease in cholesterol conversion. To do that: (1) we investigated the potential role of the proteins that convert cholesterol inside mitochondria, *i.e.*, the cytochromes (CYP) 11A1 and 27A1; (2) we studied the role of the main proteins that have been described to participate in the transport of cholesterol into mitochondria of steroidogenic organs, *i.e*,

TSPO and STAR. For this purpose, we used the TSPO ligand 4'-chlorodiazepam and TSPO global knocked-out rats (*Tspo*$^{-/-}$).

Our data demonstrate that the inhibition of cholesterol synthesis protects mitochondria against ischemia-reperfusion injury and indicate that mitochondrial processing of STAR is required to transfer cholesterol into mitochondria during myocardial ischemia-reperfusion, a process that is modulated by TSPO.

2. Methods

An expanded Methods section is available in the online Supplementary Data.

2.1. Animals

All animal procedures used in this study were conformed to the Directives of the European Parliament (2010/63/EU-848 EEC). The experimental protocols were reviewed and approved (APAFIS13504#-201820130912402v3 and APAFIS#23908-2020012712028279 v4) by the local Ethic Committee Cometh (Afssa/ENVA/UPEC, N° 16).

Wistar rats were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). A couple of heterozygous global Tspo knock out Sprague Dawley rats (*Tspo*$^{+/-}$) has been kindly provided by Pr Papadopoulos (University of Southern California, USA. These rats were crossed to generate two colonies of wild type (*Tspo*$^{+/+}$) and homozygous *Tspo* deleted (*Tspo*$^{-/-}$) rats (Supplementary Fig. 1). Cardiac morphology was similar between both genotypes and *Tspo*$^{-/-}$ rats did not display alterations in left ventricular function. This absence of cardiac phenotype variation persisted during aging (Supplementary Fig. 2). *Tspo* deletion did not alter rat reproduction and morphology (Supplementary Fig. 3A and 3B) although *Tspo*$^{-/-}$ rats tend to have a lower body weight (Supplementary Fig. 3C). In the same way, we did not observe major differences concerning circulating steroidogenic hormones (Supplementary Fig. 3D), basal glucose and lipid blood levels between both genotypes during aging (Supplementary Fig. 4A) and both genotypes respond identically when subjected to metabolic tests, *i.e.*, insulin and glucose tolerance tests (Supplementary Fig. 4B and 4C).

2.2. In vivo coronary artery occlusion-reperfusion

Rats were subjected to 30 min of ischemia followed by 15 min of reperfusion as previously described[24]. Briefly, rats were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) given intraperitoneally, intubated and ventilated with a mixture of carbogen (95% O2, 5% CO2).

A left thoracotomy in the fourth intercostal space was performed, followed by pericardectomy, using a surgical microscope. A surgical needle with a 5–0 Prolene thread was passed around the left coronary artery, and the ends of the suture were passed through a polypropylene tube to form a snare. Tightening the snare induced coronary artery occlusion and its release initiated reperfusion for 15 min.

4'-Chlorodiazepam (10 mg/kg) or its vehicle (dimethylsulfoxide) were administered intravenously through the jugular vein. In the ischemia-reperfused group, 4'-chlorodiazepam were injected 10 min before reperfusion during a 5 min infusion. For the sham group, the drugs were administered 25 min before heart excision.

Pravastatin (10mg/kg) was given by gavage three days before surgery. At the end of 15 minutes of reperfusion, the left ventricular area at risk of ischemia-reperfused rats or the left ventricle for sham rats were used to prepare mitochondria and cytosols.

2.3. Isolation of cardiac mitochondria and cytosols

Rat left ventricles were removed and immediately immersed in ice cold 0.9% NaCl, scissor minced and homogenized using a Polytron homogenizer in a cold buffer (4 °C, pH 7.4) containing: mannitol (220 mM), sucrose (70 mM), HEPES (10 mM) and EGTA (2 mM). The samples were further homogenized for 10 consecutive times using a Potter homogenizer at 1500 rev/min. The homogenates were then centrifuged at 1000 g for 5 min at 4°C to remove tissue debris and nuclei. The supernatants were centrifuged for 10 min at 10,000 g. The final pellets containing mitochondria were resuspended in the homogenization buffer with only 0.01mM of EGTA and were used immediately (evaluation of mitochondrial function) or frozen at – 80°C (western blot experiments and sterol determination). The supernatants were centrifuged at 100,000g for 60 min at 4°C. The pellets were discarded and the supernatants, corresponding to the cytosols, were frozen at – 80°C after determination of the protein concentrations (Pierce™ BCA Protein Assay Kit (23225, Thermofischer Scientific).

Testis and liver mitochondria were prepared using the same protocol without the Polytron homogenization step.

2.4. Evaluation of mitochondrial oxygen consumption and mitochondrial permeability transition pore opening

Oxygen consumption and mPTP opening were assessed as previously described[24].

2.5. Evaluation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production in primary adult rat cardiomyocytes

Left ventricular cardiomyocytes were isolated from *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo*$^{-/-}$ rats by an enzymatic technique and measurement of mitochondrial superoxide production in cardiomyocytes was performed using MitoSOX™ Red fluorescent probe which targets mitochondria and is oxidized by superoxide anion. These protocols are described in the online supplementary data.

2.6. Evaluation of CYP11A1 activity

The detailed methods of measurement of CYP11A1 activity in rat ventricular and testicular mitochondrial fractions using a cholesterol-resorufin probe and of synthesis of this probe are described in the online supplementary data.

2.7. Western Blot analysis

After denaturing proteins at 90°C for 5 minutes, a total of 40µg of protein samples were loaded onto 8-16% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel (4561104, Bio-Rad) and separated by SDS-PAGE electrophoresis and then transferred to PVDF membranes. Next, membranes were blocked with a 5% skim milk solution for one and half hours at room temperature. After, they were probed with antibodies against cytochrome P450 (CYP) 11A1 (1/250, sc 18043, Santa Cruz Biotechnologies), CYP 27A1 (1/250, sc 14835, Santa Cruz Biotechnologies), TSPO (1/1000, ab154878, Abcam), STAR 37-kDa (1/1000, MBS3223061, Cliniscience), STAR 30-kDa (1/1000, ab58013, Abcam), VDAC (1/1000, 4866, Cell Signaling), COX IV (1/2000, 4844, Cell Signaling), β-actin (1/2000, 4970, Cell Signaling) and GAPDH (1/1000, 5174, Cell Signaling). Membranes were then incubated with horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies, anti-mouse (1/5000, 7076, Cell Signaling), and anti-rabbit (1/5000, 7074, Cell Signaling). Finally, blots were revealed with ECL Western Blotting detection reagents (Amersham, GERPN2209, Sigma-Aldrich). The signal intensities for specific bands on the Western Blot were quantified using Image J software (1.30v - National Institute of Health).

2.8. Analysis of mRNA expression

Total RNA were extracted from left ventricles (sham or I/R) with a column extraction kit (Maxwell® 16 LEV simplyRNA Tissue, Promega) following the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using the AffinityScript qPCR cDNA Synthesis kit (Agilent). Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed using TaqMan Gene Expression assays (Thermo Fischer Scientific) and TaqMan primers (FAM) for *Tspo* (Rn00560892-m1), *Star* (Rn00580695-m1), *Cyp11A1* (Rn00568733-m1), *Cyp27A1* (Rn00710297-m1) and *Rplp0* (Rn03302271-gH) from Thermo Fisher Scientific. Amplification reactions were carried out using a 7000 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Gene expression was assessed by the comparative CT (ΔΔCT) method, with *Rplp0* as the reference gene.

2.9. Determination of cholesterol and oxysterol levels

Sterol and oxysterol measurements were performed on cytosolic and mitochondrial extracts. After extraction, they were measured by gas chromatography – isotope dilution mass spectrometry. The details are described in the online supplementary data.

2.10. Statistical analysis

Rats were randomly assigned to the various treatment groups and experiments were performed in parallel with rats from each strain. No formal exclusion or inclusion criteria for animals were applied (beside the inclusion of male rats only). No statistical method was used to predetermine sample size. Sample sizes were chosen based on our previous experience and corresponds to standards in the field. Sample sizes are indicated in the corresponding figure legend. No animals were excluded after randomisation except procedure failure.

The experimenter was blinding when he analysed histological immunostaining and performed echocardiographic experiments and sterol, steroidogenic hormone and lipid blood level dosages.

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 9.1.2 (Graph Pad Software, USA). Data were presented as the means ± standard error of mean (SEM). Statistical significance of differences between two groups was determined using an unpaired two-

tailed t-test. Significant differences between more than two groups were evaluated by one-way or two-way ANOVA analysis followed by an unpaired two-tailed t-test if ANOVA produced a significant value of F ($p < 0.05$). Statistical parameters and significance are reported in the figures and the figure legends.

3. Results

3.1. The inhibition of cholesterol synthesis reduces mitochondrial cholesterol accumulation and protects mitochondria against myocardial ischemia-reperfusion injury.

To reduce cholesterol biosynthesis, we used pravastatin an inhibitor of 3-hydroxy-3-methyglutaryl-CoA reductase, which blocks the mevalonate pathway. Male Wistar rats were treated or not with pravastatin (10 mg/kg/day per os, 3 days) and submitted or not to 30 min of coronary artery occlusion followed by 15 min of reperfusion. After sacrifice, the hearts were removed and cytosols and mitochondria were isolated from the ischemic area to measure cholesterol and oxysterol concentrations.

Fig. 1A shows that the reperfusion of an ischemic myocardium produced an increase in mitochondrial cholesterol concentration. A similar result was obtained in the corresponding cytosols (Fig. 1B) indicating that reperfusion promotes a global cellular accumulation of cholesterol that can result from a cellular stimulation of synthesis and/or an efflux of cholesterol from the blood compartment. This was associated with a significant increase in oxysterol contents in both mitochondria and cytosols (Fig. 1D and 1E).

In sham animals, pravastatin did not modify cytosolic (Fig. 1B) but slightly decreased mitochondrial cholesterol (Fig. 1A). We did not observe any effect of pravastatin on the concentrations of oxysterols measured in cardiac mitochondria isolated from sham rats (Fig 1D). In cardiac cytosols pravastatin treatment did not modify the concentrations of 7α-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol but, intriguingly, increased the concentration of 7β-hydroxycholesterol (Fig. 1E).

When rats were subjected to ischemia-reperfusion, pravastatin limited the enhancement of cholesterol in the cytosol and abolished its accumulation in the mitochondria (Fig. 1A and 1B).

This was associated with strong inhibition of oxysterol production in the mitochondria whereas no decrease could be observed in the cytosols (Fig. 1D and 1E). It should be

noted that pravastatin treatment did not lower serum cholesterol whatever the group of rats (Fig. 1C).

We next examined the concomitant effect of pravastatin treatment on mitochondrial function. Along with the reduction in mitochondrial cholesterol and oxysterols accumulation, pravastatin significantly improved oxidative phosphorylation as demonstrated by the increase in both ADP-stimulated respiration (state 3) and the respiratory control ratio (+48.4% versus ischemia-reperfusion). Pravastatin also decreased the sensitivity of mitochondria to mPTP opening as demonstrated by their increased capacity to retain calcium (+52.4% versus ischemia-reperfusion) (Table 1).

3.2. Cardiac mitochondrial cholesterol accumulation is not mediated by the inhibition of cholesterol catabolism during ischemia-reperfusion

Two CYP450 are responsible for the catabolism of cholesterol in mitochondria: CYP11A1 and CYP27A1. They are located to the matrix side of the inner mitochondrial membrane and convert cholesterol to pregnenolone and 27-hydroxycholesterol, respectively. In heart mitochondria, the presence and/or the role of these proteins remains a source of questions[27].

As illustrated in figure 2C, Western Blot experiments confirmed the presence of CYP11A1 in cardiac mitochondria, which is at the limit of detection when comparing the content observed in the testis on the same gel (Fig. 2A). To go further, we next analysed the activity of the enzyme in isolated mitochondria using the fluorescent probe cholesterol-resorufin. We synthesised a CYP11A1 fluorescent probe in which a resorufin molecule was conjugated to the side chain of cholesterol (See online supplemental materials). CYP11A1 cuts the cholesterol side chain and releases the fluorescent resorufin which can be measured at 590 nm. In accordance with the expression of CYP11A1, the activity of the enzyme in the heart was very low compared to that observed in the testis (Fig. 2B). This is corroborated by the fact that we were unable to detect pregnenolone using isotope dilution mass spectrometry in isolated heart mitochondria (results not shown). Western blot experiments allowed also to reveal the presence of CYP27A1 in rat isolated cardiac mitochondria (Fig. 2C) which, as CYP11A1 compared to testis, was very low compared to liver (Fig. 2A). This had not been established before and this was supported by the presence of 27-hydroxycholesterol inside cardiac mitochondria (0.0442±0.0073 µg/mg protein; n=15 different preparations). Then, we examined the effect of ischemia-reperfusion on both

cytochromes. Fig. 2C shows that protein and mRNA expressions of both cytochromes were not affected after ischemia-reperfusion nor was the activity of CYP11A1 (Fig. 2B). In the same way, the mitochondrial concentration of 27-hydroxycholesterol significantly increased after ischemia-reperfusion (from 0.0442±0.0073 (n=15) to 0.071±0.004 (n=10) µg/mg protein) ruling out an inhibition of CYP27A1 activity. These results tend to indicate that the accumulation of mitochondrial cholesterol was not a consequence of a cholesterol metabolism deficiency during ischemia-reperfusion.

3.3. Cardiac cholesterol accumulation at reperfusion is related to the increase in mitochondrial STAR but not to TSPO levels.

The accumulation of mitochondrial cholesterol at reperfusion can also be due to an enhancement of the intra-mitochondrial transport of cholesterol. Therefore, we investigated two proteins considered as critical for this transport, STAR and TSPO, even if the role of the latter in steroid organs was discussed[28,29]. To assess the role of these proteins, we examined their mitochondrial levels in the absence or in the presence of ischemia-reperfusion in isolated cardiac cytosols and mitochondria. TSPO was expressed in cardiac mitochondria but no significant change in protein and mRNA expression could be observed after ischemia-reperfusion (Fig. 2D and 2G). This is in agreement with our previous study indicating that ischemia-reperfusion did not change the level of TSPO when it was probed with the specific TSPO ligand PK11195[21]. As illustrated in Fig. 2E, STAR was expressed as a 37-kDa form in the cytosols isolated from rat hearts. After ischemia-reperfusion, the level of 37-kDa STAR decreased by 65 % in the cytosol (Fig. 2E). This decrease was associated with a strong decrease in the expression of mRNA (Fig. 2G). Concomitantly, we observed the apparition of a 30-kDa form of STAR in mitochondria (Fig. 2F).

3.4. The effect of pravastatin on mitochondrial sterol accumulation is associated with the inhibition of mitochondrial STAR processing.

As pravastatin limited the accumulation of cholesterol and oxysterols in the mitochondria at reperfusion (Fig. 1A and 1D), we wondered whether the limitation of mitochondrial STAR processing could be responsible for this effect. Thus, according to the protocol previously described, we examined the effect of the administration of pravastatin on the induction of the mitochondrial STAR processing. Fig. 3A confirmed the mitochondrial accumulation of STAR 30-kDa at reperfusion. It was totally inhibited

by pravastatin administration (Fig. 3A). It should be noted that pravastatin lowered the mitochondrial processing of STAR 30-kDa in sham animals which is in accordance with the slight decrease in mitochondrial cholesterol observed in the same group of animals (Fig. 1A).

3.5. The TSPO ligand 4'-chlorodiazepam inhibits STAR mitochondrial processing.

We previously demonstrated that TSPO ligands inhibited oxysterol formation by reducing the accumulation of cholesterol in the mitochondrial matrix at reperfusion[24]. We reasoned that this effect could be caused by the limitation of STAR mitochondrial membrane processing. Thus, we examined the effect of the administration of 4'-chlorodiazepam on mitochondrial STAR accumulation at reperfusion. When administrated before reperfusion, 4'-chlorodiazepam greatly limited STAR mitochondrial levels (Fig. 3B). As previous data have suggested that the effect of TSPO ligands could be independent from TSPO[30,31], we wanted to ascertain the involvement of TSPO in the effect of 4'-chlorodiazepam. To do that, we used *Tspo*$^{-/-}$ rats (see supplemental methods and Supplementary Fig. 1).

3.6. *Tspo* deletion reduces mitochondrial sterols accumulation without altering mitochondrial function in rats subjected to ischemia-reperfusion.

Fig. 4 shows the impact of *Tspo* deletion on mitochondrial sterol content. In sham animals, *Tspo* deletion did not alter the level of mitochondrial cholesterol (Fig. 4A) but strongly decreased the level of mitochondrial oxysterols (Fig. 4B-G). These oxysterols are known to be formed by auto-oxidation, except 25-hydroxycholesterol which has also be found to result from enzymatic conversion of cholesterol. This decrease in oxysterol content was not observed in cardiac cytosols (Supplementary Table 1) indicating that it could result from a limitation of mitochondrial ROS production in *Tspo*$^{-/-}$ mitochondria. To ascertain this hypothesis, we compared the basal level of mitochondrial superoxide generation in rat cardiomyocytes isolated from *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo*$^{-/-}$ rats. Fig. 5A provide direct evidence of this hypothesis. *Tspo* deletion limits mitochondrial superoxide anion production over time in paced cardiomyocytes, as demonstrated by the decrease in MitoSOX fluorescence. This is in accordance with studies suggesting a relationship between TSPO, ROS levels and oxidative stress[14]

and with recent data reporting significantly low ROS levels in epithelial human breast cancer cells when TSPO is down-regulated[32].

We did not observe any consequences of these sterol alterations in sham animals on cardiac mitochondrial function (Fig. 5B). When mitochondria were extracted from *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo* $^{-/-}$ rats, the yield of extraction, determined by measuring the concentration of proteins in the mitochondrial pellet per g of cardiac tissue, was identical, reflecting a similar number of mitochondria in hearts (Fig. 5B). Similarly, we did not detect any alteration of mitochondrial function. *Tspo* deletion did not affect mitochondrial respiration or oxidative phosphorylation as illustrated by the similar respiratory coefficient rate and V3 values and did not alter the capacity of mitochondria to retain calcium, a marker of the mitochondrial membrane impermeability (Fig. 5B). *Tspo* deletion being without consequence on basal cardiac mitochondrial function, we assumed that the effect of *Tspo* deletion could appear following a cardiac stress.

Therefore, rats of both genotypes were subjected to cardiac ischemia-reperfusion and mitochondrial sterols and function were assessed. Ischemia-reperfusion induced an increase in mitochondrial cholesterol and oxysterols in *Tspo*$^{+/+}$ animals (Fig. 4) as previously described[12,24,33]. It should be noted that these results were obtained in Sprague Dawleys animals (the strain in which *Tspo*$^{-/-}$ rats were generated) and confirmed all our previous results using Wistar animals.
Tspo deletion did not prevent but blunted cholesterol and oxysterol accumulation following ischemia-reperfusion (Fig. 4). However, this decrease in sterols had no consequences on mitochondrial parameters, which remained similar between *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo*$^{-/-}$ rats (Fig. 5B).

3.7. Deletion of *Tspo* abolishes the effect of 4'-chlorodiazepam on mitochondrial STAR processing and cholesterol accumulation without effect on STAR 37-kDa.
Tspo$^{-/-}$ rats being generated from a different strain (Sprague Dawleys animals) than that used in all our previous experiments, we assessed the effect of 4'-chlorodiazepam on mitochondrial STAR in Sprague Dawleys *Tspo*$^{+/+}$ rats subjected to ischemia-reperfusion before analyzing its effect in *Tspo*$^{-/-}$ rats. Ischemia-reperfusion induced an increase in mitochondrial STAR 30-kDa level, which was inhibited by 4'-chlorodiazepam administration (Fig. 6A). Similarly, 4'-chlorodiazepam prevented

mitochondrial cholesterol accumulation (Fig. 6B) confirming the results obtained with Wistar rats. These data legitimized the use of Sprague Dawleys *Tspo*$^{-/-}$ rats.

Fig. 6C shows that the mitochondrial enhancement of STAR 30-kDa caused by ischemia-reperfusion persisted in *Tspo*$^{-/-}$ rats, demonstrating a TSPO-independent mitochondrial processing of STAR. Nevertheless, *Tspo* deletion abolished the effect of 4'-chlorodiazepam, the administration of the drug being unable to prevent cholesterol accumulation (Fig. 6D), to inhibit STAR 30-kDa enhancement in mitochondria (Fig. 6C) and to improve mitochondrial functional parameters (Fig. 5B) after ischemia-reperfusion. This confirms the role of TSPO in the mitochondrial protecting effect of 4'-chlorodiazepam.

As it was shown that *Tspo* depletion induced an alteration of the level of STAR 37-kDa in Leydig tumor cells[34], we wondered whether global deletion of *Tspo* would alter the STAR 37-kDa cytosolic form. Cardiac ischemia-reperfusion in *Tspo*$^{+/+}$ Sprague Dawley rats confirmed the decrease in the level of STAR 37-kDa in cardiac cytosols (Fig. 6E) and this decrease was not altered by 4'-chlorodiazepam (Fig. 6F). Similar results were observed in *Tspo*$^{-/-}$ rats, *i.e.*, the decrease in cytosolic STAR 37-kDa level observed after ischemia-reperfusion was preserved and the administration of 4'-chlorodiazepam was without effect (Fig. 6G and 6H).

4. Discussion

Early reperfusion of an ischemic myocardium induces an accumulation of mitochondrial cholesterol and oxysterols, which is potentiated by hypercholesterolemia[12,24]. In this setting, administration of TSPO ligands prevented mitochondrial sterol accumulation, protected mitochondrial function and reduced infarct size[21,24]. This protective effect is preserved during hypercholesterolemia. [12] This makes controlling mitochondrial cholesterol concentration an interesting strategy to protect mitochondria during myocardial ischemia-reperfusion and particularly in hypercholesterolemic conditions that are known to amplify cellular injury and to impede cardioprotective mechanisms[8]. In the present study, we provide evidence that inhibiting cholesterol synthesis protects mitochondrial function during myocardial ischemia-reperfusion independently from any blood level lowering effect. We also provide novel findings that extend the understanding on the mechanisms responsible for mitochondrial cholesterol entry and accumulation during myocardial ischemia-reperfusion.

An important step of this study was to rule out the possibility of a defect in mitochondrial cholesterol catabolism that could explain mitochondrial cholesterol accumulation. We clearly established in the rat heart the presence of the cytochromes which are responsible for cholesterol catabolism in mitochondria, *i.e.* CYP11A1 and CYP27A1. To the best of our knowledge, only one study described the presence of CYP11A1 in the heart (human heart)[35] and that of CYP27A1 was unknown[27]. CYP11A1 constitutes an essential step for the formation of steroid hormones and its presence suggests a possible *de novo* cardiac steroidogenesis although we cannot yet detect pregnenolone. CYP27A1 is considered as a major mechanism for cholesterol efflux from peripheral tissues, as emphasized by Babiker *et al*[36]*.* showing that patients with CYP27A1 gene mutations do not secrete 27-oxygenated products of cholesterol in peripheral macrophages. The role of these cytochromes in cardiovascular physiology and physiopathology is largely unexplored. We demonstrate that they are very poorly expressed in the rat heart compared to reference organs but, most importantly, that their expression and activity are not modified after reperfusion. These results provide evidence that the increased influx of cholesterol and not an alteration of its mitochondrial metabolism is responsible for its mitochondrial accumulation during myocardial ischemia-reperfusion.

To investigate the mechanisms explaining mitochondrial accumulation of cholesterol, we reduced cholesterol synthesis using pravastatin that inhibits 3-hydroxy-3-methyglutaryl-CoA reductase and thus acts upstream of mitochondria. We choose this statin because it is freely soluble in water and thus easy to use in animal models. As previously observed[37,38], pravastatin treatment did not lower serum cholesterol in our experimental conditions. This is in accordance with studies indicating that pravastatin only exerts an hypocholesterolemic effect in dyslipidemic animal models[39,40]. Here, pravastatin did not alter the concentration of sterols in cardiac cytosols isolated from sham rats, which is in line with this hypothesis. The brevity of the pravastatin treatment (3 days) can also participate to this lack of effect. We observed, however, an increase in 7β-hydroxycholesterol in the cytosols of sham animals. This increase was unexpected but was associated with the inversion of the ratio 7-ketocholesterol/7β-hydroxycholesterol. A balance exists between the circulating and the tissue levels of 7-ketocholesterol and 7β-hydroxycholesterol *in vivo* and this balance is regulated by the 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1[41]. The reduction of 7-ketocholesterol in 7β-hydroxycholesterol is stereospecific and this enzyme is present in the rat heart[42]. We can assume that pravastatin treatment favors the formation of 7β-hydroxycholesterol but this needs to be confirmed. Moreover, pravastatin treatment slightly reduced the amount of cholesterol in mitochondria, which seems to be caused by the decrease in mitochondrial STAR levels.

During ischemia-reperfusion, pravastatin limited the cytosolic concentration of cholesterol but not of oxysterols. This might be the consequence of an insufficient decrease in cytosolic cholesterol, which did not reach the threshold needed to significantly reduce oxysterol content. In contrast, pravastatin strongly inhibited cholesterol and oxysterol accumulation in the mitochondria, and restored the capacity of mitochondria to synthetize ATP and to resist to mPTP opening. These are key factors involved in cell protection and they may strongly contribute to the cardioprotective effect of pravastatin. These novel results show that decreasing mitochondrial cholesterol by inhibiting cholesterol metabolism protects mitochondria from ischemia-reperfusion injury.

Importantly, we also identified a mechanism involved in the accumulation of cholesterol and oxysterols into mitochondria during myocardial ischemia-reperfusion. We demonstrated a mitochondrial targeting and processing of STAR 37-kDa leading to a

mitochondrial STAR 30-kDa mature protein. The mitochondrial accumulation of STAR 30-kDa and sterols during reperfusion are blocked by both the inhibition of cholesterol synthesis by pravastatin and the TSPO ligand 4'-chlorodiazepam. In addition, 4'-chlorodiazepam was ineffective to inhibit ischemia-reperfusion induced STAR import and cholesterol accumulation and to improve mitochondrial functional parameters in *Tspo*$^{-/-}$ rats. All these findings clearly demonstrate that a functional interaction exists between STAR and TSPO in cardiac cells as observed in Leydig cells[34]. They also validate that 4'chlorodiazepam acts through its binding to TSPO.

It should also be stressed that TSPO is not mandatory for mitochondrial STAR import and cholesterol accumulation as both processes were not abolished in *Tspo*$^{-/-}$ rats in basal conditions. This is consistent with data obtained on steroidogenic organs where TSPO appears non-essential for low-flux steroidogenesis[43]. This hypothesis is supported by the data showing no variation of cardiac phenotypes between *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo*$^{-/-}$ rats. It was suggested that adaptive mechanisms could take place to compensate for the lack of TSPO[43,44]. This raises questions concerning the role of TSPO in the heart *in vivo* since it must bind a ligand to exert an action. Moreover, in the heart, TSPO appears as a spectator unable to control STAR processing but its absence limits cholesterol movements during reperfusion. This suggests that the interaction between STAR and TSPO is necessary for an efficient transport of mitochondrial cholesterol particularly when its strong activation is needed.

We also observed that myocardial ischemia-reperfusion at its acute phase does not induce changes in TSPO expression. This is in line with data indicating that modulation of TSPO expression probably requires chronic processes and is most of the time observed during chronic pathologies such neurodegenerative, neuroinflammatory, and neuropsychiatric diseases[45,46], cerebral ischemia[47] or diabetic cardiomyopathy[48].

Our study highlights the role of STAR as a key protein during the reperfusion of an ischemic myocardium. STAR probably answers to the metabolic needs of the cells but acts as a deleterious agent stimulating cholesterol accumulation and generation of oxysterols, which are harmful for mitochondria during reperfusion. In contrast, Anuka *et al.*[18] demonstrate a cardioprotective role of STAR in cardiac fibroblasts in post-infarction conditions caused by an expression of the protein showing antiapoptotic activity, thus unrelated to the traditional role of the protein in steroidogenesis as

recently described[49]. This apparent discrepancy could be explained by different physiopathological setting as Anuka *et al.*[18] used a permanent occlusion mouse model with investigations performed more lately during reperfusion (3 days). We cannot exclude the possibility for STAR to possess two properties in stress events, a short-term cholesterol transport property and a long-term antiapoptotic effect.

5. Conclusion

Taken together, the present study highlights STAR translocation to the mitochondria and its coupling with TSPO to import cholesterol and to promote oxysterol formation during ischemia-reperfusion. This interaction regulates mitochondrial homeostasis and play a key role during mitochondrial injury

Funding

This work was supported by the Fondation de France [grant number 2018-00086493]. Juliette Bréhat and Julien Musman were supported by doctoral grants from the Ministère de l'enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation.

Author contribution statement

VL, MR, SP, BG and DM contributed to the experimental design**;** JB, SL, JM, JBS, NE, FG,LAB, CT, CC and DM conducted the experiments; JB, SL, JM, SP, DM performed data analysis; SP, BG and DM wrote or contributed to the writing of the manuscript with input from all co-authors.

Acknowledgement

We thank Pr V Papadopoulos (University of Southern California, USA) for providing two pairs of heterozyte TSPO deleted rats, which allowed us to develop a colony. We also thank him for helpful advices concerning the synthesis and the use of the fluorescent probe cholesterol-resorufin and for rereading the manuscript. The authors are greatly indebted to the Plateforme de Biochimie du Centre de Recherche sur

l'Inflammation (Hopital Bichat, Paris, France) for blood analyses. We thank the Imagery platform of IMRB for histological samples preparation and the Animal Facility of IMRB for animal care. We also thank Lucien Sambin and Alain Bizé for their help during echocardiographic exams.

Conflict of interest

All authors declare no competing financial interests.

References

1. Reed GW, Rossi JE, Cannon CP. Acute myocardial infarction. *Lancet.* 2017;**389**:197-210.

2. Lecour S, Bøtker HE, Condorelli G, Davidson SM, Garcia-Dorado D, Engel FB, Ferdinandy P, Heusch G, Madonna R, Ovize M, Ruiz-Meana M, Schulz R, Sluijter JP, Van Laake LW, Yellon DM, Hausenloy DJ. ESC working group cellular biology of the heart: position paper: improving the preclinical assessment of novel cardioprotective therapies. *Cardiovasc Res.* 2014;**104**:399-411.

3. Sniderman AD, Tsimikas S, Fazio S. The severe hypercholesterolemia phenotype: clinical diagnosis, management, and emerging therapies. *J Am Coll Cardiol.* 2014;**63**:1935-1947.

4. Neil A, Cooper J, Betteridge J, Capps N, McDowell I, Durrington P, Seed M, Humphries SE. Reductions in all-cause, cancer, and coronary mortality in statin-treated patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia: a prospective registry study. *Eur Heart J.* 2008;**29**:2625-2633.

5. Raal FJ, Pilcher GJ, Panz VR, van Deventer HE, Brice BC, Blom DJ, Marais AD. Reduction in mortality in subjects with homozygous familial hypercholesterolemia associated with advances in lipid-lowering therapy. *Circulation.* 2011;**124**:2202-2207.

6. Huang Y, Walker KE, Hanley F, Narula J, Houser SR, Tulenko TN. Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet. *Circulation.* 2004;**109**:97-102.

7. Varga ZV, Kupai K, Szűcs G, Gáspár R, Pálóczi J, Faragó N, Zvara A, Puskás LG, Rázga Z, Tiszlavicz L, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Ferdinandy P, Csont T.

MicroRNA-25-dependent up-regulation of NADPH oxidase 4 (NOX4) mediates hypercholesterolemia-induced oxidative/nitrative stress and subsequent dysfunction in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;**62**:111-121.

8. Andreadou I, Iliodromitis EK, Lazou A, Görbe A, Giricz Z, Schulz R, Ferdinandy P. Effect of hypercholesterolaemia on myocardial function, ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. *Br J Pharmacol.* 2017;**174**:1555-1569.

9. Onody A, Csonka C, Giricz Z, Ferdinandy P. Hyperlipidemia induced by a cholesterol-rich diet leads to enhanced peroxynitrite formation in rat hearts. *Cardiovasc Res.* 2003;**58**:663-670.

10. McCommis KS, McGee AM, Laughlin MH, Bowles DK, Baines CP. Hypercholesterolemia increases mitochondrial oxidative stress and enhances the MPT response in the porcine myocardium: beneficial effects of chronic exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;**301**:R1250-1258.

11. Osipov RM, Bianchi C, Feng J, Clements RT, Liu Y, Robich MP, Glazer HP, Sodha NR, Sellke FW. Effect of hypercholesterolemia on myocardial necrosis and apoptosis in the setting of ischemia-reperfusion. *Circulation.* 2009;**120**:S22-30.

12. Musman J, Paradis S, Panel M, Pons S, Barau C, Caccia C, Leoni V, Ghaleh B, Morin D. A TSPO ligand prevents mitochondrial sterol accumulation and dysfunction during myocardial ischemia-reperfusion in hypercholesterolemic rats. *Biochem Pharmacol.* 2017;**142**:87-95.

13. Halestrap AP, Richardson AP. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;78:**129**-141.

14. Morin D, Musman J, Pons S, Berdeaux A, Ghaleh B. Mitochondrial translocator protein (TSPO): From physiology to cardioprotection. *Biochem Pharmacol.* 2016;**105**:1-13.

15. Miller WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;**379**:62-73.

16. Papadopoulos V, Aghazadeh Y, Fan J, Campioli E, Zirkin B, Midzak A. Translocator protein-mediated pharmacology of cholesterol transport and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;**408**:90-98.

17. Artemenko IP, Zhao D, Hales DB, Hales KH, Jefcoate CR. Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells. *J Biol Chem.* 2001;**276**:46583-96.

18. Anuka E, Yivgi-Ohana N, Eimerl S, Garfinkel B, Melamed-Book N, Chepurkol E, Aravot D, Zinman T, Shainberg A, Hochhauser E, Orly J. Infarct-induced steroidogenic acute regulatory protein: a survival role in cardiac fibroblasts. *Mol Endocrinol.* 2013;**27**:1502-17.

19. Šileikytė J, Blachly-Dyson E, Sewell R, Carpi A, Menabò R, Di Lisa F, Ricchelli F, Bernardi P, Forte M. Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by the outer membrane does not involve the peripheral benzodiazepine receptor (Translocator Protein of 18 kDa (TSPO)). *J Biol Chem.* 2014;**289**:13769-13781.

20. Leducq N, Bono F, Sulpice T, Vin V, Janiak P, Fur GL, O'Connor SE, Herbert JM. Role of peripheral benzodiazepine receptors in mitochondrial, cellular, and cardiac damage induced by oxidative stress and ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;**306**:828-837.

21. Obame FN, Zini R, Souktani R, Berdeaux A, Morin D. Peripheral benzodiazepine receptor-induced myocardial protection is mediated by inhibition of mitochondrial membrane permeabilization. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;**323**:336-345.

22. Schaller S, Paradis S, Ngoh GA, Assaly R, Buisson B, Drouot C, Ostuni MA, Lacapere JJ, Bassissi F, Bordet T et al. TRO40303, a new cardioprotective compound, inhibits mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;**333**:696-706.

23. Vejux A, Ghzaiel I, Nury T, Schneider V, Charrière K, Sghaier R, Zarrouk A, Leoni V, Moreau T, Lizard G. Oxysterols and Multiple Sclerosis: physiopathology, evolutive biomarkers and therapeutic strategy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2021;**210**:105870.

24. Paradis S, Leoni V, Caccia C, Berdeaux A, Morin D. Cardioprotection by the TSPO ligand 4'-chlorodiazepam is associated with inhibition of mitochondrial accumulation of cholesterol at reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2013;**98**:420-427.

25. Banati RB, Middleton RJ, Chan R, Hatty CR, Kam WW, Quin C, Graeber MB, Parmar A, Zahra D, Callaghan P, Fok S, Howell NR, Gregoire M, Szabo A, Pham T, Davis E, Liu GJ. Positron emission tomography and functional characterization of a complete PBR/TSPO knockout. *Nat Commun.* 2014;**5**:5452.

26. Tu LN, Morohaku K, Manna PR, Pelton SH, Butler WR, Stocco DM, Selvaraj V. Peripheral benzodiazepine receptor/translocator protein global knock-out mice are viable with no effects on steroid hormone biosynthesis. *J Biol Chem.* 2014;**289**:27444-27454.

27. Barau C, Ghaleh B, Berdeaux A, Morin D. Cytochrome P450 and myocardial ischemia: potential pharmacological implication for cardioprotection. *Fundam Clin Pharmacol.* 2015;**29**:1-9.

28. Morohaku K, Pelton SH, Daugherty DJ, Butler WR, Deng W, Selvaraj V. Translocator protein/peripheral benzodiazepine receptor is not required for steroid hormone biosynthesis. *Endocrinology*. 2014;**155**:89-97.

29. Papadopoulos V. On the role of the translocator protein (18-kDa) TSPO in steroid hormone biosynthesis. *Endocrinology.* 2014;**155**:15-20.

30. Hans G, Wislet-Gendebien S, Lallemend F, Robe P, Rogister B, Belachew S, Nguyen L, Malgrange B, Moonen G, Rigo JM. Peripheral benzodiazepine receptor (PBR) ligand cytotoxicity unrelated to PBR expression. *Biochem Pharmacol.* 2005;**69**:819-830.

31. Tu LN, Zhao AH, Stocco DM, Selvaraj V. PK11195 effect on steroidogenesis is not mediated through the translocator protein (TSPO). *Endocrinology.* 2015;**156**:1033-1039.

32. Desai R, East DA, Hardy L, Faccenda D, Rigon M, Crosby J, Alvarez MS, Singh A, Mainenti M, Hussey LK et al. Mitochondria form contact sites with the nucleus to couple prosurvival retrograde response. *Sci Adv.* 2020;**6**:eabc9955.

33. Musman J, Pons S, Barau C, Caccia C, Leoni V, Berdeaux A, Ghaleh B, Morin D. Regular treadmill exercise inhibits mitochondrial accumulation of cholesterol and

oxysterols during myocardial ischemia-reperfusion in wild-type and ob/ob mice. *Free Radic Biol Med.* 2016;**101**:317-324.

34. Hauet T, Yao ZX, Bose HS, Wall CT, Han Z, Li W, Hales DB, Miller WL, Culty M, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. *Mol Endocrinol.* 2005;**19**:540-554.

35. Young MJ, Clyne CD, Cole TJ, Funder JW. Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;**86**:5121-5126.

36. Babiker A, Andersson O, Lund E, Xiu RJ, Deeb S, Reshef A, Leitersdorf E, Diczfalusy U, Björkhem I. Elimination of cholesterol in macrophages and endothelial cells by the sterol 27-hydroxylase mechanism. Comparison with high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *J Biol Chem.* 1997;**272**:26253-61.

37. Fontaine D, Fontaine J, Dupont I, Dessy C, Piech A, Carpentier Y, Berkenboom G. Chronic hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibition and endothelial function of the normocholesterolemic rat: comparison with angiotensin-converting enzyme inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002;**40**:172-180.

38. Lee TM, Chou TF, Tsai CH. Effects of pravastatin on cardiomyocyte hypertrophy and ventricular vulnerability in normolipidemic rats after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;**35**:1449-1159.

39. Penumathsa SV, Thirunavukkarasu M, Koneru S, Juhasz B, Zhan L, Pant R, Menon VP, Otani H, Maulik N. Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;**42**:508-516.

40. Chen Y, Ohmori K, Mizukawa M, Yoshida J, Zeng Y, Zhang L, Shinomiya K, Kosaka H, Kohno M. Differential impact of atorvastatin vs pravastatin on progressive insulin resistance and left ventricular diastolic dysfunction in a rat model of type II diabetes. *Circ J.* 2007;**71**:144-152.

41. Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE. 11β-hydroxysteroid dehydrogenases: A growing multi-tasking family. *Mol Cell Endocrinol.* 2021;526:111210.

42. Walker BR, Yau JL, Brett LP, Seckl JR, Monder C, Williams BC, Edwards CR. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in vascular smooth muscle and heart: implications for cardiovascular responses to glucocorticoids. *Endocrinology.* 1991;**129**:3305-3312.

43. Fan J, Campioli E, Midzak A, Culty M, Papadopoulos V. Conditional steroidogenic cell-targeted deletion of TSPO unveils a crucial role in viability and hormone-dependent steroid formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;**112**:7261-7266.

44. Owen DR, Fan J, Campioli E, Venugopal S, Midzak A, Daly E, Harlay A, Issop L, Libri V, Kalogiannopoulou D, Oliver E et al. TSPO mutations in rats and a human polymorphism impair the rate of steroid synthesis. *Biochem J.* 2017;**474**:3985-3999.

45. Chang CW, Chiu CH, Lin MH, Wu HM, Yu TH, Wang PY, Kuo YY, Huang YY, Shiue CY, Huang WS, Yeh SH. GMP-compliant fully automated radiosynthesis of [18F]FEPPA for PET/MRI imaging of regional brain TSPO expression. *EJNMMI Res.* 2021;**11**:26.

46. Nutma E, Ceyzériat K, Amor S, Tsartsalis S, Millet P, Owen DR, Papadopoulos V, Tournier BB. Cellular sources of TSPO expression in healthy and diseased brain. Eur *J Nucl Med Mol Imaging*. 2021;**49**:146-163

47. Rojas S, Martin A, Arranz MJ, Pareto D, Purroy J, Verdaguer E, Llop J, Gómez V, Gispert JD, Millán O, Chamorro A, Planas AM. Imaging brain inflammation with [(11)C]PK11195 by PET and induction of the peripheral-type benzodiazepine receptor after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;**27**:1975–1986.

48. Gliozzi M, Scarano F, Musolino V, Carresi C, Scicchitano M, Ruga S, Zito MC, Nucera S, Bosco F, Maiuolo J et al. Role of TSPO/VDAC1 Upregulation and Matrix Metalloproteinase-2 Localization in the Dysfunctional Myocardium of Hyperglycaemic Rats. *Int J Mol Sci.* 2020;**21**:7432.

49. Galano M, Li Y, Li L, Sottas C, Papadopoulos V. Role of Constitutive STAR in Leydig Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;**22**:2021.

Figure Legends

Fig. 1: Effects of pravastatin (P) treatment on the level of cholesterol and oxysterols in cardiac mitochondria (A, D), cytosols (B, E) and plasma (C) of rats subjected or not to cardiac ischemia-reperfusion (I/R).
7α-hydroxycholesterol (7αOHC); 7β-hydroxycholesterol (7βOHC); 7-ketocholesterol (7KC); cholesterol-5α,6α-epoxide (αEpoxiC); cholesterol-5β,6β-epoxide (βEpoxiC).
Each value is the mean of 9-15 independent experiments. All the figures were analyzed by a two-way ANOVA followed by an unpaired two-tailed t-test.

Fig. 2: Effect of ischemia-reperfusion (I/R) on cardiac CYP11A, CYP27A1, TSPO and STAR expression.
A: Expression of CYP11A1 and CYP27A1 in cardiac mitochondria compared to their respective control organs (testis and liver), respectively (n=3, independent mitochondrial preparations).
B: Representative experiment measuring CYP11A1 enzymatic activity in testis, sham and I/R cardiac mitochondria (left). Quantification of CYP11A1 enzymatic activity (right). Each value is the mean ± SEM of 4-6 independent mitochondrial preparations. Statistical analysis : one way ANOVA followed by an unpaired two-tailed t-test.
C: I/R does not alter protein level mitochondrial protein levels and mRNA left ventricle expression of CYP11A1 and CYP27A. COX-IV was used as a loading control.
D: I/R does not alter mitochondrial level of TSPO.
E: I/R decreases cytosolic level of STAR 37-kDa.
F: I/R increases mitochondria level of STAR 30-kDa.
G: I/R does not alter *Tspo* but decreases *Star* mRNA expression in the myocardium.
C,D,E,F,G: Each value is the mean ± SEM of at least 3 independent preparations. COX-IV (D and E) and actin (F) were used as a loading control. Statistical analyses were done using an unpaired two-tailed t-test.
ns: non significant.

Fig. 3: Effect of pravastatin and 4'-chlorodiazepam treatment on mitochondrial STAR level after cardiac ischemia-reperfusion (I/R).
A: Effect of pravastatin (P). Statistical analysis was done by a two-way ANOVA analysis followed by an unpaired two-tailed t-test.

B: Effect of 4'-chlorodiazepam (CDZ). Statistical analysis was done by a one-way ANOVA analysis followed by an unpaired two-tailed t-test.
COX-IV was used as a loading control. Each value is the mean ± SEM of at least 3 mitochondrial independent preparations.

Fig. 4: Effects of Tspo deletion on cholesterol (A) and oxysterols (B-G) in cardiac mitochondria in rats subjected or not to cardiac ischemia-reperfusion (I/R).
Each value is the mean ± SEM of 6-7 independent experiments. All the panels were analyzed by a two-way ANOVA followed by an unpaired two-tailed t-test. P values are indicated in the panels. White bars: *Tspo*$^{+/+}$ rats. Grey bars: *Tspo*$^{-/-}$ rats.
ns: non significant.

Fig. 5: Effects of *Tspo* deletion on mitochondrial superoxide production in isolated cardiomyocytes and mitochondrial function in rats subjected or not to cardiac ischemia-reperfusion (I/R).
A*: Left:* time-dependent mitochondrial superoxide production in cardiomyocytes isolated from *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo*$^{-/-}$ rats. Each point is the mean of 9-10 independent cardiomyocyte preparations, each preparation including 20-30 cells. Statistical comparison was done by two-way ANOVA analysis. *Right:* representative images obtained at t=0 and 60 min. Scale bar: 200 µm.
B: mitochondrial yield, oxygen consumption and calcium retention capacity in cardiac mitochondria isolated from *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo*$^{-/-}$ rats subjected to I/R and treated or not with 4'-chlorodiazepam (CDZ). Each value is the mean ± SEM of at least 6 independent experiments. All the figures were analyzed by a two-way ANOVA followed by an unpaired two-tailed t-test.

Fig. 6: Deletion of *Tspo* inhibits the effect of 4'-chlorodiazepam (CDZ) on mitochondrial STAR and cholesterol accumulation after ischemia-reperfusion (I/R) but does not affect cytosolic STAR level .
A and **B**: effect of CDZ on mitochondrial STAR and cholesterol accumulation in *Tspo*$^{+/+}$ rats.
C and **D**: effect of CDZ on mitochondrial STAR and cholesterol accumulation in *Tspo*$^{-/-}$ rats.

E: effect of I/R on cytosolic STAR 37-kDa level in *Tspo*$^{+/+}$ rats.

F: effect of CDZ treatment on cytosolic STAR 37-kDa level after I/R in *Tspo*$^{+/+}$ rats .

G: effect of I/R on cytosolic STAR 37-kDa level in *Tspo*$^{-/-}$ rats.

H: effect of CDZ treatment on cytosolic STAR 37-kDa level after I/R in *Tspo*$^{-/-}$ rats.

COX-IV and GAPDH was used as a loading control. Each value is the mean ± SEM of 3-5, 3-6 and 6-7 independent preparations for mitochondrial western blot, cytosolic western blot and cholesterol dosage, respectively. Statistical analyses were done by an unpaired two-tailed t-test (**A,C,E,F,G** and **H**) and a two-way ANOVA analysis followed by an unpaired two-tailed t-test (**B** and **D**).

ns: non significant.

Table 1: Effects of pravastatin treatment on respiration and calcium retention capacity of cardiac mitochondria from Wistar rats subjected to 30 min ischemia and 15 min reperfusion.

	Sham (n=7)	Sham+P (n=7)	I/R (n=10)	I/R + P (n=10)
Respiration				
Substrate-dependent respiration	36.3±2.24	41.6±3.12	43.6±3.59	42.1±3.4
ADP-stimulated respiration	234±8	249±13	131±11[§]	188±11[‡]
Respiratory control ratio	6.66±0.31	6.24±0.64	3.20±0.39[§]	4.75±0*
Calcium retention capacity	139±11	140±15	53±7[§]	81±7[†]

Respiration is expressed as nmoL/min/mg protein and calcium retention capacity in nmoL/mg protein. I/R: ischemia-reperfusion. P: pravastatin.
Each value is the mean ± SEM of 7-10 mitochondrial independent preparations. Data were analyzed by a two-way ANOVA followed by an unpaired two-tailed t-test. *p=0.0256, [†]p=0.0126 and [‡]p=0.0021 *vs* respective I/R.
[§]p< 0.0001 *vs* respective Sham.

Click here to access/download;Figure(s);Figure 1 CAR.pptx

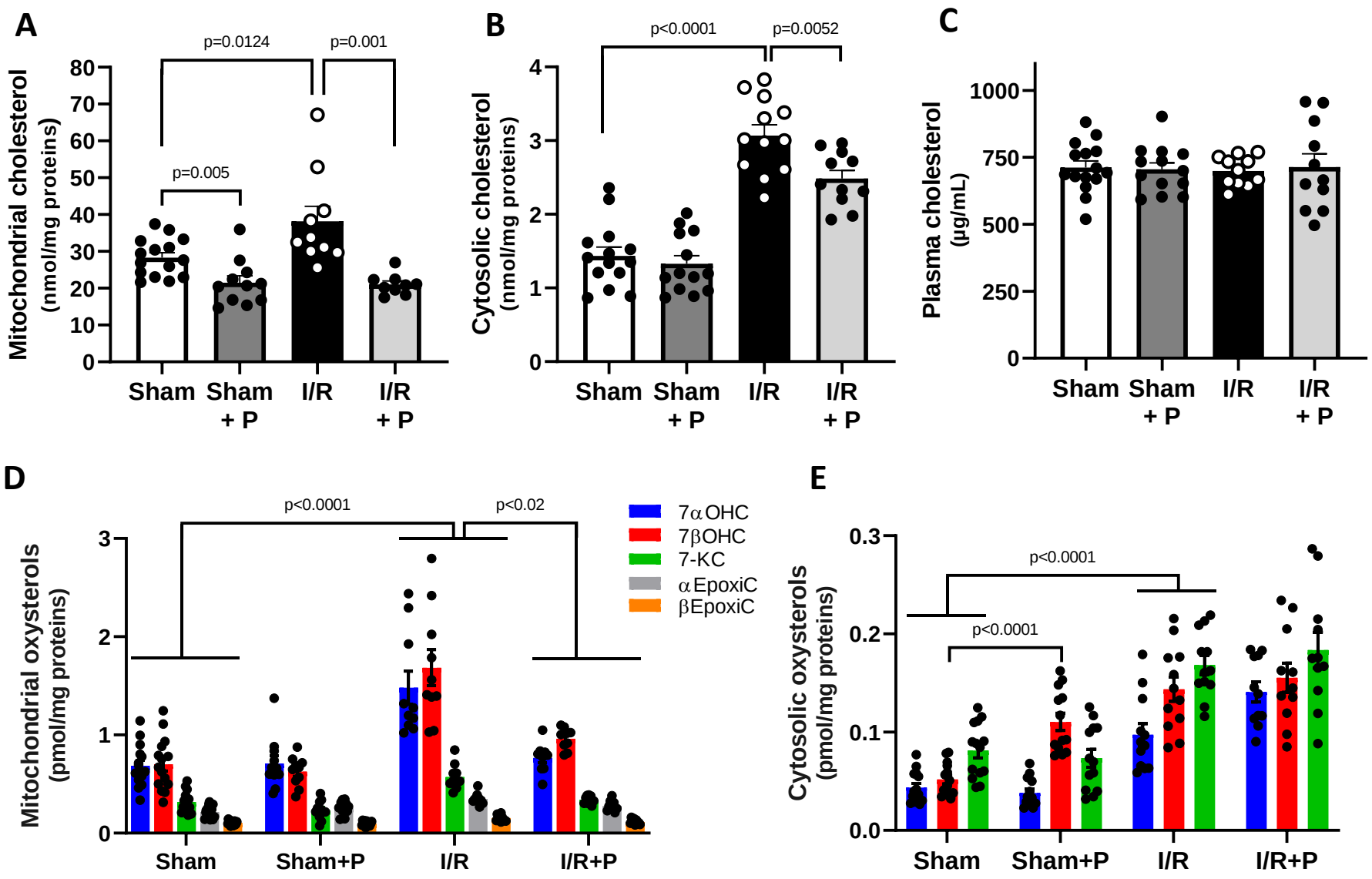


Fig. 1

Figure 2

Click here to access/download;Figure(s);figure 2 CAR.pptx

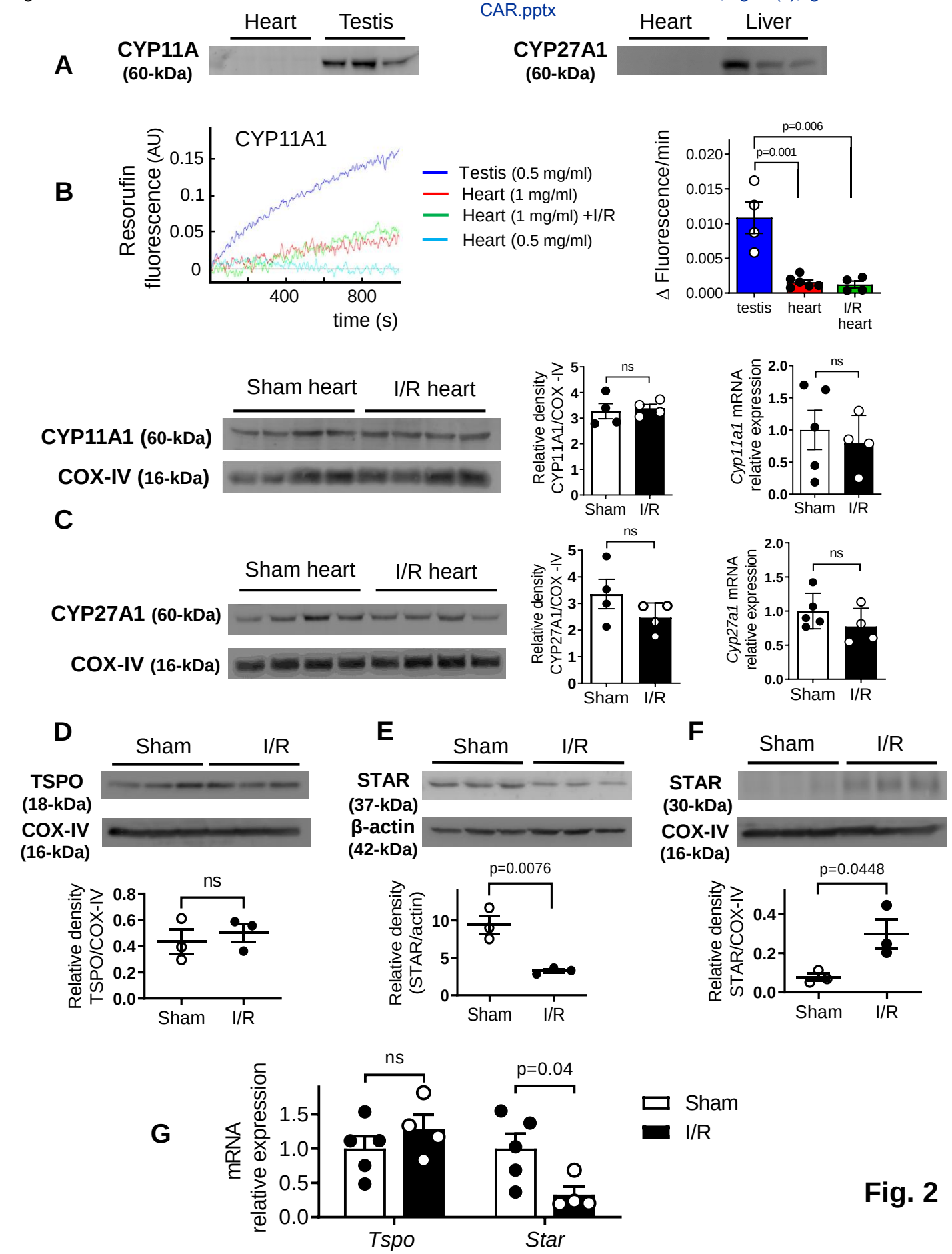
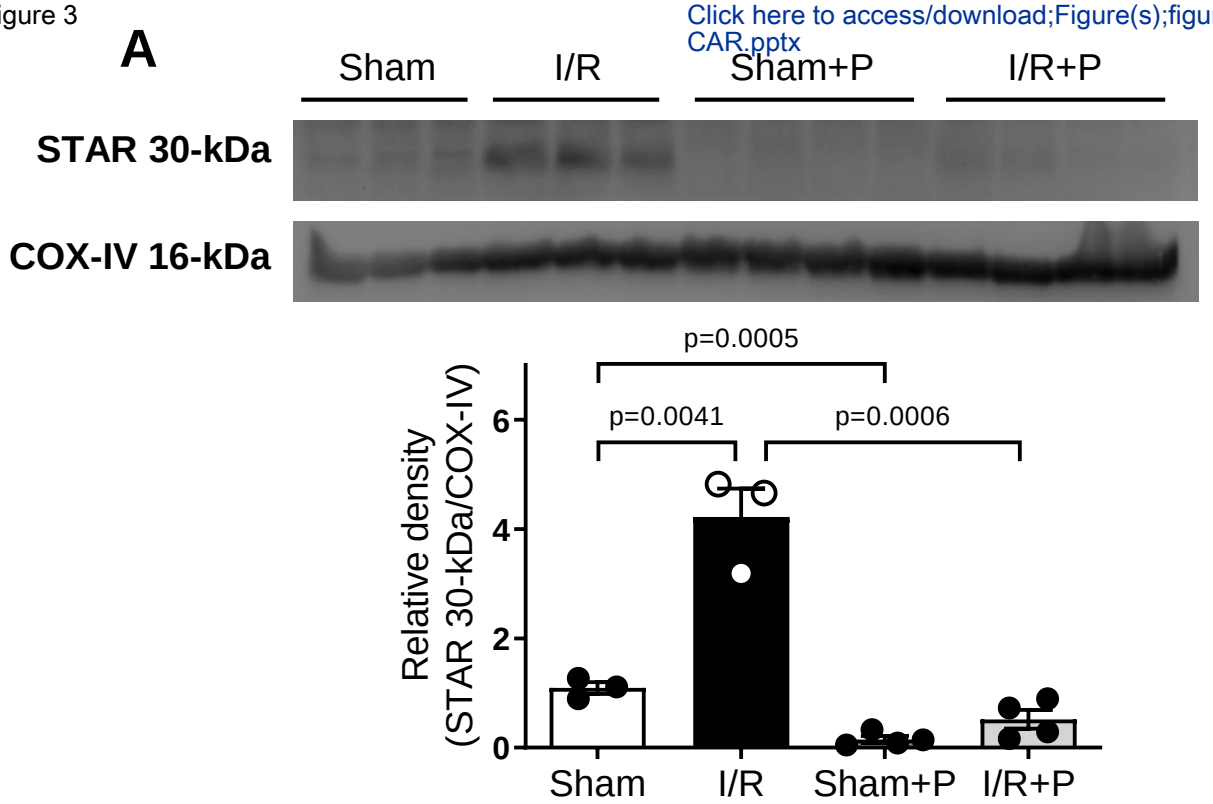


Fig. 2

Figure 3

Click here to access/download;Figure(s);figure 3 CAR.pptx



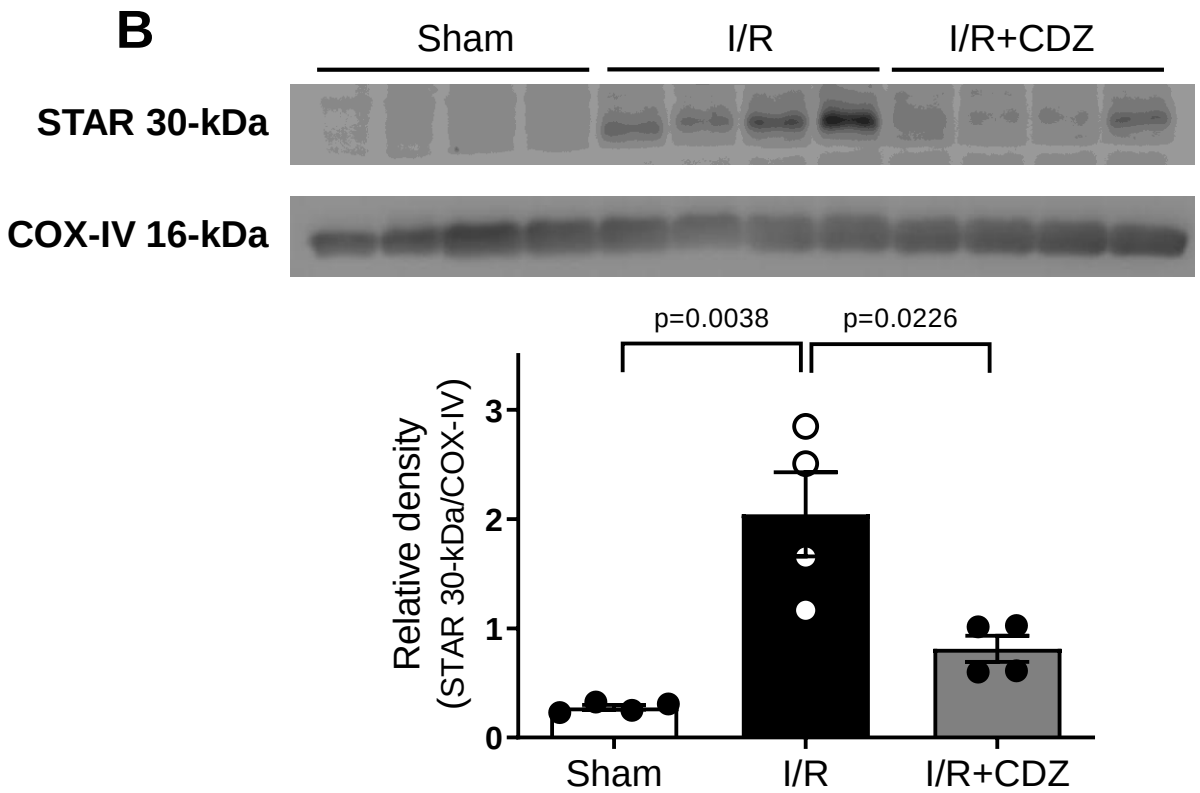


Fig. 3

Figure 4

Click here to access/download;Figure(s);figure 4 CAR.pptx

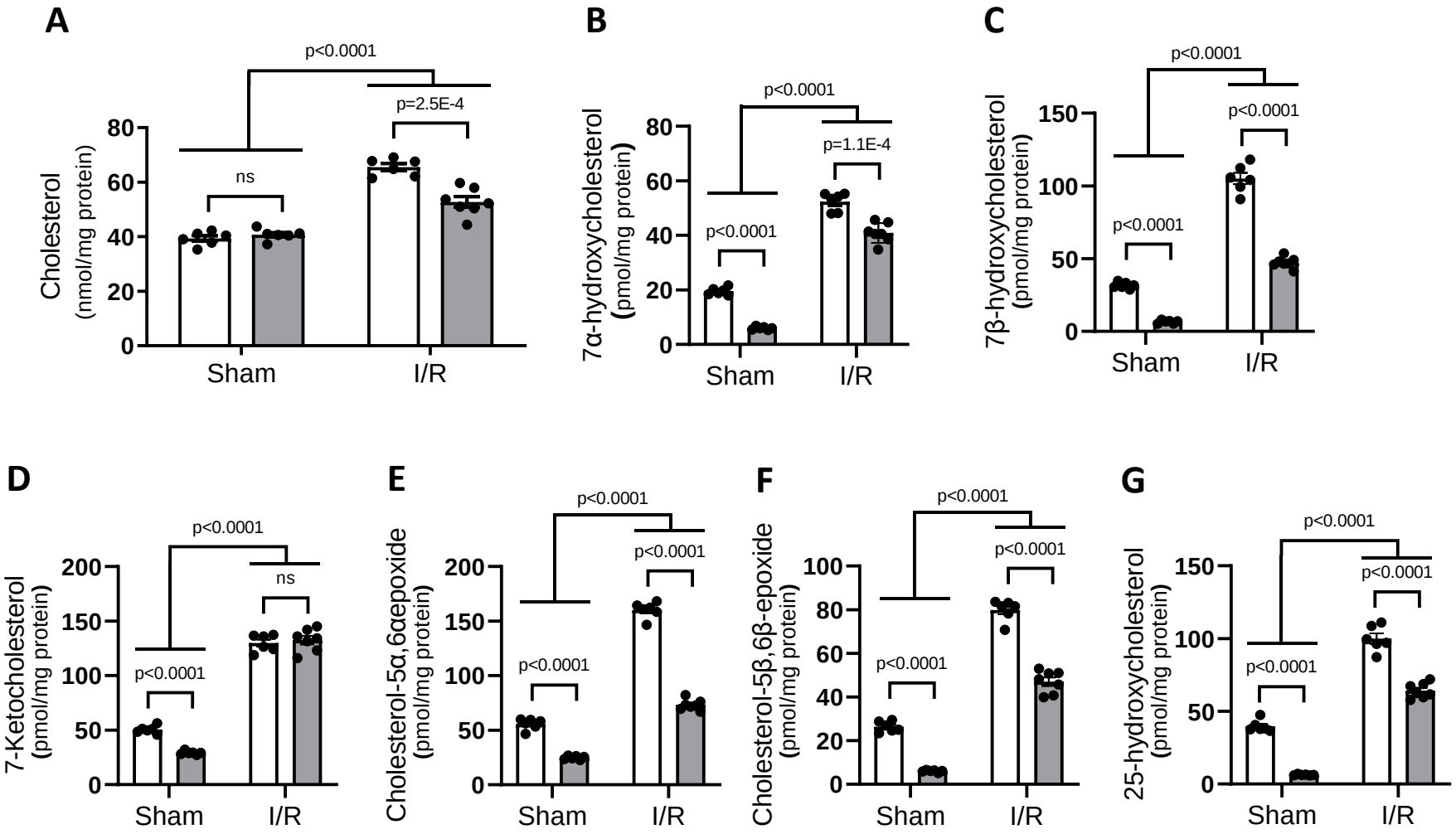


Fig. 4

Click here to access/download;Figure(s);Figure 5 CAR.pptx

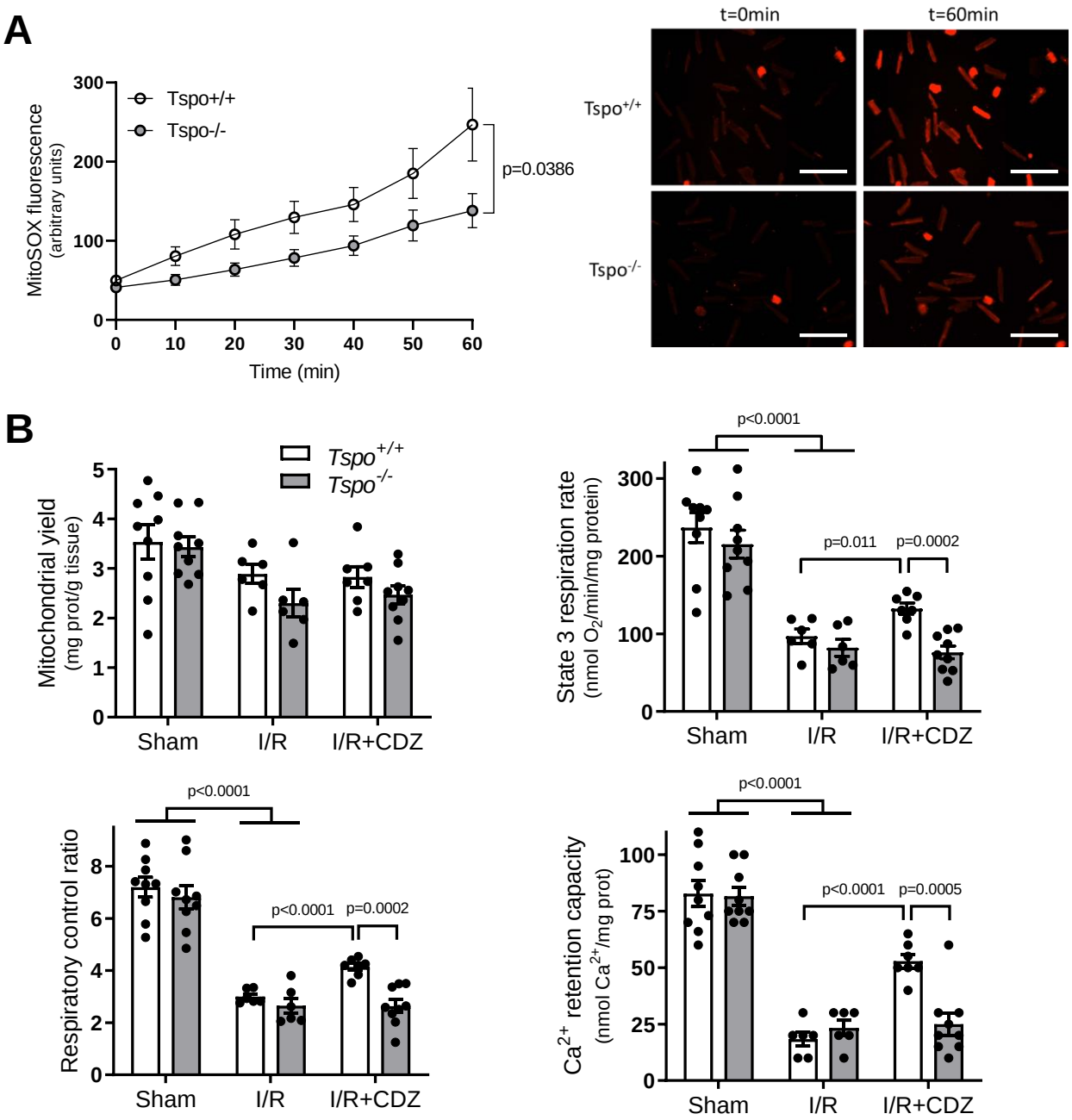


Fig. 5

Figure 6

Click here to access/download;Figure(s);Figure 6 CAR.pptx

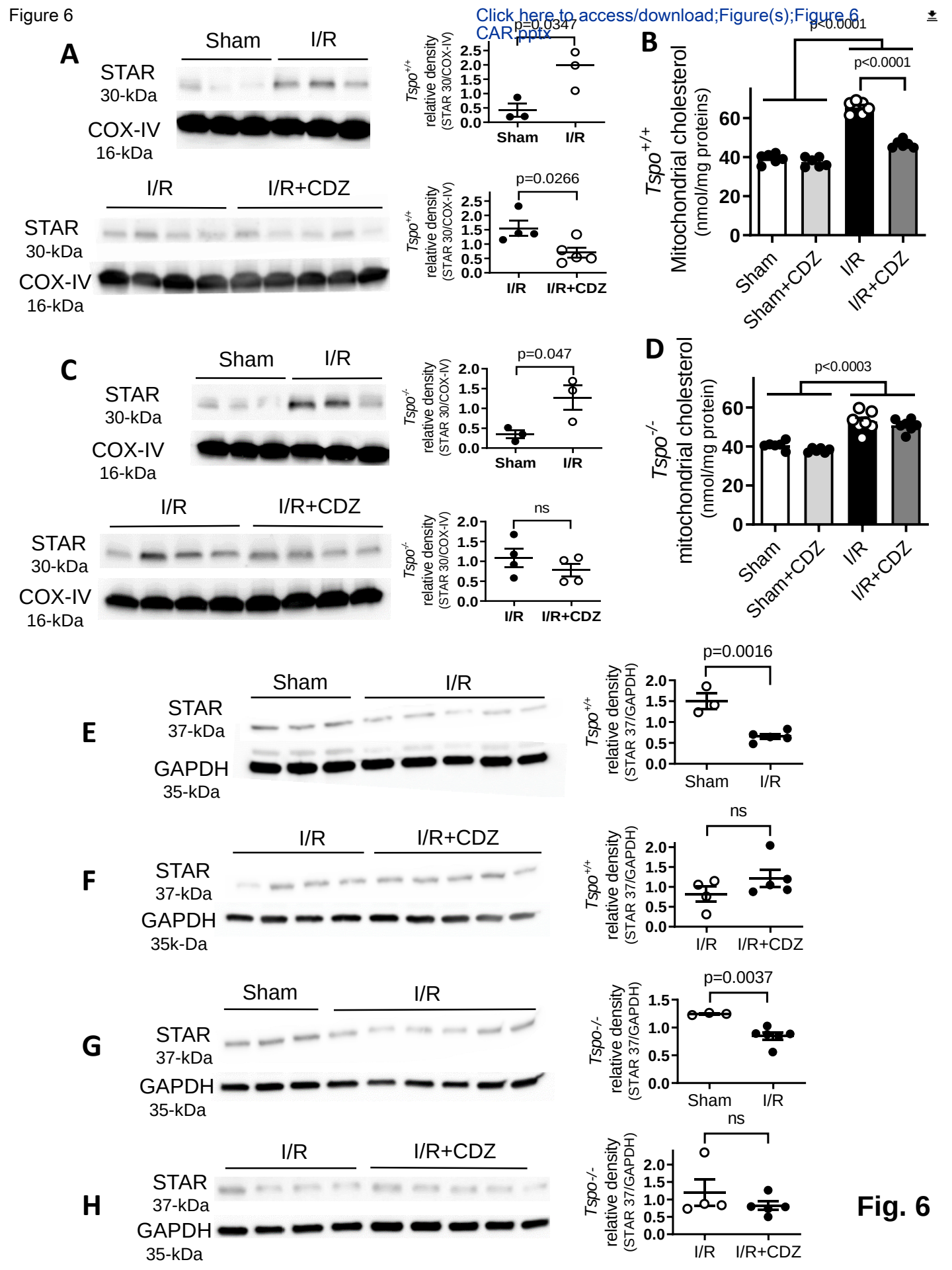


Fig. 6

Click here to access/download;Supplementary Material - Other;Supplementary Materials Cardiovasc res version

SUPPLEMENTARY DATA

Identification of a mechanism promoting mitochondrial sterol accumulation during myocardial ischemia-reperfusion: role of TSPO and STAR

Juliette Bréhat[1,#], Shirin Leick[1,#], Julien Musman[1], Jin Bo Su[1], Nicolas Eychenne[2], Frank Giton[1], Michael Rivard[3], Louis-Antoine Barel[3], Chiara Tropeano[4], Claudio Caccia[5], Valerio Leoni[4], Bijan Ghaleh[1], Sandrine Pons[1] and Didier Morin[1,*]

[1]Inserm U955-IMRB, team Ghaleh, UPEC, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Créteil, France.

[2]CHIV, Villeneuve-Saint-Georges, France

[3]UPEC, CNRS, ICMPE, UMR 7182, Thiais, France.

[4]Laboratory of Clinical Chemistry, Hospital Pio XI Desio, ASST-Brianza Department of Medicine and Surgery, University of Milano Bicocca, Monza, Italy

[5]Unit of Medical Genetics and Neurogenetics. Fondazione IRCCS – Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italy

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: Didier MORIN, PhD, INSERM U955, Team Ghaleh, Faculté de Santé, 8 rue du général Sarrail, 94000, Créteil, France, E-mail : didier.morin@inserm.fr.

Running title: TSPO, STAR and myocardial ischemia-reperfusion

Supplementary Table 1

Sterols	*Tspo*$^{+/+}$	*Tspo*$^{-/-}$
Cholesterol (nmol/mg prot)	2.69 ± 0.08	2.60 ± 0.11
7α-hydroxycholesterol (pmol/mg prot)	1.28 ± 0.05	1.30 ± 0.04
7β-hydroxycholesterol (pmol/mg prot)	1.29 ± 0.04	1.31 ± 0.01
7-ketocholesterol (pmol/mg prot)	6.30 ± 0.19	6.31 ± 0.29
cholesterol-5α,6α-epoxide (pmol/mg prot)	1.96 ± 0.15	4.76 ± 0.60‡
cholesterol-5β,6β-epoxide (pmol/mg prot)	0.97 ± 0.04	0.77 ± 0.03†
25-hydroxycholesterol (pmol/mg prot)	3.58 ± 0.14	4.11 ± 0.18*

Supplementary Table 1: Cardiac cytosolic concentrations of sterols in *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo*$^{-/-}$ rats.

Each value is the mean ± SEM of 6 independent preparations. Data were analyzed by an unpaired two-tailed t-test. *p=0.042, †p=0.0025 and ‡p=0.001 *vs* respective *Tspo*$^{+/+}$.

Legend supplementary Figures 1-4

Supplementary Fig. 1: *Tspo* deletion in Spague Dawley rats
A: Agarose gel image of the typical PCR products used for genotyping screening of rat with *Tspo* locus modification (*Tspo*$^{+/+}$, 362 bp; *Tspo*$^{+/-}$, two bands 362 and 273 bp; *Tspo*$^{-/-}$, 273 bp) and primers used for genotyping.
B: Representative immunohistochemical images of TSPO in myocardium showing the lack of TSPO *in Tspo*$^{-/-}$ rats of 2 month old. Magnification: 400x, scale-bar: 50 µm.
C: Immunoblot analysis of cardiac mitochondria extracted from *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo*$^{-/-}$ rats. Voltage-dependent anion channel (VDAC) was used as a loading control. Each value represents the mean ± SEM of 3 independent mitochondrial preparations. Statistical analysis was done using an unpaired two-tailed t-test.

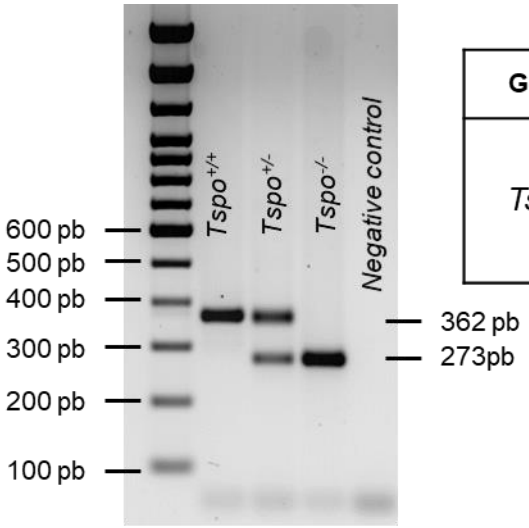
Supplementary Fig. 2: TSPO deletion does not alter rat cardiac phenotype during aging.
Cardiac parameters were evaluated at at 2-, 6- and 12-month-old rats.
A: Echocardiographic parameters: Left ventricular fractional shortening (LVFS), mitral E wave/A wave ratio (E/A ratio), left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), interventricular septum thickness in diastole (IVSd), Left Ventricular Posterior Wall thicknesses in Diastole (LVPWd). Each value is the mean ± SEM of at least 6 animals.
B: Indexes of ventricular hypertrophy in *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo*$^{-/-}$ rats.
Left: ventricular (LV) weight to body weight ratio. Each value is the mean ± SEM of at least 6 animals.
Right: cross sections of left ventricular were stained with FITC-conjugated WGA and cardiomyocyte surface in each section was quantified using Image J. Each value is the mean ± SEM of at least 6 animals, i.e., 1080 cells (6 ventricles, 6 sections by ventricle and 30 cells by section).
In all panels, statistical comparison between genotypes were done using a two-way ANOVA followed by an unpaired two-tailed t-test. No difference between genotypes was observed whatever the parameter.

Supplementary Fig. 3: Reproduction parameters (A) and evolution of body lengths (B), body weights (C) and circulating steroidogenic hormones (D) in *Tspo*$^{+/+}$ *and Tspo*$^{-/-}$ rats during aging.
B: each value is the mean ± SEM of 6-7 animals. **D**: values are means ± SEM, n=8 (*Tspo*$^{+/+}$) and n= 10 rats (*Tspo*$^{-/-}$). Statistical comparison between genotypes in panel B and D were done by a two-way ANOVA analysis followed by an unpaired two-tailed t-test. *p=0.049, †p= 0.032 and ‡p=0.028 *vs* respective *Tspo*$^{+/+}$.
Statistical analysis in panel C was done using a mixed effect analysis.

Supplementary Fig. 4: Glycemia, lipid blood levels and effect of metabolic stresses in *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo*$^{-/-}$ rats during aging.
A: glycemia and lipid blood levels in 2-, 6- and 12-month-old rats. Each value is the mean ± SEM, n=7-10 animals.
B: Insulin tolerance tests (ITT) performed in 2-, 6- and 12-month *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo*$^{-/-}$ rats. At t=0, fasting rats received 1 UI/kg insulin. Glycemia was measured for 2 hours and the areas over the curve (AOC) were calculated (bar graph). Each value is the mean ± SEM, n=7-9 animals.

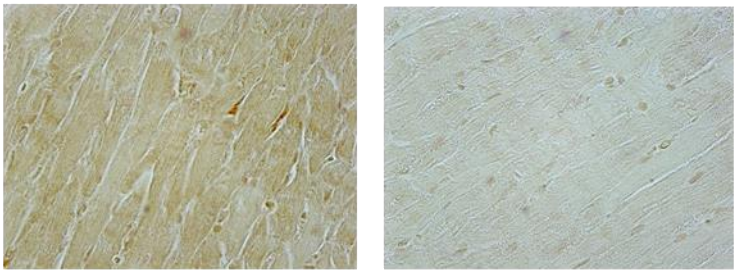
C: Glucose tolerance tests (GTT)) performed in 2-, 6- and 12-month *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo*$^{-/-}$ rats. At t=0, fasting rats received 1 g/kg D-glucose. Glycemia was measured for 2 hours and the areas under the curve (AUC) were calculated (bar graph). Each value is the mean ± SEM, n=8-12 animals. Statistical comparison between genotypes (A and bar graphs of B and C) were done by a two-way ANOVA analysis followed by an unpaired two-tailed t-test. No difference between genotypes was observed whatever the parameter.

Supplementary Fig. 1



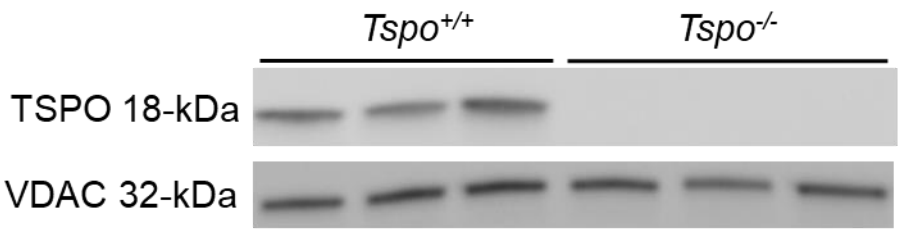
Gene	Primer name (reference)	Sequence (5' > 3')	Molecular weight	Melting temperature
Tspo	R5CKOZFN-R (6430489)	ACT-CCT-AAA-GGG-GTT-GCA-GG	6182,1 g/mol	62°C
	R5CKOZFN-F (6430488)	AGA-GCA-TAC-TCT-TGC-CGT-CG	6093,0 g/mol	62°C

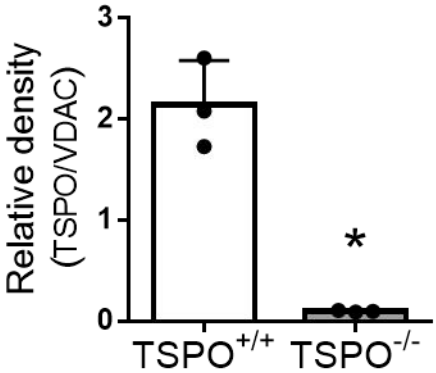
B



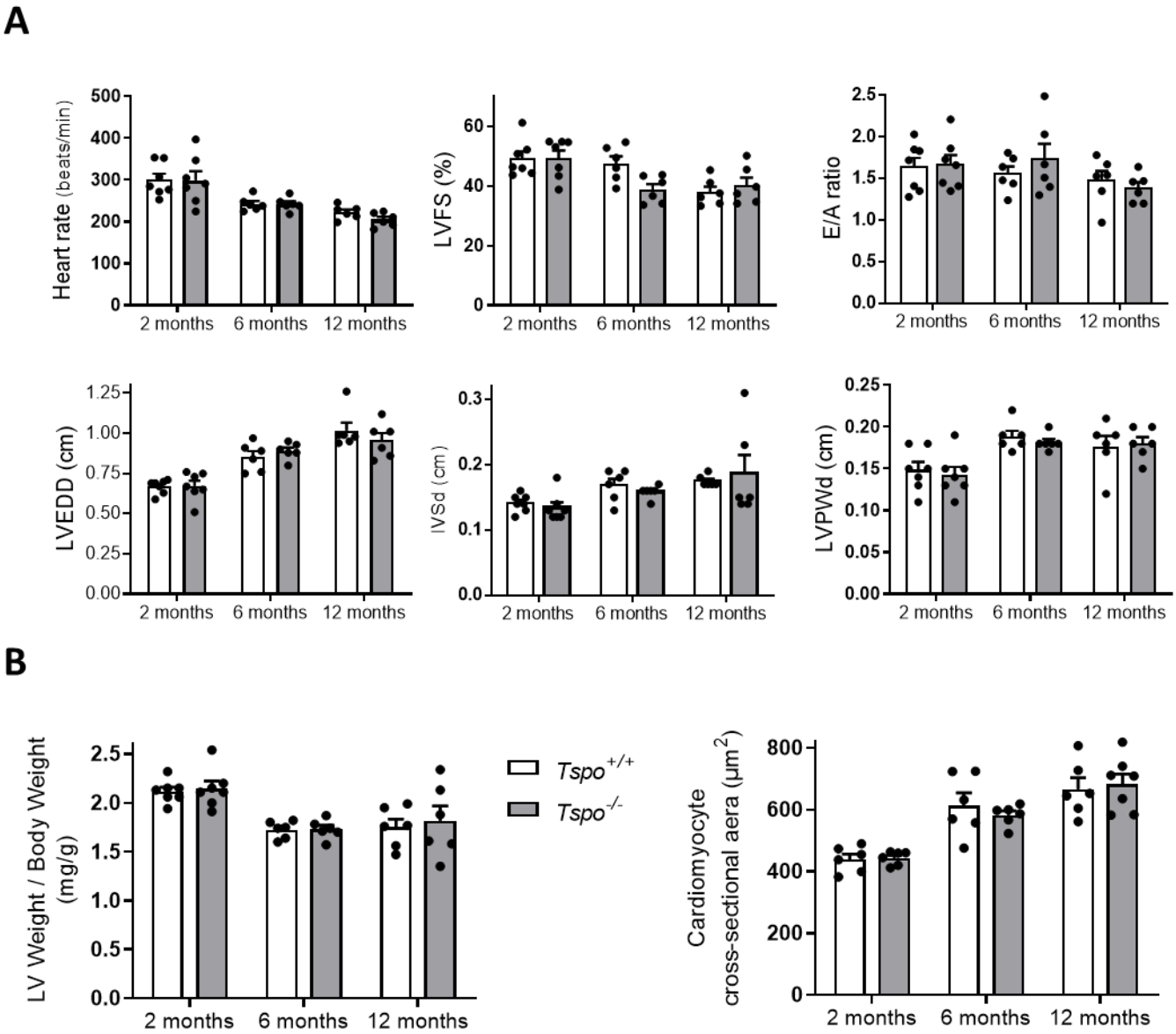
Tspo$^{+/+}$ *Tspo*$^{-/-}$

C





Supplementary Fig. 2

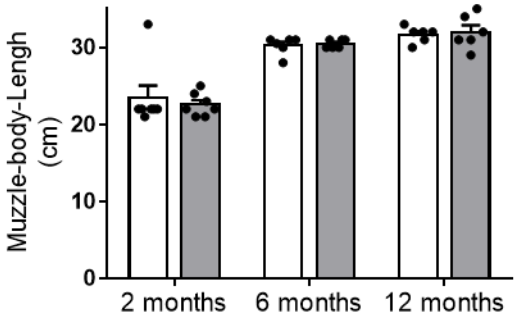


Supplementary Fig. 3

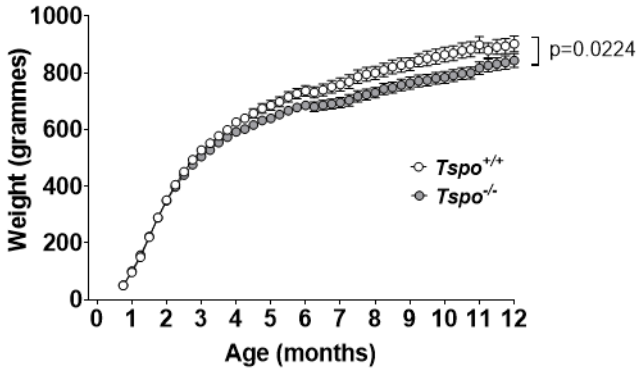
A

Coupling	Pups / litter	Sexe		Genotype			litters
		Female	Male	*Tspo*$^{+/+}$	*Tspo*$^{+/-}$	*Tspo*$^{-/-}$	
Homozygote *Tspo*$^{+/+}$	11±1	60%	40%	100%	x	x	18
Homozygote *Tspo*$^{-/-}$	12±1	55%	45%	x	x	100%	22
Heterozygote *Tspo*$^{+/-}$	10±1	51%	49%	27%	47%	25%	19

B



C



D

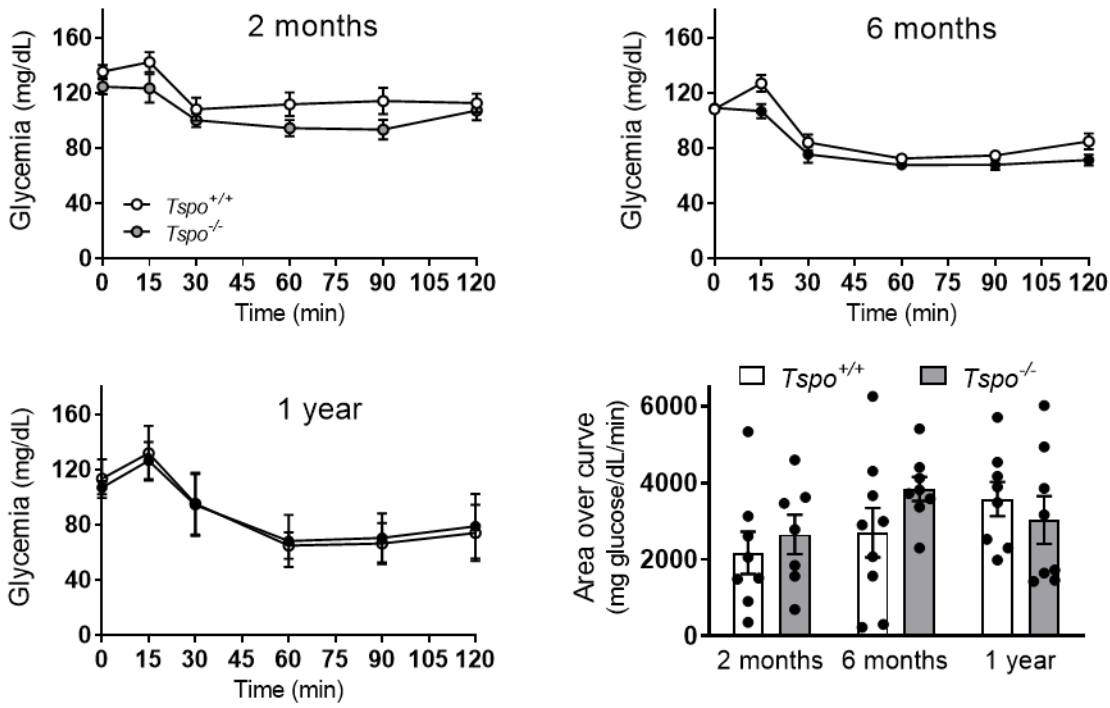
Steroid hormones (ng/ml)	2 months		6 months		12 months	
	Tspo$^{+/+}$	*Tspo*$^{-/-}$	*Tspo*$^{+/+}$	*Tspo*$^{-/-}$	*Tspo*$^{+/+}$	*Tspo*$^{-/-}$
Pregnenolone	0.26±0.02	0.28±0.02	0.51±0.05	0.59±0.05	1.16±0.12	1.21±0.13
Progesterone	0.180±0.009	0.177±0.006	0.210±0.005	0.212±0.004	0.55±0.03	0.52±0.02
Deoxycorticosterone	0.304±0.007	0.296±0.005	0.624±0.002	0.60±0.01	1.08±0.05	1.09±0.04
Corticosterone	98.4±2.70	98.8±1.59	130.0±3.81	133.3±2.75	146.6±2.44	142.9±3.68
Aldosterone	0.303±0.005	0.296±0.006	0.237±0.004	0.223±0.004	0.177±0.005	0.169±0.004
17OH-Progesterone	0.47±0.06	0.45±0.08	1.33±0.15	1.16±0.21	1.84±0.37	1.62±0.26
Cortisol	4.20±0.43	3.65±0.48	5.49±0.48	6.28±0.59	5.52±0.43	4.80±0.32
Dehydroepi-androsterone	0.55±0.07	0.54±0.11	0.56±0.05	0.62±0.04	0.88±0.08	0.76±0.06
D4-androstenedione	0.41±0.04	0.43±0.02	0.48±0.06	0.45±0.03	0.45±0.04	0.54±0.07
Testosterone	1.33±0.20	1.29±0.19	2.08±0.47	1.07±0.15	1.51±0.22	1.51±0.21
Dihydrotestosterone	0.043±0.016	0.026±0.008	0.068±0.020	0.025±0.006†	0.037±0.007	0.030±0.008
Oestradiol (x 10^{-3})	2.11±0.12	2.04±0.09	2.12±0.10	1.89±0.06*	1.67±0.08	1.42±0.07‡
Androsterone	0.060±0.005	0.058±0.006	0.056±0.005	0.042±0.002	0.052±0.003	0.048±0.004

Supplementary Fig. 4

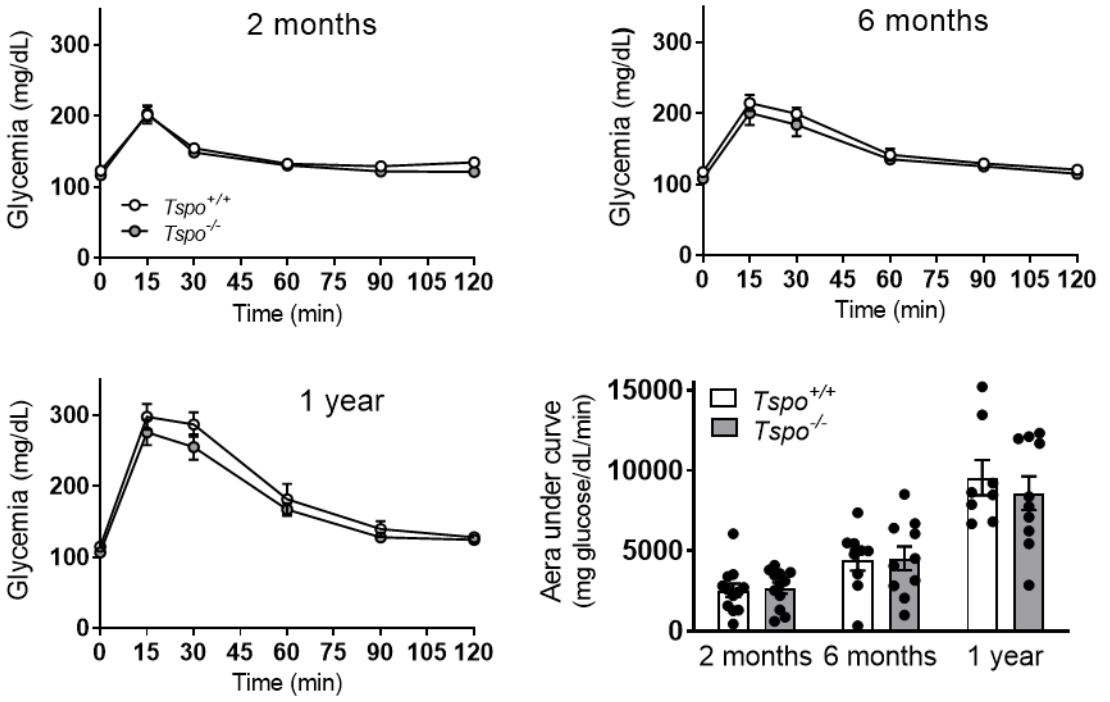
A

Age	Glycemia mg/dL		Cholesterol mmol/L		HDL mmol/L		Triglycerides mmol/L		Free Fatty Acid mmol/L	
months	*Tspo*$^{+/+}$	*Tspo*$^{-/-}$	*Tspo*$^{+/+}$	*Tspo*$^{-/-}$	*Tspo*$^{+/+}$	*Tspo*$^{-/-}$	*Tspo*$^{+/+}$	*Tspo*$^{-/-}$	*Tspo*$^{+/+}$	*Tspo*$^{-/-}$
2	127 ± 4	119 ± 3	2.49 ± 0.08	2.52 ± 0.11	1.44 ± 0.06	1.36 ± 0.06	2.43 ± 0.24	2.13 ± 0.12	1.00 ± 0.06	0.93 ± 0.04
6	107 ± 3	99 ± 1	3.08 ± 0.15	3.22 ± 0.12	1.63 ± 0.09	1.72 ± 0.07	2.53 ± 0.23	2.64 ± 0.23	0.99 ± 0.06	1.00 ± 0.05
12	110 ± 2	105 ± 3	3.46 ± 0.16	3.44 ± 0.13	1.85 ± 0.09	1.92 ± 0.06	2.11 ± 0.21	1.81 ± 0.10	1.06 ± 0.05	1.00 ± 0.03

B



C



SUPPLEMENTARY METHODS

Animals

All animal procedures used in this study were conformed to the Directives of the European Parliament (2010/63/EU-848 EEC). The experimental protocols were reviewed and approved (APAFIS13504#-201820130912402v3 and APAFIS#23908-2020012712028279 v4) by the local Ethic Committee Cometh (Afssa/ENVA/UPEC, N° 16).

Male Wistar and Sprague Dawley rats were used in this study. All animals were maintained under optimal environmental conditions (temperature 22-25°C and a constant cycle of 12-h light/dark) in the animal house of the faculty of Medicine of the University Paris-Est (approval number E94028028). Wistar rats were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). A couple of heterozygous global *Tspo* knock out Sprague Dawley rats (*Tspo*$^{+/-}$) has been kindly provided to us by Pr Papadopoulos (University of Southern California, USA). These Sprague Dawley rats carried out a 89bp deletion in the *Tspo* gene resulting in the absence of protein expression[1]. These animals were crossed to generate two colonies of wild type (*Tspo*$^{+/+}$) and homozygous *Tspo* deleted (*Tspo*$^{-/-}$) rats. For each litter number of pups, sex and genotypes were determined. All rats used in this study were PCR genotyped using specific primers (Supplementary Fig. 1A) and no TSPO immunoreactive protein was detected in myocardium (Supplementary Fig. 1B) and cardiac mitochondria (Supplementary Fig. 1C) of *Tspo*$^{-/-}$ rats.

In vivo coronary artery occlusion-reperfusion

Rats were subjected to 30 min of ischemia followed by 15 min of reperfusion. Rats were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) given intraperitoneally. The depth of anesthesia was monitored using the tail pinching response and the pedal reflex. Once anesthetized, rats were placed on a warming pad to maintain body temperature at 37°C (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard Apparatus Inc). Then, the animals were intubated using an endotracheal tube and artificially ventilated with a rodent ventilator model VentElite (respiratory rate, 63/min; respiratory volume, 2.20 mL; Harvard Apparatus Inc) with a mixture of carbogen (95% O_2, 5% CO_2).

A left thoracotomy in the fourth intercostal space was performed, followed by pericardectomy, using a surgical microscope. A surgical needle with a 5–0 Prolene thread was passed around the left coronary artery, and the ends of the suture were

passed through a polypropylene tube to form a snare. Tightening the snare induced coronary artery occlusion and its release initiated reperfusion for 15 min. This reperfusion duration was chosen because mPTP opening was shown to occur within the first minutes of reperfusion[2]. In parallel, sham animals were subjected to same surgical procedure but the coronary artery was not occluded.

4'-Chlorodiazepam (10 mg/kg) or its vehicle (dimethylsulfoxide) were administered intravenously through the jugular vein. In the ischemia-reperfused group, 4'-chlorodiazepam were injected 10 min before reperfusion during a 5 min infusion. For the sham group, the drugs were administered 25 min before heart excision.

Pravastatin (10mg/kg) was given by gavage three days before surgery. The molecule was dissolved in the drinking water at a concentration of 10mg/mL and administered orally at 10mg/kg per day. Animals underwent surgical procedures 24 hours after the last administration.

At the end of 15 minutes of reperfusion, the left ventricular area at risk of ischemia-reperfused rats or the left ventricle for sham rats were used to prepare mitochondria and cytosols.

Measurement of mitochondrial oxygen consumption

Oxygen consumption was measured with a Clark-type electrode (Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK). Mitochondria (0.4 mg /mL) were incubated in a respiration buffer (100 mM KCl, 50 mM sucrose, 10 mM HEPES and 5 mM KH_2PO_4, pH 7.4 at 30°C). Respiration was initiated by addition of 2.5 mM pyruvate/malate. After 1 min, ATP synthesis was induced by addition of 1 mM ADP (ADP-stimulation respiration rate). ADP uptake was then inhibited by adding 1 µM carboxyatractyloside (substrate-dependent respiration rate). The respiratory control ratio (ADP-stimulation / substrate-dependent respiration rate) was then calculated.

Evaluation of mitochondrial permeability transition pore opening

mPTP opening was assessed by monitoring mitochondrial calcium retention capacity. Rat cardiac mitochondria were loaded with increasing concentrations of calcium until the load reached a threshold at which mitochondria underwent a fast process of calcium release, which was due to mPTP opening. Mitochondria (1 mg/mL), energized with 5 mM pyruvate/malate, were incubated in the respiration buffer supplemented with 1 mM Calcium Green-5N fluorescent probe (C3737, Invitrogen, Eugene, OR, USA). The concentration of calcium in the extramitochondrial medium was monitored by

means of a Jasco FP-6300 spectrofluorimeter (Jasco, Bouguenais, France) at excitation and emission wavelengths of 506 and 532 nm, respectively. The calcium signal was calibrated by addition to the medium of known calcium amounts.

Isolation of primary adult rat cardiomyocytes

Left ventricular cardiomyocytes were isolated from *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo*$^{-/-}$ rats by an enzymatic technique. The heart was retrogradely perfused for 15 min at 37°C with a stock perfusion buffer bubbled with 95%O_2/5%CO_2 containing 133 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 0.6 mM KH_2PO_4, 0.6 mM Na_2HPO_4, 1.2 mM $MgSO_4$, 12 mM $NaHCO_3$, 10 mM $KHCO_3$, 10 mM HEPES, 30 mM taurine, 0.032 mM phenol red, 5.5 mM glucose, 10 mM 2,3butanedionemonoxime pH 7.4 to wash out blood. After 2 min of perfusion, liberase (Blendzyme 10 mg/100 ml, Roche Applied Science, Mannheim, Germany), trypsin EDTA (14 mg/100 ml) and 12.5 µM Ca^{2+} were added to the buffer and the heart was perfused for approximately 13-15 min. The heart was placed into a beaker in the same buffer containing 10% bovine serum albumin pH 7.4 at 37°C to stop the digestion. Left ventricles were then cut into small fragments and cells isolated by stirring the tissue and successive aspirations of the fragments through a 10 ml pipette. After 10 min the supernatant was removed and the remaining tissue fragments were re-exposed to 10 ml of the same buffer. Then, the cells were suspended in the same buffer and Ca^{2+} was gradually added from 12.5 µM to 1 mM into an incubator at 37°C. Finally, the cardiomyocytes were suspended in culture medium M199 supplemented with 0.1% insulin-transferine-selenium. They were seeded on 35 mm Petri dishes pre-coated with 10 µg/ml sterilized laminin and incubated for 90 min before being used.

Evaluation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production in living cardiomyocytes

Assessment of mitochondrial superoxide production in cardiomyocytes was performed using MitoSOX™ Red fluorescent probe which targets mitochondria and is oxidized by superoxide anion. Cells were washed with a Tyrode's buffer (in mM: NaCl 130; KCl 5; HEPES 10; $MgCl_2$ 1; $CaCl_2$ 1.8, glucose 5.6, pH 7.4 at 37 °C), loaded with 1 µM MitoSOX™ (30 min at 37°C) and then washed two times with the Tyrode solution.

The cardiomyocytes were placed into a thermostated (37°C) chamber (Warner Instruments, Hamden, CT), which was mounted on the stage of a IX-81 Olympus microscope and were paced to beat by field stimulation (5 ms, 0.5 Hz).

Cardiomyocytes were imaged with the Olympus IX-81 motorized inverted microscope equipped with a mercury lamp as a source of light for epifluorescence illumination and with a cooled camera (Hamamatsu ORCA-ER). MitoSOX™ Red fluorescence were excited at 520-550 nm and recorded at 580 nm. Images were acquired every 10 min from 0 to 60 min and analyzed using a digital epifluorescence imaging software (XCellence, Olympus, Rungis, France). Fluorescence was integrated over a region of interest (≈80 µm2) for each cardiomyocyte and a fluorescence background corresponding to an area without cells was subtracted. The global response was analyzed by averaging the fluorescence changes obtained from all the cardiomyocytes contained in a single field (20-30 cells).

Blood sample analysis

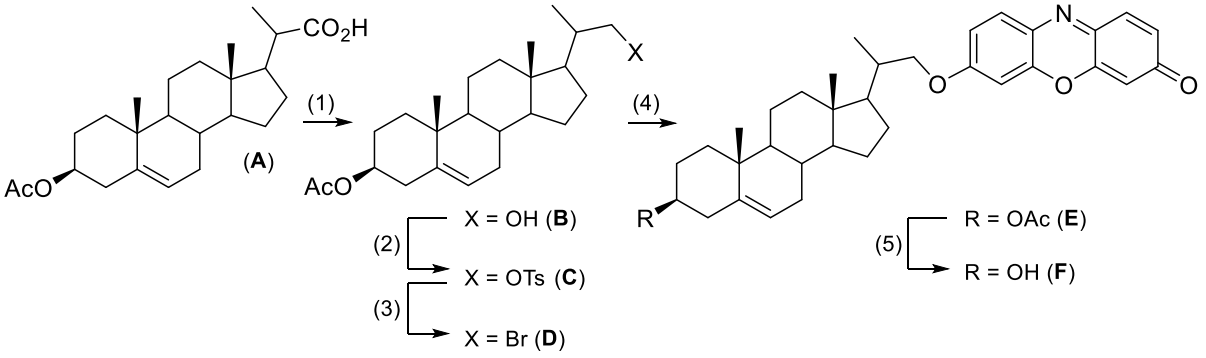
Blood was collected from 2, 6, and 12 months *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo*$^{-/-}$ rats. Rats were anesthetized with isoflurane (0.2 L/min O_2, 2.5% isoflurane) and blood were collected from the jugular vein. Serum lipid profile (total cholesterol, glycemia, LDL, HDL, VLDL, free fatty acid, triglycerids) was performed with an automaton (Olympus AU 400) by Bichat Hospital's Biochemistry plateform. Serum steroid hormones were measured with GC/MS by the mass spectrometry plateform. Serum oxysterols measurements was carried with GC/MS.

Metabolic tests

Metabolic tests were carried out according to Pitasi *et al*[3]. Insuline tolerance tests (ITT) were performed in 2, 6 and 12 months *Tspo*$^{+/+}$ and *Tspo*$^{-/-}$ rats. One week later, glucose tolerance tests (GTT) were performed in the same rats. After 6 hours of fasting, rats received an intraperitoneal injection of insuline (1 UI/kg, 3% BSA in saline solution) or D-glucose (1 g/kg in saline). Glycemia (fasting, 15, 30, 60, 90, 120 min after the injection) were measured with a hand-held glucometer (Accu-Chek Performa, Roche, France) throught blood collected from tail vein. The area under the curve (AUC) were calculated using Graphpad Prism. The AUC values for the GTT were normalized as follows: AUC = AUCtotal - (fasting glycemia * 120). The Area over curve (AOC) for the ITT were calculated as follows : AOC = (fasting glycemia * 120) - AUCtotal.

Synthesis of the cholesterol-resorufin probe

Cholesterol-resorufin probe (**F**) was prepared from 3β-acetoxy-22,23-bisnor-5-cholenic acid (**A**) according to a modified version of the procedure initially described[4]. This synthesis includes five steps as follows (following figure):



(1) (a) oxalyl chloride, RT, tetrahydrofuran; (b) $LiAlH(OtBu)_3$, -60 °C, tetrahydrofuran, quantitative.
(2) tosyl chloride, triethylamine, 4-(dimethylamino)pyridine, 50 °C, dichloromethane, 50%.
(3) LiBr, 60 °C, *N,N*-dimethylformamide, quantitative.
(4) resorufin, K_2CO_3, 50 °C, *N,N*-dimethylformamide, 65%.
(5) $LiAlH_4$, 0 °C, tetrahydrofuran, 45%.

(1) <u>Preparation of alcohol (**B**)</u>: to a stirred solution of acid (**A**) (1 g, 2.57 mmol) in anhydrous dichloromethane, was added oxalyl chloride (1.5 equiv, 325 microL) dropwise at 0 °C. After 2 h at room temperature, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the resulting solid dissolved in anhydrous tetrahydrofuran under argon. To this solution, lithium tri-t-butoxy aluminum hydride ($LiAlH(OtBu)_3$ (2.7 equivalent, prepared from lithium aluminium hydride ($LiAlH_4$, 624 mg, 7 mmol) and tert-butanol (1.54 g, 20.8 mmol) in tetrahydrofuran) was added dropwise and under stirring at -60 °C. The mixture was kept at -60 °C for 2.5 h. After dilution with diethyl ether, an aqueous solution of concentrated NaOH was added dropwise to precipitate the aluminum salts. After filtration over a celite pad, the organic phase was washed with HCl (1N), with brine and dried over $MgSO_4$. The NMR analysis confirmed the complete conversion of the acid (**A**) into the alcohol (**B**), which was used without further purification. Alcohol (**B**) was obtained as a white powder (950 mg, quantitative).

(2) <u>Preparation of tosylate (**C**)</u>: to a stirred solution of (**B**) (893 mg, 2.38 mmol) in anhydrous dichloromethane were successively added 4-toluenesulfonyl chloride (2 equiv, 910 mg), triethylamine (4.2 equiv, 1.39 mL) and 4-(dimethylamino)pyridine (5%, 14 mg). The mixture was refluxed for 15 h, then successively diluted with dichloromethane, washed with HCl (1 N), dried over $MgSO_4$ and concentrated under

reduced pressure. After purification by chromatography on silica gel (cyclohexane/ethyl acetate, 90:10), the tosylate (**C**) was obtained as a white powder (629 mg, 50%).

(3) Preparation of brominated compound (**D**): to a stirred solution of (**C**) (629 mg, 1.19 mmol) in anhydrous *N*,*N*-dimethylformamide (3.2 mL) was added LiBr (3 equiv, 310 mg), and the resulting mixture was heated at 60 °C for 15 h. After dilution with H_2O, the aqueous phase was extracted with cyclohexane. Brominated compound (**D**) was obtained as a white powder (515 mg, quantitative).

(4) Preparation of ether (**E**): to a stirred solution of (**D**) (160 mg, 0.36 mmol) in anhydrous *N*,*N*-dimethylformamide (3 mL), were successively added resorufin (1.3 equiv, 101 mg) and K_2CO_3 (2 equivalents, 100 mg). The resulting mixture was heated at 50 °C for 6 days under Ar. After dilution with H_2O, the aqueous phase was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with K_2CO_3 and dried over $MgSO_4$. After purification by chromatography on silica gel (cyclohexane/ethyl acetate, 70:30), the ether (**E**) was obtained as an orange solid (135 mg, 65%).

(5) Preparation of cholesterol-resorufin probe (**F**): to a stirred solution of (**E**) (101 mg, 0.18 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran at 0 °C, was added $LiAlH_4$ (1.5 equiv, 10 mg). The mixture was let to react for 15 min at 0 °C and hydrolyzed with HCl (1N). The mixture was extracted with dichloromethane and the organic layers were dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. After purification by chromatography on silica gel (cyclohexane/ethyl acetate/triethylamine, 80:20:1%), the probe (**F**) was obtained as a red solid (42 mg, 45%).

Evaluation of CYP11A1 activity

CYP11A1 activity was measured in rat ventricular and testicular mitochondrial fractions as the ketokonazole inhibitable resorufine release induced by the enzyme according to a modified procedure described previously[5]. Mitochondria were broken by 3 successive freeze-thaw cycles and were incubated at two concentrations 0.5 and 1 mg/ml in a buffer including 250 mM sucrose, 10 mM phosphate buffer, 15 mM triethanolamine-HCl, 20 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 µM trilostane (pH=7 at 30°C). The reaction was then initiated by the successive addition of 5 µM cholesterol-resorufin and 500 µM NADPH. CYP11A1 activity was monitored over time by monitoring the release of resorufin, which was followed by measuring the increase in fluorescence using a

fluorescence spectrometer (Jasco FP-6300, excitation wavelength 530 nm; emission wavelength 595 nm). Ketokonazole (20 M) was added to evaluate the release of resorufin specifically related to CYP11A1 activity.

Immunohistochemistry

Formalin-fixed rat left ventricles were embedded in paraffin and cross-sections (5 µm thickness) were performed using a rotary microtome. Briefly, after rehydratation, antigen retrieval was performed with heated citrate buffer. After endogenous peroxidase antigen blocking (H_2O_2 3% 15 min) followed by antigen blocking (1 hour 30% goat serum), sections were incubated with primary antibodies (TSPO, goat ab154878 1:180 - overnight at 4 °C). The following day sections were washed and incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Abcam; ab97051 1:200) for 30 minutes at room temperature. The sections were washed again and incubated with 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Vector Laboratories) under visual observation until the signal appears. The reaction was stopped by immersing slides in water. Images were acquired using an inverted optical microscope (Axioplan 2, Zeiss) at x400 magnification.

Determination of cholesterol and oxysterol levels

Sterol and oxysterol measurements were performed on cytosolic and mitochondrial extracts. To a screw-capped vial sealed with a Teflon septum, mitochondrial or cytosolic samples were added together with 50 ng of D7-7α-hydroxycholesterol, D7-7β-hydroxycholesterol, D7-7ketocholesterol, D6-cholesterol-5α,6α-epoxide, D6-cholesterol-5β,6β-epoxide and D6-27-hydroxycholesterol as internal standards, 50 µl of butylated hydroxytoluene (5 g/L) and 50 µl of K3-EDTA (10 g/L) to prevent auto oxidation. Each vial was flushed with argon for 20 min to remove air. Alkaline hydrolysis was allowed to proceed at room temperature (22°C) with magnetic stirring for 30 minutes in the presence of ethanolic 1M potassium hydroxide solution. After hydrolysis, the sterols were extracted twice with 5 ml cyclohexane and oxysterols were eluted on SPE cartridge by isopropanol:hexane 30:70 v/v. The organic solvents were evaporated under a gentle stream of argon and converted into trimethylsilyl ethers with BSTFA.

Analysis was performed by gas chromatography – isotope dilution mass spectrometry (GC-MS) with a B-XLB column (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm film thick-ness, J&W Scientific Alltech, Folsom, CA, USA.) in a HP 6890 Network GC system (Agilent Technologies, USA) connected with a direct capillary inlet system to a quadruple mass selective detector HP5975B inert MSD (Agilent Technologies, USA). GC system was

equipped with a HP 7687 series autosamplers and HP 7683 series injectors (Agilent Technologies, USA). The oven temperature program was as follows: initial temperature of 180 °C was held for 1 min, followed by a linear ramp of 20 °C/min to 270 °C, and then a linear ramp of 5 °C/min to 290 °C, which was held for 10 min. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1 mL/min and 1 µL of sample was injected in splitless mode.

Injection was carried at 250 °C with a flow rate of 20 ml/min. Transfer line temperature was 290 °C. Filament temperature was set at 150 °C and quadrupole temperature at 220 °C according with the manufacturer indication. Mass spectrometric data were acquired in selected ion monitoring mode

(OTMSi-ethers) at m/z = 463 (M+-90) for 7β-hydroxycholesterol-d7, m/z = 456 (M+-90) for 7β-hydroxycholesterol, m/z = 479 (M+-90) for 7-ketocholesterol-d7, m/z = 472 (M+-90) for 7-ketocholesterol, m/z = 462 (M+-90) for 27-hydroxycholesterol-d6 and m/z = 456 (M+-90) for 27-hydroxycholesterol, m/z = 481 for 5α,6α-epoxycholestanol-d7, m/z = 474 for 5α,6α-epoxycholestanol, m/z = 481 for 5ß,6ß-epoxycholestanol-d7, m/Z 474 for 5ß,6ß-epoxycholestanol. Peak integration was performed manually, and oxysterols were quantified from selected-ion monitoring analysis against internal standards using standard curves for the listed sterols[6].

Evaluation of cardiac hypertrophy

To assess cardiac hypertrophy, formalin-fixed rat left ventricles were embedded in paraffin and cross-sections (5 µm thickness) were performed using a rotary microtome. sections were rehydrated and incubated for 45 minutes at room temperature with 10 µg/mL Alexa488-conjugated wheat germ agglutinin (WGA; Invitrogen). Slides were then mounted using glycerol and containing 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Images were acquired using an inverted fluorescent microscope at x200 magnification (AxioImager M2, Zeiss) and analyzed with the Image J software. Cardiac hypertrophy was also assessed by measuring the ratio between the weight of the left ventricle and the body weight of the animals.

Echocardiography

Rats were lightly anesthetized with ketamine (60 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg), given intraperitoneally, before echocardiography protocol. A 10 MHz ultrasound probe was used with a digital ultrasound system (Vivid 7, GE Medical Systems, Little Chalfont, UK). A trained operator performed echocardiograms and analyzes.

The left ventricular (LV) end-diastolic diameter (LVEDD), as the thickness of the interventricular septum (IVSd), and posterior wall (LVPWd) in the end-diastole were determined on M-mode echocardiography in parasternal short-axis view at the level of papillary muscles. Transmitral flow velocities (E and A velocities and their ratio) were measured by pulse wave Doppler in the apical 4-chamber view.

LV fractional shortening (LV FS) was calculated as (LVEDD-LVESD)/LVEDD x 100, LVESD is LV end-systolic diameter. Heart rate (HR) was measured between two diastolic cycles on the M-mode image obtained in parasternal short-axis view at the level of papillary muscles.

References

1. Owen DR, Fan J, Campioli E, Venugopal S, Midzak A, Daly E, Harlay A, Issop L, Libri V, Kalogiannopoulou D, Oliver E et al. TSPO mutations in rats and a human polymorphism impair the rate of steroid synthesis. Biochem J. 2017;474:3985-3999.

2. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. Biochem J. 1995;307:939-8.

3. Pitasi CL, Liu J, Gausserès B, Pommier G, Delangre E, Armanet M, Cattan P, Mégarbane B, Hanak AS, Maouche K et al. Implication of glycogen synthase kinase 3 in diabetes-associated islet inflammation. J Endocrinol. 2020;244:133-148.

4. Simpson DJ, Unkefer CJ, Whaley TW, Marrone BL. A Mechanism-Based Fluorogenic Probe for the Cytochrome P-450 Cholesterol Side Chain Cleavage Enzyme. J Org Chem. 1991;56: 5391-5396.

5. Rone MB, Midzak AS, Issop L, Rammouz G, Jagannathan S, Fan J, Ye X, Blonder J, Veenstra T, Papadopoulos V. Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones. Mol Endocrinol. 2012;26:1868-1882.

6. Civra A, Leoni V, Caccia C, Sottemano S, Tonetto P, Coscia A, Peila C, Moro GE, Gaglioti P, Bertino E, Poli G, Lembo D. Antiviral oxysterols are present in human milk at diverse stages of lactation. J Steroid Biochem Mol Biol. 2019;193:105424.

1.4. Résultats complémentaires : caractérisation du modèle de rats délétés pour *Tspo*

Lors de la soumission du manuscrit, nous disposions de tous les paramètres sur les rats âgés de 2, 6 et 12 mois mais la caractérisation était en cours sur des rats de 18 mois. Ces résultats complémentaires sont présentés dans cette partie. Dans le cadre de la caractérisation du modèle de rats délétés pour *Tspo*, d'autres paramètres ont été évalués. Ces derniers permettent de compléter la caractérisation en prenant en compte les différentes fonctions attribuées à TSPO et les différents rôles du cholestérol dans l'organisme.

1.4.1. La délétion de *Tspo* n'altère pas la protéine STAR au niveau cardiaque

Chez les rats *Tspo*$^{-/-}$, on constate l'absence d'altération de l'expression génique, de la quantité cytosolique et de l'activation mitochondriale de la protéine STAR (Figure 32).

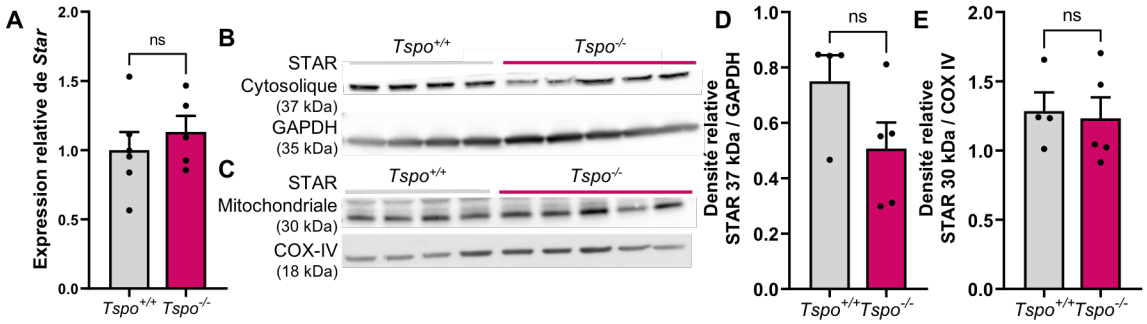


Figure 32 : Effet de la délétion de *Tspo* sur la protéine STAR au niveau cardiaque.
A. L'expression génique de *Star* a été évaluée dans des ventricules gauches de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ par RT-qPCR avec *Tbp* comme gène de ménage. **B et C.** La protéine STAR a été quantifiée par Western Blot au niveau cytosolique (37 kDa) et mitochondrial (30 kDa) de ventricules gauches de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$. **D et E.** Quantification des Western Blots. La GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) a servi de témoin de charge pour STAR cytosolique et la COX-IV (sous-unité 4 de la cytochrome C oxydase) pour STAR mitochondriale. Chaque valeur est la moyenne de 4 à 5 préparations issues d'animaux différents. La normalité de la distribution a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk puis un test t a été réalisé. *ns : non significatif.*

1.4.2. La délétion de *Tspo* n'altère pas le phénotype cardiaque au cours du vieillissement

En complément de la Figure 2 des suppléments du manuscrit qui présente les résultats d'échographies cardiaques et d'hypertrophie de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 2, 6 et 12 mois, la Figure 33A-B présente ces mêmes paramètres chez des rats âgés de 18 mois qui confirment l'absence d'effet de la délétion de *Tspo* sur ces paramètres.

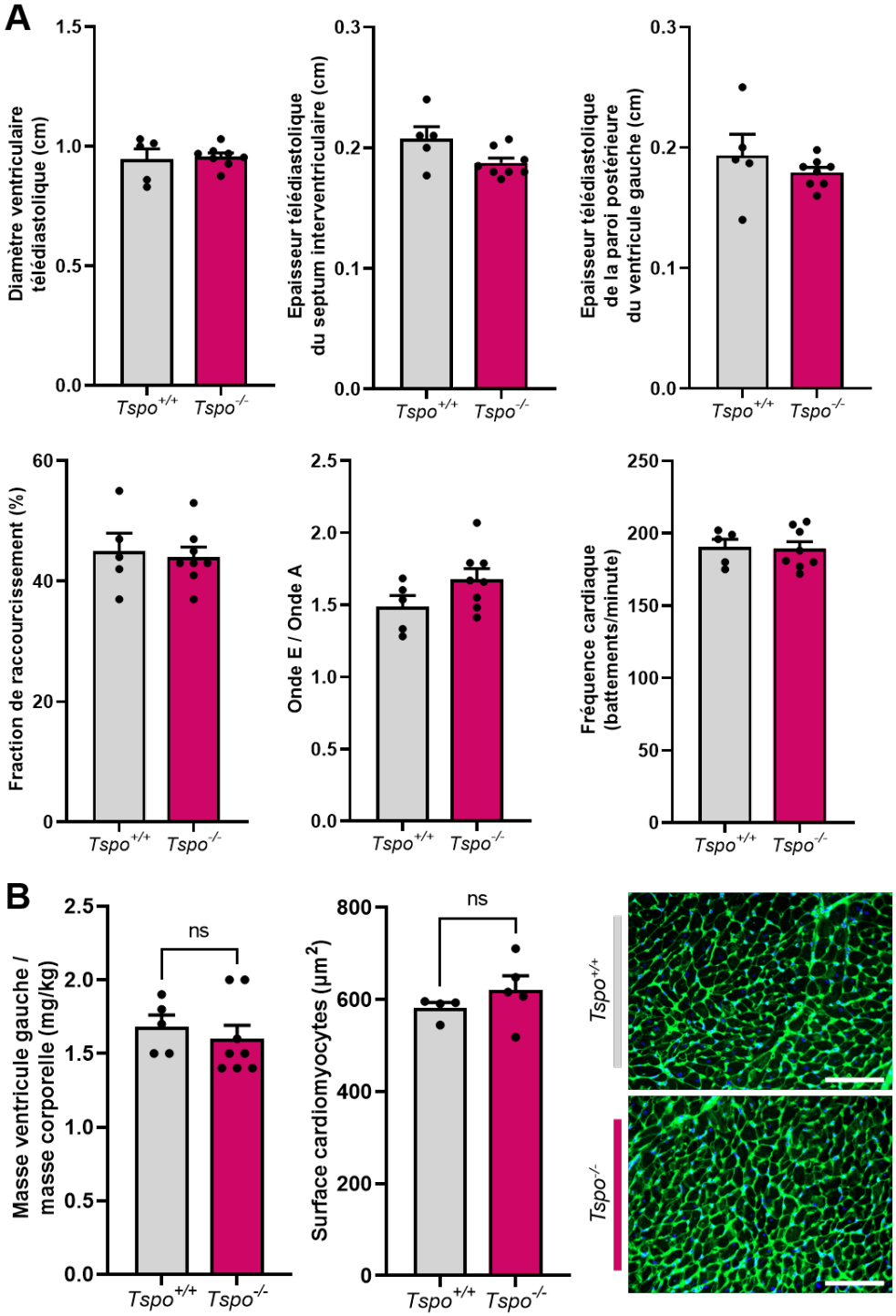


Figure 33 : Effet de la délétion de *Tspo* sur le phénotype cardiaque chez des rats âgés.
A. Paramètres échographiques de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 18 mois. Chaque valeur est la moyenne de mesures réalisées sur 5 à 8 animaux différents. **B.** Indices d'hypertrophie. Gauche : rapport masse du ventricule gauche / masse corporelle. Chaque valeur est la moyenne de mesures réalisées sur 5 à 8 animaux différents. Centre et droite : quantification et images représentatives de microscopie à fluorescence (Zeiss AxioPlan, grossissement x200, échelle : 100 µm) de la surface moyenne des cardiomyocytes ventriculaires gauches de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 18 mois. Les membranes sont en vert (WGA) et les noyaux en bleu (DAPI). Chaque valeur est la moyenne de mesures réalisées en décaplat sur 4 à 5 animaux différents. Un modèle mixte avec un post test de Bonferonni a été réalisé. *ns : non significatif.*

La caractérisation cardiaque a été complétée par une analyse de la fibrose interstitielle : des coupes de ventricules gauches de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 2, 6, 12 et 18 mois ont été colorées au rouge Sirius. En accord avec les résultats précédents, la délétion de *Tspo* n'induit pas de modification de la fibrose cardiaque chez les rats jeunes ni au cours du vieillissement (Figure 34).

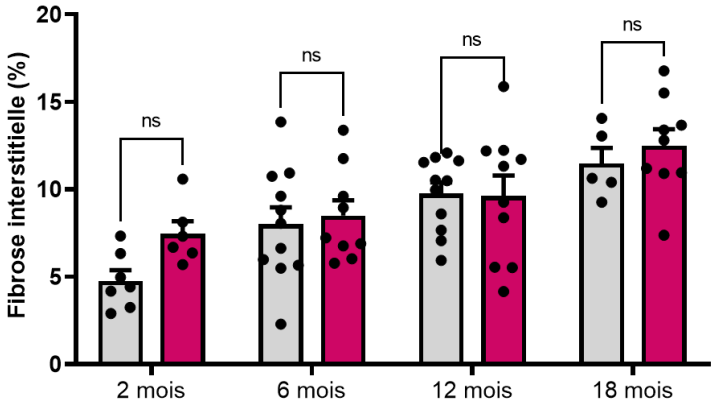


Figure 34 : Effet de la délétion de *Tspo* sur la fibrose interstitielle cardiaque au cours du vieillissement.
Quantification de la fibrose interstitielle ventriculaire gauche de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 2, 6, 12 et 18 mois. Les fibres de collagène ont été colorées avec du rouge sirius. Chaque valeur est la moyenne de mesures réalisées en décaplat sur 5 à 11 animaux différents. Un modèle mixte avec un post test de Bonferonni a été réalisé. *ns : non significatif.*

1.4.3. Effet de la délétion de *Tspo* sur la morphologie au cours du vieillissement

En complément de la Figure 3 des suppléments du manuscrit qui présente la longueur et la masse corporelles des rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 2, 6 et 12 mois, la Figure 35A-B présente ces mêmes paramètres chez des rats âgés de 18 mois. La longueur corporelle reste comparable entre les deux groupes et la masse corporelle des rats *Tspo*$^{-/-}$ reste significativement inférieure à celle des rats *Tspo*$^{+/+}$ à 18 mois. En plus de ces mesures, l'évaluation de la prise alimentaire au cours du vieillissement a été réalisée. La consommation de nourriture des rats a fortement diminué entre 2 mois et 6 mois et s'est stabilisée jusqu'à 18 mois : les rats à 2 mois sont encore en pleine croissance tandis qu'à 6 mois ils ont atteint leur taille définitive (Figure 3 des suppléments du manuscrit). La délétion de *Tspo* ne modifie pas la prise alimentaire quel que soit l'âge et ne permet pas d'expliquer la différence de poids observée entre les deux groupes (Figure 35C).

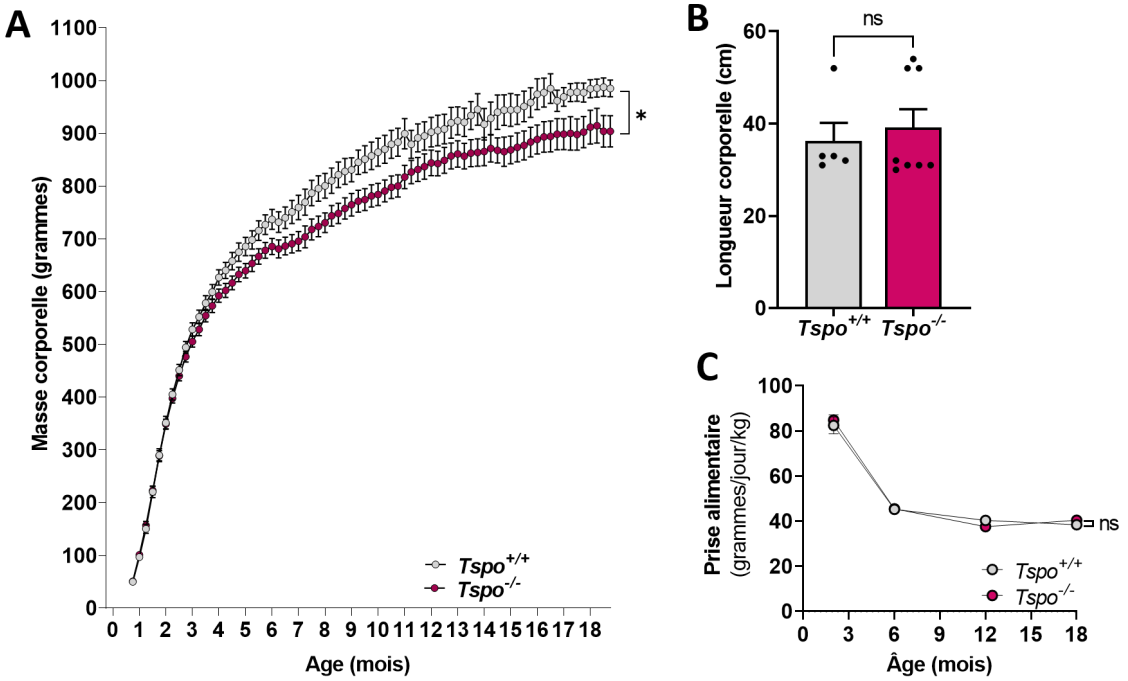


Figure 35 : Effet de la délétion de *Tspo* sur le phénotype morphologique.
A. Masse corporelle de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ au cours du vieillissement. **B.** Longueur corporelle (mesurée du museau à la naissance de la queue) de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 18 mois. **C.** Prise alimentaire de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 2, 6, 12 et 18 mois. Chaque valeur est la moyenne de mesures réalisées sur 5 à 12 animaux différents. Un modèle mixte avec un post test de Bonferonni a été réalisé. *ns : non significatif, * : p<0,05.*

1.4.4. La délétion de *Tspo* n'altère pas le métabolisme lipidique au cours du vieillissement

En complément du bilan lipidique des rats, un dosage des précurseurs du cholestérol et des oxystérols sériques a été réalisé chez des rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 2, 6 et 12 mois (Figure 36). La concentration des précurseurs de biosynthèse du cholestérol est comparable entre les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ à 2 mois, mais à 6 mois les voies du lanostérol et du lathostérol augmentent significativement chez les rats *Tspo*$^{-/-}$ alors qu'à 12 mois, le phénomène inverse est observé. En effet, les concentrations de ces deux précurseurs sont significativement réduites chez les rats *Tspo*$^{-/-}$ (Figure 36A). Ces modifications interviennent sans perturbation du taux sanguin de cholestérol (Figure 4 des suppléments du manuscrit). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'autre voie de synthèse, celle du desmostérol, n'a pas été altérée par la délétion de *Tspo* (Figure 36A). Les oxystérols sériques ont également été mesurés et la plupart (7α-hydroxycholestérol, cholestérol-5α,6α- et -5β,6β-époxide, et 27-hydroxycholestérol) ont suivi le même profil que les précurseurs du cholestérol : une augmentation significative à 6 mois puis une diminution significative à 12 mois (Figure 36B). Ces variations d'oxystérols pourraient résulter des variations des précurseurs de synthèse du cholestérol, si les oxystérols

plasmatiques sont principalement générés à partir du cholestérol issu de la voie de synthèse lano-lathostérol.

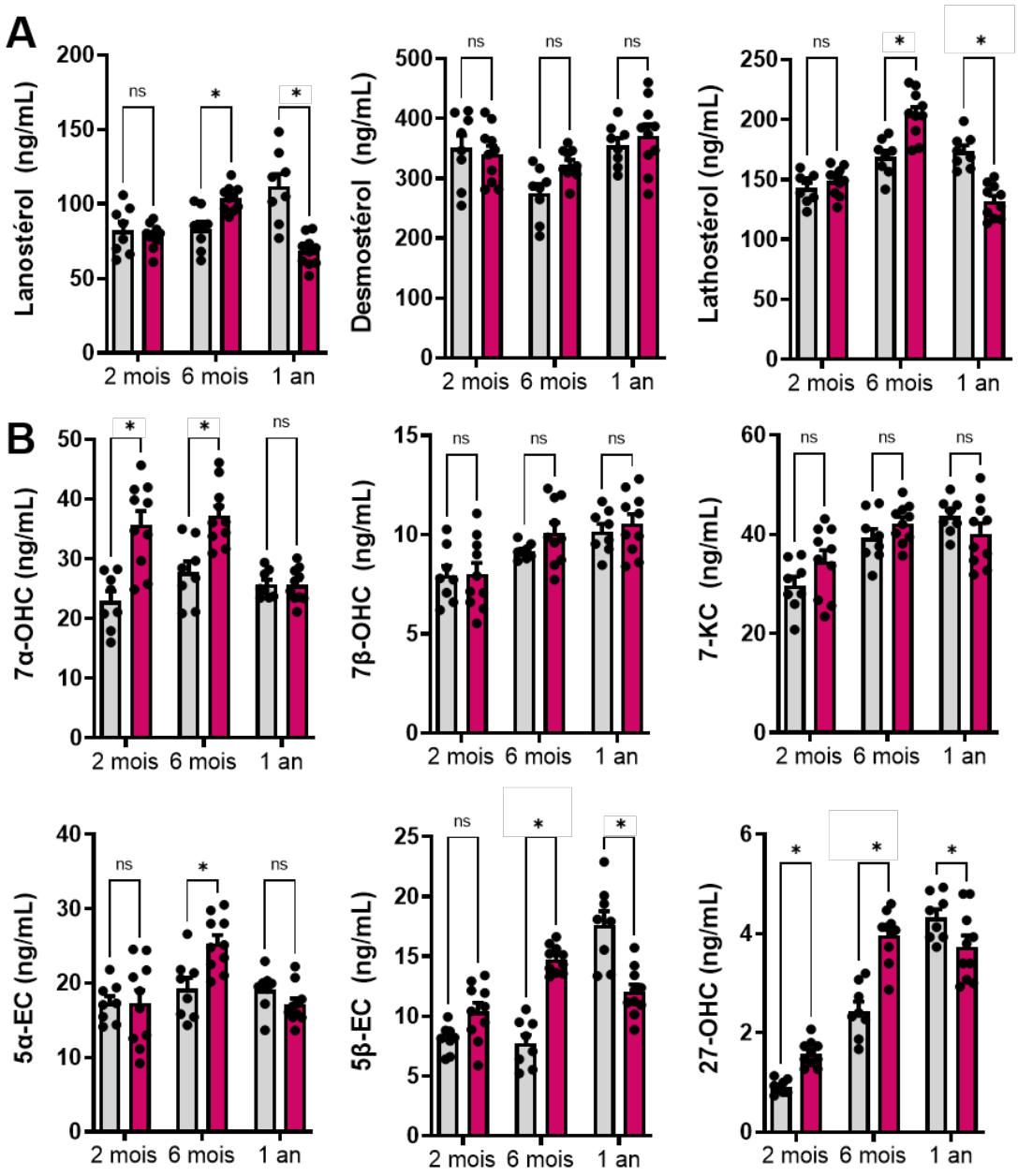


Figure 36 : Effet de la délétion de *Tspo* sur les stérols sériques au cours du vieillissement. Les stérols sériques de rats *Tspo*$^{+/+}$ (□) et *Tspo*$^{-/-}$ (■) âgés de 2, 6 et 12 mois ont été mesurés par spectrométrie de masse. **A.** Précurseurs de synthèse du cholestérol. **B.** Oxystérols : 7α-hydroxycholestérol (7α-OHC), 7β-hydroxycholestérol (7β-OHC), le 7-kétocholestérol (7-KC), le cholestérol-5α,6α-époxide (5α-EC), le cholestérol-5β,6β-époxide (5β-EC) et le 27-hydroxycholestérol (27-OHC). Chaque valeur est la moyenne de mesures réalisées sur 8 à 10 animaux différents. La normalité de la distribution a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk puis un test d'Anova à deux facteurs avec un post test de Bonferonni a été réalisé. *ns : non significatif, * : p<0,05.*

L'effet de la délétion de *Tspo* sur le contenu lipidique des cardiomyocytes a également été analysé. Dans un premier temps, les lipides de cardiomyocytes isolés de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ ont été visualisés à l'aide de différentes sondes fluorescentes. Le cholestérol libre des cardiomyocytes de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ est réparti de manière similaire comme le montre le marquage avec la Filipin III. Le D4-mCherry, qui se fixe aux régions riches en cholestérol membranaire révèle aussi une répartition semblable entre les deux groupes. Enfin, les cardiomyocytes des rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ contiennent des quantités comparables de gouttelettes lipidiques qui sont la forme de stockage des lipides intracellulaires. Les différents marquages fluorescents indiquent donc que la distribution lipidique cellulaire des cardiomyocytes n'est pas altérée par la délétion de *Tspo* (Figure 37).

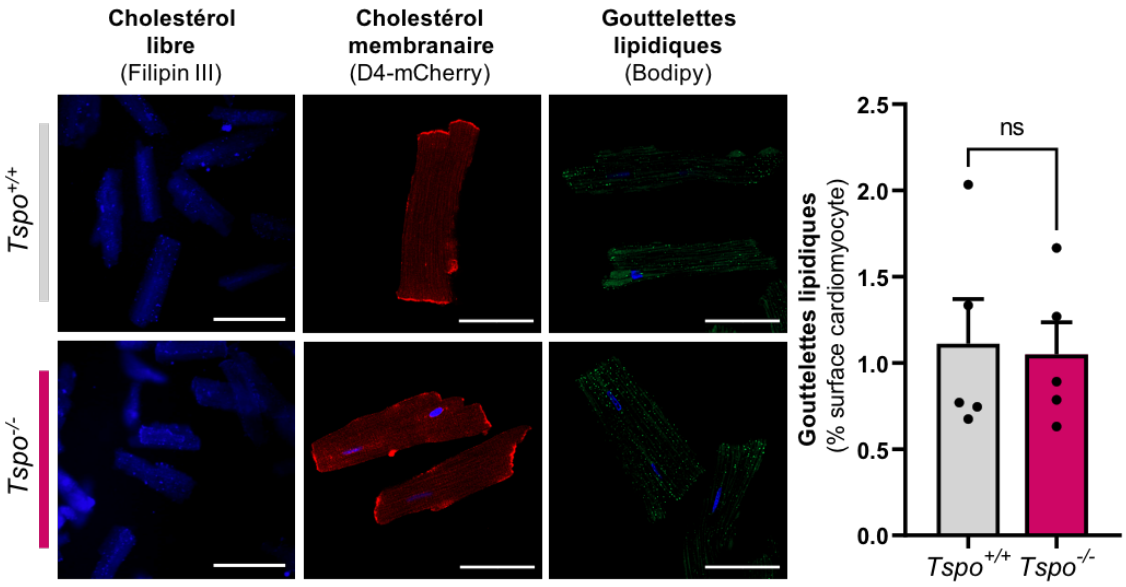


Figure 37 : Effet de la délétion de *Tspo* sur la répartition des lipides intracellulaires.
Le cholestérol libre de cardiomyocytes issus de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ a été marqué avec de la Filipin III (bleu) et visualisé au microscope à fluorescence inversée Olympus IX 81 (échelle : 100 µM). Le cholestérol membranaire a été visualisé avec du D4-mCherry (rouge), les gouttelettes lipidiques avec du Bodipy (vert) et les noyaux ont été marqués avec du Hoechst 33352 (bleu). Les cellules ont été visualisées au microscope confocal LSM 900 Airyscan 2 (échelle : 50 µm). La surface occupée par les gouttelettes lipidiques et la surface des cardiomyocytes ont été mesurées avec le logiciel Image J. Chaque valeur est la moyenne de 5 préparations issues d'animaux différents. La normalité de la distribution a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk puis un test t a été réalisé. *ns : non significatif.*

Ces résultats ont été confirmés par l'analyse des lipides neutres (esters de cholestérol, acides gras libres, triglycérides et cholestérol libre) des cardiomyocytes, de leurs mitochondries et de leurs cytosols par chromatographie sur couche mince (Figure 38). Celle-ci a permis de visualiser le cholestérol libre et les triglycérides mais pas les acides gras libres ni les esters de cholestérol.

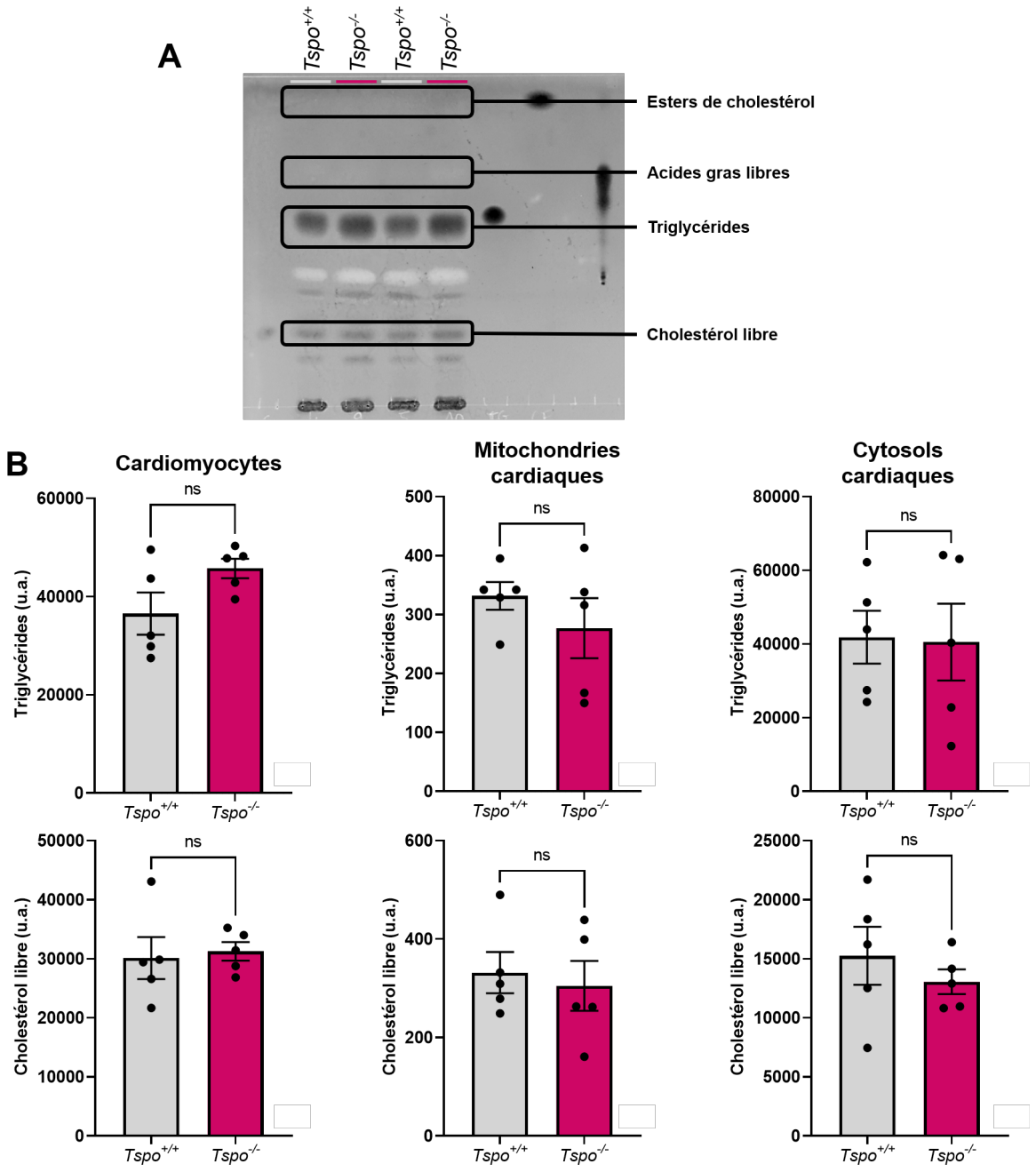


Figure 38 : Effet de la délétion de *Tspo* sur le contenu lipidique cellulaire cardiaque.
Les lipides neutres cellulaires ont été quantifiés par chromatographie sur couche mince (TLC). **A.** Image représentative d'une plaque de TLC **B.** Quantification des triglycérides et du cholestérol libre contenus dans des cardiomyocytes primaires, des mitochondries et des cytosols cardiaques de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$. Chaque valeur est la moyenne de préparations issues de 5 animaux différents. La normalité de la distribution a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk puis un test t a été réalisé. *ns : non significatif. u.a. unités arbitraires.*

Ces résultats sont en accord avec la littérature : les triglycérides sont les principaux lipides intracellulaires cardiaques, les acides gras sont majoritairement sous forme estérifiée et le cholestérol est sous forme libre dans les cardiomyocytes (Ballard *et al.*, 1960 ; Samouillan *et al.*, 2020). Les quantités de cholestérol libre et de triglycérides cardiomyocytaires,

mitochondriales et cytosoliques sont comparables entre les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$. La délétion de *Tspo* ne modifie donc pas le contenu en lipides neutres des cardiomyocytes, ce qui est en accord avec les dosages mitochondriaux et cytosoliques de cholestérol obtenus par spectrométrie de masse et les différents marquages fluorescents. Notons également que l'intensité des bandes obtenues sur les extraits mitochondriaux est très inférieure à celles des bandes des extraits cytosoliques ou cardiomyocytaires (Figure 38) : ceci reflète la faible concentration en cholestérol décrite dans les mitochondries (Horvath *et al.*, 2013).

1.4.5. La délétion de *Tspo* n'altère pas le métabolisme glucidique au cours du vieillissement

La glycémie basale est comparable entre les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ jusqu'à 18 mois (103 ± 5 et 97 ± 2 mg/dL, respectivement). Les tests métaboliques de tolérance au glucose (Figure 39A) et à l'insuline (Figure 39B) indiquent que la délétion de *Tspo* n'altère pas la réponse à une surcharge en glucose ni la sensibilité des tissus à l'insuline chez des rats de 18 mois, ce qui confirme les résultats obtenus sur des rats plus jeunes (Figure 4 des suppléments du manuscrit). Afin de compléter les tests métaboliques, le dosage de l'insulinémie à jeun avait été prévu dans le design initial du protocole de vieillissement en cas de différence entre les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ pour calculer l'index HOMA-IR. Cet index est un indice de la résistance à l'insuline, il a été calculé à partir des dosages de l'insulinémie et de la glycémie à jeun. Malgré la variabilité des insulinémies, les moyennes des index HOMA-IR des rats *Tspo*$^{-/-}$ paraissent plus faibles que celles des rats *Tspo*$^{+/+}$ (Figure 39D). Cependant, ces différences ne sont pas statistiquement significatives et n'ont pas de conséquence sur le métabolisme glucidique des rats au cours du vieillissement en conditions basales.

1.4.6. Analyse de la diminution du stress oxydant mitochondrial observée chez les rats délétés pour *Tspo*

Une diminution de la génération d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet -}$) et d'oxystérols mitochondriaux a été mise en évidence chez les rats *Tspo*$^{-/-}$ (voir paragraphe 1.3.6, page 113). Le rapport TSPO/VDAC ayant été décrit comme régulant le stress oxydant, la protéine VDAC a été quantifiée par immunoblot. La délétion de *Tspo* n'altère pas la quantité cellulaire de VDAC (Figure 40A). De ce fait, le rapport TSPO/VDAC est largement diminué (nul) chez les rats *Tspo*$^{-/-}$, ce qui peut participer à la diminution du stress oxydant mitochondrial observée dans les cardiomyocytes de ces rats.

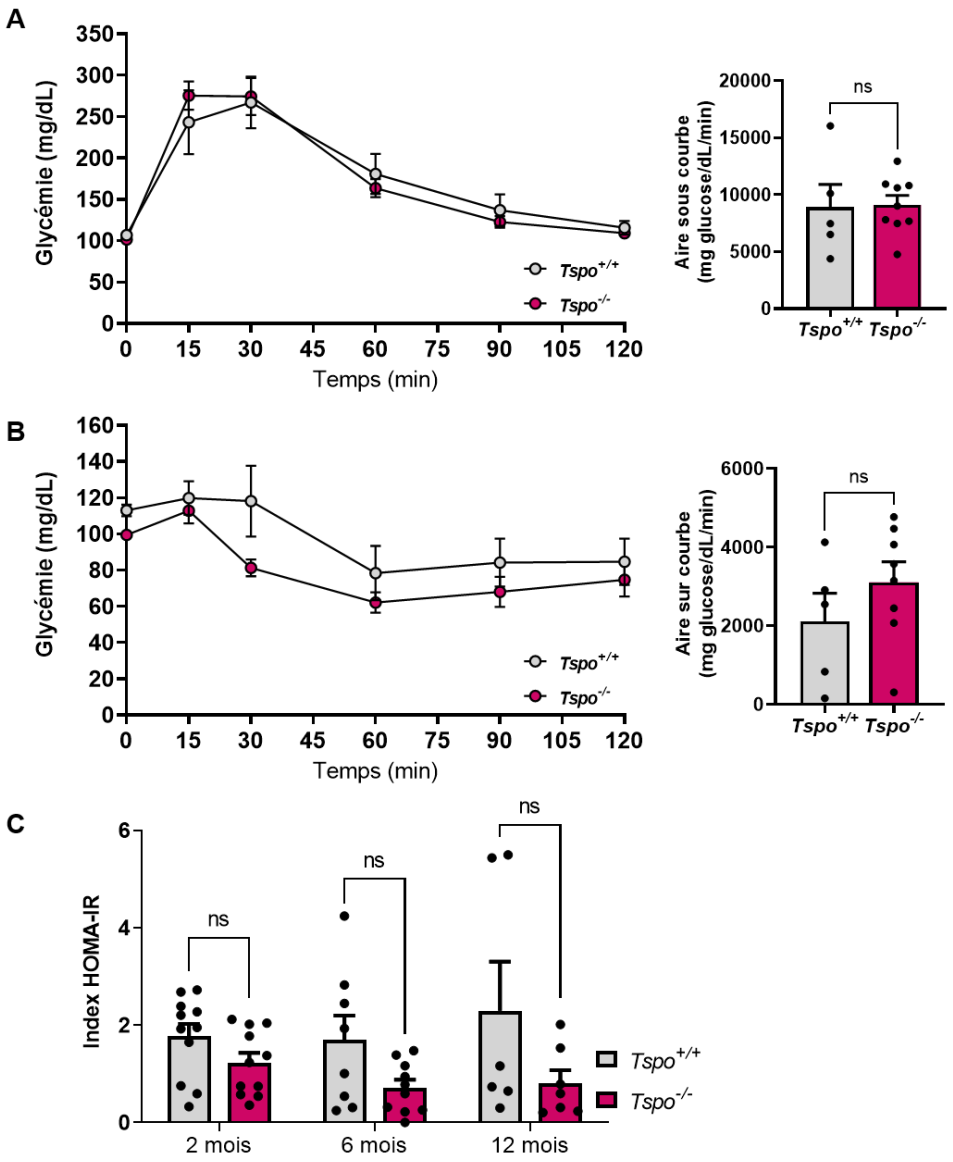


Figure 39 : Effet de la délétion de *Tspo* sur le métabolisme lipidique et glucidique au cours du vieillissement.
A. Test de tolérance au glucose sur des rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 18 mois. **B.** Test de tolérance à l'insuline sur des rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 18 mois. Chaque valeur est la moyenne de 5 à 9 expériences indépendantes. La normalité de la distribution a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk puis un test t a été réalisé. **C.** Index HOMA-IR de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 2, 6 et 12 mois. Chaque valeur est la moyenne de 6 à 11 expériences indépendantes. Un modèle mixte avec un post test de Bonferonni a été réalisé. *ns : non significatif.*

L'expression protéique de la SOD2, principale enzyme anti-oxydante mitochondriale, a également été évaluée pour déterminer si la réduction de la production mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène dans les cardiomyocytes pourrait être liée à une augmentation de son expression. Celle-ci est similaire entre les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ (Figure 40B). La génération de péroxyde d'hydrogène (H_2O_2), résultant de la production d'anion superoxyde et de sa transformation par la SOD2 dans les mitochondries cardiaques isolées,

est comparable dans les deux groupes (Figure 40C). Par ailleurs, l'étude de la production d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) par les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ne montre pas de différences entre les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$. Ces résultats (Figure 40C et Figure 5B du manuscrit) montrent également que la chaîne respiratoire mitochondriale des rats délétés pour *Tspo* est fonctionnelle.

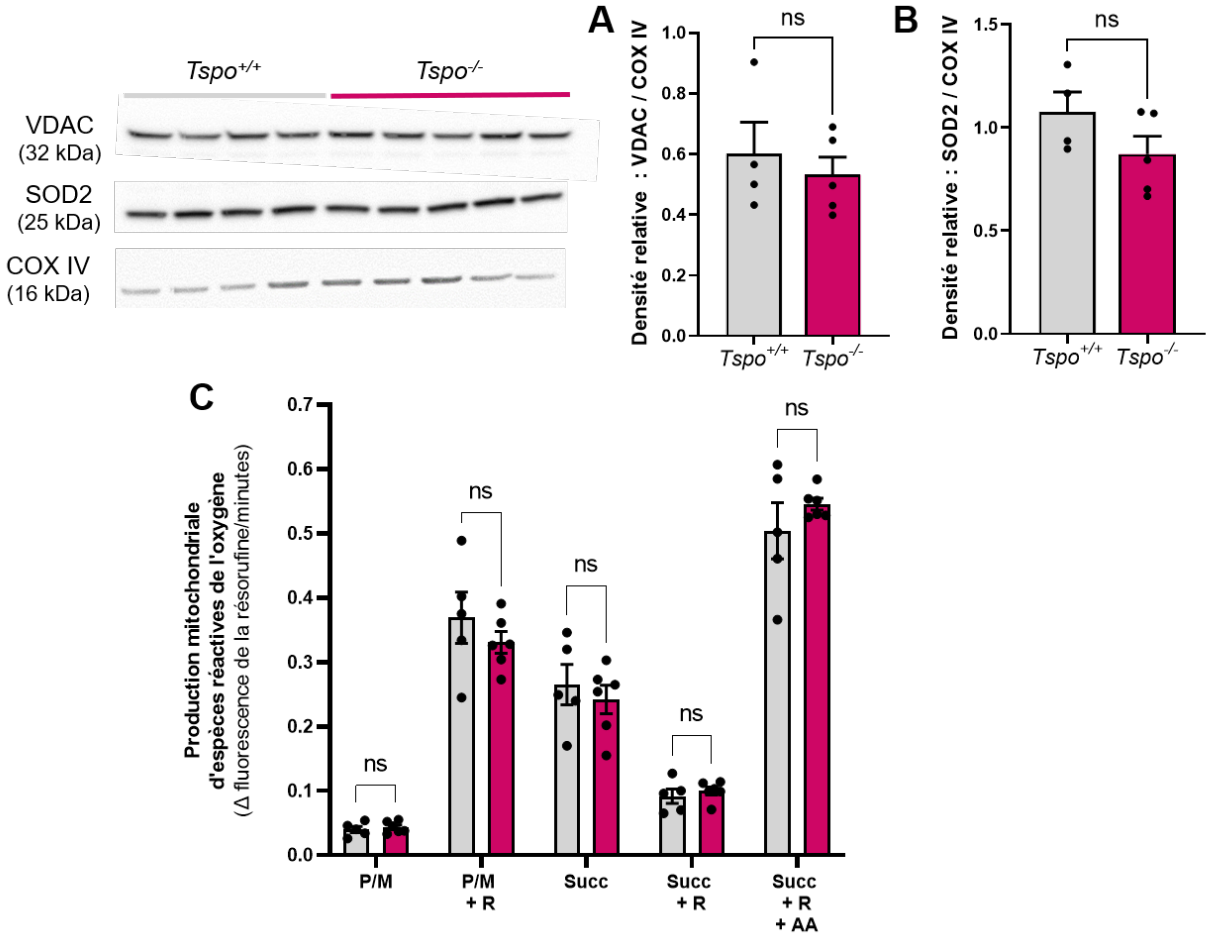


Figure 40 : Effet de la délétion de *Tspo* sur le stress oxydant mitochondrial.
A-B. Quantification par Western Blot des protéines mitochondriales VDAC (canal anionique dépendant du voltage) et SOD2 (superoxyde dismutase dépendante du manganèse) dans des cardiomyocytes issus de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$. La COX-IV (sous-unité 4 de la cytochrome C oxydase) a servi de témoin de charge. Chaque valeur est la moyenne de 4 à 5 préparations issues d'animaux différents. **C.** Des mitochondries cardiaques issues de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ ont été incubées en présence de résorufine qui devient fluorescente en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'ajout de 2,5 mM de pyruvate/malate (P/M) ou de 5 mM de succinate (Suc) alimente la chaîne respiratoire, qui est ensuite inhibée soit par l'ajout de 2 µM de roténone (R), soit par l'ajout de 2 µM de roténone (R) et de 2 µM d'antimycine A (AA). Chaque valeur est la moyenne de 5 à 6 préparations issues d'animaux différents. La normalité de la distribution a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk puis un test t ou un test d'Anova à deux facteurs avec un post test de Bonferonni a été réalisé. *ns : non significatif.*

1.4.7. La délétion de *Tspo* n'engendre pas de stress oxydant cytosolique cardiaque

Le stress oxydant cytosolique a été évalué sur des cardiomyocytes primaires isolés. Aucune différence dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène n'a été mise en évidence au niveau cytosolique (Figure 41A) et le glutathion réduit, marqueur du statut redox cellulaire, est comparable (Figure 41B) entre les cardiomyocytes primaires des rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$. Ces résultats sont en accord avec le dosage des oxystérols cytosoliques qui n'a révélé aucune différence entre les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ (voir paragraphe 1.3.6, page 113).

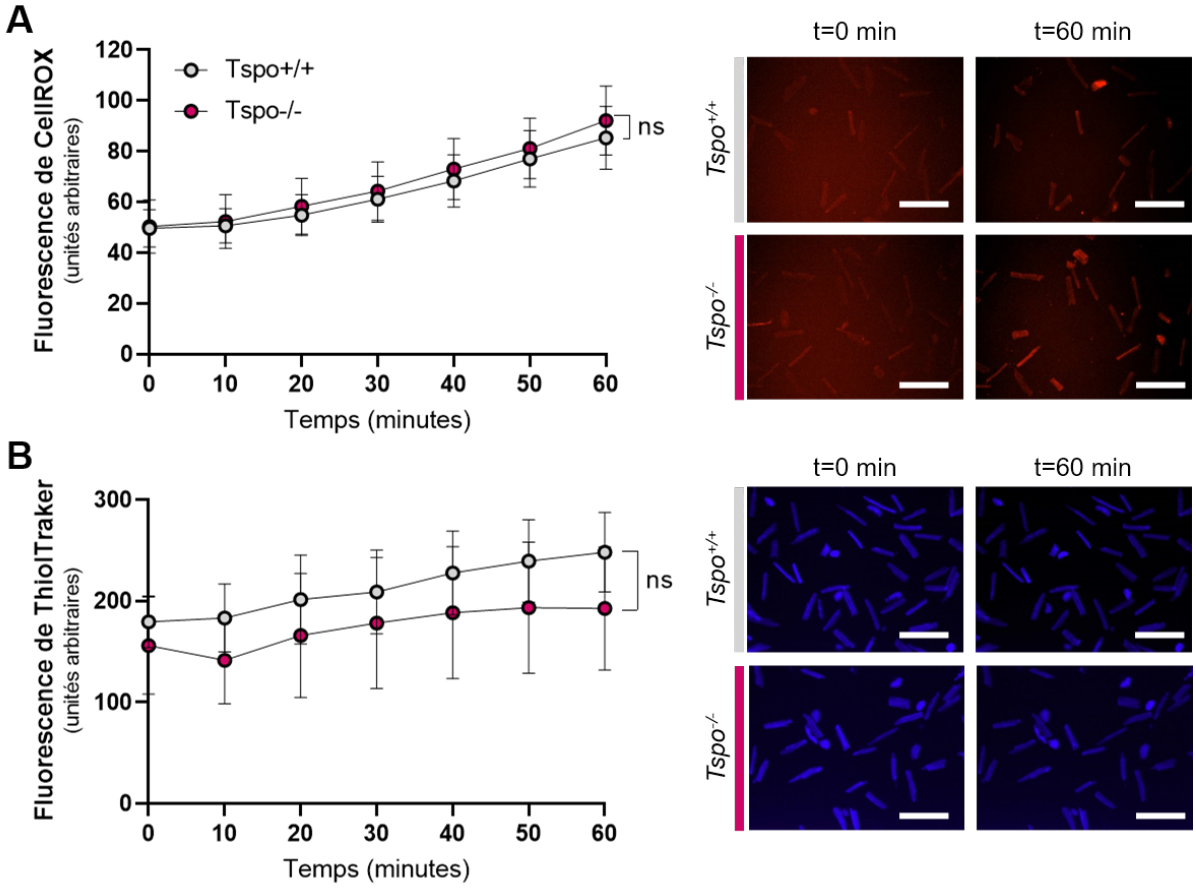


Figure 41 : Effet de la délétion de *Tspo* sur le stress oxydant cytosolique.
A. Gauche : Cinétique de la fluorescence de CellROX, marqueur de stress oxydant cytosolique, dans des cardiomyocytes issus de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$. Droite : Images représentatives de microscopie à fluorescence (Olympus IX81, grossissement x200, échelle : 200 µm) à t0 et 60 minutes. **B.** Gauche : Cinétique de la fluorescence de ThiolTraker, marqueur du glutathion réduit, dans des cardiomyocytes issus de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$. Droite : Images représentatives de microscopie à fluorescence (Olympus IX81, grossissement x200, échelle : 200 µm) à t0 et 60 minutes. Chaque valeur est la moyenne de 6 à 7 préparations issues d'animaux différents. La normalité de la distribution a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk puis un test d'Anova à deux facteurs avec un post test de Bonferonni a été réalisé. *ns : non significatif.*

1.4.8. La délétion de *Tspo* n'altère pas les paramètres hématologiques au cours du vieillissement

Des numérations formules sanguines ont été réalisées sur des prélèvements sanguins de rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ au cours du vieillissement. L'ensemble des paramètres hématologiques est comparable entre les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ quel que soit leur âge. Le nombre de lymphocytes est significativement plus élevé à deux mois chez les rats *Tspo*$^{-/-}$ mais cette augmentation aiguë est probablement due à une infection ou un stress ponctuel lié aux conditions d'élevage. A deux mois, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine des rats *Tspo*$^{-/-}$ est significativement supérieure à celle des rats *Tspo*$^{+/+}$ mais cette différence ne se retrouve pas dans les autres paramètres d'analyse des érythrocytes (numération, concentration d'hémoglobine, etc.). A 18 mois, certains paramètres d'analyse des érythrocytes (numération, hémoglobine et hématocrite) sont significativement réduits chez les rats *Tspo*$^{+/+}$ tandis qu'ils se maintiennent chez les rats *Tspo*$^{-/-}$ (Tableau 3). La délétion de *Tspo* ne semble pas altérer les paramètres hématologiques en conditions basales. Les rats ont donc été soumis à une procédure d'érythropoïèse de stress pour voir si des effets de la délétion n'apparaîtraient qu'au cours d'un stress hématologique.

1.4.9. Erythropoïèse de stress

Ces résultats sont préliminaires et seront complétés par une analyse des cellules de la lignée érythrocytaire dans la moelle osseuse, la rate et le sang par FACS, colorations histologiques et biologie moléculaire.

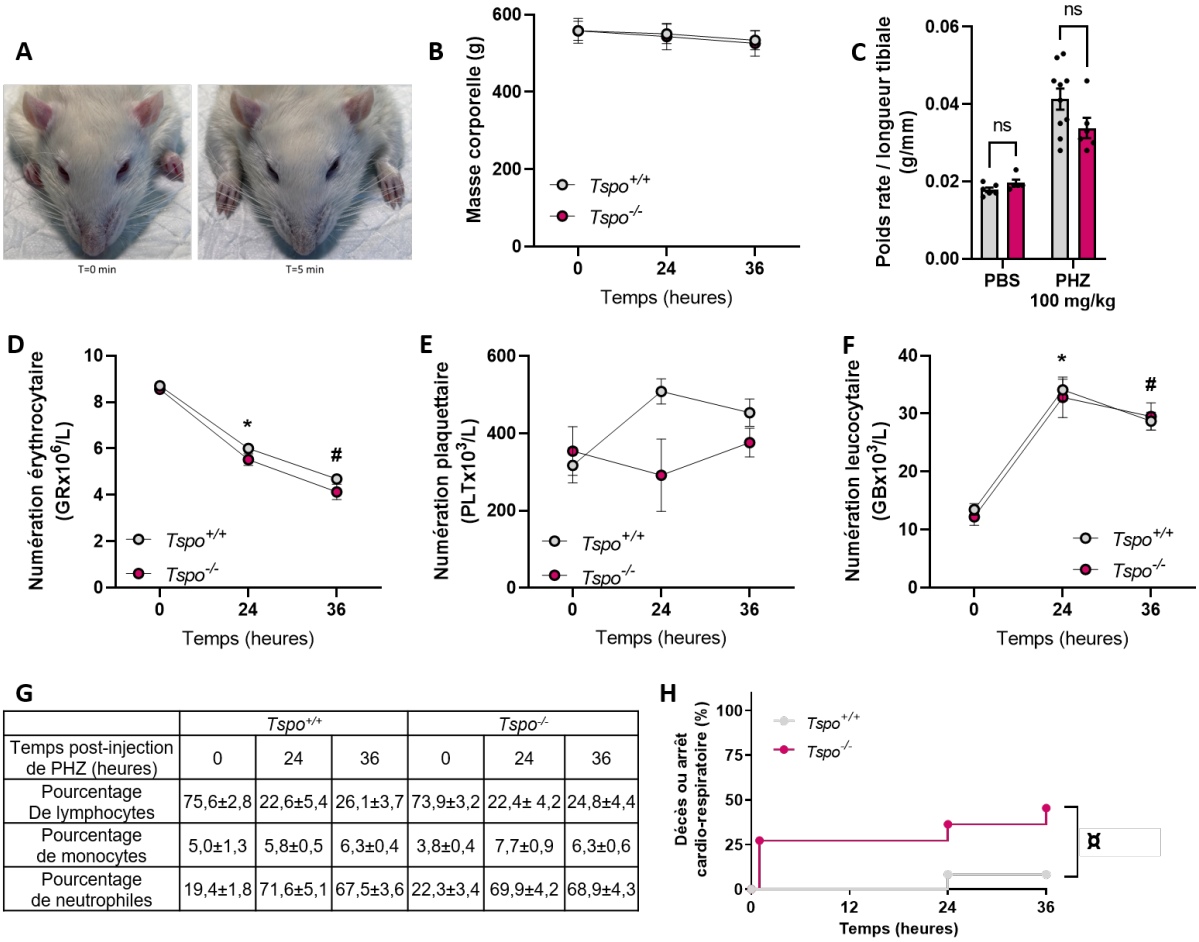
L'injection de phénylhydrazine (PHZ à 100 mg/kg), un agent hémolytique, provoque un changement de couleur presque immédiat chez les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 12 semaines : les oreilles, le museau, les pattes et la queue, d'une couleur rose à violette et les yeux rouges, caractéristiques des rats albinos, sont devenus presque noirs (Figure 42A). L'injection s'est accompagnée d'une légère perte de poids, similaire entre les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ (-4,4±0,3% et -6±0,7% 36 heures après l'injection, respectivement) (Figure 42B). En conditions basales, la délétion de *Tspo* n'a pas altéré le poids de la rate par rapport à la longueur tibiale des rats. Bien que cet effet ne soit pas significatif en raison du plus faible effectif chez les rats *Tspo*$^{-/-}$, l'hyperplasie splénique provoquée par la phénylhydrazine semble plus importante chez les rats *Tspo*$^{+/+}$ que chez les rats *Tspo*$^{-/-}$ 36 heures après l'injection de phénylhydrazine (Figure 42C). L'injection de phénylhydrazine induit bien une hémolyse, comme en témoigne la diminution significative de la numération érythrocytaire, similaire entre les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ (Figure 42D).

Tableau 3 : Effet de la délétion de *Tspo* sur les paramètres hématologiques au cours du vieillissement.
Une numération formule sanguine a été réalisée chez des rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 2, 6, 12 et 18 mois. Chaque valeur est la moyenne de 3 à 7 expériences indépendantes. Un modèle mixte avec un post test de Bonferonni a été réalisé. *ns : non significatif, * : p<0,05 vs Tspo*$^{+/+}$ de l'âge correspondant.

		2 mois		6 mois		12 mois		18 mois	
	Paramètre mesuré	*Tspo* $^{+/+}$	*Tspo* $^{-/-}$	*Tspo* $^{+/+}$	*Tspo* $^{-/-}$	*Tspo* $^{+/+}$	*Tspo* $^{-/-}$	*Tspo* $^{+/+}$	*Tspo* $^{-/-}$
Leucocytes	Numération leucocytaire totale (GBx10^9/L)	19,7±1,6	21,2±1,6	14,3±0,8	12,1±1,4	12,2±0,7	11,1±0,8	12,4±5,8	8,3±1,4
	Nombre de lymphocytes (LYMx10^9/L)	11,9±0,5	14,4±0,7*	10,7±0,6	9,4±0,9	9,0±0,4	7,9±0,5	5,3±0,9	5,5±0,9
	Nombre de monocytes (MONOx109/L)	1,7±0,3	1,0±0,4	0,8±0,2	0,2±0,2	0,4±0,2	0,5±0,2	0,4±0,1	0,5±0,1
	Nombre de neutrophiles (NEUx10^9/L)	6,1±1,2	5,8±1,0	2,9±0,4	2,5±0,4	2,7±0,3	2,7±0,3	6,7±5,0	2,4±0,4
Erythrocytes	Numération érythrocytaire (GRx10^{12}/L)	7,9±0,1	7,5±0,1	8,6±0,3	8,7±0,1	8,6±0,2	8,8±0,1	5,1±0,8	7,5±0,6*
	Hémoglobine (Hb g/dL)	15,1±0,1	14,9±0,2	15,2±0,8	15,4±0,2	15,0±0,3	15,5±0,2	8,6±1,4	13,1±1,1*
	Hématocrite (Ht %)	48,4±0,7	45,0±0,4	48,2±3,2	47,3±1,5	49,4±1,1	50,8±0,9	30,0±5,0	44,7±3,5*
	Volume globulaire moyen (VGM fL)	61,6±0,6	60,1±0,7	56,0±2,0	54,5±1,6	57,7±0,9	57,6±0,9	58,0±1,6	59,9±1,0
	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH pg)	19,2±0,2	19,8±0,2	17,6±0,3	17,8±0,1	17,6±0,3	17,5±0,2	16,6±0,4	17,4±0,4
	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH g/dL)	31,2±0,4	33,0±0,3*	31,7±0,7	32,7±0,8	30,4±0,3	30,5±0,3	28,7±0,6	29,2±0,5
Thrombocytes	Numération plaquettaire (PLTx10^9/L)	686±25	540±87	570±29	643±15	524±78	580±38	408±90	426±95
	Plaquettocrite (Pct %)	0,5±0,0	0,4±0,1	0,4±0,0	0,5±0,0	0,4±0,1	0,4±0,0	0,3±0,1	0,3±0,1
	Volume moyen plaquettaire (VPM fL)	7,3±0,1	7,1±0,1	7,3±0,2	7,2±0,1	7,0±0,1	7,0±0,1	6,8±0,1	7,1±0,1

La quantité de plaquettes dans le sang a également été mesurée et les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ ont réagi différemment à l'hémolyse provoquée par la phénylhydrazine. En effet, cette dernière provoque une augmentation de thrombocytes chez les rats *Tspo*$^{+/+}$ à 24 heures, tandis que chez les *Tspo*$^{-/-}$, elle induit l'effet inverse (Figure 42E). Contrairement aux érythrocytes, les leucocytes sont significativement augmentés par l'injection de phénylhydrazine et ceci est dû à une augmentation massive de polynucléaires neutrophiles (Figure 42F et G) qui témoigne d'une inflammation. L'injection de phénylhydrazine s'accompagne d'une mortalité importante chez les rats *Tspo*$^{-/-}$. En effet, sur les douze rats *Tspo*$^{+/+}$ inclus dans cette étude, un rat a été retrouvé mort 24 heures après l'injection. Un autre rat a été exclu des résultats pour des raisons techniques : le prélèvement sanguin à 24 heures n'a pas pu être réalisé. Sur les onze rats *Tspo*$^{-/-}$ inclus, deux rats sont morts et deux ont fait un arrêt cardio-respiratoire dans l'heure

qui a suivi l'injection. Les rats ont pu être réanimés mais un est mort peu avant 36 heures. Un autre rat *Tspo*$^{-/-}$ a été retrouvé mort à 24 heures (Figure 42H).



G

	Tspo$^{+/+}$			*Tspo*$^{-/-}$		
Temps post-injection de PHZ (heures)	0	24	36	0	24	36
Pourcentage De lymphocytes	75,6±2,8	22,6±5,4	26,1±3,7	73,9±3,2	22,4± 4,2	24,8±4,4
Pourcentage de monocytes	5,0±1,3	5,8±0,5	6,3±0,4	3,8±0,4	7,7±0,9	6,3±0,6
Pourcentage de neutrophiles	19,4±1,8	71,6±5,1	67,5±3,6	22,3±3,4	69,9±4,2	68,9±4,3

Figure 42 : Effet de la délétion de *Tspo* sur la réponse à l'injection d'un agent hémolytique. Des rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ ont reçu une injection de phénylhydrazine (PHZ, 100 mg/kg). **A.** Images représentatives de l'effet de l'injection de PHZ. **B.** Suivi du poids. **C.** Rapport poids de la rate (grammes) et longueur tibiale (mm). **D.** Numération érythrocytaire. **E.** Numération plaquettaire. **F.** Numération leucocytaire. **G.** Composition leucocytaire. Chaque valeur est la moyenne de 7 à 10 expériences indépendantes. La normalité de la distribution a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk puis un test d'Anova à deux facteurs avec un post test de Bonferonni a été réalisé. *ns : non significatif, * : p<0,05 vs.* t0, *# : p<0,05 vs.* t24h. **H.** Décès ou arrêt cardio-respiratoire des rats *Tspo*$^{+/+}$ (n=12) et *Tspo*$^{-/-}$ (n=11) suite à l'injection de PHZ. La comparaison des deux courbes a été réalisée avec un test de Log-rank. ¤ *: p<0,05 vs. Tspo*$^{+/+}$.

1.4.10. La délétion de *Tspo* induit une augmentation de la mortalité au cours du vieillissement

Après les différentes analyses réalisées à 18 mois, les rats ont été sacrifiés et certains animaux présentaient des altérations tissulaires. Des analyses anatomopathologiques ont été réalisées et, en dehors des atteintes fréquentes chez les rongeurs âgés (comme la fibrose capsulaire multifocale ou le trichofolliculome par exemple), deux rats *Tspo*$^{-/-}$ présentaient des lésions

inflammatoires multinodulaires éosinophiliques qui pourraient être liées à un syndrome hyper-éosinophilique (Figure 43A). Cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée car l'hémogramme ne permet pas la distinction des différentes populations neutrophiles et cette tendance reste à confirmer avec un nombre plus important d'animaux. En effet, le vieillissement a entraîné des pertes : les rats ont été euthanasiés en raison de points limites (perte de poids, tumeur, etc.) ou ont été retrouvés morts sans signe précurseur. L'effectif des groupes de rats âgés de 18 mois est donc réduit par rapport aux autres âges, notamment chez les rats *Tspo*$^{-/-}$ qui ont souffert de pertes significativement supérieures à celles des rats *Tspo*$^{+/+}$ (Figure 43B).

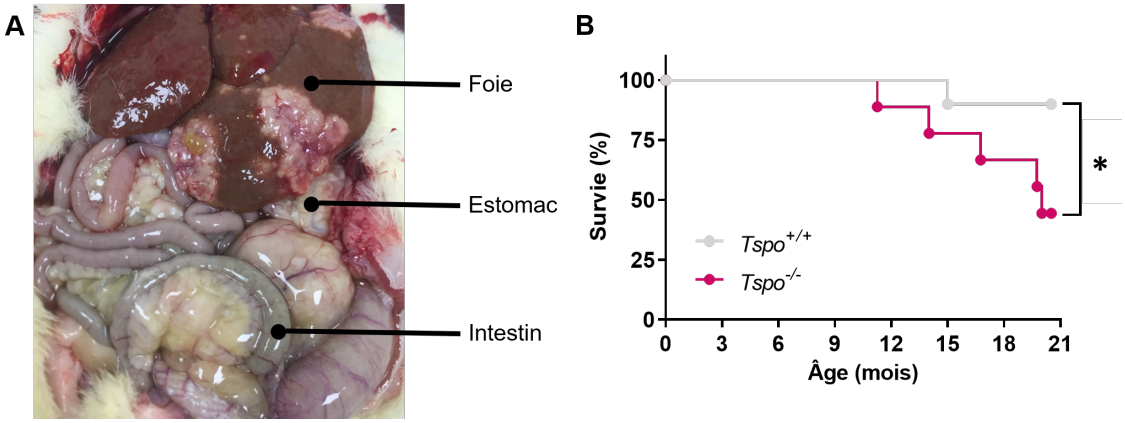


Figure 43 : Effet de la délétion de *Tspo* sur le vieillissement.
A. Photographie des lésions inflammatoires multinodulaires éosinophiliques d'un rat *Tspo*$^{-/-}$ âgé de 18 mois. **B.** Courbes de survie des rats *Tspo*$^{+/+}$ (n=10) et *Tspo*$^{-/-}$ (n=9). La comparaison des deux courbes a été réalisée avec un test de Log-rank. * *: p<0,05 vs. Tspo*$^{+/+}$.

1.5. Conclusions

Cette étude avait pour objectif d'étudier les mécanismes à l'origine de l'accumulation mitochondriale de cholestérol et d'oxystérols à la reperfusion d'un myocarde ischémié afin d'identifier des cibles potentielles pour le développement de stratégies cardioprotectrices ciblant les dysfonctions mitochondriales. Les résultats démontrent que l'accumulation mitochondriale de cholestérol à la reperfusion n'est pas due à un défaut de son catabolisme mais à une augmentation de son influx, assuré notamment par les protéines du transducéosome : TSPO et STAR. La réduction pharmacologique de la biosynthèse de cholestérol a permis de réduire l'accumulation de cholestérol à la mitochondrie lors de la reperfusion, en limitant l'influx, et de préserver les fonctions mitochondriales. Ces résultats soulignent le rôle majeur du cholestérol dans l'infarctus du myocarde et l'importance des thérapies hypocholestérolémiantes. L'injection d'un ligand de TSPO, le 4'-chlorodiazépam, abolit l'accumulation de cholestérol, la formation consécutive d'oxystérols, et l'activation

mitochondriale de STAR, démontrant l'implication de TSPO dans le transport mitochondrial de cholestérol médié par STAR dans le cœur. L'utilisation d'un modèle de rats délétés a confirmé cette implication puisque la délétion de *Tspo* abolit totalement les effets du 4'-chlorodiazépam. Cependant, la délétion de *Tspo* diminue mais n'empêche ni l'accumulation mitochondriale de cholestérol ni les dysfonctions mitochondriales provoquées par l'ischémie-reperfusion, indiquant un mécanisme de transport mitochondrial de cholestérol indépendant de TSPO en conditions basales. En revanche, l'action sur TSPO au moyen d'un ligand réduit fortement l'accumulation de cholestérol dans la mitochondrie, ce qui suggère une coopération entre TSPO et STAR en présence d'un stress tel que l'ischémie-reperfusion cardiaque.

L'étude du modèle de rats délétés pour *Tspo* n'a pas permis de mettre en évidence d'effet net de la délétion. Celle-ci n'altère pas la fonction reproductive de ces rats : les hormones stéroïdes et les portées étaient comparables à celles des rats $Tspo^{+/+}$. Malgré une croissance similaire aux rats $Tspo^{+/+}$, la masse corporelle des rats $Tspo^{-/-}$ étaient significativement réduite. Cependant, aucune altération des différents paramètres du métabolisme lipidique et glucidique n'a été mise en évidence. Les paramètres fonctionnels et morphologiques cardiaques ne sont pas affectés par la délétion de *Tspo* au cours du vieillissement, tout comme les paramètres hématologiques. De même, le contenu lipidique cardiomyocytaire et les fonctions mitochondriales sont semblables chez les rats $Tspo^{+/+}$ et $Tspo^{-/-}$. Cependant, les mitochondries des rats $Tspo^{-/-}$ contiennent moins d'oxystérols et génèrent moins d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) à l'état basal, ce qui peut favoriser une diminution du stress oxydant mitochondrial. De façon surprenante, en l'absence d'un phénotype délétère chez les rats $Tspo^{-/-}$, la mortalité est augmentée de façon significative chez ces rats.

2. RESULTATS 2 : MISE AU POINT D'UN MODELE CELLULAIRE D'HYPOXIE-REOXYGENATION DE CARDIOMYOCYTES DE LIGNEE

2.1. Objectif du travail

Parallèlement aux expériences menées chez l'animal, nous avons cherché à développer un modèle cellulaire d'hypoxie-réoxygénation afin de pouvoir étudier *in vitro* les mécanismes impliquant TSPO et STAR ainsi que la distribution et la dynamique du cholestérol cellulaire cardiaque et, à terme, de pouvoir évaluer l'effet protecteur d'agents pharmacologiques comme les nouveaux inhibiteurs de TSPO et de STAR par exemple. Dans les modèles d'hypoxie-réoxygénation *in vitro*, les cellules sont incubées dans un milieu « privatif » (sans glucose et/ou sans sérum) dans les conditions dites « hypoxiques ». En effet, l'arrêt de la circulation sanguine lors d'une ischémie-reperfusion *in vivo*, provoque une hypoxie d'une part et une privation en nutriments d'autre part. Les modèles *in vivo* ne permettent pas de dissocier les effets de ces deux conséquences de l'obstruction d'une artère coronaire tandis que les modèles cellulaires offrent la possibilité de priver les cellules en nutriments et/ou de les soumettre à une hypoxie. Pour développer ce modèle d'hypoxie-réoxygénation *in vitro*, nous avons d'abord étudié les effets de la privation en nutriments puis les effets de l'hypoxie pour enfin combiner ces deux stress, caractéristiques de l'ischémie-reperfusion.

Bien que le laboratoire dispose d'un protocole de dissociation de cardiomyocytes primaires de rats, contractiles et proches du vivant, présentant également l'avantage de pouvoir être extraits de rats *Tspo*$^{-/-}$, le modèle d'hypoxie-réoxygénation a été développé avec des cellules de lignée. Ce choix a été motivé par des considérations éthiques dans l'optique de développer des méthodes alternatives à l'expérimentation animale et par des considérations pratiques. En effet, l'obtention de cardiomyocytes primaires dépend directement de l'élevage de rats dont le nombre a été limité par la place disponible dans l'animalerie ; par l'utilisation de ces animaux pour les différents protocoles réalisés *in vivo* et par le vide sanitaire réalisé en raison de l'épidémie de COVID-19. De plus, l'utilisation de cellules de lignée, qui ne sont pas soumises à ces contraintes d'obtention, permet la réalisation de manipulations de biologie moléculaire autorisant l'inhibition de l'expression de protéines ou au contraire l'induction d'une surexpression.

Le laboratoire dispose d'une lignée de cardiomyocytes ventriculaires humains immortalisés : les cellules AC16 (Davidson *et al.*, 2005). Ces cellules ont conservé l'ADN nucléaire et mitochondrial des cardiomyocytes primaires. En effet, ces cellules expriment des facteurs

myogéniques caractéristiques des cardiomyocytes et leur chaîne respiratoire mitochondriale est fonctionnelle. Bien que les cellules AC16 expriment les protéines contractiles des cardiomyocytes primaires, elles sont dépourvues de sarcomères et ne sont donc pas contractiles (absence de courant entrants calciques et sodiques, de courants sortants potassiques et pacemaker) (Figure 44).

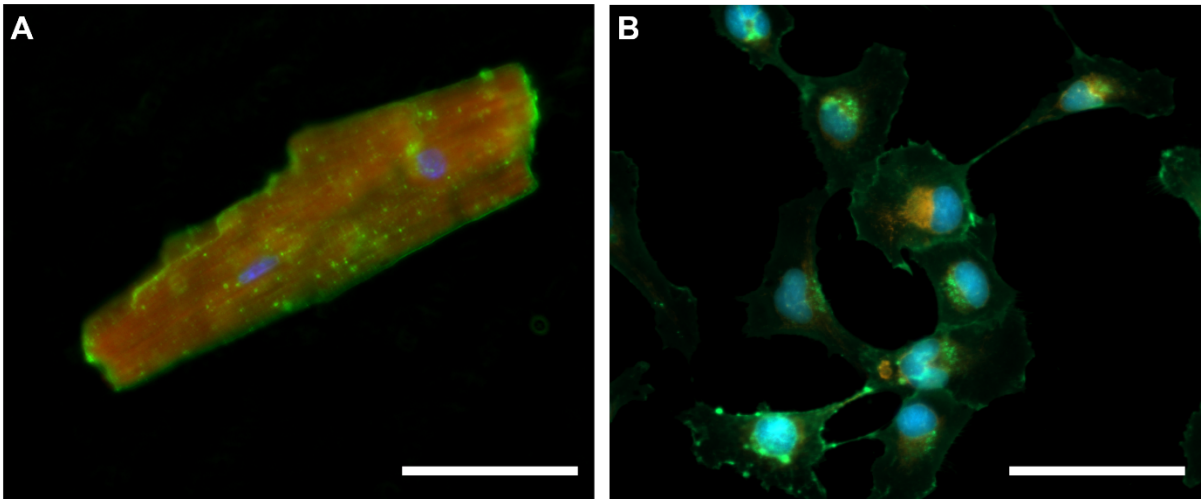


Figure 44. Comparaison de deux types de cardiomyocytes.
A. Cardiomyocyte primaire de rat adulte. **B.** Cardiomyocytes de la lignée AC16. Les noyaux ont été marqués à l'aide d'Hoechst 33342 (bleu), les mitochondries avec du MitoTracker Red (rouge) et les membranes plasmiques avec de la Wheat Germ Agglutine (vert). Echelle : 50 µm.

2.2. Modèles expérimentaux

Les conditions expérimentales ont été déterminées en fonction de la mortalité cellulaire obtenue, évaluée par le test au cristal violet et confirmée par le test MTT (ces données ne sont pas présentées dans ce manuscrit car elles sont similaires à celles obtenues avec le cristal violet). En effet, l'objectif à terme est d'utiliser ce modèle d'hypoxie-réoxygénation pour évaluer les propriétés cardioprotectrices de molécules. Les cellules de la lignée AC16 ont été soumises à une privation de nutriments (incubation dans du PBS) et d'oxygène (incubation dans un incubateur à 1% d'oxygène) de différentes durées. L'effet de ces conditions expérimentales sur l'expression de TSPO et de STAR a été évaluée par Western Blot et par RT-qPCR. Le contenu lipidique cellulaire a été visualisé à l'aide de sondes fluorescentes et quantifié par chromatographie sur couche mince.

2.3. Résultats

2.3.1. Effet de la privation en nutriments sur la viabilité cellulaire

Les cellules ont été incubées dans un milieu privatif (PBS) pendant différentes durées et la mortalité a été mesurée. La privation en nutriments pendant 3 et 6 heures n'induit pas de mortalité significative tandis que la privation de 14 heures induit une mortalité de 46±8% en normoxie (Figure 45). La privation de nutriments pendant 14 heures a donc été retenue pour la suite.

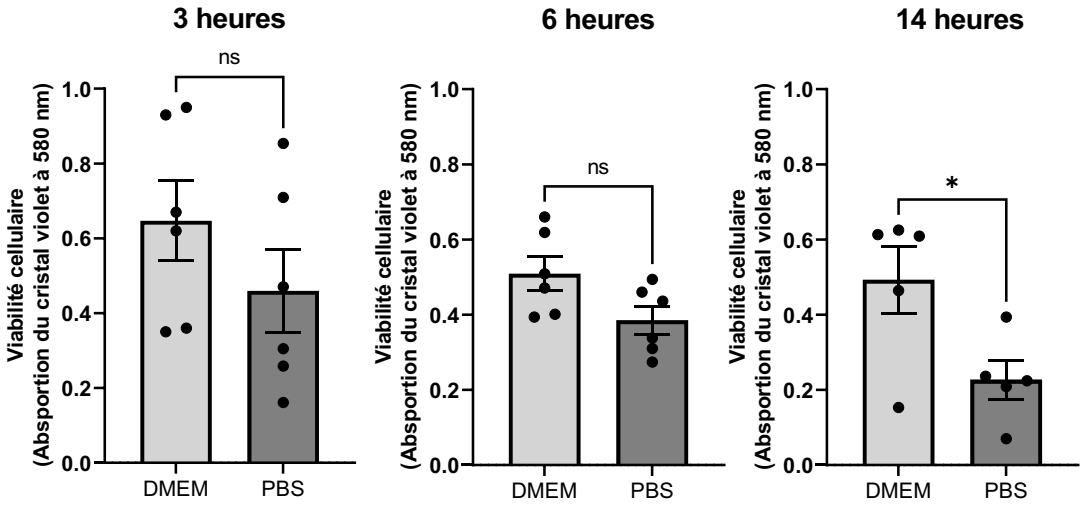


Figure 45 : Effet d'une privation en nutriments de 3, 6 et 14 heures sur la viabilité cellulaire.
Les cellules de la lignée AC16 ont été incubées dans du DMEM/F12 ou du PBS en normoxie (21% O_2) pendant 3, 6 et 14 heures. La viabilité a été évaluée à l'aide d'un test au cristal violet. La normalité de la distribution a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk puis un test t a été réalisé. *ns : non significatif, * : p<0,05.*

2.3.2. Effet de la privation en nutriments sur l'expression de *Tspo* et de *Star*

L'expression des protéines d'intérêt, TSPO et STAR, a été mesurée. Le laboratoire a démontré que dans un modèle d'ischémie-reperfusion *in vivo* chez le rat, l'expression de *Tspo* n'était pas modifiée tandis que l'expression de *Star* était significativement réduite (voir paragraphe 1.3.3, page 112). La privation en nutriments de 14 heures n'a pas modifié l'expression de *Tspo* ni le contenu cellulaire de TSPO mais a drastiquement réduit l'expression de *Star*, ainsi que sa forme cytosolique (37 kDa) et son activation mitochondriale (30 kDa) (Figure 46).

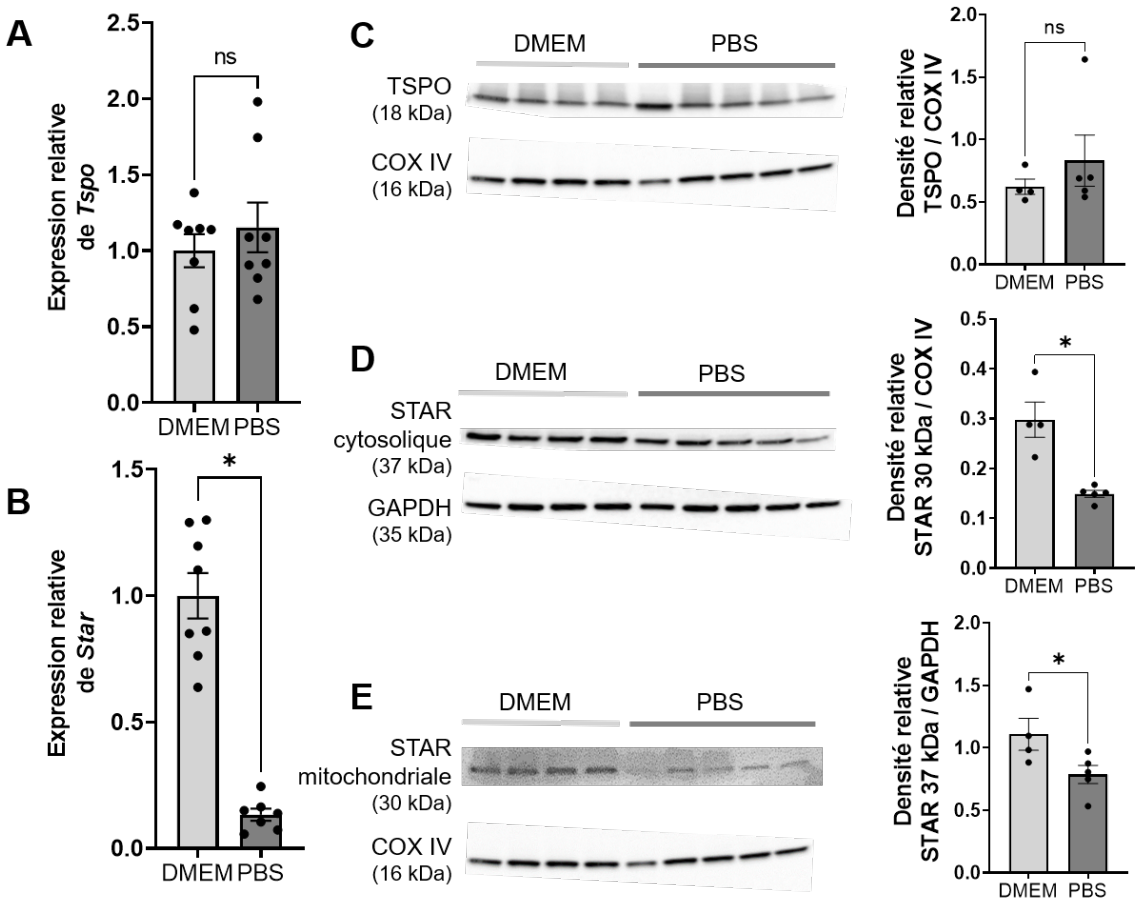


Figure 46 : Effet d'une privation en nutriments de 14 heures sur les protéines TSPO et STAR.
Les cellules de la lignée AC16 ont été incubées dans du DMEM/F12 ou du PBS en normoxie (21% O_2) pendant 14 heures. **A et B.** L'expression génique de *Tspo* et de *Star* a été évaluée par RT-qPCR avec *Hrpt* comme gène de ménage. **C, D et E.** Quantification par Western Blot des protéines TSPO (protéine translocatrice 18 kDa), STAR (protéine de régulation aigüe de la stéroïdogenèse) au niveau cytosolique (37 kDa) et mitochondrial (30 kDa). Les protéines GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et COX-IV (sous-unité 4 de la cytochrome C oxydase) ont servi de témoin de charge. La normalité de la distribution a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk puis un test t a été réalisé. *ns : non significatif, * : p<0,05.*

2.3.3. Effet de la privation en nutriments sur le contenu lipidique cellulaire

Le contenu lipidique cellulaire a été évalué par microscopie à fluorescence car la privation en nutriments induit une inhibition de l'expression de *Star*, qui est impliquée dans le transport mitochondrial de cholestérol. La privation en nutriments de 14 heures induit une accumulation significative de gouttelettes lipidiques dans les cellules AC16 (Figure 47A). En plus d'une modification du contenu lipidique des cellules, le cholestérol libre s'accumule à la membrane (Figure 47B).

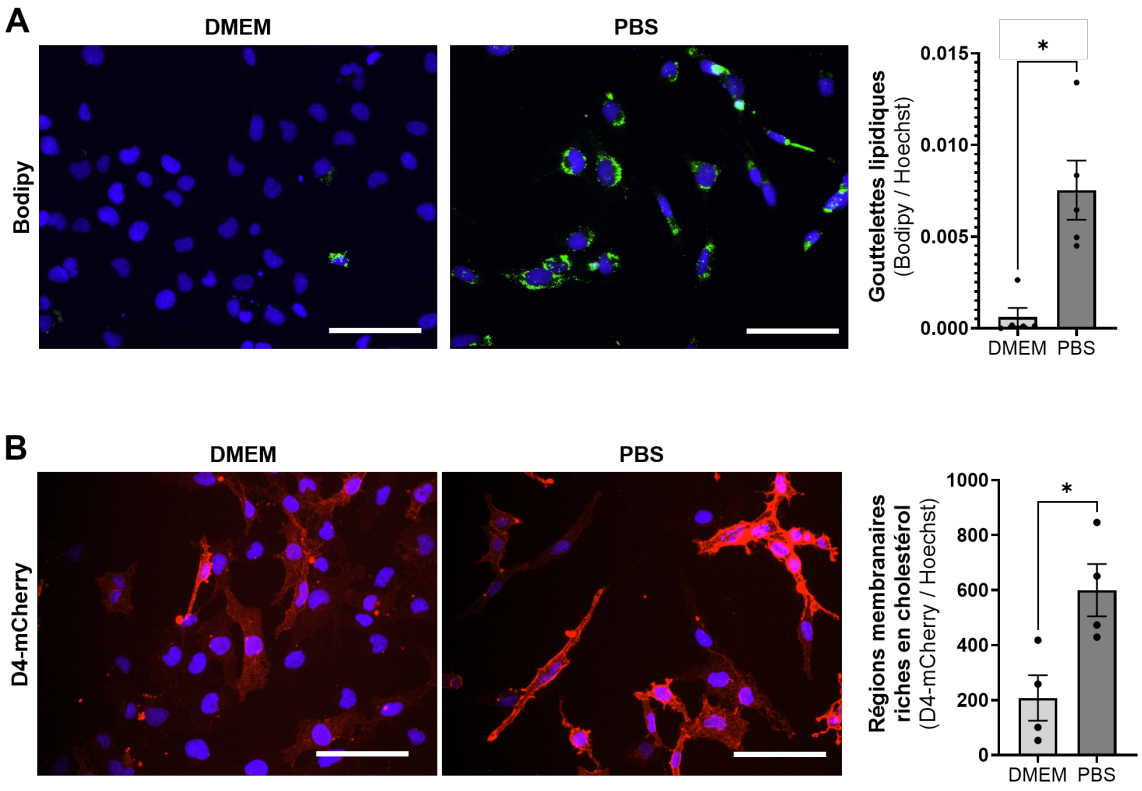


Figure 47 : Effet d'une privation en nutriments de 14 heures sur la répartition des lipides intracellulaires.
Les cellules de la lignée AC16 ont été incubées dans du DMEM/F12 ou du PBS en normoxie (21% O_2) pendant 14 heures. **A.** Les gouttelettes lipidiques ont été mises en évidence avec la sonde fluorescente Bodipy (vert) et les noyaux cellulaires avec du Hoechst 33352 (bleu). Echelle : 100 µm. Le rapport de la surface (µm^2) occupée par les gouttelettes lipidiques, par rapport au nombre de noyaux par champs, a été mesuré avec le logiciel Image J. **B.** Les régions membranaires riches en cholestérol ont été marquées à l'aide de la sonde D4-mCherry (rouge) et les noyaux avec du Hoechst 33352 (bleu). Echelle : 100 µm. La fluorescence du D4-mCherry a été intégrée pour chaque cellule sur une surface de 20 µm^2 avec le logiciel Xcellence (Olympus). La normalité de la distribution a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk puis un test t a été réalisé. ** : p<0,05.*

Les gouttelettes lipidiques sont la forme de stockage des acides gras et des esters de cholestérol dans la cellule. Le contenu lipidique des cellules a donc été mesuré par chromatographie sur couche mince après incubation dans du PBS pendant 14 heures et cette privation en nutriments a provoqué une accumulation de lipides neutres (esters de cholestérols, acides gras libres et triglycérides) (Figure 48). En revanche, elle n'a pas modifié le contenu cellulaire en cholestérol libre : son accumulation membranaire révélée par le D4-mCherry serait donc due à une redistribution cellulaire du cholestérol.

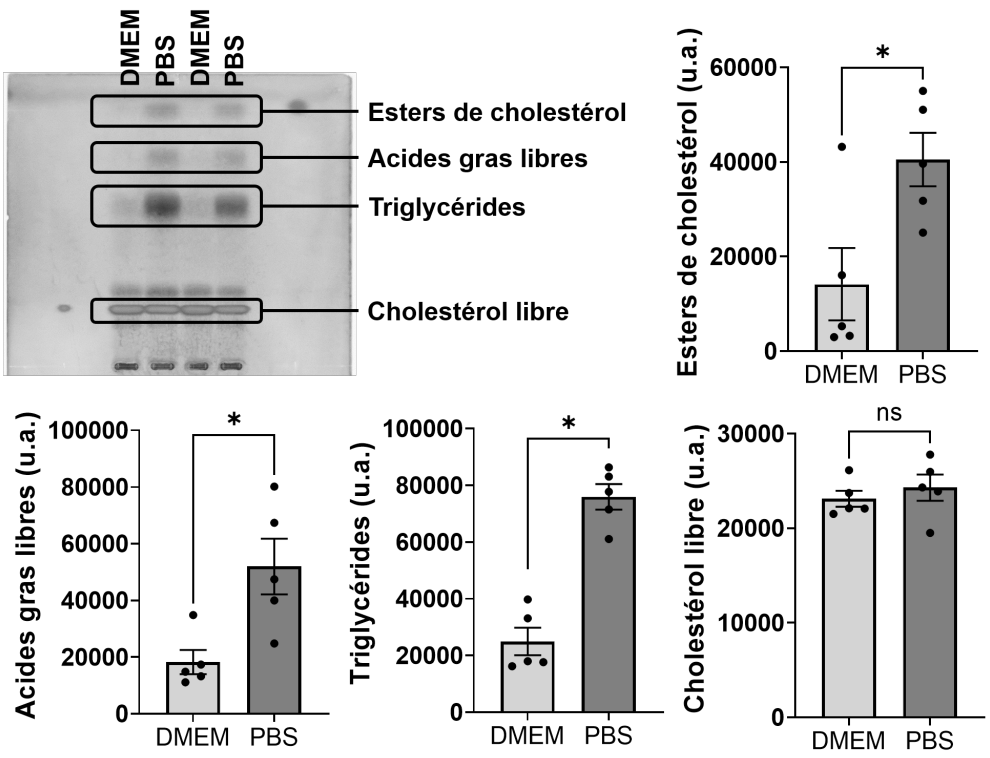


Figure 48 : Effet d'une privation en nutriments de 14 heures sur le contenu lipidique des cellules AC16.
Les cellules de la lignée AC16 ont été incubées dans du DMEM/F12 ou du PBS en normoxie (21% O_2) pendant 14 heures. Les lipides neutres cellulaires ont été mesurés par chromatographie sur couche mince (TLC). Image représentative d'une plaque de TLC et quantification du cholestérol estérifié, des acides gras libres, des triglycérides et du cholestérol libre. La normalité de la distribution a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk puis un test t a été réalisé. *ns : non significatif, * : p<0,05.*

2.3.4. Effet de la privation en oxygène sur la viabilité cellulaire

Pour compléter les conditions expérimentales de la mise au point du modèle cellulaire d'hypoxie-réoxygénation, les cellules AC16 ont été soumises à une hypoxie (1% O_2) en plus de la privation en nutriments afin de mimer au mieux les conditions physiopathologiques de l'ischémie-reperfusion qui allient privation en nutriments et en oxygène.

La Figure 49A confirme les résultats précédents, la privation en nutriments de 14 heures induit une mortalité significative de 52±3% en normoxie. En revanche, l'incubation des cellules en hypoxie n'induit pas de mortalité (-4±10% par rapport à la normoxie DMEM), ni de mortalité supplémentaire lorsqu'elle est associée à la privation en nutriments (-8±5% par rapport à la normoxie PBS) (Figure 49A). Dans ce modèle, l'hypoxie n'induit donc pas de mortalité cellulaire. Afin de vérifier que ce modèle permettait de provoquer une hypoxie chez les cellules de la lignée AC16, l'expression d'un marqueur cellulaire de l'hypoxie, l'*hypoxia inducible factor 1 alpha* (*Hif1*α) a été mesurée. L'hypoxie de 14 heures n'induit pas d'augmentation de

l'expression d'*Hif1α* (Figure 49B). Les cellules AC16 sont des cellules immortalisées qui pourraient avoir subi des modifications métaboliques qui altéreraient leur réponse à l'hypoxie et les rendraient plus résistantes.

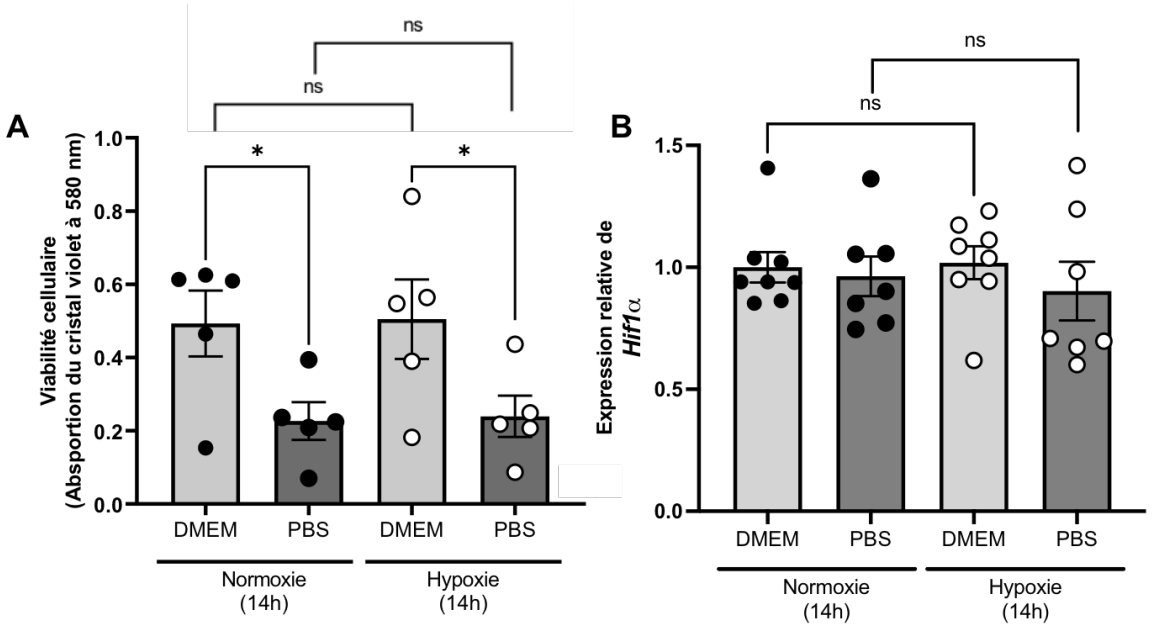


Figure 49 : Effet d'une hypoxie de 14 heures sur la viabilité cellulaire et sur l'expression du gène *Hif1α.*
Les cellules de la lignée AC16 ont été incubées dans du DMEM/F12 ou du PBS en normoxie (21% O_2) ou en hypoxie (1% O_2) pendant 14 heures. **A.** La viabilité cellulaire a été évaluée par un test au cristal violet. **B.** L'expression génique d'*Hif1α* a été évaluée par RT-qPCR avec *Hrpt* comme gène de ménage. La normalité de la distribution a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk puis un test d'Anova à deux facteurs avec un post test de Bonferonni a été réalisé. *ns : non significatif, * : p<0,05.*

Afin de déterminer si ces cellules sont sensibles à l'hypoxie, les cellules AC16 ont été soumises à des hypoxies plus longues (24, 48 et 72 heures) sans privation en nutriments. Pour ce faire, elles ont été incubées dans le même milieu que les cellules exposées à la normoxie. Les hypoxies de 24 et 48 heures n'induisent pas de mortalité par rapport aux normoxies correspondantes : 0±10% à 24 heures et 9±7% à 48 heures. L'hypoxie de 72 heures n'induit une mortalité que de 22±2% qui n'est pas significative (Figure 50A) et l'expression de *Hif1a* n'est pas induite aux différentes durées d'hypoxie (Figure 50B). Par ailleurs, l'hypoxie, quelle que soit sa durée, n'a aucun effet sur l'expression de *Tspo* et de *Star* (Figure 50C et D). En revanche, la durée d'incubation provoque une diminution de l'expression de *Star* au cours du temps que ce soit en normoxie ou en hypoxie (Figure 50D). Cette évolution pourrait être liée à la diminution des nutriments disponibles dans le milieu d'incubation, consommés par les cellules, dans les deux conditions.

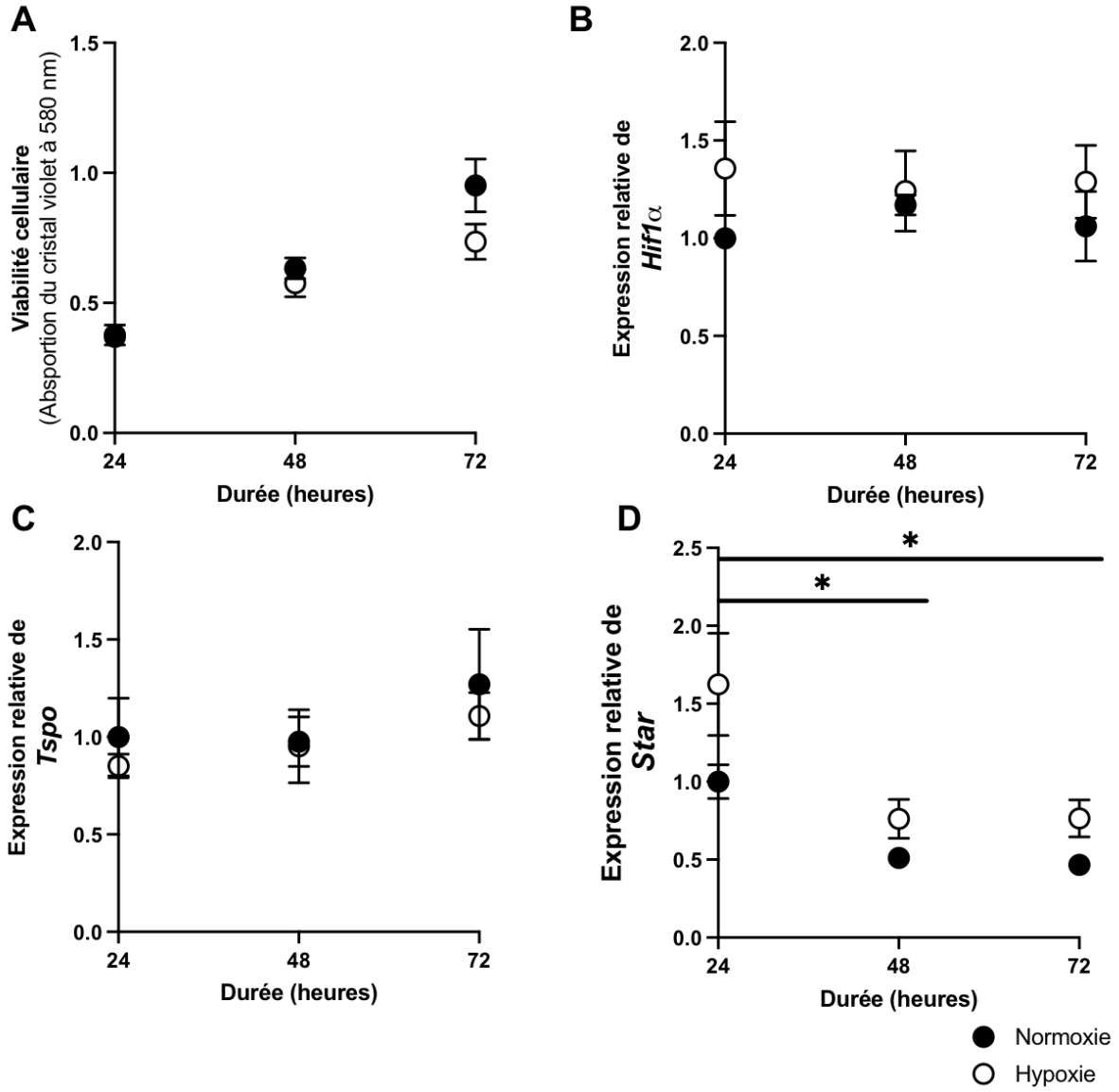


Figure 50 : Effet de 24, 48 et 72 heures d'hypoxie sur la viabilité cellulaire et sur l'expression des gènes *Hif1α, Tspo et Star*.
Les cellules de la lignée AC16 ont été incubées dans du DMEM/F12 en normoxie (21% O_2) ou en hypoxie (1% O_2) pendant 24, 48 et 72 heures. **A.** La viabilité a été mesurée par le test au cristal violet. **B.C.D**. L'expression génique a été évaluée par RT-qPCR avec *Hrpt* comme gène de ménage. Un modèle mixte avec un post test de Bonferonni a été réalisé. ** : p<0,05 vs*. 24 heures.

2.4. Conclusions

La privation en nutriments provoque une mortalité cellulaire significative sans altération de TSPO, mais induit une diminution de STAR, également observée dans l'ischémie-reperfusion *in vivo*. L'effet de l'hypoxie sur ces cellules a ensuite été étudié mais elle n'induit aucune mortalité, seule ou additionnelle à la privation en nutriments et les cellules dans la lignée AC16 ne semblent pas être sensibles à l'hypoxie de 1%. Les conditions expérimentales que nous avons choisies de tester pour développer le modèle d'hypoxie-réoxygénation n'ont pas permis

d'obtenir des résultats satisfaisants et excluent la possibilité de les utiliser pour modéliser et étudier des mécanismes *in vitro*. Une approche intéressante, que nous n'avons pas pu explorer en raison du manque d'animaux, serait d'utiliser des cardiomyocytes primaires de rats pour développer un modèle *in vitro* d'hypoxie-réoxygénation. En effet, ces cellules présentent l'avantage d'être contractiles et de pouvoir être obtenues d'animaux *Tspo*$^{-/-}$. Cette approche nécessiterait cependant un nouveau travail de mise au point du modèle, avec des conditions et des techniques d'analyses adaptées à ces cellules.

Bien que l'ensemble de ces résultats ait abouti à l'arrêt de l'utilisation des cellules AC16 pour développer un modèle d'hypoxie-réoxygénation, cette étude a permis de mettre en évidence l'effet majeur de la privation en nutriments sur l'expression de STAR et sur les lipides cellulaires. En effet, la réduction de STAR, qui est impliquée dans le transport mitochondrial de cholestérol, a motivé l'étude des lipides intracellulaires. Ceux-ci sont fortement modifiés par la privation en nutriments avec une accumulation massive d'esters de cholestérol, de triglycérides et d'acides gras libres. Ces lipides neutres constituent les gouttelettes lipidiques et leur marquage fluorescent a confirmé leur accumulation. Le cholestérol de la membrane plasmique externe est également fortement altéré, comme en témoigne l'augmentation de régions riches en cholestérol. Notons que des données préliminaires (non présentées), mettent en évidence que l'hypoxie avec ou sans privation en nutriments ne modifie pas les effets observés sur les lipides cellulaires. Les mécanismes de régulation de STAR et des lipides lors de la privation en nutriments sont à explorer plus précisément, notamment dans un modèle plus complet qui mimerait la reperfusion en ré-introduisant des nutriments dans le milieu de culture suite à la privation. L'étude de ces mécanismes pourrait participer à la compréhension des mécanismes à l'œuvre lors l'ischémie-reperfusion.

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que l'étude des lipides intracellulaires dans le modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat devrait permettre d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes lipidiques à l'œuvre lors de la reperfusion et sur l'effet de molécules pharmacologiques sur ces mécanismes.

DISCUSSION & CONCLUSION

Le cholestérol est une molécule essentielle à la vie cellulaire et une altération de son homéostasie induit des processus pathologiques comme l'athérosclérose. Celle-ci est la principale cause de l'infarctus du myocarde. A l'heure actuelle, la seule option thérapeutique est la reperfusion de l'artère occluse mais cette intervention engendre des lésions supplémentaires qui affectent particulièrement les mitochondries. Le développement de stratégies cardioprotectrices pour les limiter est donc nécessaire. Le laboratoire a démontré que la reperfusion s'accompagne d'une accumulation massive de cholestérol et d'oxystérols au niveau mitochondrial. Dans les tissus stéroïdogènes, le transport de cholestérol est assuré par un complexe multiprotéique spécialisé comprenant notamment la protéine TSPO. L'injection de ligands de TSPO lors de la reperfusion d'un myocarde ischémié inhibe l'accumulation mitochondriale de stérols et permet de protéger les mitochondries cardiaques, même en cas d'hypercholestérolémie qui amplifie les lésions cellulaires et entrave les stratégies cardioprotectrices (Musman *et al.*, 2017 ; Obame *et al.*, 2007 ; Paradis *et al.*, 2013 ; Schaller *et al.*, 2010). L'objectif du travail a été d'identifier le mécanisme d'accumulation du cholestérol dans les mitochondries lors de la reperfusion à l'aide du 4'-chlorodiazépam (ligand de TSPO), de la pravastatine (inhibiteur de la biosynthèse de cholestérol) et d'un modèle de rats délétés pour *Tspo*. La TSPO serait impliquée dans d'autres processus biologiques, qui ont été caractérisés chez des rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$, jeunes et au cours du vieillissement. En parallèle, un modèle d'hypoxie-réoxygénation sur des cellules de la lignée AC16 a été développé pour étudier ces mécanismes *in vitro*.

❖ Accumulation de cholestérol dans les mitochondries cardiaques et rôle de TSPO et STAR au cours de l'ischémie-reperfusion

L'étude du mécanisme d'accumulation du cholestérol dans la mitochondrie à la reperfusion cardiaque a tout d'abord permis d'écarter un défaut de catabolisme mitochondrial comme cause de cet effet. En effet, ni l'expression ni l'activité des cytochromes CYP11A1 et CYP27A1 n'ont été altérées par la reperfusion. Bien que la prégnénolone n'ait pas été détectée dans ce modèle et que les CYP11A1 et CYP27A1 ne soient présents qu'en faible quantité au niveau cardiaque, ces résultats confortent l'hypothèse d'autres études qui suggèrent la présence de la machinerie cellulaire nécessaire à la stéroïdogenèse *de novo* dans le tissu cardiaque (voir paragraphe 1.2.3, page 31). Ces résultats indiquent également que l'accumulation mitochondriale de cholestérol est liée à une augmentation de son influx à la reperfusion et un mécanisme a été identifié. Celui-ci fait intervenir une augmentation de la forme mitochondriale

de la protéine STAR (30 kDa), inhibée par l'administration de 4'-chlorodiazépam qui empêche également l'accumulation de cholestérol. Certaines études ont remis en question la spécificité du 4'-chlorodiazépam pour TSPO (Šileikytė *et al.,* 2014). Dans notre travail, l'utilisation de rats délétés pour *Tspo* abolit les effets de ce ligand sur l'activation de STAR et sa capacité à inhiber l'accumulation de stérols dans la mitochondrie, ce qui confirme sa spécificité pour TSPO. Ces résultats mettent également en évidence un lien fonctionnel entre TSPO et STAR dans les cellules cardiaques, qui n'est cependant pas nécessaire pour le transport mitochondrial de cholestérol. En effet, le cholestérol mitochondrial n'est pas diminué chez les rats *Tspo*$^{-/-}$ en conditions basales et lors de la reperfusion, la délétion de *Tspo* réduit l'accumulation du cholestérol sans toutefois l'inhiber. La TSPO interviendrait donc dans les situations de stress qui provoquent un influx massif de cholestérol dans la mitochondrie.

Des résultats similaires ont été obtenus au moyen de la pravastatine, un agent hypolipémiant qui n'agit pas directement sur la mitochondrie mais limite la biosynthèse de cholestérol. En effet, la pravastatine induit une diminution de l'accumulation mitochondriale de cholestérol et d'oxystérols et préserve les fonctions mitochondriales à la reperfusion, sans diminution de la cholestérolémie. Ceci s'accompagne d'une diminution de la forme mitochondriale de STAR (30 kDa), comme observée avec le 4'-chlorodiazépam, ce qui renforce l'idée que cet effet intervient dans la prévention des lésions de reperfusion. Il pourrait faire partie du mécanisme par lequel les statines, en plus de leur effet direct sur la cholestérolémie, exercent un effet cardioprotecteur (voir paragraphe 2.2.3.1, page 43). En revanche, le mécanisme par lequel la pravastatine limite l'activation mitochondriale de STAR reste inconnu. Celui-ci pourrait faire intervenir une diminution de l'expression de *Star* causée par la moindre quantité de cholestérol à transporter dans la cellule.

Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent le rôle majeur que joue l'activation mitochondriale de STAR, dans l'accumulation délétère de stérols à la mitochondrie, lors de la reperfusion. Ce mécanisme est en partie modulé par TSPO. Dans les tissus stéroïdogènes, ces deux protéines font partie du transducéosome. L'étude des autres protéines de ce complexe spécialisé pourrait permettre d'approfondir le mécanisme de régulation du transport de cholestérol dans la mitochondrie cardiaque à la reperfusion et ainsi de cibler plus finement le développement de stratégies cardioprotectrices.

- **Caractérisation cardiaque des rats délétés pour *Tspo* au cours du vieillissement**

Une partie de ce travail repose sur l'utilisation de rats délétés pour *Tspo*. En raison du peu de connaissances sur le rôle de TSPO dans la fonction cardiaque et des résultats contradictoires issus de la génération de différents modèles de délétion de *Tspo* (voir paragraphe 3.3.4.2, page 64), le phénotype des rats de notre élevage a été caractérisé chez des animaux jeunes et au cours du vieillissement. Les analyses échographiques, morphologiques et histologiques n'ont révélé aucune altération cardiaque chez les rats *Tspo*$^{-/-}$ âgés de 2 à 18 mois. Le contenu et la distribution des lipides cardiomyocytaires, notamment le cholestérol sarcolemmal, ne sont pas modifiés en l'absence de TSPO. Il en va de même pour le stress oxydant cytosolique (statut redox, espèces réactives de l'oxygène et oxystérols). En revanche, les mitochondries des cardiomyocytes issus des rats délétés génèrent moins d'espèces réactives de l'oxygène et contiennent moins d'oxystérols que celles des rats sauvages. Notre étude n'a pas permis de déterminer le mécanisme par lequel le stress oxydant mitochondrial est réduit chez les animaux mutés, mais il pourrait être lié à la réduction du rapport TSPO/VDAC dont plusieurs études suggèrent qu'il participe au contrôle du stress oxydant mitochondrial (voir paragraphe 3.3.2.3, page 60). Par ailleurs, nous n'avons pas observé de différences entre les fonctions mitochondriales (phosphorylation oxydative et résistance à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale) des rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ de notre élevage malgré la diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène chez les rats délétés. Il est possible que cette diminution ne soit pas suffisante pour affecter la fonction des mitochondries. Il faut cependant souligner que ces mesures ont été réalisées sur mitochondries isolées de leur environnement cellulaire qui, on le sait, influence grandement leur activité. D'autre part, les nombreuses études réalisées sur différents modèles de délétion de *Tspo* rapportent des effets variables sur les fonctions mitochondriales (Banati *et al.*, 2014 ; Šileikytė *et al.*, 2011 ; Thai *et al.*, 2018 ; Yao *et al.*, 2020), tout comme il n'existe pas de consensus sur l'effet de la délétion de *Tspo* dans la stéroïdogenèse et le transport mitochondrial de cholestérol.

Dans notre étude, la concentration mitochondriale de cholestérol était similaire chez les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ en conditions basales. Les autres protéines du transducéosome pourraient donc assurer le transport de cholestérol en l'absence de TSPO, peut-être par des phénomènes de compensation qui restent à établir. La délétion de *Tspo* n'a pas entraîné d'altération du phénotype en conditions basales dans notre modèle mais plusieurs études montrent que ce n'est qu'après l'application d'un stress que des effets apparaissent. C'est le cas dans notre étude : l'accumulation mitochondriale de cholestérol lors de la reperfusion était moins

importante chez les rats *Tspo*$^{-/-}$, sans toutefois qu'il y ait de conséquence sur les fonctions mitochondriales. Ces résultats sont en accord avec une étude d'ischémie-reperfusion sur cœur isolé qui avait démontré l'absence d'effet cardioprotecteur de la délétion cardiaque de *Tspo* (Šileikytė *et al.,* 2014), ce qu'ont confirmé les travaux du laboratoire réalisés par Shirin Leick sur le modèle de rats délétés (non publiés). Une autre étude, analysant l'insuffisance cardiaque induite par constriction aortique chez des souris délétées pour *Tspo*, a permis de mettre en évidence une différence entre les animaux mutés et sauvages, sans qu'il y ait de différence à l'état basal (Thai *et al.*, 2018). Dans ce modèle, la délétion de *Tspo* joue un rôle cardioprotecteur en préservant la fonction contractile et les fonctions mitochondriales, et en limitant le remodelage cardiaque. Ces résultats ne sont pas incompatibles avec nos observations. Le modèle de constriction aortique transverse constitue un stress chronique (8 semaines) au cours duquel l'expression de *Tspo* est augmentée, tandis que l'ischémie-reperfusion est un stress aigu (30/15 minutes) qui n'induit pas de modification de l'expression de *Tspo*. Une étude récente a démontré une surexpression de *Tspo* une semaine après un infarctus du myocarde expérimental chez la souris, qui a été confirmée chez des patients ayant fait un infarctus du myocarde (Thackeray *et al.*, 2018). Ainsi, TSPO aurait un rôle physiopathologique plus tardif dans l'ischémie-reperfusion, qui n'a pas pu être observé dans notre étude. Il serait donc intéressant de réaliser un modèle d'ischémie avec un temps de reperfusion plus long afin de déterminer si, comme lors d'une constriction aortique, la délétion de *Tspo* permettrait de réduire le remodelage cardiaque et de préserver la fonction contractile.

❖ Phénotype des rats délétés pour *Tspo* au cours du vieillissement

Les portées issues de croisements homozygotes *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ sont aussi fréquentes, avec un même nombre de ratons et une répartition des sexes comparable. De plus, la répartition des génotypes des portées issues de croisements hétérozygotes *Tspo*$^{+/-}$ suivent les lois de Mendel (Mendel 1865). Ceci remet en question la mortalité embryonnaire des modèles de délétion de *Tspo* souvent décrite dans la littérature.

Dans notre modèle de délétion de *Tspo*, le transport mitochondrial de cholestérol n'est pas altéré et de nombreux paramètres en témoignent. Tout d'abord, les reproductions sont comparables entre les animaux sauvages et délétés. Ensuite, comme mentionné précédemment, le contenu mitochondrial en cholestérol et l'expression de la protéine STAR au niveau cardiaque au moins, ne sont pas altérés. Enfin, les hormones stéroïdes, dosées par spectrométrie de masse, sont comparables entre les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ chez les rats jeunes et au cours du vieillissement. Pourtant, chez ces mêmes rats, une diminution significative de

la testostérone a été mise en évidence par le laboratoire du Pr. Papadopoulos (Owen *et al.*, 2017). Cette différence peut être liée à la procédure expérimentale. En effet, les prélèvements sanguins de notre étude ont été réalisés au moment du pic de sécrétion plasmatique des corticoïdes dans la journée (Nikolaeva *et al.,* 2012 ; Oishi *et al.,* 2006) et non à celui de la testostérone. Notre choix a été motivé par l'importance de ces hormones sur la fonction cardiaque et les publications qui démontrent une stéroïdogenèse cardiaque de corticoïdes (voir paragraphe 1.2.3, page 31). Ainsi, des phénomènes compensatoires pourraient être à l'œuvre pour assurer le transport mitochondrial de cholestérol chez les rats délétés. Une autre hypothèse est que TSPO ne participe à ce processus de transport que dans des situations de stress.

La croissance des rats n'est pas altérée par la délétion de Tspo, mais une différence significative a été mise en évidence chez les rats âgés : les rats *Tspo*$^{-/-}$ présentent une masse corporelle moins importante que les rats *Tspo*$^{+/+}$ pour des tailles comparables. Cette différence ne s'explique pas par une altération de la consommation de nourriture que nous avons mesurée en pesant les croquettes quotidiennement. En effet, nous ne disposions pas de cages métaboliques qui nous auraient permis d'analyser plus précisément la prise alimentaire de ces animaux. Le poids étant un facteur de risque dans de nombreuses pathologies et TSPO étant impliquée dans le métabolisme du cholestérol, nous avons réalisé des bilans lipidiques ainsi que des tests métaboliques pour comparer le comportement métabolique de ces rats au cours du vieillissement. Les concentrations des différents lipides plasmatiques (cholestérol, triglycérides, acides gras libres et HDL), dosés biochimiquement, étaient similaires chez les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$. De même, les tests métaboliques ne révèlent aucune différence entre ces deux groupes au cours du vieillissement. En effet, l'injection de glucose induit une augmentation de la glycémie puis un retour à la glycémie initiale comparables entre les deux groupes. Il en va de même pour le test de tolérance à l'insuline qui montre une évolution de la glycémie similaire chez les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$, ainsi que pour les glycémies basales et mesurées à jeun. Par ailleurs, dans ces expériences, l'injection d'insuline ne provoque pas de forte diminution de la glycémie chez les rats quel que soit le génotype. Ce point est discuté dans le paragraphe dédié aux limites de notre modèle. L'index HOMA-IR, qui reflète la résistance à l'insuline, a été calculé à partir des valeurs de l'insulinémie à jeun et n'a pas révélé de différence significative entre les rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$, confirmant les résultats des tests métaboliques. Fan *et al.* (2019) avaient démontré, dans une lignée murine de délétion totale, le développement d'un phénotype prédiabétique et une revue récente identifie TSPO comme une cible potentielle dans le développement de thérapies anti-diabétiques pour inhiber la

formation de fibrilles du polypeptide amyloïde et ainsi protéger les cellules β pancréatiques (Guillemain *et al.,* 2022). Ce phénomène n'a pas pu être évalué car les rongeurs ne sont pas sujets à la fibrillation des îlots de Langerhans.

Les précurseurs de synthèse de l'hème sont des ligands endogènes de TSPO, c'est pourquoi l'hypothèse de son rôle dans l'érythropoïèse a été émise il y a plusieurs années. Une première étude chez le poisson zèbre délété pour *Tspo* avait révélé une mortalité embryonnaire liée à un défaut de leur lignée érythrocytaire (Rampon *et al.*, 2009). Cependant, l'équipe du Pr. Selvaraj a montré que la délétion totale de *Tspo* dans leur modèle murin n'induisait aucune altération hématologique (Zhao *et al.*, 2016). Les numérations formules sanguines réalisées chez nos rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ au cours du vieillissement confirment les résultats de cette étude : aucun paramètre hématologique n'a été altéré par la délétion de *Tspo*. Nous avons émis l'hypothèse que la TSPO pourrait être impliquée dans la biosynthèse de l'hème en conditions de stress. Cependant, les différents paramètres analysés suite à l'injection d'un agent hémolytique n'indiquent pas de différence chez nos rats à l'exception de la mortalité qui était supérieure chez les rats *Tspo*$^{-/-}$. Cet effet n'est pas nécessairement lié au rôle de TSPO dans la biosynthèse de l'hème car, d'après l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS 2007), la phénylhydrazine induit des lésions hépatiques, spléniques et rénales auxquelles les rats délétés peuvent être plus sensibles. Ces résultats préliminaires sont à confirmer par les analyses des précurseurs de la lignée érythroblaste grâce aux expériences de FACS et à la lecture de frottis, qui permettront d'établir l'effet éventuel de TSPO sur l'érythropoïèse de stress.

Pris dans leur ensemble, nos résultats remettent en question l'implication de TSPO dans les processus biologiques étudiés en conditions basales. Le phénotype non altéré des rats *Tspo*$^{-/-}$ de notre élevage (et des modèles décrits dans la littérature) peut être dû à la grande capacité d'adaptation des mitochondries pour maintenir leurs fonctions en conditions de stress (Gut *et al.*, 2015). Il pourrait aussi être attribuable à ses interactions protéiques au sein du transducéosome qui font que son absence ne suffit pas à altérer certaines fonctions physiologiques en conditions de base. Il est également possible que des mécanismes compensatoires aient été déclenchés pour pallier l'absence de TSPO, soit au cours du développement des rats, soit dès la genèse de ces animaux. En effet, l'obtention de ces rats s'est révélée difficile : seul un rat *Tspo*$^{+/-}$ est né suite aux modifications génétiques des embryons (Owen *et al.*, 2017). Il est possible qu'en plus de la délétion de TSPO, une mutation additionnelle ait été engendrée, palliant l'absence de TSPO et permettant ainsi le

développement de l'animal. Par ailleurs, il faut souligner que la caractérisation de ces animaux délétés présente un certain nombre de limites qui sont analysées dans le paragraphe suivant.

❖ Limites de l'étude du modèle de rats délétés pour *Tspo*

La principale limite de ce travail a été la limitation du nombre d'animaux disponibles en raison de la place à l'animalerie et du vide sanitaire réalisé à cause de la pandémie de COVID-19. En effet, les protocoles ont dû être mis au point sur des animaux du commerce (Laboratoires Janvier) et nous avons observé d'importantes différences entre les rats du commerce et les rats *Tspo*$^{+/+}$ de l'élevage au niveau des fonctions mitochondriales par exemple. Bien que ces rats soient tous de la souche Sprague Dawley, les rats de notre colonie sont issus d'un élevage canadien (Owen *et al.*, 2017) tandis que les rats obtenus dans le commerce sont issus d'un élevage français. Ces « lignées » ont évolué en parallèle et ont sûrement dérivé l'une de l'autre. C'est pourquoi les témoins de tous les résultats présentés dans ce travail sont des rats *Tspo*$^{+/+}$ de notre colonie et non des rats sauvages du commerce. Ceci a entraîné une autre problématique : la mise au point des conditions expérimentales réalisée chez les rats du commerce n'était pas toujours optimale pour étudier les rats de notre élevage. C'est le cas, par exemple, du modèle d'hypoxie-réoxygénation sur cardiomyocytes primaires isolés employé dans le laboratoire (Panel *et al.*, 2017a ; Schaller *et al.*, 2010), qui a révélé une différence de sensibilité importante de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale entre des cardiomyocytes issus de rats du commerce et ceux extraits à partir des rats de l'élevage. En effet, les conditions expérimentales de ce modèle n'induisent pas une mortalité suffisante des cardiomyocytes issus des rats de notre élevage pour étudier l'effet de la délétion de *Tspo*. C'est également le cas du test de tolérance à l'insuline : une dose de 0,5 UI/kg avait été injectée à des rats du commerce et celle-ci induisait une diminution de la glycémie deux fois plus importante que chez les rats de l'élevage du même âge et ce, quel que soit leur génotype. La dose d'insuline a donc été doublée (1 UI/kg) pour la caractérisation du métabolisme lipidique des rats *Tspo*$^{+/+}$ et *Tspo*$^{-/-}$ de notre élevage mais il est possible que notre modèle de test de tolérance à l'insuline ne soit pas assez puissant pour mettre en évidence des différences entre les rats. La durée du jeun et/ou la dose d'insuline pourraient être augmentées. Afin de mettre en évidence un éventuel effet de la délétion de *Tspo* sur le métabolisme lipidique, il pourrait être intéressant de soumettre les rats à un stress métabolique chronique comme un régime riche en graisse.

La variabilité des paramètres en conditions basales et de stress entre deux lignées de la même souche met en lumière la dépendance des résultats à leur modèle d'étude. Un back-crossing

(croisement de rats *Tspo*$^{+/-}$ de l'élevage avec des rats sauvages du commerce sur au moins dix générations pour purifier la lignée) a été réalisé et sera utilisé par la suite dans le laboratoire. En effet, les rats *Tspo*$^{+/+}$ issus de cette colonie seront (en théorie) identiques aux rats sauvages du commerce, ce qui permettra une mise au point des protocoles plus adaptée.

Une autre limite de ce travail est l'absence d'étude du rôle de la délétion sur la voie mitochondriale de biosynthèse des acides biliaires dans laquelle TSPO pourrait être impliquée mais qui ne constitue qu'une voie minoritaire de cette synthèse (Li *et al.,* 2017) et sur la fonction cérébrale qui est étudiée par d'autres laboratoires (Daugherty *et al.*, 2016 ; Farhan *et al.*, 2021 ; Klee *et al.*, 2019 ; Wolf *et al.*, 2020).

Une des principales difficultés dans l'étude de TSPO réside dans l'absence de *endpoint*, de paramètre à mesurer qui reflète son activité puisque celle-ci n'est pas clairement établie. Cependant, cela ne remet pas en cause les très nombreuses études *in vitro, in vivo* et cliniques qui révèlent l'implication de TSPO en conditions de stress chroniques ou lors de l'administration de ses ligands (Lacapère *et al.*, 2001, 2003 ; Papadopoulos *et al.*, 2006, 2015). Elle reste donc une cible intéressante à étudier dans de nombreuses pathologies et notamment l'infarctus du myocarde, comme en témoignent la présente étude et les précédentes (voir paragraphe 3.3.5, page 76). C'est pourquoi, nous avons cherché à développer un modèle d'hypoxie-réoxygénation *in vitro* pour pouvoir étudier les effets protecteurs de certains de ses ligands, en particulier les derniers développés par l'équipe du Pr. Papadopoulos. Ce modèle a également été développé pour pouvoir analyser les lipides cellulaires cardiaques, au vu des résultats obtenus avec le cholestérol dans les mitochondries au cours de l'ischémie-reperfusion.

❖ Mise au point du modèle d'hypoxie-réoxygénation

Les modèles expérimentaux d'hypoxie-réoxygénation sur lignée cellulaire présentent l'avantage de pouvoir tester de nombreuses conditions en peu de temps, sans utiliser d'animaux. Ils permettent un premier *screening* des molécules et des études mécanistiques à l'aide de modifications de l'expression de certaines protéines et/ou d'agents pharmacologiques. Cependant, ces modèles ont l'inconvénient d'être très simplistes. L'hypoxie-réoxygénation est étudiée sur un seul type cellulaire, dans notre cas les cardiomyocytes, sans interactions avec les autres types cellulaires et sans les facteurs environnementaux présents lors de l'ischémie-reperfusion, comme la régulation du système nerveux sympathique ou la libération de cytokines inflammatoires (Lecour *et al.*, 2014). De plus, les cardiomyocytes de lignée se

multiplient tandis que les cardiomyocytes primaires sont des cellules post-mitotiques (Engel *et al.*, 2005). Enfin, une diminution de la mortalité *in vitro* n'est pas le gage d'une réduction de la taille d'infarctus *in vivo* (Lindsey *et al.*, 2018).

Les modèles décrits dans la littérature reposent sur la combinaison d'une privation en oxygène et en nutriments : les cellules sont incubées en hypoxie (1% O_2) soit dans le milieu habituel de culture privé de sérum et/ou dépourvu de glucose, soit dans un milieu minimum (du PBS notamment). Dans notre modèle, nous avons sélectionné les conditions suivantes : les cellules contrôles ont été incubées dans du milieu sans sérum et les cellules privées de nutriments dans du PBS. Ce choix a été motivé par deux critères : le sérum contient des oxydants et sa composition exacte varie d'un lot à l'autre, ce qui peut induire une variabilité dans les résultats (Van der Valk *et al.*, 2018) et la privation en sérum provoque simplement un arrêt de la prolifération et non une mortalité cellulaire. Différentes durées de privation ont été testées et l'incubation de 14 heures dans du PBS a été sélectionnée car elle permet d'obtenir une mortalité de 50%, comme le préconisent les recommandations de la Société Européenne de Cardiologie, concernant les modèles d'hypoxie-réoxygénation *in vitro* (Lecour *et al.*, 2014). En revanche, l'incubation des cellules en hypoxie (1% O_2) n'a pas induit de mortalité et lorsqu'elle est combinée à une privation en nutriments, elle n'induit pas de mortalité supplémentaire. Les cellules AC16 ne semblent donc pas être sensibles à l'hypoxie dans ce modèle. En effet, l'expression d'*Hif1*α, marqueur cellulaire d'hypoxie, n'a pas été augmentée. Cette protéine est induite dans des modèles d'hypoxie-réoxygénation sur différents types cellulaires cardiaques comme les cardiomyocytes de lignée ou les cardiomyocytes primaires néonataux mais les conditions expérimentales de ces études, notamment les durées d'hypoxie-réoxygénation, diffèrent des nôtres (Bian *et al.*, 2011 ; Hou *et al.*, 2020)**.** Cependant, il est possible, que dans notre étude, *Hif1*α ait été augmentée de façon précoce, avant le *endpoint* de 14 heures (Otterbein *et al.*, 2016). Il est également possible qu'une teneur en oxygène de 1% ne soit pas suffisante pour induire une hypoxie chez ces cellules et qu'il faudrait encore réduire ce taux (O_2 < 1%).

Ces résultats sont surprenants puisque l'ensemble des publications basées sur des modèles similaires d'hypoxie-réoxygénation, utilisant des cellules AC16, conclut que les effets mis en évidence, comme la mortalité cellulaire ou l'activation/l'inhibition de voies de signalisation, sont effectivement induits par l'hypoxie-réoxygénation. Selon nos résultats, il semble que l'hypoxie ne soit pas à l'origine des effets observés dans ces modèles. L'ensemble des publications utilisent la combinaison de la privation en nutriments et en oxygène. C'est d'ailleurs ce que

préconisent les recommandations de la Société Européenne de Cardiologie (Lecour *et al.*, 2014). Cependant, aucun contrôle sur les paramètres étudiés n'est jamais présenté montrant l'effet de la privation en nutriments ou en oxygène seule (Benoist *et al.*, 2019 ; Cao *et al.*, 2021 ; Lefort *et al.*, 2018 ; Z. Li *et al.*, 2022 ; Q. Li *et al.*, 2022 ; Liang *et al.*, 2020 ; Lu *et al.*, 2020 ; Manning *et al.*, 2019 ; Marwarha *et al.*, 2021 ; O'Shea *et al.*, 2017 ; Ouyang *et al.*, 2020 ; Park *et al.*, 2021 ; Peng *et al.*, 2021 ; Stoner *et al.*, 2020 ; Q.-H. Tong *et al.*, 2021 ; X. Tong *et al.*, 2021 ; Wang *et al.*, 2020, 2021 ; Zhan *et al.*, 2022 ; C. Zhang *et al.*, 2021 ; X.-H. Zhang *et al.*, 2021 ; Zhao *et al.*, 2021 ; Zhou *et al.*, 2020). Les modèles *in vitro* d'hypoxie-réoxygénation utilisant d'autres types cellulaires, comme les lignées cardiaques H9C2 et HL1 (Kuznetsov *et al.*, 2015) ou même les cardiomyocytes primaires néonataux (Song *et al.*, 2019) et adultes (Portal *et al.*, 2013), sont basés sur les mêmes conditions expérimentales (privation en nutriments et en oxygène). Il existe de nombreux autres modèles d'hypoxie-réoxygénation cardiaques, ajoutant des conditions supplémentaires pour reproduire au mieux les conditions observées *in vivo* : acidification du pH, ajout de déchets métaboliques, etc. (Lecour *et al.*, 2014). Cependant, l'ensemble des modèles repose sur un changement de la composition du milieu hypoxique, sans contrôles des effets du milieu hypoxique en normoxie. Notre étude suggère donc qu'il peut exister un biais expérimental à prendre en considération dans l'interprétation des résultats issus de modèles d'hypoxie-réoxygénation *in vitro* similaires. En effet, dans notre modèle, les modifications obtenues ne sont provoquées que par la privation en nutriments. Les variations d'oxygène observées lors de la reperfusion d'un myocarde ischémié n'ont pas d'effet dans notre modèle alors qu'elles jouent un rôle majeur dans les lésions de reperfusion *in vivo* et chez l'Homme.

Notre modèle, en revanche, révèle que la privation en nutriments induit une forte altération du métabolisme lipidique chez ces cellules, associant une diminution de la protéine STAR, une accumulation massive de gouttelettes lipidiques (constituées d'acides gras, triglycérides et esters de cholestérol) et une redistribution du cholestérol membranaire. Le métabolisme énergétique mitochondrial des cellules AC16 ayant pu être modifié par leur fusion avec les fibroblastes, ces résultats sont à confirmer dans un modèle de cardiomyocytes primaires puis à terme, dans le modèle expérimental d'ischémie-reperfusion cardiaque. En effet, le cholestérol cellulaire est fortement affecté à la reperfusion et joue un rôle majeur dans la physiopathologie de l'infarctus du myocarde mais les autres lipides cellulaires, comme les triglycérides et les acides gras libres n'ont à ce jour pas encore été étudiés.

D'un point de vue clinique, la distinction entre privation en nutriments et privation en oxygène n'est pas pertinente parce que, de fait, l'infarctus est provoqué par l'occlusion d'une artère coronaire et résulte donc de ces deux stress. Cependant, tout comme le pré-conditionnement (Murry *et al.*, 1986) qui n'a aucune pertinence clinique mais qui a significativement contribué aux progrès des connaissances dans le domaine de la cardioprotection (Hausenloy *et al.*, 2016), la distinction entre privation en oxygène et en nutriments présente un intérêt pour l'étude mécanistique des processus intervenant au cours de l'ischémie-reperfusion.

❖ Conclusion & perspectives

Notre étude a permis l'identification d'un mécanisme impliquant TSPO et STAR dans l'accumulation mitochondriale de cholestérol à la reperfusion d'un myocarde ischémié. Ce mécanisme représente une cible potentielle pour développer des stratégies cardioprotectrices, particulièrement parce qu'il implique la régulation du cholestérol, facteur de risque, d'aggravation et d'échec thérapeutique de l'infarctus. L'étude de lipides cardiaques au cours de l'ischémie-reperfusion constitue une perspective d'étude des lésions de reperfusion car seul le cholestérol a été étudié dans ce travail mais son métabolisme est lié aux autres lipides cellulaires comme les triglycérides et les acides gras.

Le développement du modèle d'hypoxie réoxygénation sur les cellules de la lignée AC16 pour étudier les mécanismes d'accumulation de cholestérol dans les mitochondries et les lipides cardiaques *in vitro* n'a pas abouti. Ce modèle a révélé l'absence d'effet de l'hypoxie sur la mortalité des cellules, qui n'a été induite que par la privation en nutriments, ce qui soulève une interrogation quant à l'interprétation des résultats de publications basées sur des modèles similaires. La privation en nutriments a également provoqué une forte altération des lipides cellulaires mais ces résultats sont à confirmer sur des cardiomyocytes primaires.

Une partie de ce travail de thèse repose sur l'utilisation de rats délétés pour *Tspo*. Leur caractérisation a révélé l'absence d'altération de leur phénotype, notamment cardiaque : les fonctions mitochondriales et les paramètres morphologiques, histologiques et fonctionnels du myocarde des rats *Tspo*$^{-/-}$ sont similaires à ceux des rats *Tspo*$^{+/+}$. Par ailleurs, la délétion de *Tspo* ne semble pas altérer les fonctions biologiques l'impliquant, que ce soit la stéroïdogenèse ou la biosynthèse de l'hème. Actuellement, la TSPO est très étudiée comme marqueur de l'inflammation au niveau cérébral. Le lien entre TSPO et inflammation dans le cœur, et particulièrement au cours de pathologies comme l'infarctus du myocarde, n'a pas été exploré et cet aspect pourrait constituer un prochain sujet d'étude du laboratoire. Depuis sa découverte

et les premières tentatives de développement de modèle animaux de délétion, qui datent de plus de vingt ans, la TSPO reste une énigme quant à sa fonction, comme en témoigne notre étude et les très nombreuses autres, publiées depuis plus de quarante ans.

Pris dans leur ensemble, nos résultats soulignent l'importance que jouent les lipides, et en particulier le cholestérol, dans la physiopathologie de l'infarctus du myocarde et la nécessité de poursuivre les recherches pour identifier les mécanismes les impliquant afin de pouvoir les cibler dans le développement de stratégies cardioprotectrices.

PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

Publications

2021. Circulation. *Dysregulated Phenylalanine Catabolism Plays a Key Role in the Trajectory of Cardiac Aging.* Gabor Czibik*, Zaineb Mezdari*, Dogus Murat Altintas*, Juliette Bréhat, Maria Pini, Thomas d'Humières, Thaïs Delmont, Costin Radu, Marielle Breau, Hao Liang, Cécile Martel, Azania Abatan, Rizwan Sarwar, Ophélie Marion, Suzain Naushad, Yanyan Zhang, Maissa Halfaoui, Nadine Suffee, Didier Morin, Serge Adnot, Stéphane Hatem, Arash Yavari, Daigo Sawaki, Geneviève Derumeaux. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.121.054204

*Contributed equally

Soumis à Cardiovascular Research. *Identification of a mechanism promoting mitochondrial sterol accumulation during myocardial ischemia-reperfusion: role of TSPO and STAR.* Juliette Bréhat*, Shirin Leick*, Julien Musman, Jin Bo Su, Nicolas Eychenne, Frank Giton, Michael Rivard, Louis-Antoine Barel, Chiara Tropeano, Claudio Caccia, Valerio Leoni, Bijan Ghaleh, Sandrine Pons & Didier Morin.

*Contributed equally

Soumis à Fundamental & Clinical Pharmacology. *Opening of mitochondrial permeability transition pore in cardiomyocytes: is ferutinin a suitable tool for its assessment?* Juliette Bréhat, Mathieu Panel, Bijan Ghaleh, Didier Morin.

Soumis à Basic Research in Cardiology. *Three-vessel coronary infusion of cardiosphere-derived cells for the treatment of heart failure with preserved ejection fraction in a pre-clinical pig model.* Romain Gallet, Jin-Bo Su, Paul-Matthieu Chiaroni, Alain Bizé, Daphné Corboz, Jackeline Valle, Juliette Bréhat, Lucien Sambin, Guillaume Thery, Aurélien De Pommereau, Pierre Denormandie, Emmanuel Teiger, Eduardo Marban, Bijan Ghaleh.

En cours de préparation. *In vivo* strategies in the modulation of *Tspo* gene expression. Juliette Bréhat, Didier Morin.

Communications

2022. Printemps de la Cardiologie (flash poster). *Hypoxia-reoxygenation induces neutral lipid accumulation in cardiomyocytes.* Juliette Bréhat, Alexis Nguyen, Leeyah Issop, Nario Tomishige, Toshihide Kobayashi, Sandrine Pons, Bijan Ghaleh, Didier Morin.

2021. Printemps de la Cardiologie (poster). *Effects of TSPO and STAR inhibitors on cell death in a cardiomyocyte model of hypoxia-reoxygenation.* Juliette Bréhat, Shirin Leick, Leeyah Issop, Nario Tomishige, Toshihide Kobayashi, Bijan Ghaleh, Sandrine Pons, Didier Morin.

2021. Printemps de la Cardiologie (poster). *Myocardial ischemia-reperfusion induces STAR translocation into mitochondria independently from TSPO.* Shirin Leick, Juliette Bréhat, Julien Musman, Bijan Ghaleh, Didier Morin, Sandrine Pons.

2021. Congrès SFPT (poster). Is ferutinine, a calcium ionophore a suitable tool for the investigation of mitochondrial permeability transition pore opening in murine isolated adult cardiomyocytes? Juliette Bréhat, Mathieu Panel, Bijan Ghaleh, Didier Morin.

2021. Congrès SFPT (poster). 4'-Chlorodiazepam, a TSPO ligand, inhibits STAR translocation and mitochondrial cholesterol accumulation after myocardial ischemia-reperfusion. Shirin Leick, Juliette Bréhat, Julien Musman, Bijan Ghaleh, Didier Morin, Sandrine Pons.

2020. Printemps de la Cardiologie (poster). *Characterization of a rat model deleted for TSPO, a protein involved in cardioprotection mechanisms.* Juliette Bréhat, Shirin Leick, Jin-Bo Su, Lucien Sambin, Sandrine Pons, Bijan Ghaleh, Didier Morin.

2020. Printemps de la Cardiologie (poster). *Myocardial ischemia-reperfusion induces STAR translocation and cholesterol accumulation via TSPO in cardiac mitochondria.* Shirin Leick, Juliette Bréhat, Julien Musman, Bijan Ghaleh, Didier Morin, Sandrine Pons.

2019. Printemps de la Cardiologie (poster). Ferutinine as a calcium ionophore for the investigation of mitochondrial permeability transition pore opening in murine isolated adult cardiomyocytes. Juliette Bréhat, Mathieu Panel, Bijan Ghaleh, Didier Morin.

2019. Printemps de la Cardiologie (poster). *Consequences of TSPO deletion on cardiac phenotype and mitochondrial function in rats.* Shirin Leick, Juliette Bréhat, Julien Musman, Jin-Bo Su, Bijan Ghaleh, Didier Morin, Sandrine Pons.

BIBLIOGRAPHIE

Abbate, Antonio, Stefano Toldo, Carlo Marchetti, Jordana Kron, Benjamin W. Van Tassell, et Charles A. Dinarello. 2020. « Interleukin-1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease ». *Circulation Research* 126(9):1260-80. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.315937.

Abel, E. Dale, Sheldon E. Litwin, et Gary Sweeney. 2008. « Cardiac Remodeling in Obesity ». *Physiological Reviews* 88(2):389-419. doi: 10.1152/physrev.00017.2007.

Ahn, Sung Soo, Young-Jin Kim, Jin Hur, Hye-Jeong Lee, Tae Hoon Kim, Kyu Ok Choe, et Byoung Wook Choi. 2009. « CT Detection of Subendocardial Fat in Myocardial Infarction ». *American Journal of Roentgenology* 192(2):532-37. doi: 10.2214/AJR.08.1608.

Akar, F. G. 2005. « The Mitochondrial Origin of Postischemic Arrhythmias ». *Journal of Clinical Investigation* 115(12):3527-35. doi: 10.1172/JCI25371.

Akula, Nagaraju, Andrew Midzak, Laurent Lecanu, et Vassilios Papadopoulos. 2012. « Identification of Small-Molecule Inhibitors of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein (STARD1) by Structure-Based Design ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22(12):4139-43. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.04.058.

Alemáan, C. L., R. M. Más, I. Rodeiro, M. Noa, C. Hernández, R. Menéndez, et R. Gámez. 1998. « Reference Database of the Main Physiological Parameters in Sprague-Dawley Rats from 6 to 32 Months ». *Laboratory Animals* 32(4):457-66. doi: 10.1258/002367798780599802.

Anderson, Jeffrey L., et David A. Morrow. 2017. « Acute Myocardial Infarction » édité par E. W. Campion. *New England Journal of Medicine* 376(21):2053-64. doi: 10.1056/NEJMra1606915.

Andreadou, Ioanna, Andreas Daiber, Gary F. Baxter, Maria Felice Brizzi, Fabio Di Lisa, Nina Kaludercic, Antigone Lazou, Zoltán V. Varga, Coert J. Zuurbier, Rainer Schulz, et Péter Ferdinandy. 2021. « Influence of Cardiometabolic Comorbidities on Myocardial Function, Infarction, and Cardioprotection: Role of Cardiac Redox Signaling ». *Free Radical Biology and Medicine* 166:33-52. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.02.012.

Andreadou, Ioanna, Efstathios K. Iliodromitis, Antigone Lazou, Anikó Görbe, Zoltán Giricz, Rainer Schulz, et Péter Ferdinandy. 2017. « Effect of Hypercholesterolaemia on Myocardial Function, Ischaemia-Reperfusion Injury and Cardioprotection by Preconditioning, Postconditioning and Remote Conditioning: Hypercholesterolaemia and Cardioprotection ». *British Journal of Pharmacology* 174(12):1555-69. doi: 10.1111/bph.13704.

Andreadou, Ioanna, Rainer Schulz, Lina Badimon, Adriana Adameová, Petra Kleinbongard, Sandrine Lecour, Panagiota-Efstathia Nikolaou, Ines Falcão-Pires, Gemma Vilahur, Nicholas Woudberg, Gerd

Heusch, et Péter Ferdinandy. 2020. « Hyperlipidaemia and Cardioprotection: Animal Models for Translational Studies ». *British Journal of Pharmacology* 177(23):5287-5311. doi: 10.1111/bph.14931.

Anon. 2010. « Triglyceride-Mediated Pathways and Coronary Disease: Collaborative Analysis of 101 Studies ». *The Lancet* 375(9726):1634-39. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60545-4.

Arbo, B. D., F. Benetti, L. M. Garcia-Segura, et M. F. Ribeiro. 2015. « Therapeutic Actions of Translocator Protein (18 KDa) Ligands in Experimental Models of Psychiatric Disorders and Neurodegenerative Diseases ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 154:68-74. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.07.007.

Arca, Marcello, Silvia Natoli, Fausta Micheletta, Sara Riggi, Emanuele Di Angelantonio, Anna Montali, Teresa Maria Antonini, Roberto Antonini, Ulf Diczfalusy, et Luigi Iuliano. 2007. « Increased Plasma Levels of Oxysterols, in Vivo Markers of Oxidative Stress, in Patients with Familial Combined Hyperlipidemia: Reduction during Atorvastatin and Fenofibrate Therapy ». *Free Radical Biology and Medicine* 42(5):698-705. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.013.

Atar, D., H. Arheden, A. Berdeaux, J. L. Bonnet, M. Carlsson, P. Clemmensen, V. Cuvier, N. Danchin, J. L. Dubois-Rande, H. Engblom, D. Erlinge, H. Firat, S. Halvorsen, H. S. Hansen, W. Hauke, E. Heiberg, S. Koul, A. I. Larsen, P. Le Corvoisier, J. E. Nordrehaug, F. Paganelli, R. M. Pruss, H. Rousseau, S. Schaller, G. Sonou, V. Tuseth, J. Veys, E. Vicaut, et S. E. Jensen. 2015. « Effect of Intravenous TRO40303 as an Adjunct to Primary Percutaneous Coronary Intervention for Acute ST-Elevation Myocardial Infarction: MITOCARE Study Results ». *European Heart Journal* 36(2):112-19. doi: 10.1093/eurheartj/ehu331.

Augustus, Ayanna S., Jonathan Buchanan, Tae-Sik Park, Kumiko Hirata, Hye-lim Noh, Jie Sun, Shunichi Homma, Jeanine D'armiento, E. Dale Abel, et Ira J. Goldberg. 2006. « Loss of Lipoprotein Lipase-Derived Fatty Acids Leads to Increased Cardiac Glucose Metabolism and Heart Dysfunction ». *Journal of Biological Chemistry* 281(13):8716-23. doi: 10.1074/jbc.M509890200.

Austin, Christopher J. D., Jan Kahlert, Michael Kassiou, et Louis M. Rendina. 2013. « The Translocator Protein (TSPO): A Novel Target for Cancer Chemotherapy ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45(7):1212-16. doi: 10.1016/j.biocel.2013.03.004.

Bachmann, Justin M., Benjamin L. Willis, Colby R. Ayers, Amit Khera, et Jarett D. Berry. 2012. « Association Between Family History and Coronary Heart Disease Death Across Long-Term Follow-Up in Men: The Cooper Center Longitudinal Study ». *Circulation* 125(25):3092-98. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.065490.

Balaban, Robert S. 2012. « Metabolic Homeostasis of the Heart ». *Journal of General Physiology* 139(6):407-14. doi: 10.1085/jgp.201210783.

Ballard, Fred B., William H. Danforth, Siegfried Naegle, et Richard J. Bing. 1960. « MYOCARDIAL METABOLISM OF FATTY ACIDS* ». *Journal of Clinical Investigation* 39(5):717-23. doi: 10.1172/JCI104088.

Banati, Richard B., Ryan J. Middleton, Ronald Chan, Claire R. Hatty, Winnie Wai-Ying Kam, Candice Quin, Manuel B. Graeber, Arvind Parmar, David Zahra, Paul Callaghan, Sandra Fok, Nicholas R. Howell, Marie Gregoire, Alexander Szabo, Tien Pham, Emma Davis, et Guo-Jun Liu. 2014. « Positron Emission Tomography and Functional Characterization of a Complete PBR/TSPO Knockout ». *Nature Communications* 5(1):5452. doi: 10.1038/ncomms6452.

Barau, Caroline, Bijan Ghaleh, Alain Berdeaux, et Didier Morin. 2015. « Cytochrome P450 and Myocardial Ischemia: Potential Pharmacological Implication for Cardioprotection ». *Fundamental & Clinical Pharmacology* 29(1):1-9. doi: 10.1111/fcp.12087.

Barron, Anna M., Makoto Higuchi, Satoko Hattori, Seiji Kito, Tetsuya Suhara, et Bin Ji. 2021. « Regulation of Anxiety and Depression by Mitochondrial Translocator Protein-Mediated Steroidogenesis: The Role of Neurons ». *Molecular Neurobiology* 58(2):550-63. doi: 10.1007/s12035-020-02136-5.

Barron, Anna M., Bin Ji, Seiji Kito, Tetsuya Suhara, et Makoto Higuchi. 2018. « Steroidogenic Abnormalities in Translocator Protein Knockout Mice and Significance in the Aging Male ». *Biochemical Journal* 475(1):75-85. doi: 10.1042/BCJ20170645.

Batarseh, Amani, et Vassilios Papadopoulos. 2010. « Regulation of Translocator Protein 18kDa (TSPO) Expression in Health and Disease States☆ ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 327(1-2):1-12. doi: 10.1016/j.mce.2010.06.013.

Béliard-Lasserre, Sophie. 2018. « Nouveaux traitements des dyslipidémies : la révolution des biothérapies ». *Médecine Clinique Endocrinologie & Diabète* 95:5.

Benhabbouche, S., C. Crola da silva, M. Abrial, et R. Ferrera. 2011. « Base des phénomènes d'ischémie reperfusion et de la protection myocardique ». *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 30:S2-16. doi: 10.1016/S0750-7658(11)70002-8.

Benoist, Lauriane, Stéphanie Chadet, Thibaud Genet, Claudie Lefort, Audrey Heraud, Maria D. Danila, Danina M. Muntean, Christophe Baron, Denis Angoulvant, Dominique Babuty, Thierry Bourguignon, et Fabrice Ivanes. 2019. « Stimulation of P2Y11 Receptor Protects Human Cardiomyocytes against Hypoxia/Reoxygenation Injury and Involves PKCε Signaling Pathway ». *Scientific Reports* 9(1):11613. doi: 10.1038/s41598-019-48006-6.

Benowitz, Neal L., et Joseph B. Fraiman. 2017. « Cardiovascular Effects of Electronic Cigarettes ». *Nature Reviews Cardiology* 14(8):447-56. doi: 10.1038/nrcardio.2017.36.

Bernardi, Paolo, Michela Carraro, et Giovanna Lippe. 2021. « The Mitochondrial Permeability Transition: Recent Progress and Open Questions ». *The FEBS Journal* febs.16254. doi: 10.1111/febs.16254.

Bernardi, Paolo, et Fabio Di Lisa. 2015. « The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Molecular Nature and Role as a Target in Cardioprotection ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 78:100-106. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.09.023.

Bernardi, Paolo, Andrea Rasola, Michael Forte, et Giovanna Lippe. 2015. « The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology ». *Physiological Reviews* 95(4):1111-55. doi: 10.1152/physrev.00001.2015.

Berthomieu, Dorothée, Philippe Büttgen, Olivier Coutard, Stéphane Delalande, Julie Gavard, Yaël Grosjean, Claudine Kahane, Benoit Mosser, Dimitri Peaucelle, Marc Regny-Demery, Anne-Magali Seydoux, Isabelle Théry, et Nathalie Vienne-Guerrin. 2019. « La recherche publique en France en 2019 : Diagnostic et propositions du Comité national ».

Bian, Yun-fei, Xiao-yan Hao, Feng Gao, Hui-yu Yang, Nana Zang, et Chuan-shi Xiao. 2011. « Adiponectin Attenuates Hypoxia/Reoxygenation-Induced Cardiomyocyte Injury Through Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress ». *Journal of Investigative Medicine* 59(6):921-25. doi: 10.2310/JIM.0b013e318216ad04.

Bilheimer, DW, LM Buja, RW Parkey, FJ Bonte, et JT Willerson. 1978. « Fatty Acid Accumulation and Abnormal Lipid Deposition in Peripheral and Border Zones of Experimental Myocardial Infarcts ». *Journal of Nuclear Medicine* 19:276-83.

Billon-Galés, Audrey, Coralie Fontaine, Cédric Filipe, Victorine Drouin-Echinard, Marie-José Fouque, Gilles Flouriot, Pierre Gourdy, Françoise Lenfant, Henrik Laurell, Andrée Krust, Pierre Chambon, et Jean-François Arnal. 2009. « The transactivating function 1 of estrogen receptor alpha is dispensable for the vasculoprotective actions of 17beta-estradiol ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(6):2053-58. doi: 10.1073/pnas.0808742106.

Bird, J. L. E., D. Izquierdo-Garcia, J. R. Davies, J. H. F. Rudd, K. C. Probst, N. Figg, J. C. Clark, P. L. Weissberg, A. P. Davenport, et E. A. Warburton. 2010. « Evaluation of Translocator Protein Quantification as a Tool for Characterising Macrophage Burden in Human Carotid Atherosclerosis ». *Atherosclerosis* 210(2):388-91. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.11.047.

Bloch, Konrad. 1965. « the Biological Synthesis of Cholesterol ». *Science* 150(692):19-28.

Bodo, Bernard. 2015. « Saga du cholestérol : de la substance à la structure ». *L'actualité chimique* Août-septembre 2015(399):7.

Boengler, K., R. Schulz, et G. Heusch. 2009. « Loss of Cardioprotection with Ageing ». *Cardiovascular Research* 83(2):247-61. doi: 10.1093/cvr/cvp033.

Bono, F., I. Lamarche, V. Prabonnaud, G. Le Fur, et J. M. Herbert. 1999. « Peripheral Benzodiazepine Receptor Agonists Exhibit Potent Antiapoptotic Activities ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265(2):457-61. doi: 10.1006/bbrc.1999.1683.

Bordet, Thierry, Bruno Buisson, Magali Michaud, Cyrille Drouot, Pascale Galéa, Pierre Delaage, Natalia P. Akentieva, Alex S. Evers, Douglas F. Covey, Mariano A. Ostuni, Jean-Jacques Lacapère, Charbel Massaad, Michael Schumacher, Esther-Marie Steidl, Delphine Maux, Michel Delaage, Christopher E. Henderson, et Rebecca M. Pruss. 2007. « Identification and Characterization of Cholest-4-En-3-One, Oxime (TRO19622), a Novel Drug Candidate for Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322(2):709-20. doi: 10.1124/jpet.107.123000.

Bose, Himangshu S., Randy M. Whittal, Brendan Marshall, Maheshinie Rajapaksha, Ning Ping Wang, Madhuchanda Bose, Elizabeth W. Perry, Zhi-Qing Zhao, et Walter L. Miller. 2021. « A Novel Mitochondrial Complex of Aldosterone Synthase, Steroidogenic Acute Regulatory Protein, and Tom22 Synthesizes Aldosterone in the Rat Heart ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 377(1):108-20. doi: 10.1124/jpet.120.000365.

Bøtker, Hans Erik. 2015. « Mitochondrial Care in Acute Myocardial Infarction ». *European Heart Journal* 36(2):77-79. doi: 10.1093/eurheartj/ehu380.

Braestrup, C., et R. F. Squires. 1977. « Specific Benzodiazepine Receptors in Rat Brain Characterized by High-Affinity (3H)Diazepam Binding. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(9):3805-9. doi: 10.1073/pnas.74.9.3805.

Braud, Laura, Maria Pini, Donald F. Stec, Sylvie Manin, Geneviève Derumeaux, David E. Stec, Roberta Foresti, et Roberto Motterlini. 2021. « Increased Sirt1 Secreted from Visceral White Adipose Tissue Is Associated with Improved Glucose Tolerance in Obese Nrf2-Deficient Mice ». *Redox Biology* 38:101805. doi: 10.1016/j.redox.2020.101805.

Brown, Andrew J., et Wendy Jessup. 1999. « Oxysterols and Atherosclerosis ». *Atherosclerosis* 142(1):1-28. doi: 10.1016/S0021-9150(98)00196-8.

Brown, Andrew J., Laura J. Sharpe, et Michael J. Rogers. 2021. « Oxysterols: From Physiological Tuners to Pharmacological Opportunities ». *British Journal of Pharmacology* 178(16):3089-3103. doi: 10.1111/bph.15073.

Brown, D. A., M. A. Aon, F. G. Akar, T. Liu, N. Sorarrain, et B. O'Rourke. 2008. « Effects of 4'-Chlorodiazepam on Cellular Excitation-Contraction Coupling and Ischaemia-Reperfusion Injury in Rabbit Heart ». *Cardiovascular Research* 79(1):141-49. doi: 10.1093/cvr/cvn053.

Brown, Deborah A., et Erwin London. 2000. « Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-Rich Membrane Rafts ». *Journal of Biological Chemistry* 275(23):17221-24. doi: 10.1074/jbc.R000005200.

Burroughs Peña, Melissa S., et Allman Rollins. 2017. « Environmental Exposures and Cardiovascular Disease ». *Cardiology Clinics* 35(1):71-86. doi: 10.1016/j.ccl.2016.09.001.

Cadenas, Susana. 2018. « Mitochondrial Uncoupling, ROS Generation and Cardioprotection ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1859(9):940-50. doi: 10.1016/j.bbabio.2018.05.019.

Cal, Roi, José Castellano, Elena Revuelta-López, Rosa Aledo, Montse Barriga, Jordi Farré, Gemma Vilahur, Laura Nasarre, Leif Hove-Madsen, Lina Badimon, et Vicenta Llorente-Cortés. 2012. « Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Mediates Hypoxia-Induced Very Low Density Lipoprotein-Cholesteryl Ester Uptake and Accumulation in Cardiomyocytes ». *Cardiovascular Research* 94(3):469-79. doi: 10.1093/cvr/cvs136.

Cal, Roi, Oriol Juan-Babot, Vicenç Brossa, Santiago Roura, Carolina Gálvez-Montón, Manolo Portoles, Miguel Rivera, Juan Cinca, Lina Badimon, et Vicenta Llorente-Cortés. 2012. « Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Expression Correlates with Cholesteryl Ester Accumulation in the Myocardium of Ischemic Cardiomyopathy Patients ». *Journal of Translational Medicine* 10(1):160. doi: 10.1186/1479-5876-10-160.

Cao, Zheng, Jinglan Liu, Zhanqing Zhao, et Qiao Wang. 2021. « MiR-16-5p Regulates PTPN4 and Affects Cardiomyocyte Apoptosis and Autophagy Induced by Hypoxia/Reoxygenation ». *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM* 2021:5599031. doi: 10.1155/2021/5599031.

Carayon, P., M. Portier, D. Dussossoy, A. Bord, G. Petitpretre, X. Canat, G. Le Fur, et P. Casellas. 1996. « Involvement of Peripheral Benzodiazepine Receptors in the Protection of Hematopoietic Cells against Oxygen Radical Damage ». *Blood* 87(8):3170-78. doi: 10.1182/blood.V87.8.3170.bloodjournal8783170.

Castellano, José, Jordi Farré, Jacqueline Fernandes, Antoni Bayes-Genis, Juan Cinca, Lina Badimon, Leif Hove-Madsen, et Vicenta Llorente-Cortés. 2011. « Hypoxia Exacerbates Ca2+-Handling Disturbances Induced by Very Low Density Lipoproteins (VLDL) in Neonatal Rat Cardiomyocytes ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50(5):894-902. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.02.002.

Cho, Jae Ho, Jeong Hyang Park, Chang Geon Chung, Hyun-Jung Shim, Keun Hye Jeon, Seong-Woon Yu, et Sung Bae Lee. 2015. « Parkin-Mediated Responses against Infection and Wound Involve TSPO-

VDAC Complex in Drosophila ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 463(1-2):1-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.05.006.

Colasanti, Alessandro, David R. Owen, Detelina Grozeva, Eugenii A. Rabiner, Paul M. Matthews, Nick Craddock, et Allan H. Young. 2013. « Bipolar Disorder Is Associated with the Rs6971 Polymorphism in the Gene Encoding 18kDa Translocator Protein (TSPO) ». *Psychoneuroendocrinology* 38(11):2826-29. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.07.007.

Conroy, R. M., K. Pyörälä, A. P. Fitzgerald, S. Sans, A. Menotti, G. De Backer, D. De Bacquer, et P. Ducimetière. 2003. « Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project ». *European Heart Journal* 24(11):987-1003. doi: 10.1016/S0195-668X(03)00114-3.

Costa, Barbara, Stefano Pini, Pamela Gabelloni, Eleonora Da Pozzo, Marianna Abelli, Lisa Lari, Matteo Preve, Antonio Lucacchini, Giovanni B. Cassano, et Claudia Martini. 2009. « The Spontaneous Ala147Thr Amino Acid Substitution within the Translocator Protein Influences Pregnenolone Production in Lymphomonocytes of Healthy Individuals ». *Endocrinology* 150(12):5438-45. doi: 10.1210/en.2009-0752.

Costa, Barbara, Stefano Pini, Claudia Martini, Marianna Abelli, Pamela Gabelloni, Stefano Landi, Matteo Muti, Camilla Gesi, Lisa Lari, Alessandra Cardini, Silvana Galderisi, Armida Mucci, Antonio Lucacchini, et Giovanni Battista Cassano. 2009. « Ala147Thr Substitution in Translocator Protein Is Associated with Adult Separation Anxiety in Patients with Depression ». *Psychiatric Genetics* 19(2):110-11. doi: 10.1097/YPG.0b013e32832080f6.

Cung, Thien-Tri, Olivier Morel, Guillaume Cayla, Gilles Rioufol, David Garcia-Dorado, Denis Angoulvant, Eric Bonnefoy-Cudraz, Patrice Guérin, Meier Elbaz, Nicolas Delarche, Pierre Coste, Gerald Vanzetto, Marc Metge, Jean-François Aupetit, Bernard Jouve, Pascal Motreff, Christophe Tron, Jean-Noel Labeque, Philippe Gabriel Steg, Yves Cottin, Grégoire Range, Jérome Clerc, Marc J. Claeys, Patrick Coussement, Fabrice Prunier, Frédéric Moulin, Olivier Roth, Loïc Belle, Philippe Dubois, Paul Barragan, Martine Gilard, Christophe Piot, Patrice Colin, Fabien De Poli, Marie-Claude Morice, Omar Ider, Jean-Luc Dubois-Randé, Thierry Unterseeh, Hervé Le Breton, Thierry Béard, Didier Blanchard, Gilles Grollier, Vincent Malquarti, Patrick Staat, Arnaud Sudre, Eskil Elmer, Magnus J. Hansson, Cyrille Bergerot, Inesse Boussaha, Claire Jossan, Geneviève Derumeaux, Nathan Mewton, et Michel Ovize. 2015. « Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction ». *New England Journal of Medicine* 373(11):1021-31. doi: 10.1056/NEJMoa1505489.

Czibik, Gabor, Zaineb Mezdari, Dogus Murat Altintas, Juliette Bréhat, Maria Pini, Thomas d'Humières, Thaïs Delmont, Costin Radu, Marielle Breau, Hao Liang, Cecile Martel, Azania Abatan, Rizwan Sarwar, Ophélie Marion, Suzain Naushad, Yanyan Zhang, Maissa Halfaoui, Nadine Suffee, Didier Morin, Serge Adnot, Stéphane Hatem, Arash Yavari, Daigo Sawaki, et Geneviève Derumeaux. 2021. « Dysregulated

Phenylalanine Catabolism Plays a Key Role in the Trajectory of Cardiac Aging ». *Circulation* CIRCULATIONAHA.121.054204. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.054204.

Daugherty, Daniel J., Olga Chechneva, Florian Mayrhofer, et Wenbin Deng. 2016. « The HGFAP-Driven Conditional TSPO Knockout Is Protective in a Mouse Model of Multiple Sclerosis ». *Scientific Reports* 6(1):22556. doi: 10.1038/srep22556.

Davidson, M., C. Nesti, L. Palenzuela, W. Walker, E. Hernandez, L. Protas, M. Hirano, et N. Isaac. 2005. « Novel Cell Lines Derived from Adult Human Ventricular Cardiomyocytes ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39(1):133-47. doi: 10.1016/j.yjmcc.2005.03.003.

Davidson, Sean M., Péter Ferdinandy, Ioanna Andreadou, Hans Erik Bøtker, Gerd Heusch, Borja Ibáñez, Michel Ovize, Rainer Schulz, Derek M. Yellon, Derek J. Hausenloy, et David Garcia-Dorado. 2019. « Multitarget Strategies to Reduce Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury ». *Journal of the American College of Cardiology* 73(1):89-99. doi: 10.1016/j.jacc.2018.09.086.

Derrickson, Bryan, et Gerald J. Tortora. 2015. *Principes d'anatomie et de physiologie*. 4ème. De Boeck.

Domazet-Loso, T., et D. Tautz. 2008. « An Ancient Evolutionary Origin of Genes Associated with Human Genetic Diseases ». *Molecular Biology and Evolution* 25(12):2699-2707. doi: 10.1093/molbev/msn214.

Drosatos, Konstantinos, et P. Christian Schulze. 2013. « Cardiac Lipotoxicity: Molecular Pathways and Therapeutic Implications ». *Current Heart Failure Reports* 10(2):109-21. doi: 10.1007/s11897-013-0133-0.

D'Souza, Kenneth, Carine Nzirorera, et Petra C. Kienesberger. 2016. « Lipid Metabolism and Signaling in Cardiac Lipotoxicity ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861(10):1513-24. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.02.016.

Eckel, Robert H., Scott Grundy M., et Paul Z. Zimmet. 2005. « The metabolic syndrome ». *Lancet* 365:1415-28.

Eilat-Adar, Sigal, Tali Sinai, Chaim Yosefy, et Yaakov Henkin. 2013. « Nutritional Recommendations for Cardiovascular Disease Prevention ». *Nutrients* 5(9):3646-83. doi: 10.3390/nu5093646.

Elustondo, Pia, Laura A. Martin, et Barbara Karten. 2017. « Mitochondrial Cholesterol Import ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862(1):90-101. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.08.012.

Engel, Felix B., Michael Schebesta, Mychelle T. Duong, Gang Lu, Shuxun Ren, Jeffery B. Madwed, Huiping Jiang, Yibin Wang, et Mark T. Keating. 2005. « P38 MAP Kinase Inhibition Enables Proliferation

of Adult Mammalian Cardiomyocytes ». *Genes & Development* 19(10):1175-87. doi: 10.1101/gad.1306705.

Fan, J., P. Lindemann, M. G. J. Feuilloley, et V. Papadopoulos. 2012. « Structural and Functional Evolution of the Translocator Protein (18 KDa) ». *Current Molecular Medicine* 12(4):19.

Fan, Jinjiang, Enrico Campioli, Andrew Midzak, Martine Culty, et Vassilios Papadopoulos. 2015. « Conditional Steroidogenic Cell-Targeted Deletion of TSPO Unveils a Crucial Role in Viability and Hormone-Dependent Steroid Formation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(23):7261-66. doi: 10.1073/pnas.1502670112.

Fan, Jinjiang, Enrico Campioli, et Vassilios Papadopoulos. 2019. « Nr5a1-Cre-Mediated Tspo Conditional Knockout Mice with Low Growth Rate and Prediabetes Symptoms – A Mouse Model of Stress Diabetes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1865(1):56-62. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.10.022.

Fan, Jinjiang, Enrico Campioli, Chantal Sottas, Barry Zirkin, et Vassilios Papadopoulos. 2020. « Amhr2-Cre–Mediated Global Tspo Knockout ». *Journal of the Endocrine Society* 4(2):bvaa001. doi: 10.1210/jendso/bvaa001.

Fan, Jinjiang, Malena B. Rone, et Vassilios Papadopoulos. 2009. « Translocator Protein 2 Is Involved in Cholesterol Redistribution during Erythropoiesis ». *Journal of Biological Chemistry* 284(44):30484-97. doi: 10.1074/jbc.M109.029876.

Farhan, Fahad, Mohammad Almarhoun, Aileen Wong, Amy S. Findlay, Chris Bartholomew, Mark T. S. Williams, Toby W. Hurd, et Xinhua Shu. 2021. « Deletion of TSPO Causes Dysregulation of Cholesterol Metabolism in Mouse Retina ». *Cells* 10(11):3066. doi: 10.3390/cells10113066.

Favre, Julie, Ji Gao, Jean-Paul Henry, Isabelle Remy-Jouet, Isabelle Fourquaux, Audrey Billon-Gales, Christian Thuillez, Jean-François Arnal, Françoise Lenfant, et Vincent Richard. 2010. « Endothelial Estrogen Receptor α Plays an Essential Role in the Coronary and Myocardial Protective Effects of Estradiol in Ischemia/Reperfusion ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30(12):2562-67. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.213637.

Feng, Hao, Yongxin Liu, Rui Zhang, Yingxia Liang, Lina Sun, Nannan Lan, et Baoyu Ma. 2020. « TSPO Ligands PK11195 and Midazolam Reduce NLRP3 Inflammasome Activation and Proinflammatory Cytokine Release in BV-2 Cells ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14:544431. doi: 10.3389/fncel.2020.544431.

Ferdinandy, Péter, Derek J. Hausenloy, Gerd Heusch, Gary F. Baxter, et Rainer Schulz. 2014. « Interaction of Risk Factors, Comorbidities, and Comedications with Ischemia/Reperfusion Injury and

Cardioprotection by Preconditioning, Postconditioning, and Remote Conditioning » édité par F. O. Levy. *Pharmacological Reviews* 66(4):1142-74. doi: 10.1124/pr.113.008300.

Ferdinandy, Peter, Rainer Schulz, et Gary F. Baxter. 2007. « Interaction of Cardiovascular Risk Factors with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, Preconditioning, and Postconditioning ». *Pharmacological Reviews* 59(4):418-58. doi: 10.1124/pr.107.06002.

Ference, Brian A., Henry N. Ginsberg, Ian Graham, Kausik K. Ray, Chris J. Packard, Eric Bruckert, Robert A. Hegele, Ronald M. Krauss, Frederick J. Raal, Heribert Schunkert, Gerald F. Watts, Jan Borén, Sergio Fazio, Jay D. Horton, Luis Masana, Stephen J. Nicholls, Børge G. Nordestgaard, Bart van de Sluis, Marja-Riitta Taskinen, Lale Tokgözoğlu, Ulf Landmesser, Ulrich Laufs, Olov Wiklund, Jane K. Stock, M. John Chapman, et Alberico L. Catapano. 2017. « Low-Density Lipoproteins Cause Atherosclerotic Cardiovascular Disease. 1. Evidence from Genetic, Epidemiologic, and Clinical Studies. A Consensus Statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel ». *European Heart Journal* 38(32):2459-72. doi: 10.1093/eurheartj/ehx144.

Ferzaz, Badia, Emmanuel Brault, Genevieve Bourliaud, Jean-Pierre Robert, Gilles Poughon, Yves Claustre, Franck Marguet, Philippe Liere, Michael Schumacher, Jean-Pierre Nowicki, Jacqueline Fournier, Benoit Marabout, Mireille Sevrin, Pascal George, Philippe Soubrie, Jesus Benavides, et Bernard Scatton. 2002. « SSR180575 (7-Chloro- *N* , *N* ,5-Trimethyl-4-Oxo-3-Phenyl-3,5-Dihydro-4 *H* -Pyridazino[4,5- *b*]Indole-1-Acetamide), a Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligand, Promotes Neuronal Survival and Repair ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301(3):1067-78. doi: 10.1124/jpet.301.3.1067.

Feuvray, D., et A. Darmellah. 2008. « Diabetes-Related Metabolic Perturbations in Cardiac Myocyte ». *Diabetes & Metabolism* 34:3-9. doi: 10.1016/S1262-3636(08)70096-X.

Fröhlich, Georg M., Pascal Meier, Steven K. White, Derek M. Yellon, et Derek J. Hausenloy. 2013. « Myocardial Reperfusion Injury: Looking beyond Primary PCI ». *European Heart Journal* 34(23):1714-22. doi: 10.1093/eurheartj/eht090.

Gabriel-Costa, Daniele. 2018. « The Pathophysiology of Myocardial Infarction-Induced Heart Failure ». *Pathophysiology* 25(4):277-84. doi: 10.1016/j.pathophys.2018.04.003.

Galiègue, Sylvaine, Pierre Casellas, Andrew Kramar, Norbert Tinel, et Joelle Simony-Lafontaine. 2004. « Immunohistochemical Assessment of the Peripheral Benzodiazepine Receptor in Breast Cancer and Its Relationship with Survival ». *Clinical Cancer Research* 10(6):2058-64. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0988.

Gao, Peng, Zhencheng Yan, et Zhiming Zhu. 2020. « Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Cardiovascular Diseases ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8:604240. doi: 10.3389/fcell.2020.604240.

Gatliff, Jemma, Daniel A. East, Aarti Singh, Maria Soledad Alvarez, Michele Frison, Ivana Matic, Caterina Ferraina, Natalie Sampson, Federico Turkheimer, et Michelangelo Campanella. 2017. « A Role for TSPO in Mitochondrial Ca2+ Homeostasis and Redox Stress Signaling ». *Cell Death & Disease* 8(6):e2896-e2896. doi: 10.1038/cddis.2017.186.

Gatliff, Jemma, Daniel East, James Crosby, Rosella Abeti, Robert Harvey, William Craigen, Peter Parker, et Michelangelo Campanella. 2014. « TSPO Interacts with VDAC1 and Triggers a ROS-Mediated Inhibition of Mitochondrial Quality Control ». *Autophagy* 10(12):2279-96. doi: 10.4161/15548627.2014.991665.

Giga, Hiroshi, Bin Ji, Kazuya Kikutani, Shuji Fukuda, Takashi Kitajima, Seishi Katsumata, Miho Matsumata, Tetsuya Suhara, Shigeto Yamawaki, Nobuaki Shime, Koji Hosokawa, et Hidenori Aizawa. 2021. « Pharmacological and Genetic Inhibition of Translocator Protein 18 KDa Ameliorated Neuroinflammation in Murine Endotoxemia Model ». *Shock* 56(1):142-49. doi: 10.1097/SHK.0000000000001703.

Glass, Christopher, K., et Joseph Witztum L. 2001. « Atherosclerosis: The Road Ahead ». *Cell* 104:503-16.

Goldfarb, James W., Marguerite Roth, et Jing Han. 2009. « Myocardial Fat Deposition after Left Ventricular Myocardial Infarction: Assessment by Using MR Water-Fat Separation Imaging ». *Radiology* 253(1):65-73. doi: 10.1148/radiol.2532082290.

Gomez-Sanchez, Celso R., et Elise P. Gomez-Sanchez. 2001. « Editorial: Cardiac Steroidogenesis—New Sites of Synthesis, or Much Ado About Nothing? » *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(11):2.

Goonasekara, Charitha L., Elise Balse, Stephan Hatem, David F. Steele, et David Fedida. 2010. « Cholesterol and Cardiac Arrhythmias ». *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 8(7):965-79. doi: 10.1586/erc.10.79.

Granger, D. Neil, et Peter R. Kvietys. 2015. « Reperfusion Injury and Reactive Oxygen Species: The Evolution of a Concept ». *Redox Biology* 6:524-51. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.020.

Griffiths, William J., et Yuqin Wang. 2019. « Oxysterol Research: A Brief Review ». *Biochemical Society Transactions* 47(2):517-26. doi: 10.1042/BST20180135.

Griffiths, William J., et Yuqin Wang. 2020. « Oxysterols as Lipid Mediators: Their Biosynthetic Genes, Enzymes and Metabolites ». *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 147:106381. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2019.106381.

Grundy, SM, JI Cleeman, SR Daniels, KA Donato, Robert H. Eckel, Barry A. Franklin, DJ Gordon, Ronald M. Krauss, PJ Savage, SC Smith, JA Spertus, et F. Costa. 2005. « Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement ». *Circulation* 112(17):2735-52. doi: 10.1016/S0084-3741(08)70316-0.

Guillemain, Ghislaine, Jean-Jacques Lacapere, et Lucie Khemtemourian. 2022. « Targeting HIAPP Fibrillation: A New Paradigm to Prevent β-Cell Death? » *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1864(10):184002. doi: 10.1016/j.bbamem.2022.184002.

Gut, Philipp. 2015. « Targeting Mitochondrial Energy Metabolism with TSPO Ligands ». *Biochemical Society Transactions* 43(4):537-42. doi: 10.1042/BST20150019.

Gut, Philipp, Markus Zweckstetter, et Richard B. Banati. 2015. « Lost in Translocation: The Functions of the 18-KD Translocator Protein ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 26(7):349-56. doi: 10.1016/j.tem.2015.04.001.

Halestrap, A. P., et A. M. Davidson. 1990. « Inhibition of Ca2+-Induced Large-Amplitude Swelling of Liver and Heart Mitochondria by Cyclosporin Is Probably Caused by the Inhibitor Binding to Mitochondrial-Matrix Peptidyl-Prolyl *Cis-Trans* Isomerase and Preventing It Interacting with the Adenine Nucleotide Translocase ». *Biochemical Journal* 268(1):153-60. doi: 10.1042/bj2680153.

Halestrap, Andrew P. 2009. « Mitochondrial Calcium in Health and Disease ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787(11):1289-90. doi: 10.1016/j.bbabio.2009.07.011.

Halestrap, Andrew P., et Andrew P. Richardson. 2015. « The Mitochondrial Permeability Transition: A Current Perspective on Its Identity and Role in Ischaemia/Reperfusion Injury ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 78:129-41. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.08.018.

Hansson, Göran K. 2005. « Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease ». *The New England Journal of Medicine* 11.

Hardwick, Matthew, Djamil Fertikh, et Martine Culty. 1999. « Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor (PBR) in Human Breast Cancer : Correlation of Breast Cancer Cell Aggressive Phenotype with PBR Expression, Nuclear Localization, and PBR-Mediated Cell Proliferation and Nuclear Transport of Cholesterol ». *Cancer Research* 59(4):14.

Hausenloy, D. 2003. « Inhibiting Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening at Reperfusion Protects against Ischaemia–Reperfusion Injury ». *Cardiovascular Research* 60(3):617-25. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.09.025.

Hausenloy, Derek J., Jose A. Barrabes, Hans Erik Bøtker, Sean M. Davidson, Fabio Di Lisa, James Downey, Thomas Engstrom, Péter Ferdinandy, Hector A. Carbrera-Fuentes, Gerd Heusch, Borja Ibanez, Efstathios K. Iliodromitis, Javier Inserte, Robert Jennings, Neena Kalia, Rajesh Kharbanda, Sandrine Lecour, Michael Marber, Tetsuji Miura, Michel Ovize, Miguel A. Perez-Pinzon, Hans Michael Piper, Karin Przyklenk, Michael Rahbek Schmidt, Andrew Redington, Marisol Ruiz-Meana, Gemma Vilahur, Jakob Vinten-Johansen, Derek M. Yellon, et David Garcia-Dorado. 2016. « Ischaemic Conditioning and Targeting Reperfusion Injury: A 30 Year Voyage of Discovery ». *Basic Research in Cardiology* 111(6):70. doi: 10.1007/s00395-016-0588-8.

Hausenloy, Derek J., Hans Erik Bøtker, Gianluigi Condorelli, Peter Ferdinandy, David Garcia-Dorado, Gerd Heusch, Sandrine Lecour, Linda W. van Laake, Rosalinda Madonna, Marisol Ruiz-Meana, Rainer Schulz, Joost P. G. Sluijter, Derek M. Yellon, et Michel Ovize. 2013. « Translating Cardioprotection for Patient Benefit: Position Paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology ». *Cardiovascular Research* 98(1):7-27. doi: 10.1093/cvr/cvt004.

Hausenloy, Derek J., David Garcia-Dorado, Hans Erik Bøtker, Sean M. Davidson, James Downey, Felix B. Engel, Robert Jennings, Sandrine Lecour, Jonathan Leor, Rosalinda Madonna, Michel Ovize, Cinzia Perrino, Fabrice Prunier, Rainer Schulz, Joost P. G. Sluijter, Linda W. Van Laake, Jakob Vinten-Johansen, Derek M. Yellon, Kirsti Ytrehus, Gerd Heusch, et Péter Ferdinandy. 2017. « Novel Targets and Future Strategies for Acute Cardioprotection: Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart ». *Cardiovascular Research* 113(6):564-85. doi: 10.1093/cvr/cvx049.

Hausenloy, Derek J., et Derek M. Yellon. 2007. « Reperfusion Injury Salvage Kinase Signalling: Taking a RISK for Cardioprotection ». *Heart Failure Reviews* 12(3-4):217-34. doi: 10.1007/s10741-007-9026-1.

Helmschrodt, Christin, Susen Becker, Jenny Schröter, Max Hecht, Gabriela Aust, Joachim Thiery, et Uta Ceglarek. 2013. « Fast LC–MS/MS Analysis of Free Oxysterols Derived from Reactive Oxygen Species in Human Plasma and Carotid Plaque ». *Clinica Chimica Acta* 425:3-8. doi: 10.1016/j.cca.2013.06.022.

Heusch, Gerd. 2015. « Molecular Basis of Cardioprotection: Signal Transduction in Ischemic Pre-, Post-, and Remote Conditioning ». *Circulation Research* 116(4):674-99. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305348.

Heusch, Gerd. 2020. « Myocardial Ischaemia–Reperfusion Injury and Cardioprotection in Perspective ». *Nature Reviews Cardiology* 17(12):773-89. doi: 10.1038/s41569-020-0403-y.

Hiser, Carrie, Beronda L. Montgomery, et Shelagh Ferguson-Miller. 2021. « TSPO Protein Binding Partners in Bacteria, Animals, and Plants ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 53(4):463-87. doi: 10.1007/s10863-021-09905-4.

Holmes, M. V., C. E. Dale, L. Zuccolo, R. J. Silverwood, Y. Guo, Z. Ye, D. Prieto-Merino, A. Dehghan, S. Trompet, A. Wong, A. Cavadino, D. Drogan, S. Padmanabhan, S. Li, A. Yesupriya, M. Leusink, J. Sundstrom, J. A. Hubacek, H. Pikhart, D. I. Swerdlow, A. G. Panayiotou, S. A. Borinskaya, C. Finan, S. Shah, K. B. Kuchenbaecker, T. Shah, J. Engmann, L. Folkersen, P. Eriksson, F. Ricceri, O. Melander, C. Sacerdote, D. M. Gamble, S. Rayaprolu, O. A. Ross, S. McLachlan, O. Vikhireva, I. Sluijs, R. A. Scott, V. Adamkova, L. Flicker, F. M. v. Bockxmeer, C. Power, P. Marques-Vidal, T. Meade, M. G. Marmot, J. M. Ferro, S. Paulos-Pinheiro, S. E. Humphries, P. J. Talmud, I. M. Leach, N. Verweij, A. Linneberg, T. Skaaby, P. A. Doevendans, M. J. Cramer, P. v. d. Harst, O. H. Klungel, N. F. Dowling, A. F. Dominiczak, M. Kumari, A. N. Nicolaides, C. Weikert, H. Boeing, S. Ebrahim, T. R. Gaunt, J. F. Price, L. Lannfelt, A. Peasey, R. Kubinova, A. Pajak, S. Malyutina, M. I. Voevoda, A. Tamosiunas, A. H. Maitland-van der Zee, P. E. Norman, G. J. Hankey, M. M. Bergmann, A. Hofman, O. H. Franco, J. Cooper, J. Palmen, W. Spiering, P. A. d. Jong, D. Kuh, R. Hardy, A. G. Uitterlinden, M. A. Ikram, I. Ford, E. Hypponen, O. P. Almeida, N. J. Wareham, K. T. Khaw, A. Hamsten, L. L. N. Husemoen, A. Tjonneland, J. S. Tolstrup, E. Rimm, J. W. J. Beulens, W. M. M. Verschuren, N. C. Onland-Moret, M. H. Hofker, S. G. Wannamethee, P. H. Whincup, R. Morris, A. M. Vicente, H. Watkins, M. Farrall, J. W. Jukema, J. Meschia, L. A. Cupples, S. J. Sharp, M. Fornage, C. Kooperberg, A. Z. LaCroix, J. Y. Dai, M. B. Lanktree, D. S. Siscovick, E. Jorgenson, B. Spring, J. Coresh, Y. R. Li, S. G. Buxbaum, P. J. Schreiner, R. C. Ellison, M. Y. Tsai, S. R. Patel, S. Redline, A. D. Johnson, R. C. Hoogeveen, H. Hakonarson, J. I. Rotter, E. Boerwinkle, P. I. W. d. Bakker, M. Kivimaki, F. W. Asselbergs, N. Sattar, D. A. Lawlor, J. Whittaker, G. Davey Smith, K. Mukamal, B. M. Psaty, J. G. Wilson, L. A. Lange, A. Hamidovic, A. D. Hingorani, B. G. Nordestgaard, M. Bobak, D. A. Leon, C. Langenberg, T. M. Palmer, A. P. Reiner, B. J. Keating, F. Dudbridge, J. P. Casas, et on behalf of The InterAct Consortium. 2014. « Association between Alcohol and Cardiovascular Disease: Mendelian Randomisation Analysis Based on Individual Participant Data ». *BMJ* 349(jul10 6):g4164-g4164. doi: 10.1136/bmj.g4164.

Horvath, Susanne E., et Günther Daum. 2013. « Lipids of Mitochondria ». *Progress in Lipid Research* 52(4):590-614. doi: 10.1016/j.plipres.2013.07.002.

Hou, Tianliang, Haiping Ma, Haixia Wang, Chunling Chen, Jianrong Ye, Ahmed Mohamed Ahmed, et Hong Zheng. 2020. « Sevoflurane Preconditioning Attenuates Hypoxia/Reoxygenation Injury of H9c2 Cardiomyocytes by Activation of the HIF-1/PDK-1 Pathway ». *PeerJ* 8:e10603. doi: 10.7717/peerj.10603.

Hunter, Douglas R., et Robert A. Haworth. 1979. « The Ca2+-Induced Membrane Transition in Mitochondria ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 195(2):453-59. doi: 10.1016/0003-9861(79)90371-0.

Huss, Janice M., Fiona H. Levy, et Daniel P. Kelly. 2001. « Hypoxia Inhibits the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α/ Retinoid X Receptor Gene Regulatory Pathway in Cardiac Myocytes ». *Journal of Biological Chemistry* 276(29):27605-12. doi: 10.1074/jbc.M100277200.

Ichikawa, Yasutaka, Kakuya Kitagawa, Shuji Chino, Masaki Ishida, Koji Matsuoka, Takashi Tanigawa, Tomoaki Nakamura, Tadanori Hirano, Kan Takeda, et Hajime Sakuma. 2009. « Adipose Tissue Detected by Multislice Computed Tomography in Patients After Myocardial Infarction ». *JACC: Cardiovascular Imaging* 2(5):548-55. doi: 10.1016/j.jcmg.2009.01.010.

Ilic, Ana, Dusan Todorovic, Slavica Mutavdzin, Novica Boricic, Biljana Bozic Nedeljkovic, Sanja Stankovic, Tatjana Simic, Predrag Stevanovic, Vera Celic, et Dragan Djuric. 2021. « Translocator Protein Modulation by 4′-Chlorodiazepam and NO Synthase Inhibition Affect Cardiac Oxidative Stress, Cardiometabolic and Inflammatory Markers in Isoprenaline-Induced Rat Myocardial Infarction ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(6):2867. doi: 10.3390/ijms22062867.

Inserte, Javier, Victor Hernando, Úrsula Vilardosa, Elena Abad, Marcos Poncelas-Nozal, et David Garcia-Dorado. 2013. « Activation of CGMP/Protein Kinase G Pathway in Postconditioned Myocardium Depends on Reduced Oxidative Stress and Preserved Endothelial Nitric Oxide Synthase Coupling ». *Journal of the American Heart Association* 2(1):e005975. doi: 10.1161/JAHA.112.005975.

Institut national de recherche et de sécurité. 2007. « Phénylhydrazine - Fiche toxicologique n°109 ».

Issop, Leeyah, Malena B. Rone, et Vassilios Papadopoulos. 2013. « Organelle Plasticity and Interactions in Cholesterol Transport and Steroid Biosynthesis ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 371(1-2):34-46. doi: 10.1016/j.mce.2012.12.003.

James, Michelle, Silvia Selleri, et Michael Kassiou. 2006. « Development of Ligands for the Peripheral Benzodiazepine Receptor ». *Current Medicinal Chemistry* 13(17):1991-2001. doi: 10.2174/092986706777584979.

Javadov, Sabzali, Sehwan Jang, Rebecca Parodi-Rullán, Zaza Khuchua, et Andrey V. Kuznetsov. 2017. « Mitochondrial Permeability Transition in Cardiac Ischemia–Reperfusion: Whether Cyclophilin D Is a Viable Target for Cardioprotection? » *Cellular and Molecular Life Sciences* 74(15):2795-2813. doi: 10.1007/s00018-017-2502-4.

Jennings, R. B., H. M. Sommers, G. A. Smyth, H. A. Flack, et H. Linn. 1960. « Myocardial Necrosis Induced by Temporary Occlusion of a Coronary Artery in the Dog ». *Archives of Pathology* 70:68-78.

Junqueira, L. C. U., G. Bignolas, et R. R. Brentani. 1979. « Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections ». *The Histochemical Journal volume* 11:447-55. doi: 10.1007/BF01002772.

Kawamura, M., J. W. Heinecke, et A. Chait. 1994. « Pathophysiological Concentrations of Glucose Promote Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein by a Superoxide-Dependent Pathway. » *Journal of Clinical Investigation* 94(2):771-78. doi: 10.1172/JCI117396.

Kim, Seolsong, Nayoun Kim, Seokjae Park, Yoonjeong Jeon, Jaemeun Lee, Seung-Jun Yoo, Ji-Won Lee, Cheil Moon, Seong-Woon Yu, et Eun-Kyoung Kim. 2020. « Tanycytic TSPO Inhibition Induces Lipophagy to Regulate Lipid Metabolism and Improve Energy Balance ». *Autophagy* 16(7):1200-1220. doi: 10.1080/15548627.2019.1659616.

Klee, Katrin, Federica Storti, Maya Barben, Marijana Samardzija, Thomas Langmann, Joshua Dunaief, et Christian Grimm. 2019. « Systemic Knockout of Tspo in Mice Does Not Affect Retinal Morphology, Function and Susceptibility to Degeneration ». *Experimental Eye Research* 188:107816. doi: 10.1016/j.exer.2019.107816.

Kraemer, Fredric B., Victor K. Khor, Wen-Jun Shen, et Salman Azhar. 2013. « Cholesterol Ester Droplets and Steroidogenesis ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 371(1-2):15-19. doi: 10.1016/j.mce.2012.10.012.

Kraus, William E., Kenneth E. Powell, William L. Haskell, Kathleen F. Janz, Wayne W. Campbell, John M. Jakicic, Richard P. Troiano, Kyle Sprow, Andrea Torres, et Katrina L. Piercy. 2019. « Physical Activity, All-Cause and Cardiovascular Mortality, and Cardiovascular Disease ». *Medicine & Science in Sports & Exercise* 51(6):1270-81. doi: 10.1249/MSS.0000000000001939.

Kurumaji, A., H. Nomoto, T. Yoshikawa, Y. Okubo, et M. Toru. 2000. « An Association Study between Two Missense Variations of the Benzodiazepine Receptor (Peripheral) Gene and Schizophrenia in a Japanese Sample ». *Journal of Neural Transmission* 107(4):491-500. doi: 10.1007/s007020070090.

Kurumaji, A., T. Wakai, et M. Toru. 1997. « Decreases in Peripheral-Type Benzodiazepine Receptors in Postmortem Brains of Chronic Schizophrenics ». *Journal of Neural Transmission* 104(11-12):1361-70. doi: 10.1007/BF01294737.

Kuznetsov, Andrey V., Sabzali Javadov, Stephan Sickinger, Sandra Frotschnig, et Michael Grimm. 2015. « H9c2 and HL-1 Cells Demonstrate Distinct Features of Energy Metabolism, Mitochondrial Function and Sensitivity to Hypoxia-Reoxygenation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853(2):276-84. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.11.015.

Lacapère, Jean-Jacques, Franck Delavoie, Hua Li, Gabriel Péranzi, Jean Maccario, Vassilios Papadopoulos, et Branislav Vidic. 2001. « Structural and Functional Study of Reconstituted Peripheral Benzodiazepine Receptor ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284(2):536-41. doi: 10.1006/bbrc.2001.4975.

Lacapère, Jean-Jacques, et Vassilios Papadopoulos. 2003. « Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor: Structure and Function of a Cholesterol-Binding Protein in Steroid and Bile Acid Biosynthesis ». *Steroids* 68(7-8):569-85. doi: 10.1016/S0039-128X(03)00101-6.

Landrock, Danilo, Barbara P. Atshaves, Avery L. McIntosh, Kerstin K. Landrock, Friedhelm Schroeder, et Ann B. Kier. 2010. « Acyl-CoA Binding Protein Gene Ablation Induces Pre-implantation Embryonic Lethality in Mice ». *Lipids* 45(7):567-80. doi: 10.1007/s11745-010-3437-9.

Le Lamer, Sophie, Stéphanie Paradis, Hidayat Rahmouni, Corinne Chaimbault, Magali Michaud, Marcel Culcasi, Jean Afxantidis, Mathilde Latreille, Patrick Berna, Alain Berdeaux, Sylvia Pietri, Didier Morin, Yves Donazzolo, Jean-Louis Abitbol, Rebacca M. Pruss, et Sophie Schaller. 2014. « Translation of TRO40303 from Myocardial Infarction Models to Demonstration of Safety and Tolerance in a Randomized Phase I Trial ». *Journal of Translational Medicine* 12(1):38. doi: 10.1186/1479-5876-12-38.

Lecour, S., H. E. Botker, G. Condorelli, S. M. Davidson, D. Garcia-Dorado, F. B. Engel, P. Ferdinandy, G. Heusch, R. Madonna, M. Ovize, M. Ruiz-Meana, R. Schulz, J. P. G. Sluijter, L. W. Van Laake, D. M. Yellon, et D. J. Hausenloy. 2014. « ESC Working Group Cellular Biology of the Heart: Position Paper: Improving the Preclinical Assessment of Novel Cardioprotective Therapies ». *Cardiovascular Research* 104(3):399-411. doi: 10.1093/cvr/cvu225.

Lecour, Sandrine. 2009. « Multiple Protective Pathways against Reperfusion Injury: A SAFE Path without Aktion? » *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46(5):607-9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.01.003.

Leducq, Nathalie, Françoise Bono, Thierry Sulpice, Val érie Vin, Philip Janiak, Gérard Le Fur, Steve E. O'Connor, et Jean-Marc Herbert. 2003. « Role of Peripheral Benzodiazepine Receptors in Mitochondrial, Cellular, and Cardiac Damage Induced by Oxidative Stress and Ischemia-Reperfusion ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306(3):828-37. doi: 10.1124/jpet.103.052068.

Lee, Sihoon, Ranganath Muniyappa, Xu Yan, Hui Chen, Lilly Q. Yue, Eun-Gyoung Hong, Jason K. Kim, et Michael J. Quon. 2008. « Comparison between Surrogate Indexes of Insulin Sensitivity and Resistance and Hyperinsulinemic Euglycemic Clamp Estimates in Mice ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 294(2):E261-70. doi: 10.1152/ajpendo.00676.2007.

Lefort, Claudie, Lauriane Benoist, Stéphanie Chadet, Marie Piollet, Audrey Heraud, Dominique Babuty, Christophe Baron, Fabrice Ivanes, et Denis Angoulvant. 2018. « Stimulation of P2Y11 Receptor Modulates Cardiac Fibroblasts Secretome toward Immunomodulatory and Protective Roles after Hypoxia/Reoxygenation Injury ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 121:212-22. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.07.245.

Lemaire-Ewing, S., C. Prunet, T. Montange, A. Vejux, A. Berthier, G. Bessède, L. Corcos, P. Gambert, D. Néel, et G. Lizard. 2005. « Comparison of the Cytotoxic, pro-Oxidant and pro-Inflammatory Characteristics of Different Oxysterols ». *Cell Biology and Toxicology* 21(2):97-114. doi: 10.1007/s10565-005-0141-2.

Leo Veenman, Vassilios Papadopoulos, et Moshe Gavish. 2007. « Channel-Like Functions of the 18-KDa Translocator Protein (TSPO): Regulation of Apoptosis and Steroidogenesis as Part of the Host-Defense Response ». *Current Pharmaceutical Design* 13(23):2385-2405. doi: 10.2174/138161207781368710.

Li, Lei, Wei Wang, Li-Ming Zhang, Xiang-Yun Jiang, Shu-Zheng Sun, Li-Jun Sun, Ying Guo, Jie Gong, You-Zhi Zhang, Heng-Lin Wang, et Yun-Feng Li. 2017. « Overexpression of the 18 KDa Translocator Protein (TSPO) in the Hippocampal Dentate Gyrus Produced Anxiolytic and Antidepressant-like Behavioural Effects ». *Neuropharmacology* 125:117-28. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.06.023.

Li, Qiming, Gang Deng, et Yuzhang Gao. 2022. « S100 Calcium-Binding Protein A12 Knockdown Ameliorates Hypoxia-Reoxygenation-Induced Inflammation and Apoptosis in Human Cardiomyocytes by Regulating Caspase-4-Mediated Non-Classical Pyroptosis ». *General Physiology and Biophysics* 41(4):287-97. doi: 10.4149/gpb_2022018.

Li, Tiangang, et John Y. L. Chiang. 2017. « Bile Acid-Induced Liver Injury in Cholestasis ». P. 143-72 in *Cellular Injury in Liver Diseases*, édité par W.-X. Ding et X.-M. Yin. Cham: Springer International Publishing.

Li, Yuchang, Liting Chen, Lu Li, Chantal Sottas, Stephanie K. Petrillo, Anthoula Lazaris, Peter Metrakos, Hangyu Wu, Yuji Ishida, Takeshi Saito, Lucy Golden-Mason, Hugo R. Rosen, Jeremy J. Wolff, Cristina I. Silvescu, Samuel Garza, Garett Cheung, Tiffany Huang, Jinjiang Fan, Martine Culty, Bangyan Stiles, Kinji Asahina, et Vassilios Papadopoulos. 2021. « Cholesterol-Binding Translocator Protein TSPO Regulates Steatosis and Bile Acid Synthesis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *IScience* 24(5):102457. doi: 10.1016/j.isci.2021.102457.

Li, Ziyang, Jianrong Zhao, Hui Li, Yan Li, et Caixia Lin. 2022. « Catalpol Protects AC16 Cells from Hypoxia/Reoxygenation Injury by Regulating the MiR-22-3p/DPP4 Axis ». *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 36(6):e23034. doi: 10.1002/jbt.23034.

Liang, Chenyu, Yang Liu, Huifeng Xu, Junling Huang, Yi Shen, Faxiu Chen, et Ming Luo. 2020. « Exosomes of Human Umbilical Cord MSCs Protect Against Hypoxia/Reoxygenation-Induced Pyroptosis of Cardiomyocytes via the MiRNA-100-5p/FOXO3/NLRP3 Pathway ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8:615850. doi: 10.3389/fbioe.2020.615850.

Lin, Ran, Alessia Angelin, Federico Da Settimo, Claudia Martini, Sabrina Taliani, Shigong Zhu, et Douglas C. Wallace. 2014. « Genetic Analysis of DTSPO , an Outer Mitochondrial Membrane Protein, Reveals Its

Functions in Apoptosis, Longevity, and Aβ42-induced Neurodegeneration ». *Aging Cell* 13(3):507-18. doi: 10.1111/acel.12200.

Lin, Ran, Danielle Rittenhouse, Katelyn Sweeney, Prasanth Potluri, et Douglas C. Wallace. 2015. « TSPO, a Mitochondrial Outer Membrane Protein, Controls Ethanol-Related Behaviors in Drosophila » édité par B. Lu. *PLOS Genetics* 11(8):e1005366. doi: 10.1371/journal.pgen.1005366.

Lindsey, Merry L., Roberto Bolli, John M. Canty, Xiao-Jun Du, Nikolaos G. Frangogiannis, Stefan Frantz, Robert G. Gourdie, Jeffrey W. Holmes, Steven P. Jones, Robert A. Kloner, David J. Lefer, Ronglih Liao, Elizabeth Murphy, Peipei Ping, Karin Przyklenk, Fabio A. Recchia, Lisa Schwartz Longacre, Crystal M. Ripplinger, Jennifer E. Van Eyk, et Gerd Heusch. 2018. « Guidelines for Experimental Models of Myocardial Ischemia and Infarction ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 314(4):H812-38. doi: 10.1152/ajpheart.00335.2017.

Liu, Jun, Malena B. Rone, et Vassilios Papadopoulos. 2006. « Protein-Protein Interactions Mediate Mitochondrial Cholesterol Transport and Steroid Biosynthesis ». *Journal of Biological Chemistry* 281(50):38879-93. doi: 10.1074/jbc.M608820200.

Liu, Zhang, Knight, et Goodwin. 2019. « The Glucocorticoid Receptor in Cardiovascular Health and Disease ». *Cells* 8(10):1227. doi: 10.3390/cells8101227.

Lobelo, Felipe, Deborah Rohm Young, Robert Sallis, Michael D. Garber, Sandra A. Billinger, John Duperly, Adrian Hutber, Russell R. Pate, Randal J. Thomas, Michael E. Widlansky, Michael V. McConnell, et Elizabeth A. Joy. 2018. « Routine Assessment and Promotion of Physical Activity in Healthcare Settings: A Scientific Statement From the American Heart Association ». *Circulation* 137(18). doi: 10.1161/CIR.0000000000000559.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, et R. J. Randall. 1951. « Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent ». *The Journal of Biological Chemistry* 193(1):265-75.

Lu, Min, Xinglei Qin, Jungong Yao, Yuanyuan Yang, Minghu Zhao, et Lin Sun. 2020. « MiR-134-5p Targeting XIAP Modulates Oxidative Stress and Apoptosis in Cardiomyocytes under Hypoxia/Reperfusion-Induced Injury ». *IUBMB Life* 72(10):2154-66. doi: 10.1002/iub.2351.

Lukyanenko, Valeriy, et Yevgeniya Lukyanenko. 2009. « Oxysterols in Heart Failure ». *Future Cardiology* 5(4):343-54. doi: 10.2217/fca.09.17.

Luo, Jie, Hongyuan Yang, et Bao-Liang Song. 2020. « Mechanisms and Regulation of Cholesterol Homeostasis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21(4):225-45. doi: 10.1038/s41580-019-0190-7.

Maaser, Kerstin, Patricia Grabowski, Yelda Oezdem, Antje Krahn, Bernhard Heine, Harald Stein, Heinz Buhr, Martin Zeitz, et Hans Scherübl. 2005. « Up-Regulation of the Peripheral Benzodiazepine Receptor

during Human Colorectal Carcinogenesis and Tumor Spread ». *Clinical Cancer Research* 11(5):1751-56. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1955.

Machida, Takeo, Yumiko Yonezawa, et Tetsuo Noumura. 1981. « Age-Associated Changes in Plasma Testosterone Levels in Male Mice and Their Relation to Social Dominance or Subordinance ». *Hormones and Behavior* 15(3):238-45. doi: 10.1016/0018-506X(81)90013-1.

Maekawa, Masashi. 2017. « Domain 4 (D4) of Perfringolysin O to Visualize Cholesterol in Cellular Membranes—The Update ». *Sensors* 17(3):504. doi: 10.3390/s17030504.

Makkos, András, Ágnes Szántai, János Pálóczi, Judit Pipis, Bernadett Kiss, Paola Poggi, Péter Ferdinandy, Alexandros Chatgilialoglu, et Anikó Görbe. 2020. « A Comorbidity Model of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury and Hypercholesterolemia in Rat Cardiac Myocyte Cultures ». *Frontiers in Physiology* 10:1564. doi: 10.3389/fphys.2019.01564.

Manning, Janet R., Dharendra Thapa, Manling Zhang, Michael W. Stoner, Javier Traba, Catherine Corey, Sruti Shiva, Michael N. Sack, et Iain Scott. 2019. « Loss of GCN5L1 in Cardiac Cells Disrupts Glucose Metabolism and Promotes Cell Death via Reduced Akt/MTORC2 Signaling ». *The Biochemical Journal* 476(12):1713-24. doi: 10.1042/BCJ20190302.

Martin, Laura A., Barry E. Kennedy, et Barbara Karten. 2016. « Mitochondrial Cholesterol: Mechanisms of Import and Effects on Mitochondrial Function ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 48(2):137-51. doi: 10.1007/s10863-014-9592-6.

Marwarha, Gurdeep, Øystein Røsand, Nathan Scrimgeour, Katrine Hordnes Slagsvold, et Morten Andre Høydal. 2021. « MiR-210 Regulates Apoptotic Cell Death during Cellular Hypoxia and Reoxygenation in a Diametrically Opposite Manner ». *Biomedicines* 10(1):42. doi: 10.3390/biomedicines10010042.

Mauvais-Jarvis, Franck, Noel Bairey Merz, Peter J. Barnes, Roberta D. Brinton, Juan-Jesus Carrero, Dawn L. DeMeo, Geert J. De Vries, C. Neill Epperson, Ramaswamy Govindan, Sabra L. Klein, Amedeo Lonardo, Pauline M. Maki, Louise D. McCullough, Vera Regitz-Zagrosek, Judith G. Regensteiner, Joshua B. Rubin, Kathryn Sandberg, et Ayako Suzuki. 2020. « Sex and Gender: Modifiers of Health, Disease, and Medicine ». *The Lancet* 396(10250):565-82. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31561-0.

Maxfield, Frederick R., et Daniel Wüstner. 2012. « Analysis of Cholesterol Trafficking with Fluorescent Probes ». P. 367-93 in *Methods in Cell Biology*. Vol. 108. Elsevier.

McEnery, Maureen W. 1992. « The Mitochondrial Benzodiazepine Receptor: Evidence for Association with the Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 24(1):63-69. doi: 10.1007/BF00769532.

Mendel, Gregor. 1865. « Versuche über Pflanzenhybriden ». *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn* IV(Abhandlungen):3-47.

Mewton, Nathan, Pierre Croisille, Gerald Gahide, Gilles Rioufol, Eric Bonnefoy, Ingrid Sanchez, Thien Tri Cung, Catherine Sportouch, Denis Angoulvant, Gérard Finet, Xavier André-Fouët, Geneviève Derumeaux, Christophe Piot, Hélène Vernhet, Didier Revel, et Michel Ovize. 2010. « Effect of Cyclosporine on Left Ventricular Remodeling After Reperfused Myocardial Infarction ». *Journal of the American College of Cardiology* 55(12):1200-1205. doi: 10.1016/j.jacc.2009.10.052.

Meyer, Jeffrey H., Simon Cervenka, Min-Jeong Kim, William C. Kreisl, Ioline D. Henter, et Robert B. Innis. 2020. « Neuroinflammation in Psychiatric Disorders: PET Imaging and Promising New Targets ». *The Lancet Psychiatry* 7(12):1064-74. doi: 10.1016/S2215-0366(20)30255-8.

Middleton, Ryan J., Guo-Jun Liu, et Richard B. Banati. 2015. « Guwiyang Wurra–'Fire Mouse': A Global Gene Knockout Model for TSPO/PBR Drug Development, Loss-of-Function and Mechanisms of Compensation Studies ». *Biochemical Society Transactions* 43(4):553-58. doi: 10.1042/BST20150039.

Midzak, Andrew, Nagaraju Akula, Laurent Lecanu, et Vassilios Papadopoulos. 2011. « Novel Androstenetriol Interacts with the Mitochondrial Translocator Protein and Controls Steroidogenesis ». *Journal of Biological Chemistry* 286(11):9875-87. doi: 10.1074/jbc.M110.203216.

Midzak, Andrew, Georges Rammouz, et Vassilios Papadopoulos. 2012. « Structure–Activity Relationship (SAR) Analysis of a Family of Steroids Acutely Controlling Steroidogenesis ». *Steroids* 77(13):1327-34. doi: 10.1016/j.steroids.2012.08.019.

Midzak, Andrew S., Nagaraju Akula, Malena B. Rone, et Vassilios Papadopoulos. 2015. « Computational Modeling and Biological Validation of Novel Non-Steroidal Ligands for the Cholesterol Recognition/Interaction Amino Acid Consensus (CRAC) Motif of the Mitochondrial Translocator Protein (TSPO) ». *Pharmacological Research* 99:393-403. doi: 10.1016/j.phrs.2015.03.023.

Mills, Edward J., Christopher O'Regan, Oghenowede Eyawo, Ping Wu, Fergal Mills, Otavio Berwanger, et Matthias Briel. 2011. « Intensive Statin Therapy Compared with Moderate Dosing for Prevention of Cardiovascular Events: A Meta-Analysis of >40 000 Patients ». *European Heart Journal* 32(11):1409-15. doi: 10.1093/eurheartj/ehr035.

Mokrov, Grigory V., Olga A. Deeva, et Tatiana A. Gudasheva. 2021. « The Ligands of Translocator Protein: Design and Biological Properties ». *Current Pharmaceutical Design* 27(2):217-37. doi: 10.2174/1381612826666200903122025.

Morin, D., R. Assaly, S. Paradis, et A. Berdeaux. 2009. « Inhibition of Mitochondrial Membrane Permeability as a Putative Pharmacological Target for Cardioprotection ». *Current Medicinal Chemistry* 16(33):4382-98. doi: 10.2174/092986709789712871.

Morin, Didier, Romain Long, Mathieu Panel, Lydie Laure, Adela Taranu, Cindy Gueguen, Sandrine Pons, Valerio Leoni, Claudio Caccia, Stephen F. Vatner, Dorothy E. Vatner, Hongyu Qiu, Christophe Depre, Alain Berdeaux, et Bijan Ghaleh. 2019. « Hsp22 Overexpression Induces Myocardial Hypertrophy, Senescence and Reduced Life Span through Enhanced Oxidative Stress ». *Free Radical Biology and Medicine* 137:194-200. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.035.

Morin, Didier, Julien Musman, Sandrine Pons, Alain Berdeaux, et Bijan Ghaleh. 2016. « Mitochondrial Translocator Protein (TSPO): From Physiology to Cardioprotection ». *Biochemical Pharmacology* 105:1-13. doi: 10.1016/j.bcp.2015.12.003.

Morohaku, Kanako, Susanne H. Pelton, Daniel J. Daugherty, W. Ronald Butler, Wenbin Deng, et Vimal Selvaraj. 2014. « Translocator Protein/Peripheral Benzodiazepine Receptor Is Not Required for Steroid Hormone Biosynthesis ». *Endocrinology* 155(1):89-97. doi: 10.1210/en.2013-1556.

Morrissey, Nicole A., Craig Beall, et Kate L. J. Ellacott. 2021. « Absence of the Mitochondrial Translocator Protein 18 KDa in Mice Does Not Affect Body Weight or Food Intake Responses to Altered Energy Availability ». *Journal of Neuroendocrinology* 33(9). doi: 10.1111/jne.13027.

Moussard, Christian. 2006. *Biochimie structurale et métabolique*. De Boeck Sup. De Boeck.

Mouton, Alan J., Xuan Li, Michael E. Hall, et John E. Hall. 2020. « Obesity, Hypertension, and Cardiac Dysfunction: Novel Roles of Immunometabolism in Macrophage Activation and Inflammation ». *Circulation Research* 126(6):789-806. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.312321.

Muntean, Danina M., Adrian Sturza, Maria D. Dănilă, Claudia Borza, Oana M. Duicu, et Cristian Mornoș. 2016. « The Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Injury and Protective Strategies ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016:1-19. doi: 10.1155/2016/8254942.

Murphy, Elizabeth, et Charles Steenbergen. 2008. « Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury ». *Physiological Reviews* 88(2):581-609. doi: 10.1152/physrev.00024.2007.

Murry, C. E., R. B. Jennings, et K. A. Reimer. 1986. « Preconditioning with Ischemia: A Delay of Lethal Cell Injury in Ischemic Myocardium. » *Circulation* 74(5):1124-36. doi: 10.1161/01.CIR.74.5.1124.

Musman, Julien. 2017. « L'accumulation du cholestérol et des oxystérols mitochondriaux lors de la reperfusion du myocarde ischémique : mécanismes et implication dans la cardioprotection ». Paris Est.

Musman, Julien, Stéphanie Paradis, Mathieu Panel, Sandrine Pons, Caroline Barau, Claudio Caccia, Valerio Leoni, Bijan Ghaleh, et Didier Morin. 2017. « A TSPO Ligand Prevents Mitochondrial Sterol Accumulation and Dysfunction during Myocardial Ischemia-Reperfusion in Hypercholesterolemic Rats ». *Biochemical Pharmacology* 142:87-95. doi: 10.1016/j.bcp.2017.06.125.

Mutemberezi, Valentin, Owein Guillemot-Legris, et Giulio G. Muccioli. 2016. « Oxysterols: From Cholesterol Metabolites to Key Mediators ». *Progress in Lipid Research* 64:152-69. doi: 10.1016/j.plipres.2016.09.002.

Nakamura, Kazuhiko, Isao Fukunishi, Yurie Nakamoto, Kazuhiko Iwahashi, et Mitsunobu Yoshii. 2002. « Peripheral-Type Benzodiazepine Receptors on Platelets Are Correlated with the Degrees of Anxiety in Normal Human Subjects ». *Psychopharmacology* 162(3):301-3. doi: 10.1007/s00213-002-1098-y.

Nakamura, Kazuhiko, Kazuo Yamada, Yoshimi Iwayama, Tomoko Toyota, Aizou Furukawa, Takahiro Takimoto, Hayato Terayama, Kazuhiko Iwahashi, Nori Takei, Yoshio Minabe, Yoshimoto Sekine, Katsuaki Suzuki, Yasuhide Iwata, Anitha Pillai, Yurie Nakamoto, Kazutaka Ikeda, Mitsunobu Yoshii, Isao Fukunishi, Takeo Yoshikawa, et Norio Mori. 2006. « Evidence That Variation in the Peripheral Benzodiazepine Receptor(PBR) Gene Influences Susceptibility to Panic Disorder ». *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 141B(3):222-26. doi: 10.1002/ajmg.b.30211.

Neely, J. R., et H. E. Morgan. 1974. « Relationship Between Carbohydrate and Lipid Metabolism and the Energy Balance of Heart Muscle ». *Annual Review of Physiology* 36(1):413-59. doi: 10.1146/annurev.ph.36.030174.002213.

Neess, Ditte, Maria Bloksgaard, Signe Bek, Ann-Britt Marcher, Ida C. Elle, Torben Helledie, Marianne Due, Vasileios Pagmantidis, Bente Finsen, Johannes Wilbertz, Mogens Kruhøffer, Nils Færgeman, et Susanne Mandrup. 2011. « Disruption of the Acyl-CoA-Binding Protein Gene Delays Hepatic Adaptation to Metabolic Changes at Weaning ». *Journal of Biological Chemistry* 286(5):3460-72. doi: 10.1074/jbc.M110.161109.

Nguyen, N., E. Fakra, V. Pradel, E. Jouve, C. Alquier, M. E. Le Guern, J. Micallef, et O. Blin. 2006. « Efficacy of Etifoxine Compared to Lorazepam Monotherapy in the Treatment of Patients with Adjustment Disorders with Anxiety: A Double-Blind Controlled Study in General Practice ». *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 21(3):139-49. doi: 10.1002/hup.757.

Nikolaeva, Svetlana, Sylvain Pradervand, Gabriel Centeno, Vlasta Zavadova, Natsuko Tokonami, Marc Maillard, Olivier Bonny, et Dmitri Firsov. 2012. « The Circadian Clock Modulates Renal Sodium Handling ». *Journal of the American Society of Nephrology* 23(6):1019-26. doi: 10.1681/ASN.2011080842.

Nothdurfter, Caroline, Thomas C. Baghai, Cornelius Schüle, et Rainer Rupprecht. 2012. « Translocator Protein (18 KDa) (TSPO) as a Therapeutic Target for Anxiety and Neurologic Disorders ». *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 262(S2):107-12. doi: 10.1007/s00406-012-0352-5.

Nunnari, Jodi, et Anu Suomalainen. 2012. « Mitochondria: In Sickness and in Health ». *Cell* 148(6):1145-59. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035.

Obame, Fatou Nsoure, Roland Zini, Rachid Souktani, Alain Berdeaux, et Didier Morin. 2007. « Peripheral Benzodiazepine Receptor-Induced Myocardial Protection Is Mediated by Inhibition of Mitochondrial Membrane Permeabilization ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 323(1):336-45. doi: 10.1124/jpet.107.124255.

O'Beirne, Gerard B., Margaret J. Woods, et D. Clive Williams. 1990. « Two Subcellular Locations for Peripheral-Type Benzodiazepine Acceptors in Rat Liver ». *European Journal of Biochemistry* 188(1):131-38. doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15380.x.

O'Gara, Patrick T., Frederick G. Kushner, Deborah D. Ascheim, Donald E. Casey, Mina K. Chung, James A. de Lemos, Steven M. Ettinger, James C. Fang, Francis M. Fesmire, Barry A. Franklin, Christopher B. Granger, Harlan M. Krumholz, Jane A. Linderbaum, David A. Morrow, L. Kristin Newby, Joseph P. Ornato, Narith Ou, Martha J. Radford, Jacqueline E. Tamis-Holland, Carl L. Tommaso, Cynthia M. Tracy, Y. Joseph Woo, et David X. Zhao. 2013. « 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction ». *Journal of the American College of Cardiology* 61(4):e78-140. doi: 10.1016/j.jacc.2012.11.019.

Ohtani, Tomohito, Toshiaki Mano, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata, Mayu Nishio, Yasuharu Takeda, Kinya Otsu, Takeshi Miwa, Tohru Masuyama, Masatsugu Hori, et Kazuhiro Yamamoto. 2009. « Cardiac Steroidogenesis and Glucocorticoid in the Development of Cardiac Hypertrophy during the Progression to Heart Failure ». *Journal of Hypertension* 27(5):1074-83. doi: 10.1097/HJH.0b013e328326cb04.

Oishi, Katsutaka, Naoki Ohkura, Koji Kadota, Manami Kasamatsu, Kentaro Shibusawa, Juzo Matsuda, Kazuhiko Machida, Shuichi Horie, et Norio Ishida. 2006. « Clock mutation affects circadian regulation of circulating blood cells ». *Journal of Circadian Rhythms* 4(0):13. doi: 10.1186/1740-3391-4-13.

O'Shea, Karen M., Radha Ananthakrishnan, Qing Li, Nosirudeen Quadri, Devi Thiagarajan, Gopalkrishna Sreejit, Lingjie Wang, Hylde Zirpoli, Juan Francisco Aranda, Arthur S. Alberts, Ann Marie Schmidt, et Ravichandran Ramasamy. 2017. « The Formin, DIAPH1, Is a Key Modulator of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury ». *EBioMedicine* 26:165-74. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.11.012.

Ostadal, Bohuslav, Ivan Netuka, Jiri Maly, Josef Besik, et Ivana Ostadalova. 2009. « Gender Differences in Cardiac Ischemic Injury and Protection—Experimental Aspects ». *Experimental Biology and Medicine* 234(9):1011-19. doi: 10.3181/0812-MR-362.

Ottani, Filippo, Roberto Latini, Lidia Staszewsky, Luigi La Vecchia, Nicola Locuratolo, Marco Sicuro, Serge Masson, Simona Barlera, Valentina Milani, Mario Lombardi, Alessandra Costalunga, Nadia Mollichelli, Andrea Santarelli, Nicoletta De Cesare, Paolo Sganzerla, Alberto Boi, Aldo Pietro Maggioni, et Ugo Limbruno. 2016. « Cyclosporine A in Reperfused Myocardial Infarction ». *Journal of the American College of Cardiology* 67(4):365-74. doi: 10.1016/j.jacc.2015.10.081.

Otterbein, Leo E., Roberta Foresti, et Roberto Motterlini. 2016. « Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in the Heart: The Balancing Act Between Danger Signaling and Pro-Survival ». *Circulation Research* 118(12):1940-59. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306588.

Ouyang, Mao, Junya Lu, Qi Ding, Tao Qin, Caixia Peng, et Qin Guo. 2020. « Knockdown of Long Non-Coding RNA PVT1 Protects Human AC16 Cardiomyocytes from Hypoxia/Reoxygenation-Induced Apoptosis and Autophagy by Regulating MiR-186/Beclin-1 Axis ». *Gene* 754:144775. doi: 10.1016/j.gene.2020.144775.

Owen, David R., Jinjiang Fan, Enrico Campioli, Sathvika Venugopal, Andrew Midzak, Edward Daly, Aline Harlay, Leeyah Issop, Vincenzo Libri, Dimitra Kalogiannopoulou, Eduardo Oliver, Enrique Gallego-Colon, Alessandro Colasanti, Les Huson, Eugenii A. Rabiner, Puvan Suppiah, Charles Essagian, Paul M. Matthews, et Vassilios Papadopoulos. 2017. « TSPO Mutations in Rats and a Human Polymorphism Impair the Rate of Steroid Synthesis ». *Biochemical Journal* 474(23):3985-99. doi: 10.1042/BCJ20170648.

Panel, Mathieu, Bijan Ghaleh, et Didier Morin. 2017a. « Ca2+ Ionophores Are Not Suitable for Inducing MPTP Opening in Murine Isolated Adult Cardiac Myocytes ». *Scientific Reports* 7(1):4283. doi: 10.1038/s41598-017-04618-4.

Panel, Mathieu, Bijan Ghaleh, et Didier Morin. 2017b. « Targeting Mitochondrial Permeability as a Pharmacological Cardioprotective Strategy. » *Medical Research Archives* 5(10):31.

Papadopoulos, V., H. Amri, N. Boujrad, C. Cascio, M. Culty, M. Garnier, M. Hardwick, H. Li, B. Vidic, A. S. Brown, J. L. Reversa, J. M. Bernassau, et K. Drieu. 1997. « Peripheral Benzodiazepine Receptor in Cholesterol Transport and Steroidogenesis ». *Steroids* 62(1):21-28. doi: 10.1016/S0039-128X(96)00154-7.

Papadopoulos, Vassilios. 2014. « On the Role of the Translocator Protein (18-KDa) TSPO in Steroid Hormone Biosynthesis ». *Endocrinology* 155(1):15-20. doi: 10.1210/en.2013-2033.

Papadopoulos, Vassilios, Yasaman Aghazadeh, Jinjiang Fan, Enrico Campioli, Barry Zirkin, et Andrew Midzak. 2015. « Translocator Protein-Mediated Pharmacology of Cholesterol Transport and Steroidogenesis ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 408:90-98. doi: 10.1016/j.mce.2015.03.014.

Papadopoulos, Vassilios, Mario Baraldi, Tomás R. Guilarte, Thomas B. Knudsen, Jean-Jacques Lacapère, Peter Lindemann, Michael D. Norenberg, David Nutt, Abraham Weizman, Ming-Rong Zhang, et Moshe Gavish. 2006. « Translocator Protein (18kDa): New Nomenclature for the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Based on Its Structure and Molecular Function ». *Trends in Pharmacological Sciences* 27(8):402-9. doi: 10.1016/j.tips.2006.06.005.

Paradis, Stéphanie, Valerio Leoni, Claudio Caccia, Alain Berdeaux, et Didier Morin. 2013. « Cardioprotection by the TSPO Ligand 4'-Chlorodiazepam Is Associated with Inhibition of Mitochondrial Accumulation of Cholesterol at Reperfusion ». *Cardiovascular Research* 98(3):420-27. doi: 10.1093/cvr/cvt079.

Park, Nammi, Jubert Marquez, Maria Victoria Faith Garcia, Ippei Shimizu, Sung Ryul Lee, Hyoung Kyu Kim, et Jin Han. 2021. « Phosphorylation in Novel Mitochondrial Creatine Kinase Tyrosine Residues Render Cardioprotection against Hypoxia/Reoxygenation Injury ». *Journal of Lipid and Atherosclerosis* 10(2):223-39. doi: 10.12997/jla.2021.10.2.223.

Peng, Cai-Liang, Ning Jiang, Jian-Fei Zhao, Kun Liu, Wei Jiang, et Pei-Gang Cao. 2021. « Metformin Relieves H/R-Induced Cardiomyocyte Injury through MiR-19a/ACSL Axis - Possible Therapeutic Target for Myocardial I/R Injury ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 414:115408. doi: 10.1016/j.taap.2021.115408.

Perman, Jeanna C., Pontus Boström, Malin Lindbom, Ulf Lidberg, Marcus StÅhlman, Daniel Hägg, Henrik Lindskog, Margareta Scharin Täng, Elmir Omerovic, Lillemor Mattsson Hultén, Anders Jeppsson, Petur Petursson, Johan Herlitz, Gunilla Olivecrona, Dudley K. Strickland, Kim Ekroos, Sven-Olof Olofsson, et Jan Borén. 2011. « The VLDL Receptor Promotes Lipotoxicity and Increases Mortality in Mice Following an Acute Myocardial Infarction ». *Journal of Clinical Investigation* 121(7):2625-40. doi: 10.1172/JCI43068.

Piepoli, Massimo F., Arno W. Hoes, Stefan Agewall, Christian Albus, Carlos Brotons, Alberico L. Catapano, Marie-Therese Cooney, Ugo Corrà, Bernard Cosyns, Christi Deaton, Ian Graham, Michael Stephen Hall, F. D. Richard Hobbs, Maja-Lisa Løchen, Herbert Löllgen, Pedro Marques-Vidal, Joep Perk, Eva Prescott, Josep Redon, Dimitrios J. Richter, Naveed Sattar, Yvo Smulders, Monica Tiberi, H. Bart van der Worp, Ineke van Dis, et W. M. Monique Verschuren. 2016. « 2016 European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Constituted by Representatives of 10 Societies and by Invited Experts)Developed with the Special Contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR) ». *European Heart Journal* 37(29):2315-81. doi: 10.1093/eurheartj/ehw106.

Piot, Christophe, Croisille Pierre, Staat Patrick, Thibault Hélène, Rioufol Gilles, Mewton Nathan, Elbelghiti Rachid, Cung Thien Tri, Bonnefoy Eric, Angoulvant Denis, Macia Christophe, Raczka Franck, Sportouch Catherine, Gahide Gerald, Finet Gérard, André-Fouët Xavier, Revel Didier, Kirkorian Gilbert, Monassier Jean-Pierre, Derumeaux Geneviève, et Ovize Michel. 2008. « Effect of Cyclosporine on Reperfusion Injury in Acute Myocardial Infarction ». *The New England Journal of Medicine* 9.

Pitasi, Caterina Luana, Junjun Liu, Blandine Gausserès, Gaëlle Pommier, Etienne Delangre, Mathieu Armanet, Pierre Cattan, Bruno Mégarbane, Anne-Sophie Hanak, Kamel Maouche, Danielle Bailbé,

Bernard Portha, et Jamileh Movassat. 2020. « Implication of Glycogen Synthase Kinase 3 in Diabetes-Associated Islet Inflammation ». *Journal of Endocrinology* 244(1):133-48. doi: 10.1530/JOE-19-0239.

Poli, Giuseppe, Fiorella Biasi, et Gabriella Leonarduzzi. 2013. « Oxysterols in the Pathogenesis of Major Chronic Diseases ». *Redox Biology* 1(1):125-30. doi: 10.1016/j.redox.2012.12.001.

Poornima, Indu G., Pratik Parikh, et Richard P. Shannon. 2006. « Diabetic Cardiomyopathy: The Search for a Unifying Hypothesis ». *Circulation Research* 98(5):596-605. doi: 10.1161/01.RES.0000207406.94146.c2.

Portal, Lolita, Valérie Martin, Rana Assaly, Alexandra d'Anglemont de Tassigny, Stéphanie Michineau, Alain Berdeaux, Bijan Ghaleh, et Sandrine Pons. 2013. « A Model of Hypoxia-Reoxygenation on Isolated Adult Mouse Cardiomyocytes: Characterization, Comparison With Ischemia-Reperfusion, and Application to the Cardioprotective Effect of Regular Treadmill Exercise ». *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 18(4):367-75. doi: 10.1177/1074248412475158.

Pozzo, E. Da, B. Costa, et C. Martini. 2012. « Translocator Protein (TSPO) and Neurosteroids: Implications in Psychiatric Disorders ». *Current Molecular Medicine* 12:426-42.

Qi, Xiaolong, Jiahong Xu, Fei Wang, et Junjie Xiao. 2012. « Translocator Protein (18 KDa): A Promising Therapeutic Target and Diagnostic Tool for Cardiovascular Diseases ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012:1-9. doi: 10.1155/2012/162934.

Rakugi, H., H. Yu, A. Kamitani, Y. Nakamura, M. Ohishi, K. Kamide, Y. Nakata, S. Takami, J. Higaki, et T. Ogihara. 1996. « Links between hypertension and myocardial infarction ». *American Heart Journal* 132:213-21.

Rampon, Christine, Mohamed Rouzaffour, Mariano A. Ostuni, Pascale Dufourcq, Christelle Girard, Jean Marie Freyssinet, Jean-Jacques Lacapere, Ghislaine Schweizer-Groyer, et Sophie Vriz. 2009. « Translocator Protein (18 KDa) Is Involved in Primitive Erythropoiesis in Zebrafish ». *The FASEB Journal* 23(12):4181-92. doi: 10.1096/fj.09-129262.

Ray, Kausik K., Pablo Corral, Enrique Morales, et Stephen J. Nicholls. 2019. « Pharmacological Lipid-Modification Therapies for Prevention of Ischaemic Heart Disease: Current and Future Options ». *The Lancet* 394(10199):697-708. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31950-6.

Regitz-Zagrosek, Vera, et Georgios Kararigas. 2017. « Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease ». *Physiological Reviews* 97(1):1-37. doi: 10.1152/physrev.00021.2015.

Repa, Joyce J., et David J. Mangelsdorf. 1999. « Nuclear Receptor Regulation of Cholesterol and Bile Acid Metabolism ». *Current Opinion in Biotechnology* 10(6):557-63. doi: 10.1016/S0958-1669(99)00031-2.

Rone, Malena B., Jinjiang Fan, et Vassilios Papadopoulos. 2009. « Cholesterol Transport in Steroid Biosynthesis: Role of Protein–Protein Interactions and Implications in Disease States ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791(7):646-58. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.03.001.

Rone, Malena B., Andrew S. Midzak, Leeyah Issop, Georges Rammouz, Sathvika Jagannathan, Jinjiang Fan, Xiaoying Ye, Josip Blonder, Timothy Veenstra, et Vassilios Papadopoulos. 2012. « Identification of a Dynamic Mitochondrial Protein Complex Driving Cholesterol Import, Trafficking, and Metabolism to Steroid Hormones ». *Molecular Endocrinology* 26(11):1868-82. doi: 10.1210/me.2012-1159.

Rupprecht, Rainer, Vassilios Papadopoulos, Gerhard Rammes, Thomas C. Baghai, Jinjiang Fan, Nagaraju Akula, Ghislaine Groyer, David Adams, et Michael Schumacher. 2010. « Translocator Protein (18 KDa) (TSPO) as a Therapeutic Target for Neurological and Psychiatric Disorders ». *Nature Reviews Drug Discovery* 9(12):971-88. doi: 10.1038/nrd3295.

Rupprecht, Rainer, Gerhard Rammes, Daniela Eser, Thomas C. Baghai, Cornelius Schüle, Caroline Nothdurfter, Thomas Troxler, Conrad Gentsch, Hans O. Kalkman, Frederique Chaperon, Veska Uzunov, Kevin H. McAllister, Valerie Bertaina-Anglade, Christophe Drieu La Rochelle, Dietrich Tuerck, Annette Floesser, Beate Kiese, Michael Schumacher, Rainer Landgraf, Florian Holsboer, et Klaus Kucher. 2009. « Translocator Protein (18 KD) as Target for Anxiolytics Without Benzodiazepine-Like Side Effects ». *Science* 325(5939):490-93. doi: 10.1126/science.1175055.

Russell, Jake, Eugene F. Du Toit, Jason N. Peart, Hemal H. Patel, et John P. Headrick. 2017. « Myocyte Membrane and Microdomain Modifications in Diabetes: Determinants of Ischemic Tolerance and Cardioprotection ». *Cardiovascular Diabetology* 16(1):155. doi: 10.1186/s12933-017-0638-z.

Samouillan, Valerie, Ignacio Miguel Martinez de Lejarza Samper, Aleyda Benitez Amaro, David Vilades, Jany Dandurand, Josefina Casas, Esther Jorge, David de Gonzalo Calvo, Alberto Gallardo, Enrique Lerma, Jose Maria Guerra, Francesc Carreras, Ruben Leta, et Vicenta Llorente Cortes. 2020. « Biophysical and Lipidomic Biomarkers of Cardiac Remodeling Post-Myocardial Infarction in Humans ». *Biomolecules* 10(11):1471. doi: 10.3390/biom10111471.

Scaini, Giselli, Tatiana Barichello, Gabriel R. Fries, Elizabeth A. Kennon, Taylor Andrews, Bobby R. Nix, Giovana Zunta-Soares, Samira S. Valvassori, Jair C. Soares, et João Quevedo. 2019. « TSPO Upregulation in Bipolar Disorder and Concomitant Downregulation of Mitophagic Proteins and NLRP3 Inflammasome Activation ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 44(7):1291-99. doi: 10.1038/s41386-018-0293-4.

Schain, Martin, et William Charles Kreisl. 2017. « Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders—a Review ». *Current Neurology and Neuroscience Reports* 17(3):25. doi: 10.1007/s11910-017-0733-2.

Schaller, Sophie, Stéphanie Paradis, Gladys A. Ngoh, Rana Assaly, Bruno Buisson, Cyrille Drouot, Mariano A. Ostuni, Jean-Jacques Lacapere, Firas Bassissi, Thierry Bordet, Alain Berdeaux, Steven P. Jones, Didier Morin, et Rebecca M. Pruss. 2010. « TRO40303, a New Cardioprotective Compound, Inhibits Mitochondrial Permeability Transition ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 333(3):696-706. doi: 10.1124/jpet.110.167486.

Schmidt, M., J. B. Jacobsen, T. L. Lash, H. E. Botker, et H. T. Sorensen. 2012. « 25 Year Trends in First Time Hospitalisation for Acute Myocardial Infarction, Subsequent Short and Long Term Mortality, and the Prognostic Impact of Sex and Comorbidity: A Danish Nationwide Cohort Study ». *BMJ* 344(jan25 2):e356-e356. doi: 10.1136/bmj.e356.

Schroepfer, George J. 2000. « Oxysterols: Modulators of Cholesterol Metabolism and Other Processes ». *Physiological Reviews* 80(1):361-554. doi: 10.1152/physrev.2000.80.1.361.

Selvaraj, Vimal, Kanako Morohaku, Prasanthi P. Koganti, Jianmin Zhang, Wei He, Susan M. Quirk, et Douglas M. Stocco. 2020. « Commentary: Amhr2-Cre-Mediated Global Tspo Knockout ». *Frontiers in Endocrinology* 11:472. doi: 10.3389/fendo.2020.00472.

Selvaraj, Vimal, et Douglas M. Stocco. 2015. « The Changing Landscape in Translocator Protein (TSPO) Function ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 26(7):341-48. doi: 10.1016/j.tem.2015.02.007.

Selvaraj, Vimal, Douglas M. Stocco, et Barbara J. Clark. 2018. « Current Knowledge on the Acute Regulation of Steroidogenesis† ». *Biology of Reproduction* 99(1):13-26. doi: 10.1093/biolre/ioy102.

Senicourt, Lucile. 2016. « Etudes des protéines membranaires TSPO ». Université Pierre et Marie Curie.

Seravalle, Gino, et Guido Grassi. 2017. « Obesity and Hypertension ». *Pharmacological Research* 122:1-7. doi: 10.1016/j.phrs.2017.05.013.

Setiawan, Elaine, Alan A. Wilson, Romina Mizrahi, Pablo M. Rusjan, Laura Miler, Grazyna Rajkowska, Ivonne Suridjan, James L. Kennedy, P. Vivien Rekkas, Sylvain Houle, et Jeffrey H. Meyer. 2015. « Role of Translocator Protein Density, a Marker of Neuroinflammation, in the Brain During Major Depressive Episodes ». *JAMA Psychiatry* 72(3):268. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2014.2427.

Shansky, Rebecca M., et Anne Z. Murphy. 2021. « Considering Sex as a Biological Variable Will Require a Global Shift in Science Culture ». *Nature Neuroscience* 24(4):457-64. doi: 10.1038/s41593-021-00806-8.

Sharma, Saumya, Julia V. Adrogue, Leonard Golfman, Ivan Uray, John Lemm, Keith Youker, George P. Noon, O. H. Frazier, et Heinrich Taegtmeyer. 2004. « Intramyocardial Lipid Accumulation in the Failing Human Heart Resembles the Lipotoxic Rat Heart ». *The FASEB Journal* 18(14):1692-1700. doi: 10.1096/fj.04-2263com.

Silbernagl, Stefan, et Florian Lang. 2015. *Atlas de poche de physiopathologie*. 4ème édition. Lavoisier.

Šileikytė, Justina, Elizabeth Blachly-Dyson, Randall Sewell, Andrea Carpi, Roberta Menabò, Fabio Di Lisa, Fernanda Ricchelli, Paolo Bernardi, et Michael Forte. 2014. « Regulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by the Outer Membrane Does Not Involve the Peripheral Benzodiazepine Receptor (Translocator Protein of 18 KDa (TSPO)) ». *Journal of Biological Chemistry* 289(20):13769-81. doi: 10.1074/jbc.M114.549634.

Šileikytė, Justina, Valeria Petronilli, Alessandra Zulian, Federica Dabbeni-Sala, Giuseppe Tognon, Peter Nikolov, Paolo Bernardi, et Fernanda Ricchelli. 2011. « Regulation of the Inner Membrane Mitochondrial Permeability Transition by the Outer Membrane Translocator Protein (Peripheral Benzodiazepine Receptor) ». *Journal of Biological Chemistry* 286(2):1046-53. doi: 10.1074/jbc.M110.172486.

Silvestre, Jean-Sébastien, Christophe Heymes, Abdeslam Oubénaïssa, Valérie Robert, Brigitte Aupetit-Faisant, Alain Carayon, Bernard Swynghedauw, et Claude Delcayre. 1999. « Activation of Cardiac Aldosterone Production in Rat Myocardial Infarction: Effect of Angiotensin II Receptor Blockade and Role in Cardiac Fibrosis ». *Circulation* 99(20):2694-2701. doi: 10.1161/01.CIR.99.20.2694.

Silvestre, Jean-Sébastien, Valérie Robert, Christophe Heymes, Brigitte Aupetit-Faisant, Christian Mouas, Jean-Marie Moalic, Bernard Swynghedauw, et Claude Delcayre. 1998. « Myocardial Production of Aldosterone and Corticosterone in the Rat ». *Journal of Biological Chemistry* 273(9):4883-91. doi: 10.1074/jbc.273.9.4883.

Soffientini, Ugo, et Annette Graham. 2016. « Intracellular Cholesterol Transport Proteins: Roles in Health and Disease ». *Clinical Science* 130(21):1843-59. doi: 10.1042/CS20160339.

Song, Huiwen, Xing Feng, Heng Zhang, Yunmei Luo, Juan Huang, Meihua Lin, Junfei Jin, Xue Ding, Shujing Wu, He Huang, Tian Yu, Mukun Zhang, Haiou Hong, Shihua Yao, Yongxiang Zhao, et Zhiyong Zhang. 2019. « METTL3 and ALKBH5 Oppositely Regulate m ^{6} A Modification of *TFEB* MRNA, Which Dictates the Fate of Hypoxia/Reoxygenation-Treated Cardiomyocytes ». *Autophagy* 15(8):1419-37. doi: 10.1080/15548627.2019.1586246.

Song, Jiayi, Duan Wang, Hongen Chen, Xiuwei Huang, Yuan Zhong, Nan Jiang, Chaogang Chen, et Min Xia. 2017. « Association of Plasma 7-Ketocholesterol With Cardiovascular Outcomes and Total Mortality in Patients With Coronary Artery Disease ». *Circulation Research* 120(10):1622-31. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311049.

Song, Yongfeng, Junjun Liu, Ke Zhao, Ling Gao, et Jiajun Zhao. 2021. « Cholesterol-Induced Toxicity: An Integrated View of the Role of Cholesterol in Multiple Diseases ». *Cell Metabolism* 33(10):1911-25. doi: 10.1016/j.cmet.2021.09.001.

Sozen, Erdi, Burak Yazgan, Ali Sahin, Umit Ince, et Nesrin Kartal Ozer. 2018. « High Cholesterol Diet-Induced Changes in Oxysterol and Scavenger Receptor Levels in Heart Tissue ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018:1-13. doi: 10.1155/2018/8520746.

Stoner, Michael W., Charles F. McTiernan, Iain Scott, et Janet R. Manning. 2020. « Calreticulin Expression in Human Cardiac Myocytes Induces ER Stress-Associated Apoptosis ». *Physiological Reports* 8(8):e14400. doi: 10.14814/phy2.14400.

Stumvoll, Michael, Barry J. Goldstein, et Timon W. van Haeften. 2005. « Type 2 Diabetes: Principles of Pathogenesis and Therapy ». *The Lancet* 365(9467):1333-46. doi: 10.1016/S0140-6736(05)61032-X.

Su, Leon, John E. Siegel, et Michael C. Fishbein. 2004. « Adipose Tissue in Myocardial Infarction ». *Cardiovascular Pathology* 13(2):98-102. doi: 10.1016/S1054-8807(03)00134-0.

Taketani, S., H. Kohno, T. Furukawa, et R. Tokunaga. 1995. « Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the intracellular transport of heme and porphyrins ». *The Journal of Biochemistry* 117(4):875-80.

Talchai, Chutima, Shouhong Xuan, Hua V. Lin, Lori Sussel, et Domenico Accili. 2012. « Pancreatic β Cell Dedifferentiation as a Mechanism of Diabetic β Cell Failure ». *Cell* 150(6):1223-34. doi: 10.1016/j.cell.2012.07.029.

Thackeray, James T., Henri C. Hupe, Yong Wang, Jens P. Bankstahl, Georg Berding, Tobias L. Ross, Johann Bauersachs, Kai C. Wollert, et Frank M. Bengel. 2018. « Myocardial Inflammation Predicts Remodeling and Neuroinflammation After Myocardial Infarction ». *Journal of the American College of Cardiology* 71(3):263-75. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.024.

Thai, Phung N., Daniel J. Daugherty, Bert J. Frederich, Xiyuan Lu, Wenbin Deng, Donald M. Bers, Elena N. Dedkova, et Saul Schaefer. 2018. « Cardiac-Specific Conditional Knockout of the 18-KDa Mitochondrial Translocator Protein Protects from Pressure Overload Induced Heart Failure ». *Scientific Reports* 8(1):16213. doi: 10.1038/s41598-018-34451-2.

Tibaut, Miha, Dusan Mekis, et Daniel Petrovic. 2017. « Pathophysiology of Myocardial Infarction and Acute Management Strategies ». *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 14(3):150-59. doi: 10.2174/1871525714666161216100553.

Timmers, L., G. Pasterkamp, V. C. de Hoog, F. Arslan, Y. Appelman, et D. P. V. de Kleijn. 2012. « The Innate Immune Response in Reperfused Myocardium ». *Cardiovascular Research* 94(2):276-83. doi: 10.1093/cvr/cvs018.

Timmis, Adam, Nick Townsend, Chris P. Gale, Aleksandra Torbica, Maddalena Lettino, Steffen E. Petersen, Elias A. Mossialos, Aldo P. Maggioni, Dzianis Kazakiewicz, Heidi T. May, Delphine De Smedt,

Marcus Flather, Liesl Zuhlke, John F. Beltrame, Radu Huculeci, Luigi Tavazzi, Gerhard Hindricks, Jeroen Bax, Barbara Casadei, Stephan Achenbach, Lucy Wright, Panos Vardas, European Society of Cardiology, Lezha Mimoza, Goda Artan, Demiraj Aurel, Mohammed Chettibi, Naima Hammoudi, Hamayak Sisakian, Sergey Pepoyan, Bernhard Metzler, Peter Siostrzonek, Franz Weidinger, Tofig Jahangirov, Farid Aliyev, Yasmin Rustamova, Nikolay Manak, Aliaksandr Mrochak, Patrizio Lancellotti, Agnès Pasquet, Marc Claeys, Zumreta Kušljugić, Larisa Dizdarević Hudić, Elnur Smajić, Mariya Petkova Tokmakova, Plamen Marinov Gatzov, Davor Milicic, Mijo Bergovec, Christos Christou, Hera Heracleous Moustra, Theodoros Christodoulides, Ales Linhart, Milos Taborsky, Henrik Steen Hansen, Lene Holmvang, Steen Dalby Kristensen, Magdy Abdelhamid, Khaled Shokry, Priit Kampus, Margus Viigimaa, Essi Ryödi, Matti Niemelä, Tuomas T. Rissanen, Jean-Yves Le Heuzey, Martine Gilard, A. Aladashvili, A. Gamkrelidze, Maia Kereselidze, A. Zeiher, H. Katus, K. Bestehorn, Costas Tsioufis, John Goudevenos, Zoltán Csanádi, Dávid Becker, Kálmán Tóth, Þórdís Jóna Hrafnkelsdóttir, James Crowley, Peter Kearney, Barbra Dalton, Doron Zahger, Arik Wolak, Domenico Gabrielli, Ciro Indolfi, Stefano Urbinati, Gulnara Imantayeva, Salim Berkinbayev, Gani Bajraktari, Artan Ahmeti, Gezim Berisha, Mirrakhimov Erkin, Abilova Saamay, Andrejs Erglis, Iveta Bajare, Sanda Jegere, Malek Mohammed, Antoine Sarkis, Georges Saadeh, Ruta Zvirblyte, Gintare Sakalyte, Rimvydas Slapikas, Khaled Ellafi, Fathi El Ghamari, Cristiana Banu, Jean Beissel, Tiziana Felice, Sandra C. Buttigieg, Robert G. Xuereb, Mihail Popovici, Aneta Boskovic, Miroslav Rabrenovic, Samir Ztot, Saadia Abir-Khalil, A. C. van Rossum, B. J. M. Mulder, M. W. Elsendoorn, Elizabeta Srbinovska-Kostovska, Jorgo Kostov, Bosevski Marjan, Terje Steigen, Ole Christian Mjølstad, Piotr Ponikowski, Adam Witkowski, Piotr Jankowski, Victor Machado Gil, Jorge Mimoso, Sérgio Baptista, Dragos Vinereanu, Ovidiu Chioncel, Bogdan A. Popescu, Evgeny Shlyakhto, Raphael Oganov, Marina Foscoli, Marco Zavatta, Ana Djordjevic Dikic, Branko Beleslin, Mina Radosavljevic Radovanovic, Peter Hlivák, Robert Hatala, Gabriela Kaliská, Miran Kenda, Zlatko Fras, Manuel Anguita, Ángel Cequier, Javier Muñiz, Stefan James, Bengt Johansson, Pyotr Platonov, Michael Johannes Zellweger, Giovanni B. Pedrazzini, David Carballo, Hussam Eddin Shebli, Samer Kabbani, Leila Abid, Faouzi Addad, Engin Bozkurt, Meral Kayıkçıoğlu, Mustafa Kemal Erol, Volodymyr Kovalenko, Elena Nesukay, Andrew Wragg, Peter Ludman, Simon Ray, Ravshanbek Kurbanov, Dennis Boateng, Ghislain Daval, Víctor de Benito Rubio, David Sebastiao, Paola Thellung de Courtelary, et Isabel Bardinet. 2020. « European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019 ». *European Heart Journal* 41(1):12-85. doi: 10.1093/eurheartj/ehz859.

Tong, Qin-Hong, Hai-Ying Hu, Hui Chai, Ai-Bin Wu, Xiao-Hu Guo, Shan Wang, Yu-Feng Zhang, et Xiao-Yong Fan. 2021. « Dysregulation of the MiR-1275/HK2 Axis Contributes to the Progression of Hypoxia/Reoxygenation-Induced Myocardial Injury ». *Archives of Medical Research* 52(5):461-70. doi: 10.1016/j.arcmed.2021.01.006.

Tong, Xueying, Jiajuan Chen, Wei Liu, Hui Liang, et Hezhong Zhu. 2021. « LncRNA LSINCT5/MiR-222 Regulates Myocardial Ischemia-reperfusion Injury through PI3K/AKT Pathway ». *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 52(3):720-29. doi: 10.1007/s11239-021-02506-3.

Tremolanti, Chiara, Lorenzo Germelli, Elisabetta Barresi, Eleonora Da Pozzo, Francesca Simorini, Sabrina Castellano, Sabrina Taliani, Federico Da Settimo, Claudia Martini, et Barbara Costa. 2022. « Translocator Protein 18-KDa: A Promising Target to Treat Neuroinflammation-Related Degenerative Diseases ». *Current Medicinal Chemistry* 29(28):4831-61. doi: 10.2174/0929867329666220415120820.

Tsamatsoulis, Michalis, Chris J. Kapelios, Lambros Katsaros, Stella Vakrou, Vasilis Sousonis, Stefania Sventzouri, Nicholas Michelinakis, Despoina N. Perrea, Maria Anastasiou-Nana, et Konstantinos Malliaras. 2016. « Cardioprotective Effects of Intracoronary Administration of 4-Chlorodiazepam in Small and Large Animal Models of Ischemia-Reperfusion ». *International Journal of Cardiology* 224:90-95. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.09.011.

Tu, Lan N., Kanako Morohaku, Pulak R. Manna, Susanne H. Pelton, W. Ronald Butler, Douglas M. Stocco, et Vimal Selvaraj. 2014. « Peripheral Benzodiazepine Receptor/Translocator Protein Global Knock-out Mice Are Viable with No Effects on Steroid Hormone Biosynthesis ». *Journal of Biological Chemistry* 289(40):27444-54. doi: 10.1074/jbc.M114.578286.

Umetani, Michihisa, Pritam Ghosh, Tomonori Ishikawa, Junko Umetani, Mohamed Ahmed, Chieko Mineo, et Philip W. Shaul. 2014. « The Cholesterol Metabolite 27-Hydroxycholesterol Promotes Atherosclerosis via Proinflammatory Processes Mediated by Estrogen Receptor Alpha ». *Cell Metabolism* 20(1):172-82. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.013.

van der Valk, Jan. 2018. « Fetal bovine serum (FBS): Past – present – future ». *ALTEX* 99-118. doi: 10.14573/altex.1705101.

Vance, Jean E. 2014. « MAM (Mitochondria-Associated Membranes) in Mammalian Cells: Lipids and Beyond ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841(4):595-609. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.11.014.

Vander Heiden, M. G., N. S. Chandel, X. X. Li, P. T. Schumacker, M. Colombini, et C. B. Thompson. 2000. « Outer Mitochondrial Membrane Permeability Can Regulate Coupled Respiration and Cell Survival ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(9):4666-71. doi: 10.1073/pnas.090082297.

Varga, Zoltan, Zoltan Giricz, Peter Bencsik, Rosalinda Madonna, Mariann Gyongyosi, Rainer Schulz, Manuel Mayr, Thomas Thum, Laszlo Puskas, et Peter Ferdinandy. 2015. « Functional Genomics of Cardioprotection by Ischemic Conditioning and the Influence of Comorbid Conditions: Implications in Target Identification ». *Current Drug Targets* 16(8):904-11. doi: 10.2174/1389450116666150427154203.

Vaya, Jacob, Andrea Szuchman, Hagai Tavori, et Yuval Aluf. 2011. « Oxysterols Formation as a Reflection of Biochemical Pathways: Summary of in Vitro and in Vivo Studies ». *Chemistry and Physics of Lipids* 164(6):438-42. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2011.03.005.

Veenman, Leo, Yulia Shandalov, et Moshe Gavish. 2008. « VDAC Activation by the 18 KDa Translocator Protein (TSPO), Implications for Apoptosis ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40(3):199-205. doi: 10.1007/s10863-008-9142-1.

Vejux, A., L. Malvitte, et G. Lizard. 2008. « Side Effects of Oxysterols: Cytotoxicity, Oxidation, Inflammation, and Phospholipidosis ». *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 41(7):545-56. doi: 10.1590/S0100-879X2008000700001.

Vejux, Anne, Dehbia Abed-Vieillard, Khadija Hajji, Amira Zarrouk, John J. Mackrill, Shubhrima Ghosh, Thomas Nury, Aline Yammine, Mohamed Zaibi, Wafa Mihoubi, Habiba Bouchab, Boubker Nasser, Yaël Grosjean, et Gérard Lizard. 2020. « 7-Ketocholesterol and 7β-Hydroxycholesterol: In Vitro and Animal Models Used to Characterize Their Activities and to Identify Molecules Preventing Their Toxicity ». *Biochemical Pharmacology* 173:113648. doi: 10.1016/j.bcp.2019.113648.

Venugopal, Sathvika, Daniel Benjamin Martinez-Arguelles, Seimia Chebbi, Françoise Hullin-Matsuda, Toshihide Kobayashi, et Vassilios Papadopoulos. 2016. « Plasma Membrane Origin of the Steroidogenic Pool of Cholesterol Used in Hormone-Induced Acute Steroid Formation in Leydig Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 291(50):26109-25. doi: 10.1074/jbc.M116.740928.

Verma, A., J. S. Nye, et S. H. Snyder. 1987. « Porphyrins Are Endogenous Ligands for the Mitochondrial (Peripheral-Type) Benzodiazepine Receptor. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(8):2256-60. doi: 10.1073/pnas.84.8.2256.

Vinten-Johansen, J. 2004. « Involvement of Neutrophils in the Pathogenesis of Lethal Myocardial Reperfusion Injury ». *Cardiovascular Research* 61(3):481-97. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.10.011.

Virally, M., J. F. Blicklé, J. Girard, S. Halimi, D. Simon, et P. J. Guillausseau. 2007. « Type 2 Diabetes Mellitus: Epidemiology, Pathophysiology, Unmet Needs and Therapeutical Perspectives ». *Diabetes & Metabolism* 33(4):231-44. doi: 10.1016/j.diabet.2007.07.001.

Visseren, Frank L. J., François Mach, Yvo M. Smulders, David Carballo, Konstantinos C. Koskinas, Maria Bäck, Athanase Benetos, Alessandro Biffi, José-Manuel Boavida, Davide Capodanno, Bernard Cosyns, Carolyn Crawford, Constantinos H. Davos, Ileana Desormais, Emanuele Di Angelantonio, Oscar H. Franco, Sigrun Halvorsen, F. D. Richard Hobbs, Monika Hollander, Ewa A. Jankowska, Matthias Michal, Simona Sacco, Naveed Sattar, Lale Tokgozoglu, Serena Tonstad, Konstantinos P. Tsioufis, Ineke van Dis, Isabelle C. van Gelder, Christoph Wanner, Bryan Williams, ESC Scientific Document Group, Guy De Backer, Vera Regitz-Zagrosek, Anne Hege Aamodt, Magdy Abdelhamid, Victor Aboyans, Christian

Albus, Riccardo Asteggiano, Magnus Bäck, Michael A. Borger, Carlos Brotons, Jelena Čelutkienė, Renata Cifkova, Maja Cikes, Francesco Cosentino, Nikolaos Dagres, Tine De Backer, Dirk De Bacquer, Victoria Delgado, Hester Den Ruijter, Paul Dendale, Heinz Drexel, Volkmar Falk, Laurent Fauchier, Brian A. Ference, Jean Ferrières, Marc Ferrini, Miles Fisher, Danilo Fliser, Zlatko Fras, Dan Gaita, Simona Giampaoli, Stephan Gielen, Ian Graham, Catriona Jennings, Torben Jorgensen, Alexandra Kautzky-Willer, Maryam Kavousi, Wolfgang Koenig, Aleksandra Konradi, Dipak Kotecha, Ulf Landmesser, Madalena Lettino, Basil S. Lewis, Aleš Linhart, Maja-Lisa Løchen, Konstantinos Makrilakis, Giuseppe Mancia, Pedro Marques-Vidal, John William McEvoy, Paul McGreavy, Bela Merkely, Lis Neubeck, Jens Cosedis Nielsen, Joep Perk, Steffen E. Petersen, Anna Sonia Petronio, Massimo Piepoli, Nana Goar Pogosova, Eva Irene Bossano Prescott, Kausik K. Ray, Zeljko Reiner, Dimitrios J. Richter, Lars Rydén, Evgeny Shlyakhto, Marta Sitges, Miguel Sousa-Uva, Isabella Sudano, Monica Tiberi, Rhian M. Touyz, Andrea Ungar, W. M. Monique Verschuren, Olov Wiklund, David Wood, Jose Luis Zamorano, Yvo M. Smulders, David Carballo, Konstantinos C. Koskinas, Maria Bäck, Athanase Benetos, Alessandro Biffi, José-Manuel Boavida, Davide Capodanno, Bernard Cosyns, Carolyn A. Crawford, Constantinos H. Davos, Ileana Desormais, Emanuele Di Angelantonio, Oscar H. Franco Duran, Sigrun Halvorsen, F. D. Richard Hobbs, Monika Hollander, Ewa A. Jankowska, Matthias Michal, Simona Sacco, Naveed Sattar, Lale Tokgozoglu, Serena Tonstad, Konstantinos P. Tsioufis, Ineke van Dis, Isabelle C. van Gelder, Christoph Wanner, et Bryan Williams. 2021. « 2021 ESC Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice ». *European Heart Journal* 42(34):3227-3337. doi: 10.1093/eurheartj/ehab484.

Wang, Huaishan, Kangle Zhai, Yingchao Xue, Jia Yang, Qi Yang, Yi Fu, Yu Hu, Fang Liu, Weiqing Wang, Lianxian Cui, Hui Chen, Jianmin Zhang, et Wei He. 2016. « Global Deletion of TSPO Does Not Affect the Viability and Gene Expression Profile » édité par R. S. Weiss. *PLOS ONE* 11(12):e0167307. doi: 10.1371/journal.pone.0167307.

Wang, Jiayi, Jiehan Zhang, Yan Ma, Yuxiao Zeng, Cheng Lu, Fenghua Yang, Nianxin Jiang, Xuan Zhang, Yuhua Wang, Yinghui Xu, Hanjing Hou, Shengyang Jiang, et Shaowei Zhuang. 2021. « WTAP Promotes Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Increasing Endoplasmic Reticulum Stress via Regulating M6A Modification of ATF4 MRNA ». *Aging* 13(8):11135-49. doi: 10.18632/aging.202770.

Wang, Kai, Gang Wang, et Botao Zhou. 2022. « TSPO Knockdown Attenuates OGD/R-Induced Neuroinflammation and Neural Apoptosis by Decreasing NLRP3 Inflammasome Activity through PPARγ Pathway ». *Brain Research Bulletin* 187:1-10. doi: 10.1016/j.brainresbull.2022.06.009.

Wang, Wei, Liming Zhang, Xiaoying Zhang, Rui Xue, Lei Li, Weixing Zhao, Qiang Fu, Weidong Mi, et Yunfeng Li. 2016. « Lentiviral-Mediated Overexpression of the 18 KDa Translocator Protein (TSPO) in the Hippocampal Dentate Gyrus Ameliorates LPS-Induced Cognitive Impairment in Mice ». *Frontiers in Pharmacology* 07. doi: 10.3389/fphar.2016.00384.

Wang, Xiancan, Yuqiang Shang, Shilin Dai, Wei Wu, Fan Yi, et Long Cheng. 2020. « MicroRNA-16-5p Aggravates Myocardial Infarction Injury by Targeting the Expression of Insulin Receptor Substrates 1 and Mediating Myocardial Apoptosis and Angiogenesis ». *Current Neurovascular Research* 17(1):11-17. doi: 10.2174/1567202617666191223142743.

Weber, K. T., et C. G. Brilla. 1991. « Pathological Hypertrophy and Cardiac Interstitium. Fibrosis and Renin-Angiotensin-Aldosterone System. » *Circulation* 83(6):1849-65. doi: 10.1161/01.CIR.83.6.1849.

Wilhelm, Léa P., Laetitia Voilquin, Toshihide Kobayashi, Catherine Tomasetto, et Fabien Alpy. 2019. « Intracellular and Plasma Membrane Cholesterol Labeling and Quantification Using Filipin and GFP-D4 ». P. 137-52 in *Intracellular Lipid Transport*. Vol. 1949, *Methods in Molecular Biology*, édité par G. Drin. New York, NY: Springer New York.

Wolf, Anne, Marc Herb, Michael Schramm, et Thomas Langmann. 2020. « The TSPO-NOX1 Axis Controls Phagocyte-Triggered Pathological Angiogenesis in the Eye ». *Nature Communications* 11(1):2709. doi: 10.1038/s41467-020-16400-8.

Wright, Gary, et Vernon Reichenbecher. 1999. « The Effects of Superoxide and the Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligands on the Mitochondrial Processing of Manganese-Dependent Superoxide Dismutase ». *Experimental Cell Research* 246(2):443-50. doi: 10.1006/excr.1998.4331.

Xiao, Junjie, Dandan Liang, Hong Zhang, Ying Liu, Fajie Li, et Yi-Han Chen. 2010. « 4′-Chlorodiazepam, a Translocator Protein (18 KDa) Antagonist, Improves Cardiac Functional Recovery during Postischemia Reperfusion in Rats ». *Experimental Biology and Medicine* 235(4):478-86. doi: 10.1258/ebm.2009.009291.

Yao, Rumeng, Ruiyuan Pan, Chao Shang, Xiaoheng Li, Jinbo Cheng, Jiangping Xu, et Yunfeng Li. 2020. « Translocator Protein 18 KDa (TSPO) Deficiency Inhibits Microglial Activation and Impairs Mitochondrial Function ». *Frontiers in Pharmacology* 11:986. doi: 10.3389/fphar.2020.00986.

Yeagle, Philip L. 1989. « Lipid Regulation of Cell Membrane Structure and Function ». *The FASEB Journal* 3(7):1833-42. doi: 10.1096/fasebj.3.7.2469614.

Yellon, Derek M., et Derek J. Hausenloy. 2007. « Myocardial Reperfusion Injury ». *The New England Journal of Medicine* 15.

Young, Morag J., Colin D. Clyne, Timothy J. Cole, et John W. Funder. 2001. « Cardiac Steroidogenesis in the Normal and Failing Heart ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(11):6.

Zacchigna, Serena, Alessia Paldino, Inês Falcão-Pires, Evangelos P. Daskalopoulos, Matteo Dal Ferro, Simone Vodret, Pierluigi Lesizza, Antonio Cannatà, Daniela Miranda-Silva, André P. Lourenço, Bruno Pinamonti, Gianfranco Sinagra, Florian Weinberger, Thomas Eschenhagen, Lucie Carrier, Izhak Kehat,

Carlo G. Tocchetti, Michele Russo, Alessandra Ghigo, James Cimino, Emilio Hirsch, Dana Dawson, Michele Ciccarelli, Marco Oliveti, Wolfgang A. Linke, Ilona Cuijpers, Stephane Heymans, Nazha Hamdani, Martine de Boer, Dirk J. Duncker, Diederik Kuster, Jolanda van der Velden, Christophe Beauloye, Luc Bertrand, Manuel Mayr, Mauro Giacca, Florian Leuschner, Johannes Backs, et Thomas Thum. 2021. « Towards Standardization of Echocardiography for the Evaluation of Left Ventricular Function in Adult Rodents: A Position Paper of the ESC Working Group on Myocardial Function ». *Cardiovascular Research* 117(1):43-59. doi: 10.1093/cvr/cvaa110.

Zhan, Junfeng, Qiulin Yin, Peng Zhao, et Lang Hong. 2022. « Role and Mechanism of the LncRNA SNHG1/MiR-450b-5p/IGF1 Axis in the Regulation of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury ». *Molecular Medicine Reports* 25(5):176. doi: 10.3892/mmr.2022.12692.

Zhang, Changyi, Hongwu Wang, Jilin Li, et Lian Ma. 2021. « Circular RNA Involvement in the Protective Effect of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Against Hypoxia/Reoxygenation Injury in Cardiac Cells ». *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 8:626878. doi: 10.3389/fcvm.2021.626878.

Zhang, Han, Huaishan Wang, Fei Gao, Jia Yang, Yi Xu, Yi Fu, Menghua Cai, Xue Zhang, Qi Yang, Kexin Tong, Yu Hu, Hui Chen, Chao Ma, Wei He, et Jianmin Zhang. 2021. « TSPO Deficiency Accelerates Amyloid Pathology and Neuroinflammation by Impairing Microglial Phagocytosis ». *Neurobiology of Aging* 106:292-303. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2021.06.020.

Zhang, Hui, Li Ma, Yan-ling Yin, Lian-qiang Dong, Gang-ge Cheng, Ya-qun Ma, Yun-feng Li, et Bai-nan Xu. 2016. « Over-Expression of TSPO in the Hippocampal CA1 Area Alleviates Cognitive Dysfunction Caused by Lipopolysaccharide in Mice ». *Brain Research* 1646:402-9. doi: 10.1016/j.brainres.2016.06.001.

Zhang, Jingxin, Yijie Liu, Xu Han, Yang Mei, Jing Yang, Zheng J. Zhang, Xinyan Lu, et Peng Ji. 2019. « Rats Provide a Superior Model of Human Stress Erythropoiesis ». *Experimental Hematology* 78:21-34.e3. doi: 10.1016/j.exphem.2019.09.021.

Zhang, Xiao-Hua, Hong-Yu Zhao, Yu Wang, Lin Di, Xin-Yu Liu, Feng Qian, et Shu-Rong Liu. 2021. « Zenglv Fumai Granule Protects Cardiomyocytes against Hypoxia/Reoxygenation-Induced Apoptosis via Inhibiting TRIM28 Expression ». *Molecular Medicine Reports* 23(3):171. doi: 10.3892/mmr.2020.11810.

Zhang, Xiao-Ying, Wang Wei, You-Zhi Zhang, Qiang Fu, Wei-Dong Mi, Li-Ming Zhang, et Yun-Feng Li. 2018. « The 18 KDa Translocator Protein (TSPO) Overexpression in Hippocampal Dentate Gyrus Elicits Anxiolytic-Like Effects in a Mouse Model of Post-Traumatic Stress Disorder ». *Frontiers in Pharmacology* 9:1364. doi: 10.3389/fphar.2018.01364.

Zhao, Amy H., Lan N. Tu, Chinatsu Mukai, Madhu P. Sirivelu, Viju V. Pillai, Kanako Morohaku, Roy Cohen, et Vimal Selvaraj. 2016. « Mitochondrial Translocator Protein (TSPO) Function Is Not Essential for Heme Biosynthesis ». *Journal of Biological Chemistry* 291(4):1591-1603. doi: 10.1074/jbc.M115.686360.

Zhao, Jinyang, Xiaolong Lin, Haoxuan Sun, Donghui Zhao, Qin Ma, Wayne Bond Lau, Zichao Cheng, Fanqi Li, Jinghua Liu, et Qian Fan. 2021. « LncRNA NONHSAT069381 and NONHSAT140844 Increase in Aging Human Blood, Regulating Cardiomyocyte Apoptosis ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021:9465300. doi: 10.1155/2021/9465300.

Zhou, Haiyan, Bailong Hu, et Xingde Liu. 2020. « Thyroid Hormone Metabolite 3-Iodothyronamine (T1AM) Alleviates Hypoxia/Reoxygenation-Induced Cardiac Myocyte Apoptosis via Akt/FoxO1 Pathway ». *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 26:e923195. doi: 10.12659/MSM.923195.

Zhuo, Chuanjun, Ying Wang, Xiaohui Wang, Yufen Wang, et Yuhui Chen. 2011. « Cardioprotection by Ischemic Postconditioning Is Abolished in Depressed Rats: Role of Akt and Signal Transducer and Activator of Transcription-3 ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 346(1-2):39-47. doi: 10.1007/s11010-010-0589-0.

Zorov, D. B., M. Juhaszova, Y. Yaniv, H. B. Nuss, S. Wang, et S. J. Sollott. 2009. « Regulation and Pharmacology of the Mitochondrial Permeability Transition Pore ». *Cardiovascular Research* 83(2):213-25. doi: 10.1093/cvr/cvp151.

Zorov, Dmitry B., Magdalena Juhaszova, et Steven J. Sollott. 2014. « Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release ». *Physiological Reviews* 94(3):909-50. doi: 10.1152/physrev.00026.2013.

Zuurbier, Coert J., Luc Bertrand, Christoph R. Beauloye, Ioanna Andreadou, Marisol Ruiz-Meana, Nichlas R. Jespersen, Duvaraka Kula-Alwar, Hiran A. Prag, Hans Eric Botker, Maija Dambrova, Christophe Montessuit, Tuuli Kaambre, Edgars Liepinsh, Paul S. Brookes, et Thomas Krieg. 2020. « Cardiac Metabolism as a Driver and Therapeutic Target of Myocardial Infarction ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24(11):5937-54. doi: 10.1111/jcmm.15180.