



HAL
open science

Rôle de la protéine découplante mitochondriale Ucp2 dans la régulation du métabolisme et de la maturation des cardiomyocytes néonataux

Yoann Kovacs

► **To cite this version:**

Yoann Kovacs. Rôle de la protéine découplante mitochondriale Ucp2 dans la régulation du métabolisme et de la maturation des cardiomyocytes néonataux. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS391 . tel-04725349

HAL Id: tel-04725349

<https://theses.hal.science/tel-04725349v1>

Submitted on 8 Oct 2024

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.

Thèse de Doctorat de Sorbonne Université

Ecole Doctorale Complexité du Vivant – ED515

Présentée par
M. Yoann KOVACS

Pour obtenir le grade de
Docteur de Sorbonne Université

Laboratoire d'accueil :

Adaptation Biologique et Vieillesse (SU-CNRS UMR8256, INSERM ERL U1164)
Equipe : Vieillesse Cellulaire Intégrée et Inflammation

Rôle de la protéine découplante mitochondriale Ucp2 dans la régulation du métabolisme et de la maturation des cardiomyocytes néonataux

Thèse soutenue le 07 octobre 2022 devant le jury composé de :

Mme Patricia Serradas Pacheco Professeure des Universités, Sorbonne Université	Présidente
M. Mathias Mericskay Directeur de Recherche, Université Paris-Saclay	Rapporteur
M. Rodrigue Rossignol Directeur de Recherche, Université de Bordeaux	Rapporteur
Mme Francesca Rochais Chargée de Recherche, Aix-Marseille Université	Examinatrice
M. Giovanni Bénard Directeur de Recherche, Université de Bordeaux	Examineur
Mme Aurore L'honoré Maître de Conférences, Sorbonne Université	Co-encadrante
M. Bertrand Friguet Professeur des Universités, Sorbonne Université	Directeur de thèse

*« Le crâne dégarni comme un vieux savant,
J'suis pas richissime mais c'est mieux qu'avant. »*

Jazzy Bazz, Element 115, Memoria

Parce qu'à la manière de ma coupe de cheveux ou de mon goût pour la musique, mon amour pour la Science du Vivant et les enrichissements que m'ont apportés ces quelque 3 années feront éternellement partie de moi.

*Je dédie ce manuscrit à Armelle Laurent,
Sans qui le chemin emprunté aurait sans doute été bien différent.*

*« TATAKAE ! » (« BATS-TOI ! » en japonais). Eren Jager, garantissant son présent en s'adressant à lui-même et à ses prédécesseurs.
Shingeki no Kyojin, Hajime Isayama*

REMERCIEMENTS

Tout au long de ma thèse, l'écriture des remerciements est restée une pensée lointaine qui s'accompagnait d'une légère appréhension à l'idée d'avoir des difficultés à exprimer correctement ma gratitude. A présent que je vois le bout de cette aventure et que cette page de ma vie s'apprête à se tourner, tant de noms, de visages et de souvenirs se bousculent dans ma tête que je ne pourrais tous les énumérer. Je vais donc tâcher ici d'honorer ceux qui m'ont apporté leur soutien, qu'il soit moral ou professionnel, volontaire ou non.

Aux membres du jury

Tout d'abord, je remercie vivement tous les membres du jury d'avoir accepté de me donner de leur temps pour évaluer ces travaux de thèse. Je remercie **Rodrigue Rossignol** et **Mathias Mericskay** d'avoir accepté d'en être les rapporteurs ainsi que **Francesca Rochais** et **Giovanni Bénard** d'avoir accepté d'être examinateurs. Un grand merci à **Patricia Serradas Pacheco** qui a accepté la tâche de présider le jury. Je n'ai rencontré pour le moment que l'une d'entre vous, et j'attends avec impatience de vous rencontrer tous, de recevoir vos retours, et d'échanger avec vous pendant la Soutenance. En espérant que cette lecture vous soit agréable, je vous dis donc à très bientôt.

A mes encadrants et mes collaborateurs

Aurore, je te remercie de m'avoir confié une partie de ton bébé que représente ce projet de recherche. Lorsque j'ai débuté, j'étais aussi immature qu'un cœur *Ucp2^{-/-}*. Cette opportunité que tu m'as donnée m'aura beaucoup appris. Je vois le chemin parcouru, et avec le recul que j'ai aujourd'hui, je voudrais pouvoir tout recommencer, plus rapidement, plus efficacement, de manière à dégager le temps nécessaire à la poursuite de ce que nous avons commencé. Ce projet nous a menés sur des pistes plus qu'intéressantes et m'a même permis de faire le lien avec l'Épigénétique que je souhaitais tant étudier en sortant de mon master. Ton choix d'étudier *Ucp2* dans le cœur était plus que prometteur. J'espère un jour avoir la même clairvoyance et proposer des projets qui le seront autant que celui-ci. Je ne sais pas encore où je serai dans 1 an, mais j'espère de tout cœur pouvoir mettre en application ce que j'ai appris sous ta supervision dans un autre laboratoire. Pour le reste, je ne peux que te souhaiter une suite de carrière brillante, et espérer que notre article t'y aidera.

Bertrand, je vous remercie de m'avoir intégré au sein du laboratoire. Votre bonne humeur communicative, votre humour, votre calme à toute épreuve, votre maîtrise des filons administratifs et de la diplomatie par écrit sont autant de qualités qui assurent l'apaisement d'un doctorant inquiet. Vous avez ce pouvoir de rassurer professionnellement et de détendre votre équipe en dehors du laboratoire. Je serais ravi de vous recroiser en congrès ou dans un autre contexte à l'avenir. Mon aventure aux États Unis avec vous restera un magnifique souvenir de mes années de thèse à vos côtés. Mais je n'en dirai pas plus ici, car après tout, ce qui est à Philadelphie reste à Philadelphie !

Merci à **Pierre Joanne**, **Anne-Laure Bulteau** et **Marco Da Costa** qui ont fait partie de mon Comité de Suivi de Thèse. J'ai noté vos conseils, et j'en ai appliqué la majorité. Vous êtes bien évidemment les bienvenus à ma soutenance de thèse si vous voulez constater l'avancée du projet.

Kevin, la liste de ce que tu as apporté à ce projet est longue, mais ce n'est pas de cela que je parlerai ici. Ton arrivée sur ce projet m'a garanti une paix relative et m'a dégagé le temps d'écrire un manuscrit dont je peux être fier. Tu m'as permis d'échanger scientifiquement au quotidien et de mettre à l'épreuve mes hypothèses et mes conclusions. Ton expérience en manip a eu un aspect rassurant et m'a donné confiance dans les choix de protocoles que je faisais. Merci pour ça, merci pour tout. J'espère que tu prendras du plaisir à poursuivre ta voie dans la Recherche, et que tu te

sentiras bien dans ta nouvelle position. A ce sujet, encore une fois toutes mes félicitations **Maître Bassand** ! Et n'oublie pas : ne deviens pas ce que tu as juré de combattre Anakin !

Rachel, je sais que tu as cherché tout au long de ma thèse à me protéger de moi-même et je t'en suis reconnaissant. Merci également pour la correction de dernière minute des données de LC-MS ! Je n'oublierai pas tes conseils en manip (et en hygiène et sécurité !), et j'espère que tu ne t'ennuieras pas trop quand toute notre génération de doctorants sera partie. Je te souhaite de trouver le bonheur, la paix et de prendre soin de ta Flamme de la Science ! On continuera de se tenir mutuellement informés des meilleurs mêmes sur la vie politique de ce pays quoiqu'il arrive.

Luke, even though you will not read this French PhD manuscript, I think it is important to address you a few words. I profoundly appreciated our interactions, as well as your support and suggestions when talking about our results. Your consideration has been a real pleasure even when said as a joke such as calling me "The Ucp2 Guy" or saying that you trusted me "with your life" to take care of the samples I was about to send to the US. Seeing you back in this bar in Phillie being so competitive for a stupid Quizz makes me laugh just by the thought of it.

Seeing both our names on the published paper will fill me with pride, and I'm looking forward to crossing your path again in some meeting wherever! Maybe in Madrid this year ? Who knows...!

François, merci à toi pour tous ces comptages, je ne sais pas encore si tu as pris ta décision, mais tu as tout à fait ta place dans la Recherche, à toi de voir ! J'attends toujours de goûter ton PiscoSour d'ailleurs.

Je remercie également **Marie-Clotilde Alves Guerra** de nous avoir fourni les modèles animaux, et donc sans qui tous ces résultats ne pourraient être présentés aujourd'hui !

Meriem, nous ne nous connaissons pas encore véritablement, mais je te remercie par avance. Merci de clore ce projet et d'assurer la review. Je serais ravi de pouvoir aider si tu as besoin d'informations pour mener à bien cette tâche.

Un grand merci également aux instigateurs du projet « Vis ma Vie de Chercheur », **Michel Labouesse**, **Mélanie Paces-Fressy**, **Régine Hepp** et **Caroline Dubacq**, ainsi qu'à ses financeurs. Merci évidemment à tous mes comparses doctorants qui ont animé les sessions à mes côtés **Elsa**, **Ségoène**, **Natalia**, **Virginia**, **Yohan**, **Leonor**, **Antoine**, **Flaminia**, **Helena** et bien sûr, **Rémy**. Un grand merci également à tous les élèves et leurs professeurs qui nous ont complimentés.

I deeply thank the **Leducq Foundation** for financing both me and the project, and to have provided a framework allowing discussion between labs and skills improvement of trainees like me. I also want to thank **Inga Dreville** for organizing all the meetings, and the whole consortium **Leducq Redox Network**, especially all the team leaders **Miguel Torres**, **Hesham Sadek**, **Magdi Yacoub**, **Silvia Martin Puig**, **Ajay Shah**, **Luke Sweda** and **Olaf Bergmann**. Thank you for sharing your work, your experience, and to have invited all these experts from your respective fields.

Mentions spéciales

Je me dois de remercier les gens qui m'ont convaincu de continuer ma route en Recherche, les Professeurs et Maîtres de Conférences **Fabien Fauchereau**, **Guillaume Velasco**, **Anne-Laure Todeschini**, **Jean-François Ouimette**, **Jean-Marc Verbavatz** et **Jonathan Weitzmann**.

Je remercie les membres de l'UMR7216 qui m'ont motivé à continuer en Recherche, les jeunes, mais aussi les chercheurs expérimentés, comme **Claire Francastel** et **Délara Sabéran-Djoneidi** qui m'ont conseillé lorsque j'étais à la recherche d'une thèse. Tout particulièrement, je souhaite remercier **Claire Rougeulle**, pour m'avoir dit un jour cette simple mais impactante phrase : «*Je te vois bien*»

continuer en Recherche». Claire, c'est grâce à toi que je suis arrivé là où j'en suis aujourd'hui. Encore félicitations pour toutes tes récompenses ! Je te remercie aussi pour ton encadrement et tes conseils, ainsi que **Céline Morey** qui a encadré mon projet de M2 au sein du laboratoire. Au sein de ce même laboratoire, je remercie également **Jean-François Ouimette**, qui m'a fait confiance et m'a recommandé auprès d'Aurore L'honoré.

I want to thank you all **Giuseppe Fiermonte, Frédéric Bouillaud, Daniel Ricquier, Angelo Vozza, Susanna Raho** and your coworkers. Your papers from 2014 and 2020 proving the Ucp2 ability to export metabolites have shed light on my project, and allowed us to propose a mechanism for the unexpected phenotypes we observed. Even though you will probably not read this manuscript, you may read our paper once it is published, and I wish you will enjoy reading it as much as I have enjoyed reading yours.

De plus, la revue de 2016 « *UCPs, at the interface between bioenergetics and metabolism.* » co-signée par **Frédéric Bouillaud, Marie-Clotilde Alves Guerra** et **Daniel Ricquier** a été une révélation. Je vous remercie donc tous les trois pour cette discussion nuancée des phénotypes variés et parfois contradictoires associés à Ucp2 dans la littérature.

A mes amis doctorants et fraîchement docteurs

Tania, ton sourire est une vraie source de lumière pour ce labo, et je suis persuadé que tu lui manqueras. Ton soutien m'a été précieux, en manip comme dans les relations personnelles. J'aurais aimé qu'on ait plus l'occasion de faire des manips en collaboration, je suis sûr qu'on aurait fait de grandes choses ! Je ne peux que te souhaiter une vie aussi rose que tes vêtements et tes accessoires, et je serai joignable si tu as besoin d'une fraction de l'aide que tu m'as apportée. Merci d'avoir toujours proposé ton aide et d'avoir tenté de m'alléger la tâche même jusqu'aux derniers jours de rédaction. J'espère que mon manuscrit pourra t'aider un peu pendant l'écriture du tiens, et que le code couleur d'Ucp2 te plaira. Bon courage pour la dernière ligne droite (et je ne parle pas de cheveux, ceux-là il faut qu'ils ondulent !). On se croiera à Monaco si ce n'est pas en soirée reggaeton ou en boîte à Madrid. Merci à toi.

Rémy, je ne sais pas par où commencer. Tu es le plus fou, le plus drôle, le plus extraverti, et à la fois le plus discret de ce laboratoire. Ton soutien moral et/ou psychologique et ton sens de la justice (Kimi No Segi dakara) lorsqu'il s'agit de tes amis font de toi une oreille attentive et un ami sans faille. J'aurais aimé que tu me laisses te tendre la main comme tu me l'as tendue et je saurais me montrer digne de ce que tu m'as (nous as) apporté si un jour tu ressens le besoin de parler ou de demander de l'aide. Evidemment, je ne souhaite pas que ce jour arrive, mais si c'était le cas, tu sais comment me trouver. Une grande carrière d'enseignant t'attend, j'en suis persuadé. N'arrête jamais de m'envoyer des c**neries sur Instagram.

Sabrina, ah Sabrina ! Ton talent n'a d'égal que ta sympathie et ton humilité. Tu prouves au monde qu'on peut être une bête en Sciences et mettre des FILA Disruptor roses en écoutant du Beyoncé et du Damso. Merci pour ton soutien, toutes ces séries de messages vocaux où tu m'as conseillé, écouté, calmé pendant la rédaction. Merci aussi d'avoir passé ces 2 ans à mes côtés, de m'avoir apporté ton soutien moral. Cela fait plus d'un an que tu as défendu ta Thèse (oui il y a un grand T), et tu restes l'exemple de la soutenance de rêve dans mon imaginaire. Je n'espère pas faire mieux, mais m'en approcher serait déjà un pas de géant. A vrai dire, tu es un exemple tout court, au-delà des compétences scientifiques, tes compétences interpersonnelles sont à un niveau encore plus élevé. J'attends avec impatience la libération pour siroter un mojito en ta compagnie.

Laureline, la Giga Boss (oui 10⁹ Boss). Merci de m'avoir écouté raconter tout mon dos jusqu'à la dernière vertèbre ! Je sais que tu ne voulais pas que je dise une fois de plus merci, mais MERCI pour ton talent lorsqu'il s'agit de faire les heatmaps les plus belles qui soient ! Et p***in, merci d'avoir été

là jusqu'à la dernière minute avant la soumission ! Ta détermination, ton goût des choses bien faites et ton obstination feront de toi une grande Chercheuse, sans aucun doute. (Si tu bosses ton anglais c'est encore mieux ahaha). Tu es en avance sur tous les étudiants en thèse, je suis déjà pressé d'assister à ta soutenance. Et notre contrat tient toujours, contacte-moi si tu as besoin d'aide lorsque la deadline s'approchera, tu le mérites. Merci !

Rhti **Rym**, je n'ai pas été un très bon élève ni en arabe, ni en yoga, mais qui sait, ça pourrait s'améliorer ! Merci pour toutes ces fois où l'on a ri, merci pour les blagues, le drama, et le soutien ! La France a gagné une sacrée citoyenne. Appelle-moi si tu as besoin d'un Doowap ou d'une mauresque, je serai toujours là pour te les offrir. A très bientôt !

Caroline, merci pour tes blagues, tes grimaces et ton humeur positive en toutes circonstances. Et surtout, merci pour ce vocabulaire si surprenant qui te caractérise. Flaubert, Rousseau et les autres vivent en toi. J'espère que ta thèse sera splendide et tes résultats exquis !

Lucille, la nouvelle venue comme moi ! Je me rappellerai de nos débuts, de notre tampon raté et de ces expos où j'ai tenté de me cultiver artistiquement. Merci à toi et force pour la suite, tu vas bientôt arriver dans le sprint final!

Jota, « alors » ? Obrigado pour ta bonne humeur, pour l'aide que tu as proposée à maintes reprises pour les analyses bioinformatiques, et pour les fois où tu m'as fait exploser de rire. Que du bonheur pour la suite jeune Shaman !

Marie-Paule, tu es la meilleure ! Merci encore pour ton aide lorsqu'il s'agissait de trouver les coquilles dans mon introduction ! Et merci de m'avoir aidé avec le cytomètre, de m'avoir prêté ta pince à membrane et pour toutes ces bonnes ondes que tu transmets toute la journée sans discontinuer. Ta gentillesse n'a d'égal que ton humour. EKIP.

Dominique, je sais que tu ne devrais pas te trouver dans cette catégorie, mais je ne peux pas m'empêcher de t'associer aux différentes personnes précédemment citées. Merci pour tous tes conseils, ton humour, tous tes encouragements, et pour toutes les fois où tu m'as proposé de l'aide. Merci aussi d'avoir cette manière si particulière de t'adresser aux doctorants comme à des chercheurs juste un peu moins expérimentés que les autres. Tu nous donnes à tous foi dans le monde de la Recherche. Que tu le veuilles ou non, tu es la Big Boss, et aussi la Big Boss des sauces. Je pourrai dire à mes enfants qu'une chargée de Recherche de l'Inserm m'a offert de la sauce Andalouse Belge, ce n'est pas rien ! Merci d'être toi.

Merci à **Mazzarine** pour nos échanges et nos petits secrets. Ton organisation et ton investissement me persuadent que ta thèse sera géniale. N'oublie pas d'envoyer les bons de livraison de l'azote liquide à Honorine quand je serai parti !

Merci à **Elodie** pour les encouragements pendant la rédaction. Tu es assez dingue de travail pour faire une thèse après avoir eu l'agrégation, alors je suis sûr que tout se passera bien pour toi.

A mes collègues

Je remercie **Eric**, pour son entrain et ses opinions éclairées lorsqu'il fallait discuter de métabolisme. Je remercie **Khadija** pour ses encouragements pendant la rédaction et pour les sucreries qu'elle m'a offert pour tenir plus tard devant mon ordinateur. **Hilaire**, merci à toi et à ton rire communicatif. Je remercie **Chahrazade** pour ses blagues continues, ses encouragements et ses conseils pour la rédaction de la thèse. Merci également à **Michel** et à **Mustapha** pour leur bonne humeur. Merci **Isabelle** de t'être inquiétée de mon bien-être, de m'avoir conseillé et de m'avoir motivé lorsque je restais tard le soir. Un grand Merci à **Honorine** pour sa vitesse et sa précision. Cela aura été bref,

mais un réel plaisir de travailler avec toi ! Merci à **Valérie** de m'avoir aidé quand j'en avais besoin, et de m'avoir prêté les thèses des anciens membres du laboratoire pour m'inspirer de leur forme. Merci à **Johanne** de s'être toujours intéressée au bien-être des gens avec qui elle travaillait, et d'avoir accepté de passer mes commandes même quand c'était au dernier moment. **Maira** et **Quentin**, j'espère que vous avez passé des bons moments à nos côtés et que vous ferez votre trou en Recherche ou ailleurs. **Riles**, le nouveau venu, courage pour la poursuite en thèse, on se croiera à l'occasion pour parler des avancées dans One Piece. Merci à **Nancy** et **Yara** d'avoir fait briller l'étoile du Liban au laboratoire.

Merci **Khadiatou** de nous avoir soutenus et encouragés toutes ces années, d'avoir amené des bonnes choses à manger, d'être tout le temps de bonne humeur et communicative. J'étais très heureux, après tout ce temps, de pouvoir partager un repas avec toi à quelques jours de rendre le manuscrit. Tu es la perle de ce laboratoire, ne change rien !

Merci au duo à la fois très professionnel et très blagueur d'**Onnik** et **Zhenlin**. Les deux congrès que j'ai passés en votre compagnie ont été un réel plaisir ! J'ai été fier et très touché de recevoir vos félicitations lorsque j'ai eu mon prix au Printemps de la Cardiologie. J'espère vous recroiser pour se faire un restaurant en congrès ! Merci aussi aux membres de leurs équipes, **Katia** et **Amata** qui m'ont beaucoup fait rire malgré le stress de présenter au congrès. Merci à **Mehdi** et **Ara** pour ces échanges toujours très détendus. Merci à **Alexandre Simon** de m'avoir donné de son temps pour m'aider à purifier ou à manipuler des cardiomyocytes néonataux, et de m'avoir transmis ses protocoles jusqu'à la toute fin. Tous les labos devraient avoir quelqu'un comme toi pour les gérer. Merci à **J-S**, **Vivien**, **Denisa** et **Mélanie** pour ces soirées. On en fera bientôt d'autres !

Ahmed, le grand A, merci à toi pour les révisions et références de dernière minute. La fraternité du Magistère Européen de Génétique aura encore fait ses preuves. Dommage qu'on n'ait pas fait partie de la même génération !

A mes proches et ceux qui l'ont été

Maman, je sais qu'on a toujours un peu de mal à exprimer nos émotions dans cette famille, mais si je te dédie ce manuscrit, ce n'est pas pour rien. Sans ton soutien, ta chape d'amour qui m'a donné la sécurité et la confiance en moi nécessaire pour continuer, je ne sais pas si je me serais lancé dans une thèse, ou si je l'aurais terminée. Je n'aurais peut-être même jamais goûté à la Biologie si tu ne m'avais pas poussé à intégrer une première S malgré mon poil dans la main ! Que je me retrouve à écrire un pavé pareil est plutôt ironique quand on sait que je souhaitais intégrer la filière littéraire pour faire comme toi. On ne le dit jamais assez alors je le dis ici : merci pour tout, merci pour ton soutien, tes inquiétudes au sujet de mes problèmes de santé pendant la rédaction, ta protection et ton éducation quand j'étais enfant, ta tendresse, ton attention et tout ce travail gratuit que l'on exige d'une mère seule dans cette société. Sans vouloir paraître prétentieux, je suis plutôt content du résultat de tes efforts. Avec ton mon amour, merci.

Mes chers colocataires, **Marie** et **Arnaud**, merci d'avoir été la pendant les heures sombres que j'ai traversées indépendamment de la thèse. Merci pour vos conseils sur la vie en général et sur les interactions avec les autres. Vous avez largement gagné vos places d'amis, et j'espère que vous le resterez. Vous êtes des gens vrais, spontanés, et profondément bons. Merci de m'avoir soutenu pendant ces quelques 6 mois de rédaction et de m'avoir allégé les tâches domestiques pendant cette période. Je vous promets de faire mon grand retour très bientôt !

Mon cher **Papa**, merci à toi de m'avoir soutenu toutes ces années et d'avoir essayé de comprendre ce que je faisais. Merci d'être si drôle et de m'avoir transmis ton goût pour la rencontre de nouvelles personnes. C'est une qualité précieuse. Toutes mes félicitations pour la nouvelle ! Je te prédis une retraite radieuse au Cambodge ou ailleurs, et j'espère y faire un tour avec toi un de ces jours ! Merci.

Fluorochrome, même si le bleaching était inévitable, la période où le FRET était encore possible, et ce qui a suivi, m'a apporté beaucoup de lumière(s). Où que tu sois, et malgré tout, je ne peux que te souhaiter de continuer de briller. Trougaré.

Merci également à mes amis biologistes en dehors du laboratoire. **Camille**, je passerai te voir en Espagne, que ce soit pour travailler ou pour te visiter, c'est promis ! Merci de m'avoir donné cette longue liste de laboratoires qui pourraient m'intéresser. **Nji**, merci pour ces expériences musicales et ces mémos vocaux sur lesquels on a tellement déblaté ! Merci à **Marie** de m'avoir fait confiance en tant que cobaye pour son expérience d'interview, et pour m'avoir donné un aliquot d'inhibiteur de l'AMPK ! Merci également à **Charly, Lucia, Tom, Mathieu, Clarisse, Charly, Valéria, Guillem, Alexandra, Lisa, Liza, Nadja, Yannis, Claire, Amina, Giovanna, Raphaël, Egill, Juliette, Yann, Sara, Bertrand** et tous les doctorants de Vis ma Vie de chercheur précédemment cités pour le soutien moral et les bons moments que nous avons passés ensemble.

Je me dois évidemment de remercier mes frères de cœur. **Bangaly**, qui s'est toujours inquiété de mon bien-être et a œuvré à me rappeler que même si mon travail me passionne, il ne doit pas représenter ma vie entière. **Martin**, le seul de mes amis non-biologistes à pouvoir expliquer mon projet de recherche et citer le mot « mitochondrie », quelles que soient les circonstances. **Pierre**, qui, à l'instar du chercheur, a choisi une voie qui mêle passion et volume de travail conséquent, et qui a compris depuis le début dans quelle situation j'étais. **Karim**, qui a toujours eu une confiance en moi débordante et m'a invité à prendre soin de moi et à accepter ma situation. Je remercie tous les autres membres du **310 & Co**, qui ont toujours surestimé mes capacités et que je ne voulais pas décevoir. Vous m'avez poussé à me dépasser, et je n'attends que de fêter la libération avec vous tous, **Sofiène, Barbara, Erwan, Pauline, Gaétan, Charles, Anaëlle, Léo, Sarah, Maud, Amine, Ilyes, Alexis, Maxence, Géraud, Hugo, Géraud, Auguste et Augustin**.

Luc, malheureusement, je ne suis pas croyant. Aussi, je ne crois pas que ces mots te parviendront. Je profite de l'aspect officiel de ce manuscrit pour laisser une trace de toi, et je sais que c'est un geste bien maigre. Ta disparition a été un choc pour tous les gens qui t'entouraient. Je sais que nous n'étions pas si proches, mais j'avais l'espoir un peu ridicule qu'à la fin de ma thèse, je serai de nouveau disponible et qu'on aurait l'occasion de rattraper tout ça, d'avoir des discussions sérieuses, de nous expliquer au sujet des différends qu'on a pu avoir dans le passé. Ce ne sera malheureusement pas possible. Je t'adresse donc mes excuses les plus sincères, et je te promets d'honorer ta mémoire en vivant ma vie de la manière la plus « **Lucci** » qui soit, c'est-à-dire de la manière la plus libre possible. Merci d'avoir fait partie de ma vie.

AVANT-PROPOS

Cette thèse fait suite à mes études au sein du Magistère Européen de Génétique de l'Université de Paris (anciennement Paris VII, Diderot). En donnant à ses étudiants l'opportunité d'effectuer des stages dans des laboratoires partenaires en Europe ou en Amérique du Nord, et en accueillant des étudiants étrangers, cette formation m'a permis d'embrasser l'aspect universel de la Science. J'ai ainsi pu faire mes classes dans les laboratoires de Ferran Azorin (IRB, Barcelone) et Moses Chao (NYU Langone – Skirball, New York) et développer mon goût pour le travail de laboratoire comme pour les langues. Mon envie de poursuivre ma route en Recherche au travers d'une thèse a été motivée par le temps que j'ai passé dans l'équipe de Claire Rougeulle, sous l'encadrement de Céline Morey, qui ont achevé de me convaincre que la Recherche était la voie qui me correspondait. Sur les conseils d'un membre de l'équipe, Jean-François Ouimette, qui était par ailleurs mon professeur, j'ai rencontré Aurore L'honoré. Comme vous l'aurez compris, j'ai débuté ma thèse sous sa direction ainsi que celle de Bertrand Friguet.

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un Consortium international transatlantique composé de plusieurs laboratoires co-financés par la Fondation Leducq et intitulé « Redox Regulation of Cardiomyocyte Renewal » (<https://www.leducqredox.com>). Sur la base de ce financement commun, les différents laboratoires, basés aux Etats-Unis, en Europe, et en Egypte, devaient collaborer et échanger afin d'élucider la régulation redox de la prolifération des cardiomyocytes, en vue de stimuler la régénération cardiaque. S'appuyant sur la qualité de régulateur redox d'Ucp2, notre équipe avait pour objectif d'étudier le potentiel régénératif du cœur néonatal en absence d'Ucp2 et de voir si sa surexpression dans le cœur adulte pouvait participer à la stimulation de la prolifération post-ischémie. Néanmoins, les phénotypes observés chez le néonatal nous ont convaincus de pousser l'analyse des souris *Ucp2^{-/-}* et nous ont permis de révéler un rôle nouveau d'Ucp2 dans la régulation du métabolisme et le contrôle de l'expression génique assurant la maturation cardiaque. Ce projet, qui est le fruit d'un travail collectif, a ainsi pu, par la force des choses, mettre en lien deux de mes passions : l'Epigénétique, qui m'a fasciné pendant mes études de Master, et le Métabolisme, auquel j'ai pris goût plus tard, au cours de ces années de thèse.

MISSION DE MÉDIATION AU COURS DE LA THÈSE

Pendant ma thèse, j'ai eu la chance de participer pendant 2 ans au dispositif *Vis ma Vie de Chercheur*, organisé par Sorbonne Université et le CNRS. Cette mission de médiation consistait à accueillir des classes de lycée sur le campus de Sorbonne Université pour des sessions de 3h de Travaux Pratiques. Ces sessions, dont le scénario était écrit et animé par notre équipe de doctorants, consistaient en des enquêtes policières ou médicales qui n'étaient qu'une excuse ludique pour sensibiliser les lycéens aux bonnes pratiques scientifiques et au fonctionnement de l'Université, tout en les aidant à clarifier leur projet professionnel. Cette expérience mêle enseignement et vulgarisation scientifique et donne un sens immédiat à notre travail. Elle a été plus qu'enrichissante, et je conseille à tous les doctorants qui le peuvent d'y participer. J'espère également que les financeurs (CNRS, Mairie de Paris, Région Ile-de-France) souhaiteront que ce projet se perpétue. Je suis intimement convaincu que nous avons pu aider des jeunes à trouver leur voie et j'espère avoir pu transmettre autant de joie que j'en ai éprouvée en animant ces sessions.

RÉSUMÉ

Au cours du développement, le cœur utilise un métabolisme essentiellement glycolytique. A la naissance, l'exposition à l'O₂ atmosphérique et le passage à l'alimentation lactée riche en acides gras entraînent un remodelage métabolique vers la β -oxydation. La transition métabolique s'accompagne de changements transcriptionnels permettant de promouvoir la maturation des cardiomyocytes et d'optimiser la production d'énergie et la fonction contractile. Ces changements impliquent une induction de la biogénèse mitochondriale, ainsi qu'une augmentation et une modulation de l'expression des constituants de la machinerie contractile, responsables de l'hypertrophie des cardiomyocytes néonataux. De nombreuses hypothèses suggèrent que l'activité métabolique de la mitochondrie participe à la signalisation de la maturation, régulant notamment l'arrêt de prolifération des cardiomyocytes après la naissance. Dans une perspective thérapeutique, la compréhension de cette signalisation permettrait notamment d'améliorer la différenciation terminale des modèles de cardiomyocytes *in vitro*, ou de stimuler la prolifération des cardiomyocytes adultes *in vivo* pour assurer la régénération. Mes travaux portent sur la protéine mitochondriale Ucp2, spécifiquement exprimée dans le cœur néonatal, et sur son rôle dans la maturation. Ucp2 est un transporteur localisé dans la membrane interne qui possède deux fonctions (1) de régulation de la production d'espèces réactives mitochondriales et (2) de régulation de l'orientation métabolique de la cellule via l'export d'intermédiaires du cycle de Krebs de la matrice vers le cytosol.

Nous avons montré que la délétion d'Ucp2 dans le cœur murin néonatal entraîne un retard de maturation des cardiomyocytes. Celui-ci est marqué par un défaut d'initiation du programme transcriptionnel associé à la maturation, entraînant une altération de la biogénèse mitochondriale, une utilisation réduite de la β -oxydation et des défauts de contractilité. En absence d'Ucp2, le cœur néonatal utilise peu les acides gras et le pyruvate, et devient dépendant de la glutamine. Cela entraîne un déséquilibre de la présence relative des intermédiaires du cycle de Krebs, notamment l' α -cétoglutarate et le succinate. Ces métabolites sont des régulateurs essentiels des TET, enzymes qui activent l'expression génique et sont impliquées dans la maturation métabolique et contractile des cardiomyocytes néonataux. Ces résultats démontrent le rôle essentiel d'Ucp2 dans la régulation métabolique du cœur néonatal, et révèlent l'existence d'un nouveau type de signalisation mitochondriale initiant la maturation cardiaque post-natale.

ABSTRACT

During development, the heart relies mainly on glycolysis for ATP production. At birth, exposure to atmospheric O₂ levels and nutritional switch towards the fatty acid-rich maternal milk triggers a metabolic remodeling towards mitochondrial oxidative phosphorylation. Cardiomyocytes then rely on oxidative metabolism, particularly β -oxidation. The remodeling is concomitant with transcriptional changes inducing mitochondrial biogenesis and maturation of the contractile machinery, thus optimizing energy production and heart contractile function. The augmentation of mitochondrial metabolic activity participates in the signaling ensuring the emergence of mature phenotypes, including cardiomyocyte cell-cycle arrest and transition to hypertrophy. Thus, in a long-term therapeutic view, a better understanding of mitochondrial signaling during maturation appears critical to improve cardiomyocyte *in vitro* models' fidelity as well as to stimulate their proliferation *in vivo* in order to sustain heart regeneration.

My PhD project is focused on the mitochondrial uncoupling protein 2 (Ucp2), specifically expressed in the neonatal heart, and its role during cardiomyocyte maturation. Ucp2 is a carrier located on the inner mitochondrial membrane, where it exerts 2 functions. (1) It regulates mitochondrial reactive oxygen species production and (2) it is involved in cell fuel preferences via Krebs metabolite export from the matrix to the cytosol.

We have shown that Ucp2 deletion in neonatal mouse heart induces defective cardiomyocyte maturation. Indeed, *Ucp2*^{-/-} cardiomyocytes display inability to induce the post-natal transcriptional program, including impaired mitochondrial biogenesis, absence of β -oxidation and defective contractility. Metabolic activity analysis revealed that Ucp2 mutant heart poorly relies on pyruvate or fatty acids for ATP production. Instead, it shows metabolic dependency to glutamine. This is associated to unbalanced Krebs intermediates relative abundance, in particular α -ketoglutarate and succinate. These metabolites are important regulators of TET enzymes activity which activate gene expression and participate in neonatal cardiomyocyte metabolic and contractile maturation.

These results demonstrate that Ucp2 plays a critical role in regulating metabolic activity of neonatal cardiomyocytes, and unravel a new type of mitochondrial signaling initiating postnatal heart maturation.

RÉSUMÉ POUR LES NON-BIOLOGISTES

Contexte

Une blessure cardiaque, comme un infarctus (=attaque cardiaque) entraîne une perte de cellules musculaires, appelées **cardiomyocytes**, qui sont responsables de la contraction du cœur. Chez le mammifère adulte, comme l'humain, ces cardiomyocytes ne sont pas remplacés, par conséquent, les attaques cardiaques conduisent à une baisse de la capacité du cœur à pomper le sang. A la différence du cœur adulte, le cœur du fœtus contient des cardiomyocytes **immatures** qui sont capables de **proliférer**, c'est-à-dire de se multiplier, pour **régénérer** le cœur blessé. Cette capacité se poursuit jusqu'à la naissance, période durant laquelle les cardiomyocytes effectuent une **maturation**. La maturation s'accompagne d'un arrêt de prolifération, et donc de la capacité de régénération.

Maturation du cœur après la naissance

Pendant la grossesse, le cœur du fœtus a peu accès à l'oxygène et produit peu d'énergie. Ses cardiomyocytes sont plus petits, ont une machinerie contractile moins bien organisée, et donc une force de contraction relativement faible. A partir de la naissance, il y a deux changements majeurs : la nourriture vient du lait maternel qui est riche en graisses et l'oxygène, qui provient désormais des poumons, est disponible en grande quantité.

Ces changements vont permettre aux cardiomyocytes de produire de l'énergie autrement : elles vont utiliser la **respiration cellulaire**, c'est-à-dire qu'elles vont se servir de l'oxygène pour casser les graisses provenant du lait maternel et en extraire de l'énergie. Pour ce faire, les cellules vont produire plus de **mitochondries**, qui sont responsables de la respiration et fonctionnent comme les centrales électriques de la cellule. L'énergie produite par la mitochondrie fonctionne comme notre électricité, elle est utilisable par tous les constituants de la cellule, et est donc nécessaire pour assurer la contraction cardiaque.

L'augmentation de la quantité de mitochondries et de l'utilisation des graisses, en plus de produire de l'énergie, produit des molécules qui servent de signal induisant la maturation des cardiomyocytes. Durant ce processus de maturation, les cardiomyocytes vont ainsi grossir, s'organiser différemment pour améliorer la capacité de contraction du cœur, et perdre la capacité à proliférer et à effectuer une régénération en cas de blessure cardiaque. L'activité des mitochondries à partir de la naissance est donc nécessaire pour garantir au

cœur sa fonction de pompe, mais elle est aussi impliquée dans la **communication** qui provoque la maturation cardiaque et la perte de capacité régénérative.

Problématique du projet de thèse

La communication entre les mitochondries et le reste de la cellule à la naissance est encore mal comprise. Bien que l'on sache ce qu'il se passe, on ne comprend pas bien comment, ni quels sont les acteurs dictant ce programme de maturation. Ainsi, nous avons choisi de nous intéresser à un gène de la mitochondrie particulier, appelé **Ucp2**, et qui n'est actif dans le cœur que pendant une courte période autour de la naissance. Dans d'autres organes, Ucp2 est connu pour réguler l'activité de la mitochondrie, c'est-à-dire, la vitesse à laquelle elle fonctionne, sa préférence pour les graisses ou les sucres, la production de déchets, etc... Le mécanisme qui permet à Ucp2 de réguler ces différentes activités est encore mal compris, et il a été très peu étudié dans le domaine cardiaque. J'ai donc étudié son rôle dans le cœur de nouveau-né durant ma thèse.

Stratégie et objectifs

Nous avons étudié le déroulement de la maturation du cœur et des cardiomyocytes de **souris ne possédant pas le gène Ucp2** dans le but de :

- 1) Mieux comprendre le mécanisme de fonctionnement d'Ucp2, qui est un gène impliqué dans plusieurs maladies, comme le diabète ou les cancers.
- 2) Se servir d'Ucp2 pour modifier l'activité des mitochondries dans le cœur immature, et ainsi mieux comprendre comment s'effectue la communication entre le cœur et ses mitochondries pendant la maturation cardiaque.

Résultats Principaux

En absence d'Ucp2, les cardiomyocytes ont des difficultés à activer leur programme de maturation normal :

- Les gènes clefs de la maturation ne s'activent pas
- Ils ne peuvent pas utiliser les graisses,
- Leurs mitochondries sont moins nombreuses
- Les messages normalement émis par la mitochondrie sont bloqués

En conséquence, les cardiomyocytes produisent peu d'énergie, sont plus petits et leur capacité de contraction est réduite.

Pour comprendre pourquoi la perte d'Ucp2 entraîne ce défaut de maturation cardiaque, nous avons essayé de comprendre ce que sa perte provoque dans les mitochondries. Nous avons vu qu'au lieu d'utiliser les graisses, les mitochondries ayant perdu Ucp2 produisent de l'énergie à partir des protéines. Cependant, l'utilisation des protéines au lieu des graisses produit des molécules différentes. Ainsi, certaines molécules que la mitochondrie produit dans le cœur normal, comme l' α -KG, sont manquantes en absence d'Ucp2. L' α -KG sert de carburant aux interrupteurs activant le programme permettant la maturation, ce qui explique pourquoi les cœurs déficients pour Ucp2 échouent à effectuer une maturation normale.

Conclusion

Nos travaux ont donc démontré que la présence spécifique d'Ucp2 dans le cœur de nouveau-né est nécessaire pour permettre au cœur de murer et donc, d'améliorer sa production d'énergie et sa capacité de contraction. Cette découverte permet de mieux comprendre le rôle de la mitochondrie dans l'activation de la maturation à la naissance. Au regard de nos résultats, nous émettons l'hypothèse qu'à la naissance, l'apport en graisses du lait maternel et la disponibilité de l'oxygène augmentent la production d' α -KG par la mitochondrie. Cet α -KG est utilisé pour activer les gènes clefs de la maturation, qui vont augmenter le nombre de mitochondries et donc créer un cercle vertueux produisant plus d' α -KG et accélérant la maturation du cœur.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	5
AVANT-PROPOS.....	12
MISSION DE MÉDIATION AU COURS DE LA THÈSE.....	13
RÉSUMÉ.....	14
ABSTRACT.....	15
RÉSUMÉ POUR LES NON-BIOLOGISTES.....	17
SOMMAIRE.....	20
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	25
TABLE DES ABREVIATIONS.....	28

INTRODUCTION GENERALE..... 33

PREAMBULE..... 34

Chapitre 1 : Cœur et cardiomyocyte..... 36

I. Structure, physiologie et fonctionnement cardiaque.....	36
A. Structure et fonction.....	36
B. Le cycle cardiaque.....	38
C. Contrôle de la contraction cardiaque.....	40
D. Les paramètres de la fonction cardiaque.....	41
II. Le cardiomyocyte, au cœur de la contraction cardiaque.....	42
A. Structure du cardiomyocyte.....	42
B. Couplage contraction/relaxation dépendant du calcium et de l'ATP.....	43

Chapitre 2 : La mitochondrie, un organite à la confluence du métabolisme énergétique et de la signalisation..... 45

I. Le réseau mitochondrial.....	45
A. La mitochondrie, un organite codé par deux génomes.....	45
1. Un organite composé de compartiments spécialisés.....	45
2. Génome mitochondrial.....	46
B. Contrôle de la biogénèse mitochondriale par Pgc-1 α	48
C. Fusion, fission et dégradation.....	50
II. Métabolisme cardiaque : substrats et principales voies.....	51
A. Métabolisme des acides gras.....	51
1. Transport des acides gras de la circulation vers la mitochondrie.....	51
2. La β -oxydation.....	52
B. Métabolisme du glucose.....	53
1. Prise en charge du glucose.....	53
2. Glycolyse.....	54
3. Voie des pentoses.....	57
4. Métabolisme du lactate.....	57

C.	Le cycle de Krebs, hub du métabolisme oxydatif et de l'anabolisme	57
1.	Oxydation de l'acétyl-CoA et formation de coenzymes réduits	57
2.	Synthèse de molécules et reformation des intermédiaires	59
D.	Métabolisme des acides aminés.....	60
E.	Acides gras et glucose, deux substrats complémentaires du cœur adulte	61
F.	Chaîne respiratoire mitochondriale et production d'ATP	63
III.	Signalisation redox.....	65
A.	Origine des espèces réactives de l'oxygène	65
B.	Caractéristiques des différentes espèces réactives de l'oxygène	67
C.	L'état redox résulte d'un équilibre production/dégradation	68
1.	Les systèmes antioxydants non-enzymatiques.....	68
2.	Les systèmes antioxydants enzymatiques.....	69
D.	Principes de la signalisation redox	71
1.	Modifications réversibles des protéines	71
2.	Modifications de molécules autres que les protéines.....	74
3.	Carbonylation, hyperoxydation et dégradation des protéines.....	74
E.	Exemples de voies de signalisation redox-dépendantes	75
1.	Les p38MAPK.....	75
2.	La voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR)	76
IV.	Signalisation métabolique : contrôle de l'expression génique par l'activité métabolique.....	77
A.	Régulation de l'acétylation et de la méthylation des histones par l'activité métabolique	77
B.	Régulation de la méthylation de l'ADN par les intermédiaires du cycle de Krebs.....	79
Chapitre 3 : Conséquences du métabolisme mitochondrial sur les propriétés des cardiomyocytes.....		81
I.	Implications de la mitochondrie et du métabolisme oxydatif dans l'insuffisance cardiaque entraînée par l'ischémie/reperfusion.....	81
A.	Ischémie/reperfusion	81
B.	Remodelage structurel	82
C.	Remodelage métabolique.....	83
II.	Maturation néonatale des cardiomyocytes	84
A.	Sortie du cycle cellulaire	84
B.	Croissance hypertrophique et maturation de la machinerie contractile	85
C.	Maturation électrophysiologique.....	86
D.	Binucléation et polyploïdisation	88
E.	Changements métaboliques à la naissance.....	89
1.	Métabolisme fœtal	89
2.	Transition métabolique à la naissance	90
III.	Impacts du métabolisme oxydatif sur la maturation des cardiomyocytes	93
A.	L'élévation de la production de ROS à la naissance participe à la transition vers la croissance hypertrophique des cardiomyocytes	93
B.	Régulation redox de la maturation des cardiomyocytes.....	94
C.	Signalisation métabolique et activation du programme transcriptionnel néonatal	95
D.	Maturation et régulation de la prolifération des cardiomyocytes.....	96

1.	Immaturité métabolique des cardiomyocytes prolifératifs	96
2.	Le cœur, un organe post-mitotique ?	96
E.	Plasticité des cardiomyocytes adultes	97
	Chapitre 4 : Ucp2, un membre de la famille des protéines découplantes mitochondriales	100
I.	Ucp1, la protéine clef de la thermogénèse chez les mammifères.....	100
II.	Ucp2, structure, expression et régulation.....	101
A.	Structure du gène et de la protéine	101
B.	Régulation de l'expression d'Ucp2.....	103
1.	Profil d'expression d'Ucp2.....	103
2.	Régulation par les microARN.....	104
3.	Régulation traductionnelle et profil d'expression de la protéine.....	104
III.	Fonction d'Ucp2 et phénotypes associés	106
A.	La conductance protonique effectuée par Ucp2 permet le contrôle de la production de ROS mitochondriaux.....	106
1.	Conductance protonique d'Ucp2	106
2.	L'activité découplante d'Ucp2 n'est pas associée à la thermogénèse	107
3.	Contrôle du potentiel de membrane mitochondrial et régulation de la production de ROS.....	108
4.	Régulation de l'activité découplante par les ROS.....	109
5.	Signalisation et protection via le contrôle des niveaux de ROS par Ucp2	109
B.	Ucp2, protéine découplante, mais également membre de la superfamille des échangeurs mitochondriaux.....	110
1.	Un autre mécanisme pour Ucp2.....	110
2.	Export de métabolites et import de phosphate inorganique par UCP2	111
C.	Contrôle de l'orientation métabolique de la cellule par Ucp2.....	112
1.	Inhibition de l'oxydation du pyruvate par Ucp2	113
2.	Implication d'Ucp2 dans le métabolisme de la glutamine.....	114
D.	Dans le cœur, Ucp2 régule le métabolisme, la production de ROS et la dynamique mitochondriale	114
	Objectifs des travaux	116
	RESULTATS.....	119
	Partie 1 - La régulation du métabolisme par Ucp2 est requise pour assurer la maturation des cardiomyocytes néonataux.....	120
	PREAMBULE	120
I.	La perte d'Ucp2 est associée à la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la maturation néonatale des cardiomyocytes.....	121
II.	Les cardiomyocytes mutants <i>Ucp2</i> ^{-/-} sont caractérisés par une réduction de la masse mitochondriale et par un défaut de biogénèse mitochondriale	124
III.	Les cardiomyocytes <i>Ucp2</i> ^{-/-} néonataux présentent une altération du métabolisme énergétique.	127
IV.	L'absence d'Ucp2 dans les cardiomyocytes néonataux inhibe leur transition métabolique vers la β-oxydation et l'activation de la signalisation redox.....	129
V.	Les cardiomyocytes <i>Ucp2</i> ^{-/-} se caractérisent par un défaut de maturation contractile	133

VI.	Dans les cardiomyocytes <i>Ucp2</i> ^{-/-} , l'altération du métabolisme mitochondrial entraîne une réduction de la quantité relative d' α -cétoglutarate, co-facteur des enzymes TETs	137
VII.	Conclusion et Discussion	142
VIII.	Matériel et Méthodes	144
A.	Modèles expérimentaux	144
1.	Animaux, élevage et génotypage	144
2.	Purification et culture de cardiomyocytes murins néonataux.....	144
3.	Infection virale avec un adenovirus CRE-recombinase	145
B.	Détail des méthodes utilisées	145
1.	Extraits protéiques et Western blots	145
2.	Analyse d'incorporation EdU ex vivo et in vivo.....	146
3.	Analyse de la taille des cardiomyocytes ex vivo par Immunofluorescence.....	147
4.	Quantification des niveaux de ROS mitochondriaux.....	147
5.	Quantification des niveaux de carbonylation des protéines	148
6.	Quantification du ratio ATP/ADP	148
7.	Quantification du ratio ADN mitochondrial / ADN nucléaire	149
8.	Purification d'ARN et RT-qPCR	149
9.	Mesure de la consommation d'O ₂ (Oxygen Consumption Rate, OCR) par Seahorse XF [®] 24	149
10.	Mesure de la contractilité de sphéroïdes cardiaques en 3D.....	150
11.	Analyses ciblées des métabolites par chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS).....	150
12.	Analyses protéomiques par chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).....	152
13.	Analyse transcriptomique par RNA-seq	153
14.	Analyses Statistiques	153
IX.	Références Bibliographiques.....	155
 Partie 2 – L'inhibition d'<i>Ucp2</i> par la génipine entraine l'activation rédox-dépendante de la voie <i>p38MAPK</i> et l'inhibition de la prolifération des cardiomyocytes néonataux		
159		
I.	Introduction.....	159
II.	L'inhibition d' <i>Ucp2</i> par la génipine altère la fonction mitochondriale sans affecter la viabilité des cardiomyocytes	160
III.	L'inhibition de l'activité d' <i>Ucp2</i> par la génipine entraîne l'augmentation des niveaux de ROS et l'activation ROS-dépendante de la voie <i>p38MAPK</i> dans les cardiomyocytes néonataux	163
IV.	L'augmentation des niveaux de ROS et l'activation prématurée de la voie <i>p38MAPK</i> entraînent une baisse de prolifération des cardiomyocytes néonataux	164
V.	Discussion	166
VI.	Matériel et Méthodes.....	168
1.	Animaux, purification et culture de cardiomyocytes murins néonataux.....	168
2.	Traitements des cellules en culture.....	168
3.	Mesure de la consommation d'O ₂ (Oxygen Consumption Rate, OCR) par Seahorse XF [®] 24	168
4.	Quantification du potentiel de membrane mitochondrial.....	169
5.	Quantification des niveaux de ROS totaux.....	169

6.	Incorporation EdU, marquage TUNEL, immunofluorescence.....	170
7.	Extraits protéiques et Western blots.....	170
8.	Quantification du ratio ADN mitochondrial / ADN nucléaire.....	171
VII.	Références Bibliographiques.....	172
CONCLUSIONS GENERALES		175
	<i>Préambule.....</i>	176
	<i>Conclusions générales.....</i>	177
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....		181
	<i>Discussion.....</i>	182
I.	Défaut de maturation et insuffisance cardiaque associés à la perte d'Ucp2	182
A.	Dérégulation de la transition du métabolisme oxydatif en absence d'Ucp2 et conséquences sur la maturation structurelle du cœur et des cardiomyocytes.....	182
B.	Rôle potentiel d'Ucp2 dans le cœur fœtal.....	185
C.	Potentielle insuffisance cardiaque de long terme associée à la perte d'Ucp2	187
II.	Mécanismes de fonctionnement d'Ucp2 et conséquences phénotypiques.....	191
A.	Ucp2 en tant que messenger critique de la signalisation rétrograde mitochondriale via l'export de métabolites	191
B.	La dérégulation du métabolisme associée à la délétion d'Ucp2 met en lumière une régulation épigénétique dépendante du métabolisme pendant la maturation cardiaque.....	194
C.	Perte de capacité de prolifération et d'activité glycolytique malgré l'apparente immaturité des cardiomyocytes Ucp2 ^{-/-}	196
D.	Dépendance à la glutamine en absence d'Ucp2	198
E.	Quid de la régulation de la production de ROS mitochondriaux via le découplage partiel d'Ucp2 dans le cœur en maturation ?.....	201
F.	La génipine, un inhibiteur d'Ucp2 ?.....	202
	<i>Perspectives.....</i>	204
I.	Perspectives à court terme.....	204
II.	Perspectives à long terme	205
A.	Ucp2 en tant que modèle pour étudier la maturation cardiaque.....	205
B.	Rôle d'Ucp2 dans des conditions pathologiques.....	206
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		210
ANNEXES		237
<i>Publication – Egr1 loss-of-function promotes beige adipocytes differentiation and activation specifically in inguinal subcutaneous white adipose tissue.....</i>		249
I.	Introduction.....	249
II.	Résultats	249
III.	Discussion	250
PUBLICATIONS, CONGRÈS & COMMUNICATION		268

Table des illustrations

INTRODUCTION GENERALE.....	33
FIGURE 1. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES CHAMBRES CARDIAQUES.....	36
FIGURE 2. RESEAU DE CORONAIRES ALIMENTANT LE MYOCARDE.....	37
FIGURE 3. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CIRCULATION CARDIAQUE.....	39
FIGURE 4. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU SYSTEME DE CONDUCTION COORDONNANT LA CONTRACTION DES DIFFERENTES CHAMBRES CARDIAQUES.	40
FIGURE 5. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CARDIOMYOCYTE, DES MYOFIBRILLES ET D'UNE UNITE SARCOMERIQUE RELACHEE.....	42
FIGURE 6. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE DU CALCIUM ASSURANT LA CONTRACTION D'UN CARDIOMYOCYTE.....	44
FIGURE 7. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS COMPARTIMENTS MITOCHONDRIAUX.....	46
FIGURE 8. CARTE DU GENOME MITOCHONDRIAL.....	47
FIGURE 9. REGULATION ET PARTENAIRES DE PGC-1A.....	49
FIGURE 10. DYNAMIQUE DE LA FUSION, LA FISSION MITOCHONDRIALE ET DE LA MITOPHAGIE.....	50
FIGURE 11. INTERMEDIAIRES ET ENZYMES IMPLIQUES DANS UN CYCLE DE B-OXYDATION.....	53
FIGURE 12. INTERMEDIAIRES ET ENZYMES IMPLIQUES DANS LA DEGRADATION D'UNE MOLECULE DE GLUCOSE EN 2 MOLECULES DE PYRUVATE AU COURS DE LA GLYCOLYSE..	55
FIGURE 13. INTERMEDIAIRES METABOLIQUES ET ENZYMES IMPLIQUES DANS LE CYCLE DE KREBS.....	59
FIGURE 14. PARTICIPATION DE LA GLUTAMINE AUX PROCESSUS ANAPLEROTIQUES. L'EXPORT D'INTERMEDIAIRES DU CYCLE DE KREBS PARTICIPE A LA SYNTHESE DE NUCLEOTIDES, D'ACIDES AMINES OU DE LIPIDES DANS LE CYTOSOL.....	61
FIGURE 15. LE CŒUR, UN ORGANE « OMNIVORE » : INTERACTIONS ENTRE METABOLISME DU GLUCOSE ET DES ACIDES GRAS.....	62
FIGURE 16. LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE, SIEGE DE LA PRODUCTION D'ATP CARDIAQUE.	64
FIGURE 17. LES PRINCIPAUX SITES DE PRODUCTION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.....	66
FIGURE 18. CONVERSION DE L'H ₂ O ₂ EN H ₂ O PAR LES SYSTEMES TRXR/TRX/PRX ET GR/GSH/GPX ET OXYDATION DU NADPH EN NADP ⁺	70
FIGURE 19. REDUCTION DES DISULFIDES VIA LES SYSTEMES TRXR/TRX ET GR/GSH/GRX ET OXYDATION DU NADPH EN NADP ⁺	72
FIGURE 20. ACTIVATION ROS-DEPENDANTE DE P38. LA TRX SOUS FORME REDUITE INHIBE L'ACTIVITE DE ASK1 ET ENTRAINE SON UBIQUITINYLATION ET SA DEGRADATION.....	76
FIGURE 21. IMPACT DE L'ACTIVITE METABOLIQUE SUR LA REGULATION DU PAYSAGE EPIGENETIQUE ET DE L'EXPRESSION GENIQUE. LA METHYLATION DE L'ADN ET DES HISTONES REQUIERT DE L'ATP.....	79
FIGURE 22. L'INFARCTUS DU MYOCARDE EST PROVOQUE PAR L'OBSTRUCTION DE L'ARTERE CORONAIRE.....	81
FIGURE 23. LA PERTE DE CARDIOMYOCYTES ENTRAINE LE REMODELAGE STRUCTUREL DU VENTRICULE.	82
FIGURE 24. LES CARDIOMYOCYTES NEONATAUX OPERENT DES CHANGEMENTS STRUCTURAUX PENDANT LEUR MATURATION.....	85
FIGURE 25. MODIFICATIONS DE LA LOCALISATION DES JONCTIONS COMMUNICANTES ET FORMATION DES TUBULES-T PENDANT LA MATURATION.....	87
FIGURE 26. REMODELAGE METABOLIQUE DU CŒUR VERS LE METABOLISME MITOCHONDRIAL ET LA B-OXYDATION PENDANT LA PERIODE PERINATALE.	91
FIGURE 27. BILAN DE LA MATURATION STRUCTURELLE ET BIOCHIMIQUE DU CARDIOMYOCYTE PENDANT LA PERIODE PERINATALE.....	92

FIGURE 28. L'INDUCTION DU METABOLISME OXYDATIF A LA NAISSANCE STIMULE LA MATURATION DES CARDIOMYOCYTES VIA L'ACTIVATION ROS-DEPENDANTE DES VOIES ATM ET p38MAPK.....	94
FIGURE 29. LA STRUCTURE D'Ucp2 PRESENTE LES CARACTERISTIQUES DES ECHANGEURS MITOCHONDRIAUX ET EST SIMILAIRE A CELLE D'Ucp1.....	102
FIGURE 30. PHYLOGENIE SIMPLIFIEE D'Ucp2 ET DE SES HOMOLOGUES.....	103
FIGURE 31. REGULATION DE L'EXPRESSION D'Ucp2 PAR LA DISPONIBILITE DES SUBSTRATS, LES MICROARNs ET LE LPS.....	105
FIGURE 32. ACTIVITE FLIPPASE D'Ucp2 ET CONDUCTANCE PROTONIQUE A TRAVERS LA BICOUCHE LIPIDIQUE.....	107
FIGURE 33. LE DECOUPLAGE PARTIEL EFFECTUE PAR Ucp2 PEUT REGULER LE POTENTIEL DE MEMBRANE (Ψ_M) ET LA PRODUCTION DE ROS MITOCHONDRIAUX.....	108
FIGURE 34. MODELE DE L'EXPORT DE METABOLITES PAR Ucp2.....	111

RESULTATS..... 119

FIGURE 35. (FIGURE 1) L'ABSENCE D'Ucp2 DANS LES CARDIOMYOCYTES NEONATAUX ENTRAINE UNE REDUCTION D'EXPRESSION DES GENES ASSOCIES A LA MATURATION CARDIAQUE.....	122
FIGURE 36. (FIGURE S1) L'ABSENCE D'Ucp2 DANS LES CARDIOMYOCYTES NEONATAUX ENTRAINE UNE REDUCTION D'EXPRESSION DES GENES ASSOCIES A LA MATURATION CARDIAQUE.	123
FIGURE 37. (FIGURE 2) LES CARDIOMYOCYTES NEONATAUX <i>Ucp2</i> ^{-/-} PRESENTENT UNE REDUCTION DE LA MASSE MITOCHONDRIALE AINSI QUE DE L'EXPRESSION DES ACTEURS DE LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE. (A).....	125
FIGURE 38. (FIGURE S2) LES CARDIOMYOCYTES NEONATAUX <i>Ucp2</i> ^{-/-} SE CARACTERISENT PAR UNE REDUCTION DE L'EXPRESSION DES PROTEINES SIRT1 ET NRF1 IMPLIQUEES DANS LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE.....	126
FIGURE 39. (FIGURE 3) LE METABOLISME ENERGETIQUE DES CARDIOMYOCYTES NEONATAUX EST ALTERE EN ABSENCE D'Ucp2.	128
FIGURE 40. (FIGURE 4) LE COEUR <i>Ucp2</i> ^{-/-} NEONATAL SE CARACTERISE PAR UN DEFAUT D'ACTIVATION DE LA B-OXYDATION ET D'AUGMENTATION DU NIVEAU DE ROS.	131
FIGURE 41. (FIGURE S4) LE COEUR <i>Ucp2</i> ^{-/-} NEONATAL SE CARACTERISE PAR UN DEFAUT D'ACTIVATION DE LA B-OXYDATION ET DES VOIES DE REONSE AUX DOMMAGES A L'ADN.....	132
FIGURE 42. (FIGURE 5) LES CARDIOMYOCYTES <i>Ucp2</i> ^{-/-} PRESENTENT UN DEFAUT DE MATURATION CONTRACTILE.....	134
FIGURE 43. (FIGURE S5) LES CARDIOMYOCYTES <i>Ucp2</i> ^{-/-} SE CARACTERISENT PAR UN DEFAUT DE PROLIFERATION.....	135
FIGURE 44. (FIGURE 6) LA DEPENDANCE DES CŒURS <i>Ucp2</i> ^{-/-} A LA GLUTAMINE ENTRAINE UNE DISPONIBILITE REDUITE EN ACETOGLUTARATE, UTILISE COMME COFACTEUR PAR LES TETS.....	138
FIGURE 45. (FIGURE S6) LA DEPENDANCE METABOLIQUE DES CŒURS <i>Ucp2</i> ^{-/-} A LA GLUTAMINE ENTRAINE UN DESEQUILIBRE DANS LES NIVEAUX RELATIFS D'INTERMEDIAIRES METABOLIQUES.	140
FIGURE 46. (FIGURE 7) REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA FONCTION D'Ucp2 DANS LES CARDIOMYOCYTES NEONATAUX.	141
FIGURE 47. (FIGURE S7) LE DEFAUT DE MATURATION METABOLIQUE DES MUTANTS <i>Ucp2</i> ^{-/-} EST PARTIELLEMENT COMPENSE A P15.....	143
FIGURE 48. (FIGURE 1) ALTERATION DE LA RESPIRATION DES CARDIOMYOCYTES NEONATAUX TRAITES AVEC LA GENIPINE.....	162
FIGURE 49. (FIGURE 2) L'INHIBITION D'Ucp2 DANS LES CARDIOMYOCYTES NEONATAUX ENTRAINE UNE AUGMENTATION DES NIVEAUX DE ROS TOTAUX AINSI QUE L'ACTIVATION REDOX-DEPENDANTE DE LA p38MAPK.....	164

FIGURE 50. (FIGURE 3) LA DIMINUTION DU NIVEAU DE ROS OU L'INHIBITION DE LA P38MAPK PREVIENNENT LA REDUCTION DE
PROLIFERATION DES CARDIOMYOCYTES OBSERVEE APRES INHIBITION D'Ucp2.....165

DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... 181

FIGURE 51. ERRa, ERG, GATA4 ET PGC-1A COORDONNENT LA MATURATION CONTRACTILE ET METABOLIQUE DES
CARDIOMYOCYTES.....187

FIGURE 52. MODELES DE FONCTIONNEMENT POSSIBLE D'Ucp2 PENDANT LA MATURATION CARDIAQUE NEONATALE192

Table des abréviations

2-DG	2-deoxy-D-glucose
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
Acétyl-CoA	Acetyl coenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adenosine monophosphate
AMPK	AMP activated protein kinase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATM	Ataxia Telangiectasia triphosphate
ATP	Adénosine tri-phosphate
ATPase	Adénosine triphosphate hydrolase
BOH	Acide β -hydroxybutyrique
BSA	Albumine sérique bovine
DDR	DNA Damage Response Pathway
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNase	Désoxyribonucléase
DNMT	DNA methyl transferase
Drp1	Dynamin-related protein 1
ECAR	Extracellular acidification rate
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EdU	5-éthynyl-2'-déoxyuridine
EGF	Epidermal growth factor
Errg	Estrogen-related receptor gamma
ETC	Electron Transport Chain (Chaine de transport des électrons)
ETF-QOR	Electron transferring flavoprotein ubiquinone oxidoreductase
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FCCP	Trifluoromethoxy carbonylcyanide phenylhydrazone
FGF	Fibroblast growth factor

GABA	Acide γ -amino butyrique
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
Gata4	Gata binding protein 4
Gpx	Glutathione peroxidase
Grx	Glutaredoxine
GSH	Glutathione (forme réduite)
GSSG	Glutathione (forme oxydée)
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
HAT	Histone acetyl transferase
HDAC	Histone Deacetylase
Hif-1α	Hypoxia Inducible factor 1 alpha
HK	Hexokinase
HNE	Hydroxynonenal
HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunoglobuline G
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass spectrometry
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mfn	Mitofusine
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide oxide
NAD(H)	Nicotinamide adenine dinucleotide (forme réduite)
NADPH	Nicotinamide nucleotide phosphate (oxydé)
NOX	NADPH oxidase
NRF1	Nuclear respiratory factor 1
OCR	Oxygen consumption rate
OPA1	Optic Atrophy 1
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PDK	Pyruvate dehydrogenase kinase
PFK	Phosphofructokinase
PGC1α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

Prx	Peroxyredoxine
ROS	Reactive oxygen species
RT-qPCR	Reverse Transcriptase – Quantitative Polymerisation Chain Reaction
siRNA	small interfering Ribonucleic acid
Sirt	Sirtuine
SOD	Superoxide dismutase
TBS	Tris-Buffered saline
TET	Ten-eleven ranslocation proteins
TFAM	Transcription factor A, mitochondrial
Trx	Thioredoxine
TrxR	Thioredoxine réductase
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UTR	Untranslated Transcribed Region
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WGA	Wheat germ agglutinin
WT	Wild Type

Introduction Générale

PREAMBULE

En dépit du développement de traitements préventifs ou curatifs évitant ou retardant les conséquences d'un accident vasculaire, les maladies cardiaques sont une cause majeure de mortalité. Cette mortalité est en grande partie due à la faible capacité de régénération du cœur adulte. Par conséquent, la perte de **cardiomyocytes** suite à un infarctus du myocarde conduit à une diminution de la fonction cardiaque, ou **insuffisance cardiaque**. Cette faible capacité régénérative contraste avec celle du mammifère néonatal dont les cardiomyocytes peuvent, pendant une courte période après la naissance, proliférer pour régénérer le cœur endommagé. Néanmoins, ces cardiomyocytes, qui présentent des caractéristiques fœtales, perdent leur capacité de prolifération pendant leur **maturation**. De plus, le développement de traitements luttant contre l'insuffisance cardiaque ou les cardiomyopathies requiert des modèles pertinents. Or, les applications de *drug-screening in vitro* sont fortement freinées par l'incapacité de maintenir des cardiomyocytes adultes en culture ou d'obtenir des cardiomyocytes matures à partir de cellules souches embryonnaires.

Un événement important de la maturation est l'orientation métabolique vers le **métabolisme mitochondrial** et la **β -oxydation** en tant que source majeure de production d'ATP. Plusieurs études pionnières ont montré que la mitochondrie participait à la **signalisation** induisant la maturation cardiaque et que la stimulation de la β -oxydation de cardiomyocytes en culture permet l'acquisition de phénotypes électrophysiologiques ou structurels proches des cardiomyocytes adultes. Ainsi, la compréhension de la signalisation initiée par la mitochondrie permettrait d'améliorer à la fois la régénération cardiaque et la fidélité des modèles *in vitro*, facilitant donc le développement de thérapies efficaces pour lutter contre l'insuffisance cardiaque.

Ce manuscrit synthétise plus de trois années de travaux de thèse visant à mieux caractériser la signalisation rétrograde de la mitochondrie au noyau pendant la maturation cardiaque. Dans ce but, nous avons étudié les conséquences de la délétion d'**Ucp2**, qui, en tant que régulateur de la production d'**espèces réactives mitochondriales**, du **cycle de Krebs** et/ou de l'orientation métabolique de la cellule, constitue un modèle d'intérêt dans l'étude de la signalisation d'origine mitochondriale pendant la maturation des cardiomyocytes.

L'introduction décrira donc le plus largement possible le contexte dans lequel s'inscrivent ces travaux et s'articulera selon le plan ci-dessous :

- **Le premier chapitre** présentera le cœur, sa structure, la régulation du cycle de contraction de l'organe et certains paramètres mesurables permettant d'évaluer la fonction cardiaque. Seront ensuite présentés la cellule spécialisée qu'est le cardiomyocyte et les principes généraux de la régulation de la contraction et la relaxation à l'échelle cellulaire.
- **Le deuxième chapitre** abordera la dynamique de la synthèse et de la dégradation des mitochondries, ainsi que le métabolisme énergétique cardiaque. Nous détaillerons en particulier les grands principes de la signalisation redox, dont les mitochondries sont des acteurs majeurs, et dans laquelle Ucp2 est connu pour jouer un rôle. Pour clore cette partie sur la signalisation d'origine métabolique, seront abordés l'interaction entre métabolisme énergétique et régulation de l'expression génique, ainsi que certains des acteurs moléculaires impliqués dans cette communication.
- **Le troisième chapitre** présentera l'état actuel des connaissances des fonctions du métabolisme oxydatif indépendantes de la production d'ATP dans le cœur et les cardiomyocytes. Le rôle de la mitochondrie dans la pathophysiologie du remodelage ventriculaire associée aux ischémies sera brièvement décrit. La maturation du cardiomyocyte ainsi que l'impact du métabolisme oxydatif dans l'acquisition néonatale des phénotypes matures et leur maintenance à l'âge adulte seront exposés de manière détaillée.
- Enfin, **le quatrième chapitre** s'articulera autour d'Ucp2. Sa fonction apparaît comme dépendante du contexte cellulaire et n'est que partiellement comprise. Aussi seront exposés un panel relativement large de données à son sujet : les informations tirées de ses homologues, la régulation de son expression et son activité, les différents modèles proposés pour Ucp2, ainsi que les phénotypes associés à son expression ou sa délétion.

Chapitre 1 : Cœur et cardiomyocyte

I. Structure, physiologie et fonctionnement cardiaque

A. Structure et fonction

Chez les vertébrés, le cœur est l'organe central du système circulatoire et le premier à se former pendant le développement (Olson and Schneider, 2003). Il a pour fonctions d'éjecter le sang oxygéné provenant des poumons vers le reste de l'organisme et d'acheminer le sang appauvri en oxygène et enrichi en CO₂ de l'organisme vers les poumons. Il est également nécessaire à l'apport des nutriments aux organes.

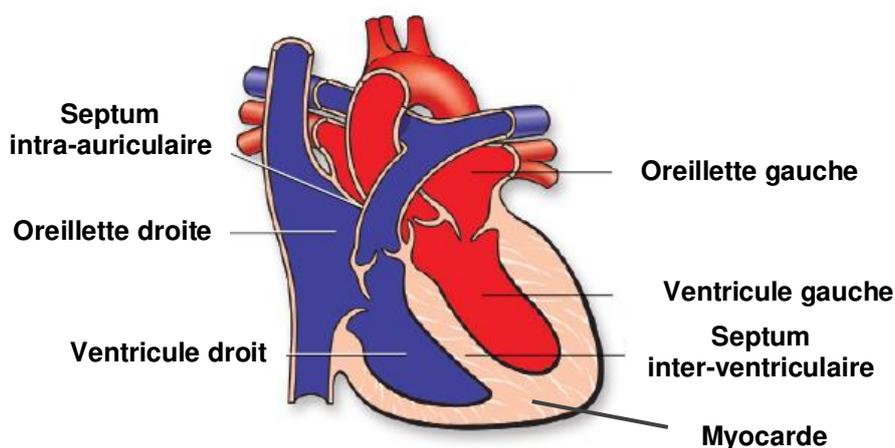


Figure 1. Représentation schématique des différentes chambres cardiaques. *Adapté de www.heart.org*

Le cœur de mammifère adulte contient 4 chambres qui sont séparées par des valves régulant le flux sanguin au sein des chambres (Figure 1). Les oreillettes, ou atriums, sont les deux chambres situées dans la partie haute du cœur. Elles ont pour fonction de recueillir le sang veineux et, par leur contraction, de le transmettre aux ventricules, les chambres de la portion basse. Ces derniers permettent ensuite l'éjection du sang vers les organes (poumons ou reste de l'organisme). Le cœur est séparé latéralement grâce aux septums intra-auriculaire et inter-ventriculaire (Figure 1). Ainsi, chaque oreillette est couplée à un ventricule, formant le cœur droit et le cœur gauche. Le cœur droit est en charge de la

réception du sang provenant de l'organisme pour l'acheminer aux poumons où les échanges gazeux dans l'alvéole permettront l'élimination du CO₂ accumulé et l'enrichissement en oxygène. Le cœur gauche expulse le sang oxygéné vers le reste de l'organisme via l'artère aortique, ou aorte. Chaque oreillette communique avec le ventricule correspondant par l'intermédiaire d'une valve dite tricuspide à droite et mitrale à gauche. Le cœur est connecté à la circulation via deux réseaux de vaisseaux sanguins distincts : les veines qui transportent le sang des organes vers le cœur et les artères, aortiques et pulmonaires, qui transportent le sang dans le sens inverse (Figure 1).

Le cœur est un organe creux constitué de trois couches, l'épicarde, le myocarde et l'endocarde. Le myocarde, qui constitue l'essentiel de la masse du cœur, est le tissu musculaire responsable de la fonction de contraction. Il est bordé du côté interne par l'endocarde, qui tapisse et délimite l'intérieur des chambres, et du côté externe par une enveloppe, le péricarde. Celui-ci est composé de deux feuillets, le péricarde fibreux, qui fixe de manière stable le cœur aux poumons et au diaphragme, et le péricarde viscéral. Lorsque le cœur se contracte, une partie du péricarde sécrète le fluide péricardique qui agit comme lubrifiant entre les deux feuillets et facilite les mouvements cardiaques.

En tant que muscle, le myocarde nécessite un apport propre en oxygène et en nutriments. Il est irrigué par un réseau de veines et d'artères. Les artères, qui forment le réseau de coronaires issues de l'aorte, permettent, en se dilatant, d'augmenter les apports en oxygène et en nutriments, et d'assurer l'adaptation du cœur à la demande énergétique, notamment pendant l'effort (Figure 2).

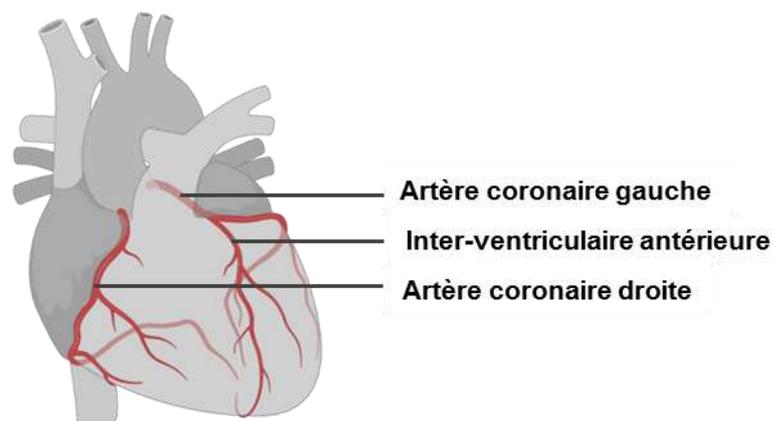


Figure 2. Réseau de coronaires alimentant le myocarde. Créé sur Biorender.com

Le cœur est composé de différents types cellulaires, dont 30% de cardiomyocytes chez l'humain et la souris, qui représentent environ 75 % du volume cardiaque (Bergmann *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2016). Il contient aussi des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses, des cellules immunitaires, ainsi que des fibroblastes (10 à 15%) qui participent au maintien de l'intégrité structurelle de l'organe en sécrétant la matrice extracellulaire (Souders, Bowers and Baudino, 2009; Pinto *et al.*, 2016).

B. Le cycle cardiaque

L'alternance de contraction et de relaxation des quatre chambres cardiaques à chaque battement suit un ordre précis appelé cycle cardiaque. Chaque cycle cardiaque comprend une phase de relaxation, appelée diastole, permettant aux chambres de se remplir de sang provenant des veines, et une phase de contraction, ou systole, permettant l'expulsion du sang vers les artères. Les phases systoliques et diastoliques des oreillettes et les ventricules sont asynchrones, de sorte que lorsque les oreillettes effectuent la diastole, les ventricules sont en systole.

Pendant la diastole atriale, le sang provenant des veines caves entre dans l'oreillette droite, tandis que l'oreillette gauche accueille le sang provenant des veines pulmonaires (Figure 3). Lorsque la pression dans les oreillettes devient supérieure à celle à l'intérieur du ventricule correspondant, les valves tricuspide et mitrale s'ouvrent et permettent le passage du sang des oreillettes vers les ventricules. S'en suit une contraction des oreillettes, ou systole atriale, pour éjecter le sang restant dans les ventricules. Pendant ce temps, les ventricules sont en phase de diastole, donc relâchés, et s'emplissent du sang provenant des oreillettes. La relaxation des ventricules permet la dilatation des artères coronaires et l'augmentation du flux sanguin vers les parois du myocarde. C'est donc principalement pendant cette phase que le muscle cardiaque est alimenté en oxygène et en nutriments. Les ventricules entament ensuite leur phase de systole en se contractant. La pression ventriculaire excédant celle des oreillettes, cela entraîne la fermeture des valves atrio-ventriculaires et l'ouverture des valves semi-lunaires (pulmonaire à droite et aortique à gauche), permettant l'éjection du sang du cœur vers le système circulatoire, c'est à dire l'artère aortique pour le ventricule gauche et

l'artère pulmonaire pour le ventricule droit (Figure 3) (Johnson *et al.*, 2008; Pollock and Makaryus, 2021).

Le bon déroulement du cycle cardiaque et de ses différentes phases détermine la capacité du cœur à éjecter un volume de sang suffisant pour alimenter l'organisme. Par conséquent, la cinétique des différentes étapes du cycle est finement contrôlée.

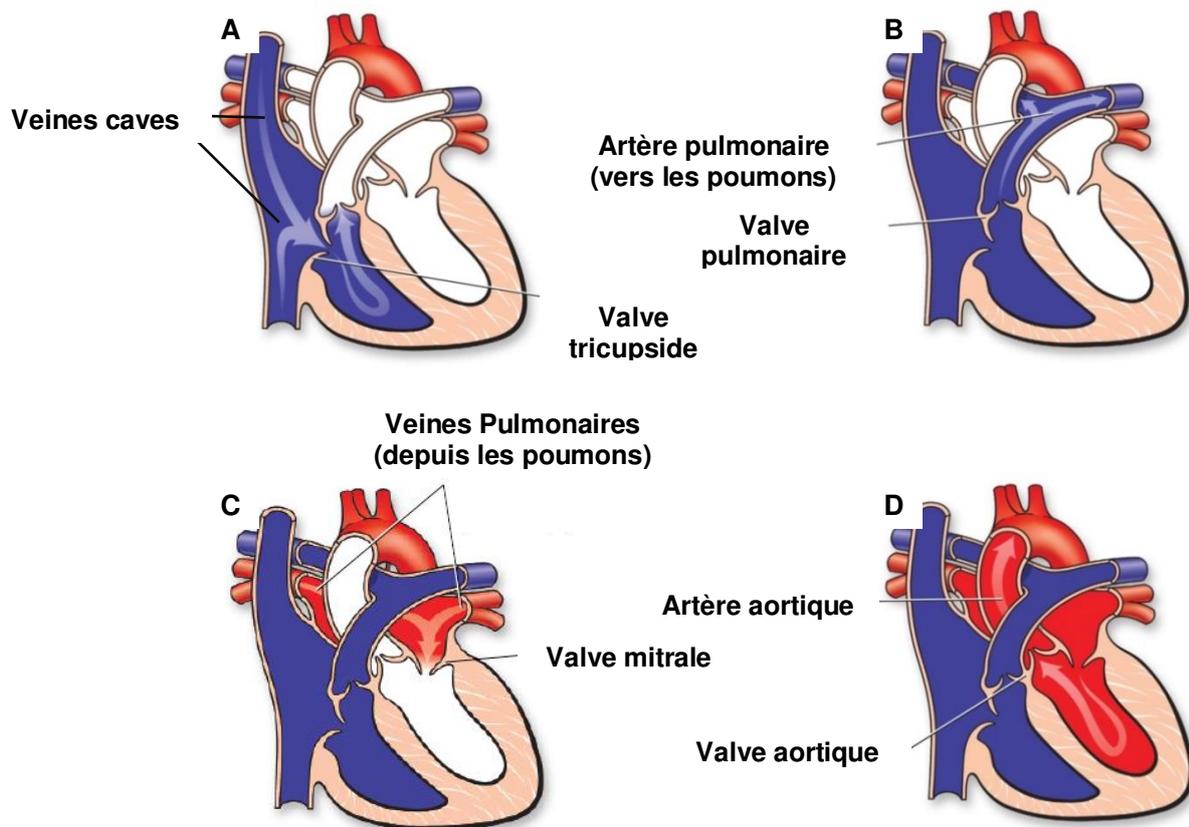


Figure 3. Représentation schématique de la circulation cardiaque. (A) Le sang enrichi en CO₂ et appauvri en O₂ provenant de l'organisme via les veines caves entre dans l'oreillette droite puis le ventricule droit au travers de la valve tricuspide. (B) La contraction ventriculaire entraîne l'ouverture de la valve pulmonaire et l'éjection du sang vers les poumons. (C) Le sang enrichi en O₂ en provenance des poumons pénètre dans l'oreillette gauche. (D) La contraction du ventricule gauche propulse le sang en direction des organes via l'aorte. Les phases (A) et (C) d'une part, et (B) et (D) d'autre part, sont simultanées. Adapté de www.heart.org

C. Contrôle de la contraction cardiaque

Le rythme cardiaque et la désynchronisation de la contraction des oreillettes et des ventricules sont contrôlés par des tissus spécialisés dans la conduction, le tissu nodal et le système His-Purkinje. Les cellules qui composent le tissu nodal ont un aspect embryonnaire avec des constituants myofibrillaires immatures et s'organisent en îlots cellulaires appelés nœuds. Les nœuds sont localisés dans l'oreillette droite et le septum inter-ventriculaire, et sont capables d'émettre des potentiels d'action. Le premier, appelé nœud sinoatrial, est capable d'effectuer spontanément une dépolarisation qu'il transmet aux cardiomyocytes qui l'entourent, entraînant ainsi leur contraction (Figure 4). Localisé dans l'oreillette droite, il contrôle le rythme cardiaque et est considéré comme le pacemaker naturel du cœur. Sa repolarisation est sous le contrôle du système nerveux périphérique autonome, ce qui permet de modifier le rythme cardiaque selon la demande. Lorsque le potentiel d'action, après avoir entraîné la contraction des oreillettes, atteint le nœud auriculo-ventriculaire au niveau du septum inter-ventriculaire, ce dernier le transmet aux deux ventricules via le faisceau de His et ses branches du réseau de Purkinje (Figure 4). La vitesse de conduction varie le long du tissu nodal : tandis qu'elle est très lente dans le nœud sinoatrial, puis lente dans le nœud auriculo-ventriculaire afin d'assurer le remplissage des ventricules, elle augmente très rapidement dans le faisceau de His puis le réseau de Purkinje afin de dépolariser rapidement l'ensemble des cardiomyocytes et de synchroniser la contraction des deux ventricules (Anderson and Ho, 1998; Kennedy *et al.*, 2016).

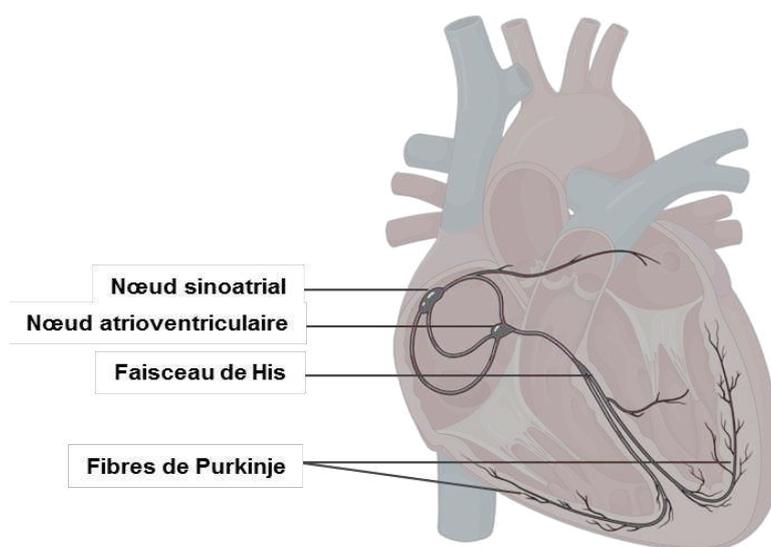


Figure 4. Représentation schématique du système de conduction coordonnant la contraction des différentes chambres cardiaques. Créé sur Biorender.com

D. Les paramètres de la fonction cardiaque

Plusieurs paramètres permettent d'évaluer la fonction cardiaque. Pour les déterminer, il est nécessaire d'estimer les volumes sanguins présents dans les différentes chambres au cours des phases du cycle cardiaque.

Ainsi, le volume maximum contenu dans les ventricules à la fin de la diastole ventriculaire est appelé volume télédiastolique (*end-diastolic volume*) ou pré-charge (*preload*). Le volume minimum restant dans le ventricule après la contraction est appelé volume télésystolique (*end-systolic volume*) ou post-charge. La différence entre les volumes pré et post charge, appelée volume d'éjection systolique (*stroke volume*), permet de calculer la fraction d'éjection systolique :

$$\text{Fraction d'éjection} = \frac{\text{Volume éjection systolique}}{\text{Volume précharge (\%)}}$$

Cette fraction, qui représente le volume de sang expulsé du ventricule par rapport à son volume total, est un indicateur couramment utilisé pour évaluer la fonction contractile cardiaque (Johnson *et al.*, 2008). Elle varie chez l'humain entre 50 et 70% (Cikes and Solomon, 2016), et chez la souris entre 65 et 80% selon la lignée étudiée (Vinhas *et al.*, 2013). On s'intéresse généralement à la fraction d'éjection du ventricule gauche, celui-ci étant souvent impliqué dans les maladies cardiaques de par sa fonction d'expulsion du sang oxygéné vers les organes. Cette valeur est complémentaire de la fraction de raccourcissement. Celle-ci, qui correspond à la réduction de taille du ventricule entre la fin de la diastole et celle de la systole, représente la capacité du ventricule à exercer une pression sur le sang qu'il contient.

Enfin, le rendement, ou débit cardiaque (*cardiac output*), correspond au volume de sang éjecté par unité de temps. Il est dépendant de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection systolique.

II. Le cardiomyocyte, au cœur de la contraction cardiaque

A. Structure du cardiomyocyte

A l'âge adulte, les cardiomyocytes ventriculaires possèdent une forme allongée d'environ 150 μm de long et 20 μm de large. Leur machinerie contractile est composée de faisceaux de myofibrilles d'environ 1 μm de diamètre, entourés de réticulum sarcoplasmique. Chaque myofibrille est constituée de sarcomères en série connectés les uns aux autres au niveau des stries Z (Figure 5). Les sarcomères sont les unités contractiles du cardiomyocyte et sont responsables de la contraction et de la relaxation musculaire au cours du cycle cardiaque. Ils sont composés de filaments d'actine et de myosine intercalés. Les filaments d'actine sont connectés aux stries Z, tandis que les filaments de myosine sont interconnectés entre eux au niveau de la bande M. Enfin, des filaments de titine assurent le lien entre les stries Z et les filaments de myosine (Figure 5).

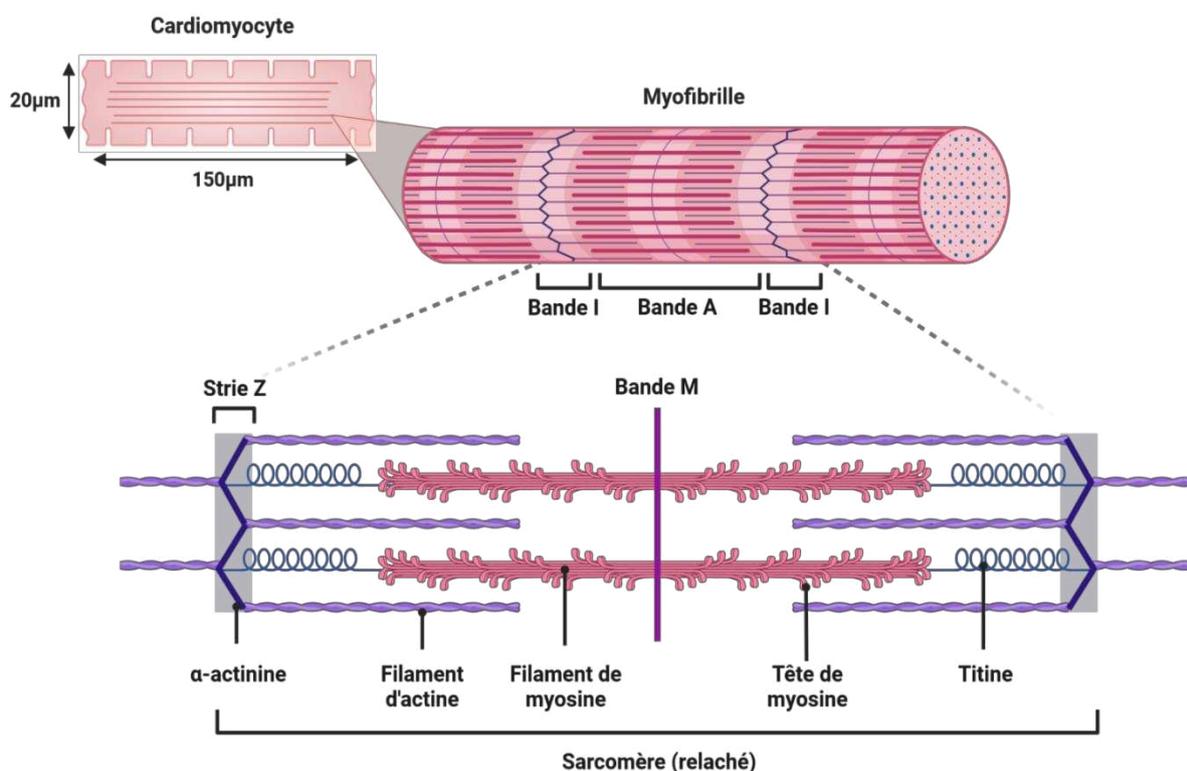


Figure 5. Représentation schématique du cardiomyocyte, des myofibrilles et d'une unité sarcomérique relâchée. Créé sur Biorender.com

La contraction est permise par le glissement relatif des filaments de myosine et d'actine. Ce glissement nécessite l'attachement des têtes de myosine à des sites spécifiques sur les filaments d'actine. Au repos, ces sites sont couverts par un complexe composé de différentes troponines et tropomyosines qui empêche la contraction.

Les sarcomères contiennent également des protéines essentielles à leur organisation et à leur assemblage, comme la desmine et l' α -actinine qui assurent le maintien de la liaison entre les différents sarcomères et leurs filaments respectifs au niveau des stries Z (Figure 5). Enfin, la dystrophine assure la jonction entre les myofibrilles et un complexe de protéines localisé dans la membrane plasmique, les costamères. Ces complexes sont eux-mêmes composés de plusieurs protéines musculaires, comme la sarcospane. Cette liaison garantit la cohésion cellulaire pendant les cycles de contraction/relaxation, et les mutations de la dystrophine ou des protéines du costamère induisent des dégénérescences cellulaires à l'origine de dystrophies musculaires (Jaka *et al.*, 2015; Gautel and Djinočić-Carugo, 2016; van der Velden and Stienen, 2019).

B. Couplage contraction/relaxation dépendant du calcium et de l'ATP

La membrane plasmique des cardiomyocytes s'invagine pour former des tubules-T. Ces derniers, situés en regard des sarcomères et du réticulum sarcoplasmique, permettent la propagation des potentiels d'action de la membrane vers l'intérieur de la cellule. La dépolarisation de la membrane permet l'entrée de calcium Ca^{2+} dans les cardiomyocytes via des canaux calciques voltage-dépendants de type L (LTCC). Cet afflux calcique entraîne le relargage du Ca^{2+} stocké dans le réticulum sarcoplasmique via l'activation des récepteurs de la ryanodine (RyR). Les ions Ca^{2+} , en se fixant sur les troponines, déclenchent le changement de leur conformation et la libération des sites d'attachement des têtes de myosine sur les filaments d'actine sarcomérique (Figure 6). Associé à l'hydrolyse de l'ATP, l'attachement des têtes de myosine sur les filaments d'actine génère une force qui permet le glissement relatif des deux types de filaments, et donc le raccourcissement des sarcomères et la contraction de la cellule. Des jonctions gap et des connexines connectent les cardiomyocytes entre eux et permettent le passage des ions, ce qui assure la conduction électrique et la

synchronisation des différents cardiomyocytes composant les ventricules ou les oreillettes (van der Velden and Stienen, 2019; Zhihao *et al.*, 2020).

La relaxation est permise par les titines, des protéines élastiques fonctionnant comme un ressort forçant les sarcomères à reprendre leur longueur initiale une fois les têtes de myosine détachées (LeWinter and Granzier, 2010). Ce processus s'accompagne de la diminution de la concentration cytosolique en ions Ca^{2+} qui sont stockés dans le réticulum sarcoplasmique grâce à des pompes ATP-dépendantes, les protéines SERCA2a (Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase), ou exportés dans le milieu extracellulaire via les échangeurs calcium-sodium (NCX) (Figure 6) (Zhihao *et al.*, 2020).

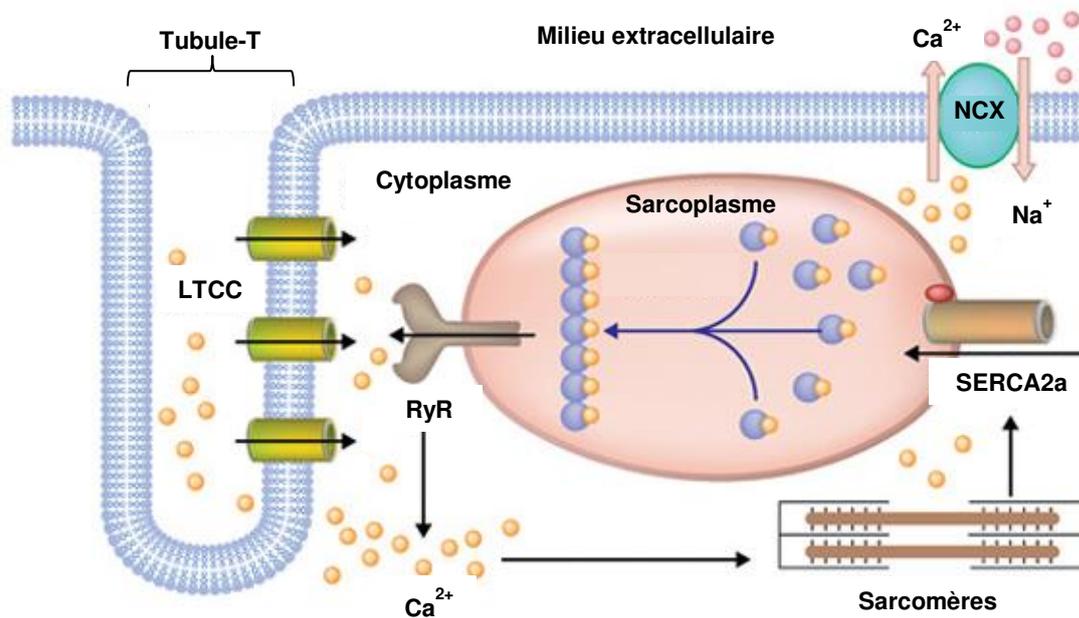


Figure 6. Représentation schématique du cycle du calcium assurant la contraction d'un cardiomyocyte. La dépolarisation de la membrane entraîne l'entrée de calcium dans le cytosol via les LTCC. Les ions Ca^{2+} vont activer les RyR, qui vont permettre la sortie massive d'ions Ca^{2+} depuis le sarcoplasme et la contraction des sarcomères. La relaxation s'accompagne d'un retour des ions Ca^{2+} dans le sarcoplasme grâce au pompage actif par les SERCA2a, ou d'un export dans le milieu extracellulaire en échange d'ions Na^{+} via les NCX. *Adapté de Garg et al., 2018*

Chapitre 2 : La mitochondrie, un organe à la confluence du métabolisme énergétique et de la signalisation

La contraction et la relaxation des cardiomyocytes nécessitent une grande quantité d'ATP. Ainsi, le cœur est un organe très énergivore qui requiert la synthèse d'environ 5kg d'ATP par jour, avec un réservoir d'ATP renouvelé toutes les 13 secondes (Witteles and Fowler, 2008). Par conséquent, la fonction cardiaque est hautement dépendante de la production d'ATP, et la mitochondrie, qui est responsable de 95% de cette production dans le cœur adulte, représente jusqu'à 40% du volume des cardiomyocytes adultes. (Doenst, Nguyen and Abel, 2013; Li et al., 2020). Les mitochondries jouent également un rôle important dans la synthèse de biomolécules (lipides, nucléotides, acides aminés) (Spinelli and Haigis, 2018) et la signalisation cellulaire, via notamment la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Bock and Tait, 2020; Sies and Jones, 2020). Les mitochondries sont donc capitales dans le cœur, et leur synthèse, de même que leur dégradation, sont finement contrôlées.

I. Le réseau mitochondrial

A. La mitochondrie, un organe codé par deux génomes

1. *Un organe composé de compartiments spécialisés*

La mitochondrie est connue comme étant la « centrale énergétique » de la cellule. Sa structure à double membrane permet la formation de deux espaces distincts du cytosol que sont la matrice et l'espace intermembranaire (Figure 7). La matrice est le siège de bon nombre des réactions chimiques impliquées dans la dégradation et l'oxydation des substrats, notamment le cycle de Krebs, nœud majeur du métabolisme, mais également de la β -oxydation. La membrane interne est le siège de la chaîne respiratoire qui, grâce à la phosphorylation oxydative, ou OXPHOS, convertit en ATP l'énergie libérée par l'oxydation des nutriments. Cette membrane forme des repliements, ou crêtes, qui augmentent sa surface et dont le nombre est corrélé à la quantité d'ATP produite par l'OXPHOS (Zick, Rabl

and Reichert, 2009). L'espace intermembranaire participe au fonctionnement de la chaîne respiratoire en stockant des protons qui permettent la formation d'un gradient électrochimique nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthase.

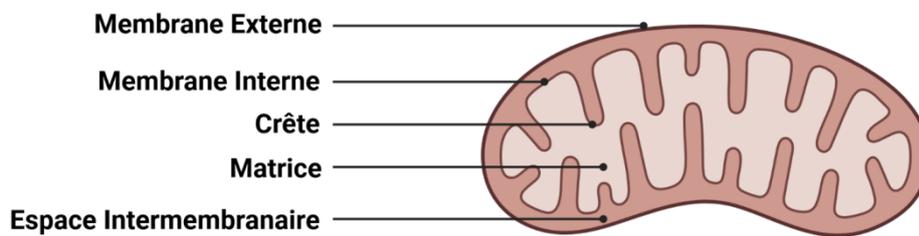


Figure 7. Représentation schématique des différents compartiments mitochondriaux. La matrice accueille le génome mitochondrial et est le siège des réactions du catabolisme oxydatif, le cycle de Krebs et la β -oxydation, dont la fonction est la reformation des coenzymes réduits NADH et FADH₂. Ces coenzymes assurent le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Celle-ci, localisée sur la membrane interne, principalement au niveau des crêtes mitochondriales, produit un gradient de protons dans l'espace intermembranaire. Ce potentiel électrochimique assure le fonctionnement de l'ATP synthase et la phosphorylation de l'ADP en ATP. Créé sur Biorender.com

2. Génome mitochondrial

La mitochondrie possède son propre génome hérité de son origine endosymbiotique et résidant dans la matrice. A la différence du génome nucléaire, il est présent en plusieurs copies par mitochondrie, variant de 100 à 10 000 selon le type cellulaire.

L'ADN mitochondrial est une molécule circulaire sans histone, et qui ne bénéficie pas de systèmes de réparation. Il est donc sensible aux dommages, notamment oxydatifs, du fait de sa proximité avec la chaîne respiratoire (Bogehagen, 2012).

Le génome mitochondrial est composé d'un peu plus de 16000 paires de bases chez l'Homme comme chez la souris. Chez ces deux espèces, il contient 37 gènes codants pour 22 ARNt, 2 ARNs ribosomiaux spécifiques (12S et 16S) et 13 sous-unités protéiques des complexes I, III, IV, et V de la chaîne respiratoire (Figure 8). Le génome mitochondrial est codant sur toute sa longueur, à l'exception de son origine de réplication (boucle D). La transcription des brins se fait sous forme de transcrits polycistroniques (Bogehagen, 2012; Kummer and Ban, 2021). L'initiation de sa transcription et de sa réplication sont dépendantes de TFAM (Facteur de transcription mitochondrial A) (Campbell, Kolesar and

Kaufman, 2012). Elles sont effectuées respectivement par l'ARN polymérase mitochondriale (mtRNAP) et l'ADN polymérase γ (Young and Copeland, 2016).

Leur génome codant pour seulement 13 protéines (Tableau 1), les mitochondries, qui contiennent entre 1000 et 1500 protéines différentes, sont hautement dépendantes de l'expression de gènes nucléaires. Cette expression nécessite une synchronisation avec les gènes mitochondriaux, et les mitochondries sont dépendantes de l'activation de voies de signalisation cytosoliques pour leur synthèse et leur dégradation (Tang *et al.*, 2020; Kummer and Ban, 2021).

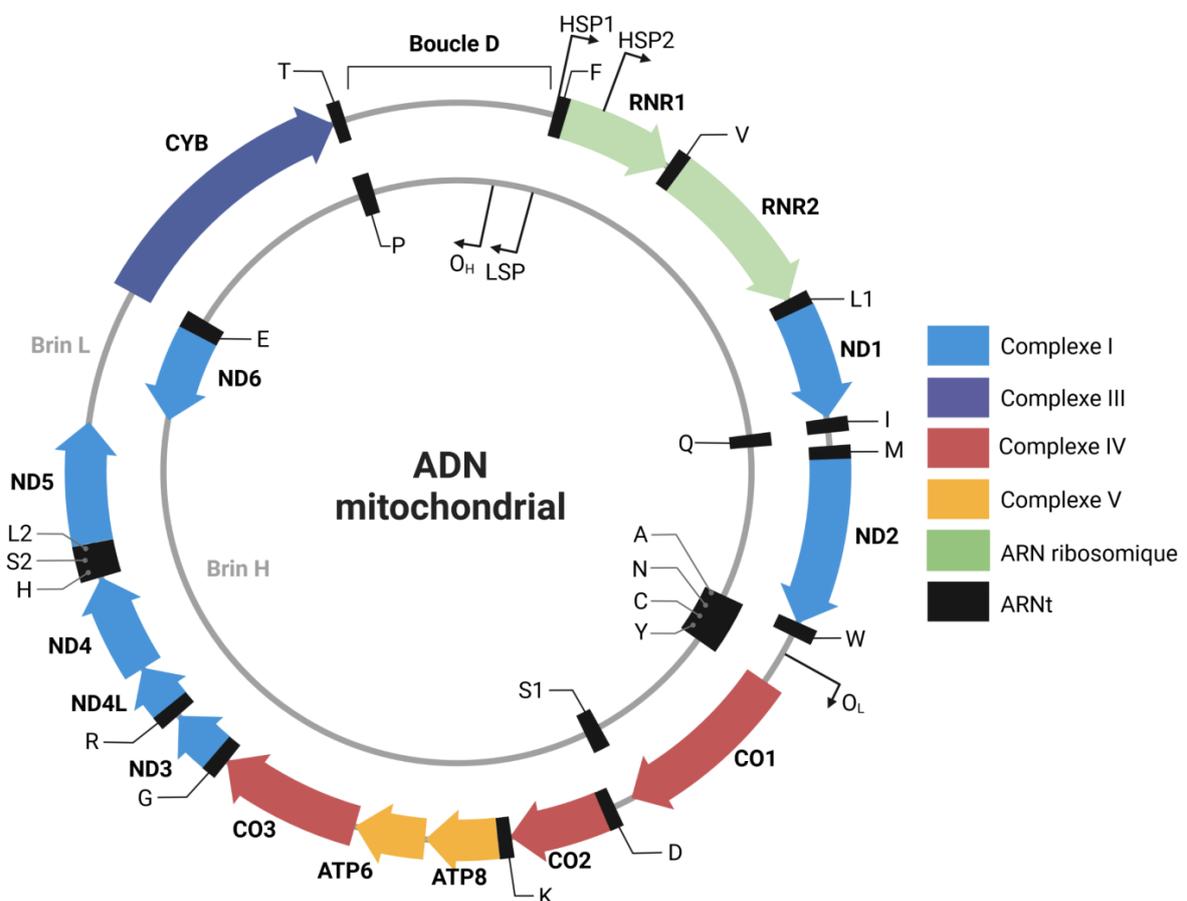


Figure 8. Carte du génome mitochondrial. L'ADN mitochondrial est double brin et circulaire, et code principalement pour des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase, ainsi que pour des ARN ribosomiques et de transfert. Créé sur Biorender.com

Complexe chaîne Resp.	Sous-unités codées par ADNmt
Complexe I	7/40
Complexe II	0/4
Complexe III	1/10
Complexe IV	3/9
ATP Synthase (CV)	2/14

Tableau 1. Proportion des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase codées par le génome mitochondrial. Le génome mitochondrial code pour une proportion relativement faible de ces sous-unités. Les autres sous-unités, ainsi que les 1000 à 1500 protéines intervenant dans les mitochondries, sont codées par le génome nucléaire.

B. Contrôle de la biogénèse mitochondriale par Pgc-1 α

Du point de vue transcriptionnel, le co-activateur Pgc-1 α (Peroxisome proliferator activated receptor Gamma Coactivator-1) est considéré comme l'un des régulateurs majeurs de la biogénèse mitochondriale (Kummer and Ban, 2021). Cette protéine stimule la transcription de gènes cibles en formant des complexes avec des facteurs de transcription spécifiques et des enzymes remodelant la chromatine comme les histones acétyl-transférases (Puigserver *et al.*, 1999; Lin, Handschin and Spiegelman, 2005). De plus, la présence de ces complexes empêche la fixation de répresseurs transcriptionnels (Guan *et al.*, 2005).

En interagissant entre autres avec les facteurs de transcription Ppar α , Ppar γ , Nrf1 et Err α/γ , Pgc-1 α stimule l'expression de gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire, des gènes associés à la réplication et à la transcription de l'ADN mitochondrial, à la régulation de la traduction mitochondriale, ainsi que des gènes impliqués dans le cycle de Krebs et la β -oxydation des acides gras (Figure 9) (Di *et al.*, 2018; Kummer and Ban, 2021).

Pgc-1 α est une protéine dont la demi-vie est relativement courte (2-3h) et qui est dégradée par le protéasome après ubiquitylation (Sano *et al.*, 2007; Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011; Trausch-Azar *et al.*, 2015). Sa stabilité, ainsi que sa fonction de co-activateur sont augmentées par sa phosphorylation par la p38MAPK ou par l'AMPK, ou par sa dé-acétylation par Sirt1 (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011). Ces voies en amont peuvent s'activer en réponse à des stress énergétiques : l'AMPK est active en présence d'un ratio AMP/ATP élevé

et participe à la stimulation de la biogénèse mitochondriale via Pgc-1 α lorsque les niveaux d'ATP intracellulaires sont faibles (Hardie, 2007). D'une manière analogue, le ratio NADH/NAD⁺ contrôle l'activité de Sirt1, qui utilise le NAD⁺ comme substrat et est inhibée par sa forme réduite NADH. Ainsi, en cas d'altération de l'activité métabolique entraînant une diminution de la réduction du NAD⁺ en NADH, ou une altération de la voie de biosynthèse de NAD⁺, l'activité de Sirt1 est augmentée et peut permettre la stabilisation de Pgc-1 α . Cette boucle de régulation permet donc de stimuler la biogénèse mitochondriale et l'expression des enzymes associées au métabolisme oxydatif dans des cas où la demande en coenzymes réduits dépasse la capacité de réduction des coenzymes oxydés. (Rodgers *et al.*, 2005; Cantó *et al.*, 2009a). Pgc-1 α se trouve donc à la confluence de plusieurs voies régulant le métabolisme énergétique et intègre différents signaux pour permettre à la cellule d'adapter sa masse mitochondriale en fonction de ses besoins en ATP ou de la disponibilité des substrats (Puigserver *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2004; Jäger *et al.*, 2007).

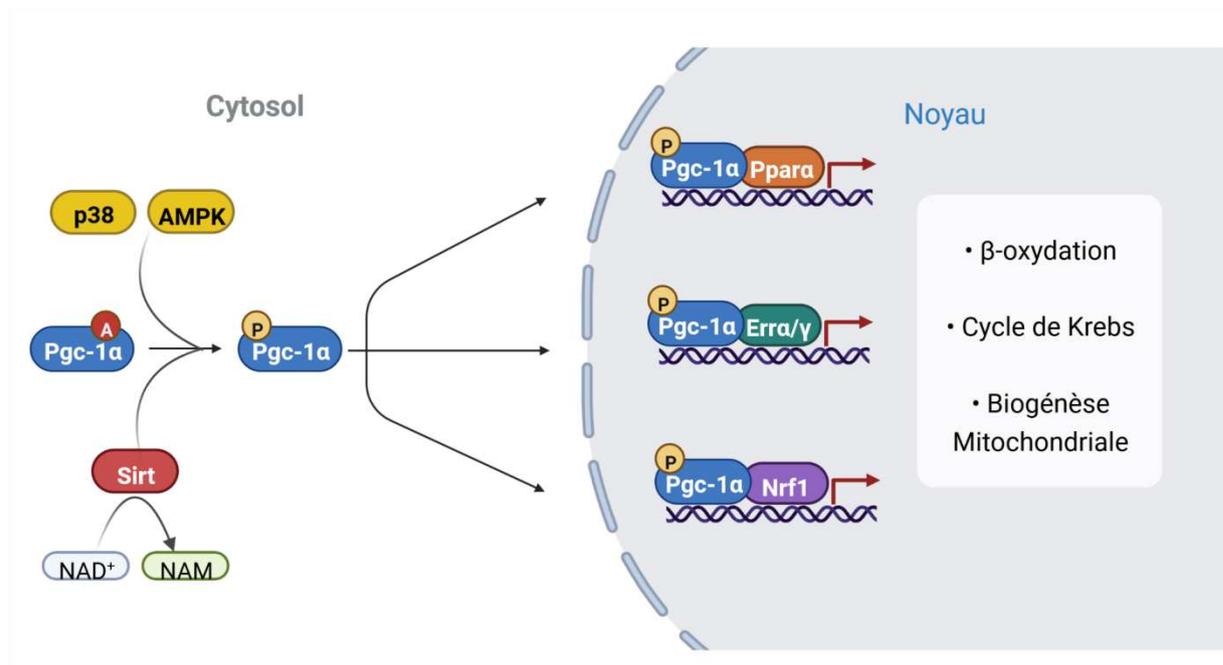


Figure 9. Régulation et partenaires de Pgc-1 α . Régulation de l'activité de Pgc-1 α , et de l'affinité pour ses partenaires par p38MAPK, AMPK et les sirtuines. La formation de complexes avec des facteurs de transcription comme les Ppar, les Err ou NRF1 stimule l'expression de leurs gènes cibles, notamment les gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale et la β -oxydation. (NAM = Nicotinamide). Créé sur Biorender.com

C. Fusion, fission et dégradation

Les mitochondries s'organisent en un réseau dynamique pouvant prendre différentes formes, depuis des organelles très individualisées et arrondies jusqu'à des réseaux denses et filamenteux. Ce réseau est régulé par la biogénèse mitochondriale ainsi que par des processus de fission et de fusion (Figure 10).

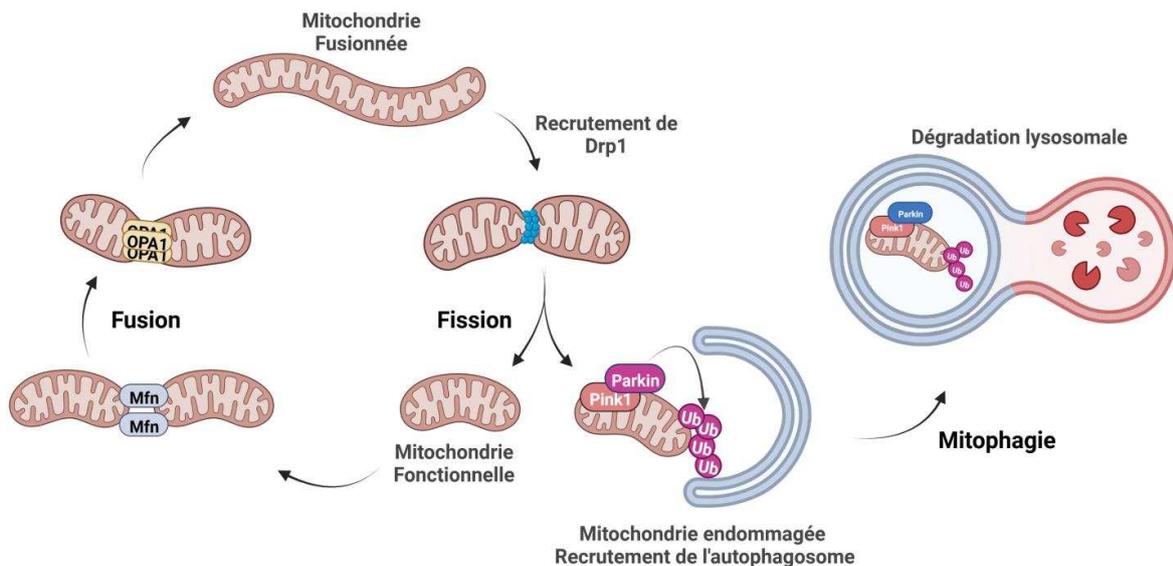


Figure 10. Dynamique de la fusion, la fission mitochondriale et de la mitophagie. Mfn1/2 et Opa1 assurent la fusion des membranes mitochondriales, tandis que le recrutement de Drp1 permet la fission et la discrimination des composants endommagés. La dégradation de ces derniers est assurée par Pink1 qui recrute Parkin, entraînant ainsi l'ubiquitinylation et le recrutement de l'autophagosome. Créé sur Biorender.com.

La fission permet de maintenir l'homéostasie mitochondriale en évacuant le contenu endommagé et en permettant le recyclage via le processus de mitophagie (Youle and van der Bliek, 2012). Ainsi, un réseau mitochondrial fragmenté est souvent associé à une faible capacité oxydative ou à une pathologie (Parra *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2019). Drp1 est une protéine cytosolique qui orchestre la fission en étant recrutée à la membrane externe de la mitochondrie et en entraînant sa séparation en deux «mitochondries filles». La kinase mitochondriale Pink1 prend ensuite le relais en s'accumulant dans les mitochondries dysfonctionnelles. Elle recrute Parkin qui provoque l'ubiquitinylation à la membrane externe des mitochondries, leur séquestration dans des autophagosomes, puis leur dégradation lysosomale (Figure 10) (Meyer, Leuthner and Luz, 2017).

La fusion est quant à elle associée à une forte demande en énergie. Les régulateurs de ce processus sont les protéines Mfn1/2, ou mitofusines. Localisées à la membrane externe, elles coordonnent la fusion des membranes externes en interagissant avec leurs homologues sur la membrane d'une autre mitochondrie. La protéine Opa1, située sur la membrane interne, est requise pour organiser la fusion des membranes internes et le remodelage des crêtes (Figure 10) (Youle and van der Bliek, 2012).

Dans les cardiomyocytes, la dynamique fusion/fission régule la disposition du réseau mitochondrial entre les myofibrilles. Cette disposition assure une transmission rapide de l'ATP des mitochondries vers les sarcomères, et permet leur contraction (Wai *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2020).

II. Métabolisme cardiaque : substrats et principales voies

Le but principal du métabolisme énergétique est la synthèse d'ATP. Comme expliqué précédemment, la majeure partie de l'ATP produit dans le cœur provient de la phosphorylation oxydative effectuée par la chaîne respiratoire. La phosphorylation oxydative est un ensemble de réactions enzymatiques nécessitant l'oxydation des coenzymes réduits NADH et FADH₂. Pour reformer ces molécules, la cellule catabolise les acides gras via la β -oxydation, le glucose via la glycolyse, le lactate ou les acides aminés pour réduire les coenzymes oxydés et produire des intermédiaires du cycle de Krebs (acétyl-CoA, succinyl-CoA, ou α -cétoglutarate). Le fonctionnement du cycle de Krebs permet ensuite la réduction de molécules supplémentaires de NAD⁺ et de FADH en NADH et FADH₂ respectivement.

A. Métabolisme des acides gras

1. Transport des acides gras de la circulation vers la mitochondrie

Les acides gras sont des acides carboxyliques (-COOH) possédant une chaîne aliphatique dont le nombre de carbones varie de 4 à 36. Leur oxydation représente 70 à 90% de l'ATP généré pour assurer la fonction cardiaque chez les mammifères adultes (Lopaschuk *et al.*, 2010). Les acides gras provenant de la nutrition étant estérifiés avec du glycérol, l'activité

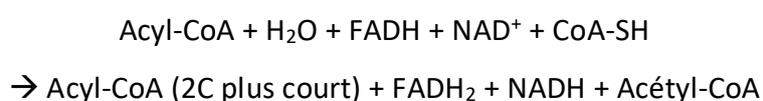
des lipases est nécessaire pour permettre leur capture par les cellules via les protéines membranaires FAT (Fatty Acid Translocase) et H-FABP (Heart-Fatty Acid Binding Protein ou Fabp3) (Werner, Doenst and Schwarzer, 2016). Une fois dans la cellule, ils sont estérifiés en Acyl-Coenzyme A (Acyl-CoA) par la thiokinase.

Tandis qu'une partie des Acyl-CoA formés sont ensuite stockés sous forme de trycglycérides (10 à 30%), la majorité sont importés dans la matrice mitochondriale pour y être oxydés via la β -oxydation (70 à 90%) (Lopaschuk *et al.*, 1994). Les membranes n'étant pas perméables aux Acyl-CoA, cet import est assuré par le système des carnitines palmitoyltransférases (CPTs). CPTI/Cpt1a (Homme/souris) est localisée sur la membrane externe mitochondriale et catalyse, en présence de carnitine, l'étape limitante de conversion des Acyl-CoA en acyl-carnitine. Les molécules d'acyl-carnitine traversent ainsi la membrane externe et sont ensuite échangées contre des molécules de carnitines matricielles par les carnitine acyl-carnitines translocases, qui sont situées sur la membrane interne. Une fois dans la matrice, les molécules d'acyl-carnitine sont converties de nouveau en Acyl-CoA par CPTII/Cpt1b, et pourront intégrer le processus de β -oxydation (Qu *et al.*, 2016).

2. La β -oxydation

L'entrée des acides gras dans la mitochondrie par les Cpt est considérée comme une des étapes limitantes de leur oxydation. L'expression de ces enzymes est régulée par le complexe Pgc-1 α /Ppara (Finck and Kelly, 2002). Leur activité est inhibée par le malonyl-CoA qui est converti à partir d'acétyl-CoA par l'Acétyl-CoA Carboxylase (Acc). Ainsi, dans des conditions où l'oxydation du pyruvate ou du lactate en acétyl-CoA augmente, la β -oxydation est réprimée (Depre, Vanoverschelde and Taegtmeyer, 1999; Karwi *et al.*, 2020).

La β -oxydation consiste en la dissociation de 2 carbones de la chaîne aliphatique de l'acyl-CoA, permettant la réduction de NAD⁺ et FADH en NADH et FADH₂, ainsi que la formation d'un acétyl-CoA pouvant entrer dans le cycle de Krebs (Figure 11). Elle peut être simplifiée ainsi :



Cette réaction est réitérée jusqu'à ce que toutes les paires de carbones soient converties en acétyl-CoA. Ainsi, plus l'acide gras initial est long, plus le nombre de coenzymes réduits et de molécules d'acétyl-CoA produit augmente. Les acides gras utilisés par le cœur sont pour la plupart formés de nombres pairs de carbones. Néanmoins, pour ceux qui ont des nombres impairs, les cycles de β -oxydation continuent jusqu'à la formation de propionyl-CoA, acyl-CoA à 3 carbones qui intègre le cycle de Krebs sous forme de succinyl-CoA (Werner, Doenst and Schwarzer, 2016).

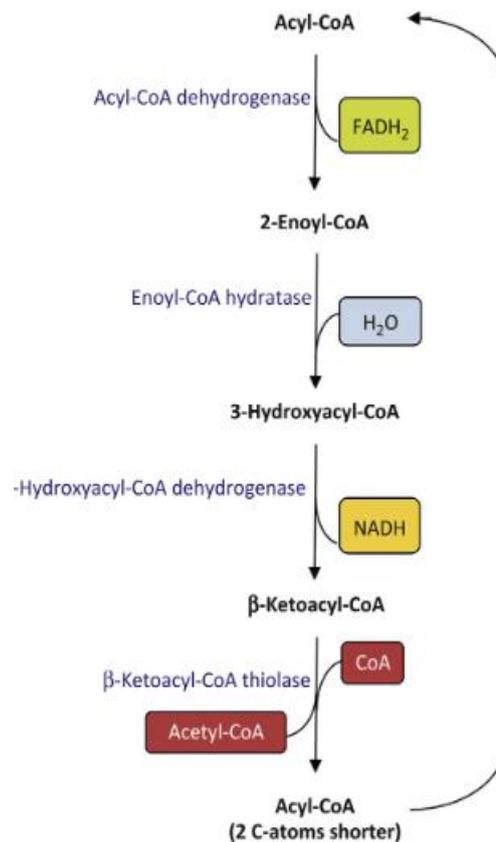


Figure 11. Intermédiaires et enzymes impliqués dans un cycle de β -oxydation. D'après (Werner, Doenst and Schwarzer, 2016)

B. Métabolisme du glucose

1. Prise en charge du glucose

Le glucose est un hexose, c'est-à-dire un ose à 6 carbones. Sa dégradation par la glycolyse et l'oxydation contribue pour 10 à 30% de la production d'ATP du cœur adulte (Amaral and Okonko, 2015).

L'entrée du glucose depuis la circulation vers les cardiomyocytes se fait via les récepteurs Glut localisés à la membrane plasmique. Au sein de cette famille, Glut1 et Glut4 sont les membres les plus exprimés dans le myocarde. Tandis que Glut1 est exprimé au cours du développement, Glut4 est majoritairement exprimé chez l'adulte. Il est le plus efficace des deux récepteurs mais il est insulino-dépendant et n'est transloqué à la membrane plasmique qu'en présence d'insuline (Bryant, Govers and James, 2002; Navale and Paranjape, 2016).

Une fois dans la cellule, le glucose est converti en glucose-6-phosphate par l'hexokinase, dont l'isoforme Hk2 est prédominante chez l'adulte (Postic *et al.*, 1994). C'est sous cette forme qu'il peut être dégradé en pyruvate via la glycolyse, être converti en ribulose par la voie des pentoses, ou stocké sous forme de glycogène (Werner, Doenst and Schwarzer, 2016).

2. Glycolyse

La glycolyse met en jeu plusieurs enzymes qui, en convertissant une molécule de glucose-6-phosphate en 2 molécules de pyruvate, permettent la formation de 2 molécules d'ATP et de NADH (Figure 12). Certaines de ces réactions subissent un rétrocontrôle limitant la glycolyse lorsque qu'elle n'est pas nécessaire. Ainsi, la phosphofructokinase (Pfk) qui convertit le fructose-6-phosphosphate en fructose-1,6-phosphate est inhibée par le citrate et l'ATP formés par le cycle de Krebs et l'OXPPOS (Griffin *et al.*, 2016). La poursuite de la glycolyse requiert la ré-oxydation du NADH en NAD⁺, ce dernier étant le co-facteur de la GAPDH (Figure 12).

En conditions aérobies, cette ré-oxydation est réalisée par la chaîne respiratoire. Néanmoins, la membrane externe de la mitochondrie étant imperméable au NAD(H), un transport actif du cytosol à la matrice est nécessaire pour, d'une part, garantir un ratio NAD⁺/NADH cytosolique favorable à l'activité GAPDH et donc à l'activité glycolytique, d'autre part, pour transférer l'énergie chimique (sous forme d'électrons) du NADH produit dans le cytosol à la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce transport actif d'électrons est assuré par des navettes, dont la plus active au niveau cardiaque est la navette malate-aspartate (M-A) (Lu *et al.*, 2008). Via un cycle de transamination, de transport et de réaction d'oxydo-réduction, cette navette transfère les électrons du NADH cytosolique dans la matrice mitochondriale. L'un des éléments de cette navette, l'échangeur malate/ α -cétoglutarate (OGC), qui catalyse l'échange de malate cytosolique contre de l' α -cétoglutarate mitochondrial, est contrôlé par

les gradients de concentration entre malate et α -cétoglutarate dans les différents compartiments et est par conséquent bi-directionnel. Or, la conversion de malate matriciel

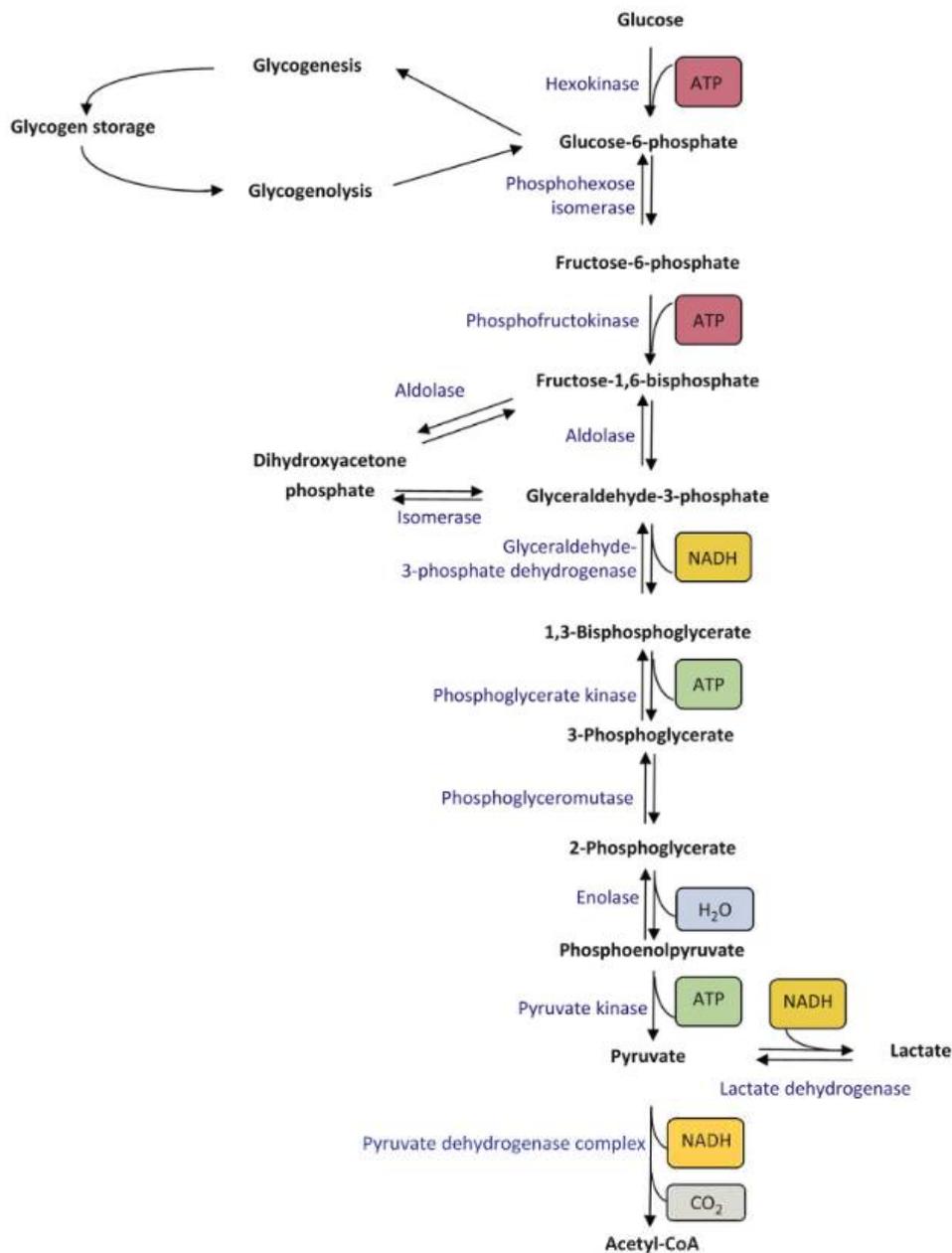


Figure 12. Intermédiaires et enzymes impliqués dans la dégradation d'une molécule de glucose en 2 molécules de pyruvate au cours de la glycolyse. La GAPDH requiert le NAD^+ pour fonctionner. Ainsi, en conditions anaérobies, le pyruvate est converti en lactate et permet la ré-oxydation du NADH en NAD^+ et la poursuite de la glycolyse. En conditions aérobies, le NADH est ré-oxydé par la chaîne respiratoire, et le pyruvate est préférentiellement converti par la PDH en acétyl-coA pour intégrer le cycle de Krebs, dont le rendement en ATP est plus important. *D'après (Werner, Doenst and Schwarzer, 2016).*

en α -cétoglutarate requiert une molécule de NAD^+ . Ainsi, dans des conditions hypoxiques, où l'activité de la chaîne respiratoire diminue, le défaut de réoxydation du NADH en NAD^+ inhibe l'activité de conversion de malate en α -cétoglutarate l'activité de transport de NADH

du cytosol à la mitochondrie effectué par la navette M-A (Lu *et al.*, 2008). En conditions anaérobies, la réoxydation du NADH est assurée, dans le cytosol, par la fermentation lactique.

Par conséquent, le devenir du pyruvate dépend du taux d'oxygène dont dispose la cellule, de ses besoins énergétiques, ainsi que de l'équipement enzymatique dont elle dispose pour oxyder le NADH. Dans les cardiomyocytes en conditions d'homéostasie, le pyruvate est majoritairement utilisé par le cycle de Krebs (Werner, Doenst and Schwarzer, 2016). Son transport dans la mitochondrie est catalysé par les mitochondrial pyruvate carriers (MPC), tandis que son entrée dans le cycle de Krebs est régulée par les besoins de la cellule, et donc principalement par la disponibilité des acides gras.

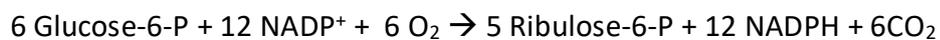
Pour entrer dans le cycle de Krebs, le pyruvate doit être décarboxylé en une molécule d'acétyl-CoA par le complexe Pyruvate Déshydrogénase (PDH). L'activité de ce complexe, qui permet aussi la réduction d'une molécule de NADH, peut être inhibée par phosphorylation par les Pyruvate Déshydrogénase Kinases (Pdk). Pdk4, la représentante majoritaire de cette famille dans le cœur adulte, inactive le complexe Pdh lorsque la cellule possède de grandes quantités d'ATP, de NADH, d'acides gras libres ou d'acétyl-CoA (Cardoso *et al.*, 2020). Ainsi, lorsque la β -oxydation des acides gras est active, le flux glycolytique et l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs sont inhibés au niveau de la Pfk et de la Pdh. Cette interaction entre oxydation des acides gras et du glucose est appelée Cycle de Randle (Griffin *et al.*, 2016).

Bien que dans les cardiomyocytes le pyruvate soit majoritairement utilisé par le cycle de Krebs (Werner, Doenst and Schwarzer, 2016), il peut aussi être converti en lactate par la fermentation lactique. Cette réaction, qui se produit en conditions anaérobies, est catalysée par la Ldh et requiert 2 molécules de NADH. Elle permet, en ré-oxydant le NADH en NAD⁺, la poursuite de l'activité de la GAPDH, et donc de la glycolyse (Figure 12).

Enfin, le pyruvate participe à l'anaplérose et au maintien de l'équilibre des métabolites du cycle de Krebs. Lorsque les niveaux d'acétyl-CoA sont élevés, il peut être carboxylé par la pyruvate carboxylase pour maintenir les niveaux d'oxaloacétate ou de malate et assurer le fonctionnement du cycle de Krebs (Werner, Doenst and Schwarzer, 2016).

3. Voie des pentoses

Une alternative à la dégradation du glucose par la glycolyse est la voie des pentoses qui convertit le glucose-6-phosphate en ribulose-5-phosphate en produisant du NADPH et du CO₂. Le ribulose-5-phosphate est ensuite converti en ribose qui intervient dans la prolifération via la synthèse de nucléotides et d'acides nucléiques. Il peut également entrer à nouveau dans la glycolyse en étant converti en fructose-6-phosphate. Le NADPH, quant à lui, participe à la synthèse d'acides gras et à la régénération des systèmes antioxydants (Kloska *et al.*, 2022).



4. Métabolisme du lactate

Le cœur est un importateur de lactate qui compte pour environ 15% de sa synthèse d'ATP. Le lactate, qui ne provient que très peu d'une conversion interne à partir de glucose, est un substrat de choix pour les cardiomyocytes pendant l'exercice. Il est en effet produit par le métabolisme anaérobie du muscle squelettique, et ses niveaux dans la circulation augmentent pendant l'effort. La demande énergétique et la disponibilité du lactate augmentant au niveau cardiaque, il peut être importé et oxydé par la lactate deshydrogénase (Ldh) pour former du NADH et du pyruvate qui peut intégrer le cycle de Krebs. L'expression spécifique de l'isoforme Ldh1 dans le cœur participe à ce mécanisme en favorisant la conversion du lactate en pyruvate plutôt que la réaction inverse. En conditions aérobies, le cœur est ainsi un importateur net de lactate, c'est-à-dire qu'il oxyde plus de lactate qu'il n'en produit (Van Hall, 2000; Lopaschuk, 2017; Fulghum and Hill, 2018).

C. Le cycle de Krebs, hub du métabolisme oxydatif et de l'anabolisme

1. Oxydation de l'acétyl-CoA et formation de coenzymes réduits

Le cycle de Krebs, ou cycle de l'acide citrique (TCA), se produit dans la matrice mitochondriale et est au centre du métabolisme énergétique. Il forme un nœud reliant les produits d'oxydation des acides gras, des glucides et des acides aminés. Les enzymes du

cycle de Krebs catabolisent l'acétyl-CoA en deux molécules de CO₂ tout en réduisant 3 molécules de NAD⁺ et une molécule de FADH en 3NADH et 1FADH₂, molécules qui fournissent électrons et protons à la chaîne respiratoire (Figure 13). Le cycle de Krebs a donc une fonction capitale dans le métabolisme oxydatif et la production d'ATP (Werner, Doenst and Schwarzer, 2016; Martínez-Reyes and Chandel, 2020).

L'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs via une réaction avec l'oxaloacétate catalysée par la citrate synthase (Figure 13). Après un tour de cycle, l'acétyl-CoA est complètement catabolisé en CO₂, et un oxaloacétate est libéré. Il peut réagir avec une nouvelle molécule d'acétyl-coA pour effectuer un nouveau cycle (Werner, Doenst and Schwarzer, 2016).

Le cycle de Krebs étant un pivot du métabolisme énergétique, il est régulé par les besoins énergétiques de la cellule, c'est-à-dire les quantités d'ATP, d'acétyl-coA et de NADH (Martínez-Reyes and Chandel, 2020). Cette régulation s'exerce :

- en amont, par le contrôle de l'activité du complexe PDH qui régule le flux d'entrée de l'acétyl coA d'origine glucidique.
- en interne, par le contrôle des trois réactions irréversibles catalysées par la citrate synthase, l'isocitrate déshydrogénase, et l' α KG déshydrogénase, qui sont notamment inhibées par leur(s) produits(s), comme le NADH ou l'ATP (Alabduladhem and Bordoni, 2021).
- L'activité des enzymes et complexes enzymatiques PDH, isocitrate déshydrogénase et α -cétoglutarate déshydrogénase (Figure 13) peuvent également être stimulées par la présence d'ions calcium (Ca²⁺) (Williams, Boyman and Lederer, 2015). De plus, dans le cœur, en cas d'élévation du rythme cardiaque, les niveaux d'ions Ca²⁺ dans la matrice mitochondriale augmentent (Boyman *et al.*, 2014). Ainsi, en cas d'augmentation de la demande en énergie, l'internalisation du calcium peut stimuler l'activité du cycle de Krebs, permettant ainsi à la synthèse d'ATP de s'adapter à l'augmentation de la demande énergétique.

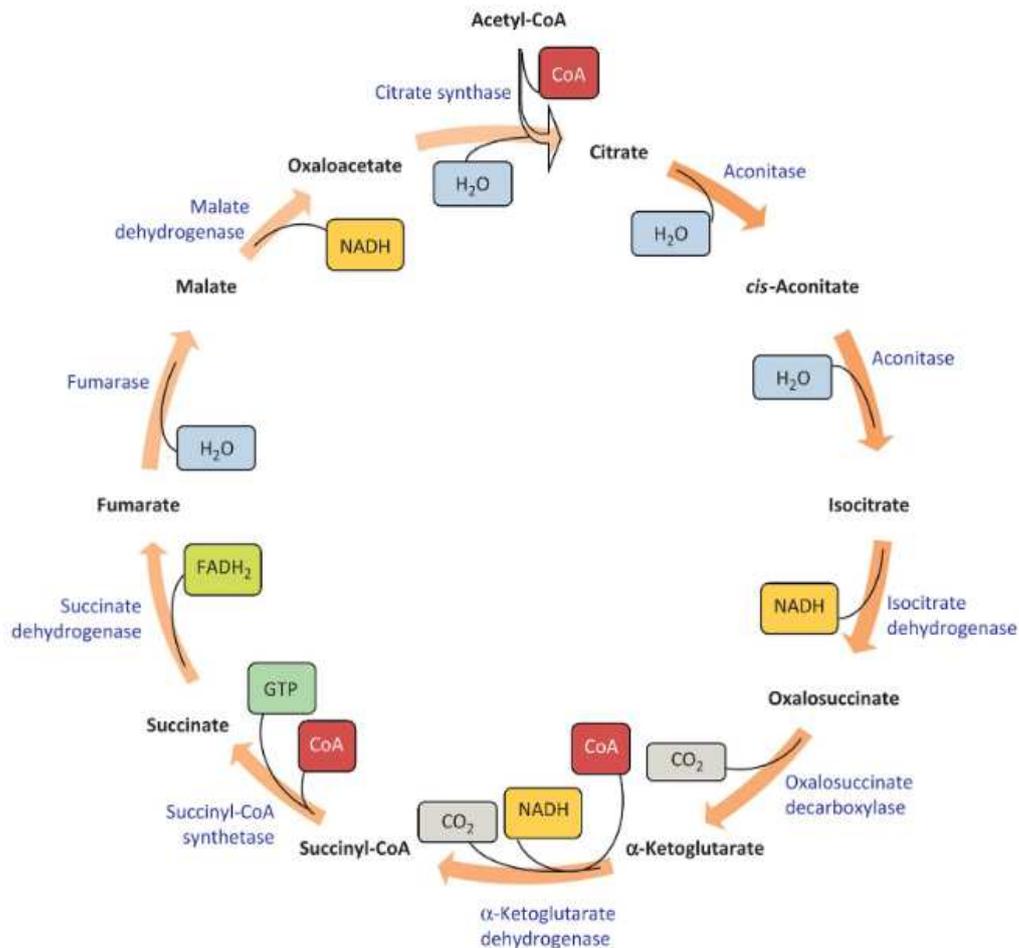


Figure 13. Intermédiaires métaboliques et enzymes impliqués dans le cycle de Krebs.
 D'après (Werner, Doenst and Schwarzer, 2016).

2. Synthèse de molécules et reformation des intermédiaires

En parallèle de sa fonction d'oxydation des substrats, le cycle de Krebs et ses intermédiaires sont impliqués dans l'anabolisme et la synthèse de biomolécules nécessaires au fonctionnement de la cellule. Pour en citer quelques exemples, l' α -cétoglutarate est nécessaire à la biosynthèse d'acides aminés non-essentiels, le citrate participe à la synthèse de lipides (Martínez-Reyes and Chandel, 2020) et l'aspartate formé à partir d'oxaloacétate, soutient la prolifération en participant à la synthèse d'acides nucléiques (Birsoy *et al.*, 2015; Alkan *et al.*, 2018; Alkan and Bogner-Strauss, 2019). L'ensemble des processus impliquant la sortie d'intermédiaires du cycle de Krebs, empêchant leur accumulation dans la matrice mitochondriale et permettant l'anabolisme est appelée cataplérose (Owen, Kalhan and Hanson, 2002).

Les intermédiaires du cycle de Krebs formés dans la mitochondrie sont ainsi constamment échangés avec le cytosol. Pour conserver la flexibilité de la cellule entre production d'ATP et synthèse de molécules, l'équilibre des concentrations des intermédiaires doit être maintenu. Les intermédiaires sont reformés via un ensemble de processus appelés anaplérose. Dans le cœur, ces voies anaplérotiques sont critiques : en effet, en cas de défaillance de ces voies, le cycle de Krebs et la production d'ATP sont altérés, provoquant des dysfonctions contractiles (Owen, Kalhan and Hanson, 2002; Doenst, Nguyen and Abel, 2013).

D. Métabolisme des acides aminés

Les acides aminés, parmi lesquels la glutamine est le plus abondant dans la circulation, ont un rôle mineur dans la production d'ATP cardiaque (moins de 5%). En conditions physiologiques, la glutamine est majoritairement utilisée par le cœur pour la synthèse de protéines et de précurseurs de lipides ou pour la signalisation (Lauzier *et al.*, 2013; Altman, Stine and Dang, 2016, Fulghum and Hill, 2018). Néanmoins, dans des cardiomyocytes de rats néonataux subissant un stress oxydant, la glutamine peut participer à l'anaplérose du cycle de Krebs et au maintien de la synthèse d'ATP par la glutaminolyse, ainsi qu'à la synthèse de GSH pour la défense antioxydante (Watanabe *et al.*, 2021). La glutamine est hydrolysée en glutamate par la glutaminase. Le glutamate alimente ensuite le cycle de Krebs une fois converti en α -cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase (Figure 14) (Altman, Stine and Dang, 2016).

Le glutamate peut aussi être métabolisé en acide γ -aminobutyrique (GABA) par l'enzyme Gad (Glutamic Acid Decarboxylase). Le GABA subit ensuite une réaction de transamination et intègre le cycle de Krebs sous forme de succinate (Figure 14). Ce processus est appelé GABA shunt (Yogeeswari, Sriram and Vaigundaragavendran, 2005). Enfin, le malate issu de l'entrée de la glutamine dans le cycle de Krebs peut également permettre la production de NADPH et de pyruvate par l'enzyme malique (Yang *et al.*, 2014).

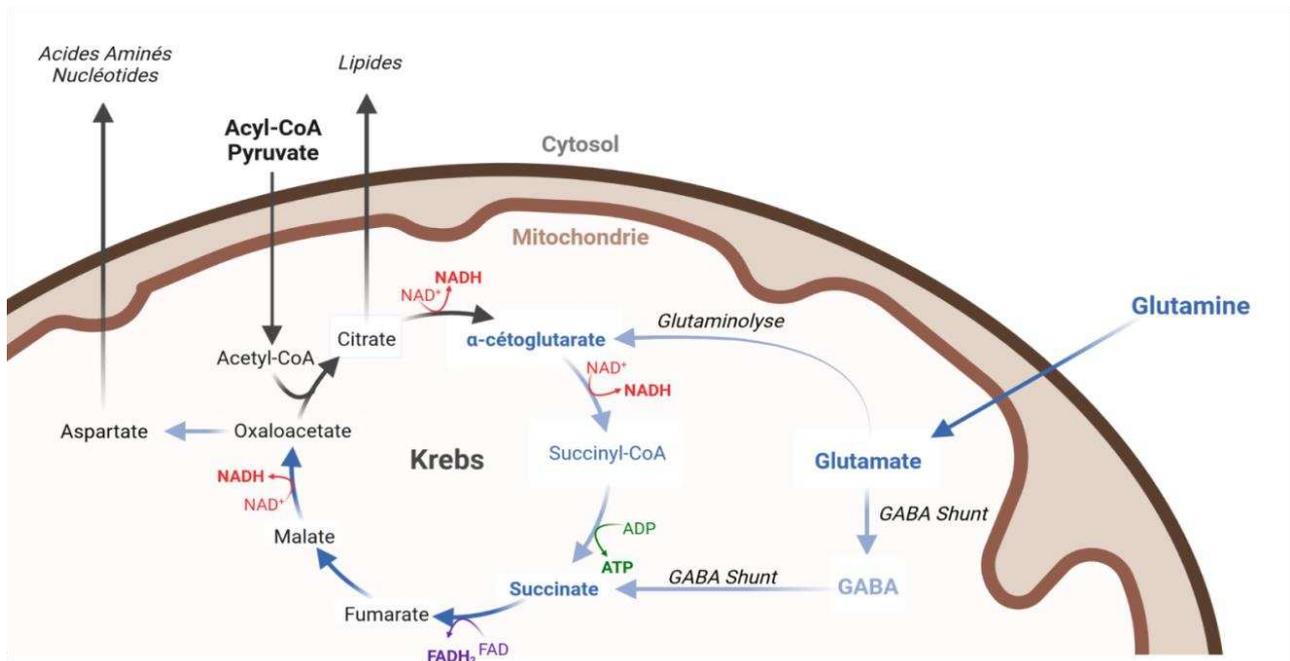


Figure 14. Participation de la glutamine aux processus anaplerotiques. L'export d'intermédiaires du cycle de Krebs participe à la synthèse de nucléotides, d'acides aminés ou de lipides dans le cytosol. Pour reformer les intermédiaires et assurer le fonctionnement du cycle, la glutamine peut intégrer le cycle de Krebs sous forme d' α -cétoglutarate (glutaminolyse classique) ou de succinate (GABA shunt) et ainsi assurer le fonctionnement du cycle de Krebs. *Crée sur Biorender.com*

E. Acides gras et glucose, deux substrats complémentaires du cœur adulte

Le cœur est considéré comme un organe « omnivore » dans la mesure où il est capable d'oxyder des substrats de natures différentes, en particulier les acides gras et le glucose (Figure 15). En conditions d'homéostasie, il possède une grande flexibilité métabolique et est capable de modifier l'utilisation de ces deux substrats selon leur disponibilité (Griffin *et al.*, 2016).

Etape du métabolisme	ATP	Composés réduits		Rendement en ATP après OXPHOS
		NADH	FADH ₂	
Glycolyse et Krebs	4	10	2	34,2
β -oxydation et Krebs	2	11	5	39,7

Tableau 2. Comparaison des rendements en coenzymes réduits et en ATP de la dégradation du glucose et de l'acide hexanoïque. Les valeurs utilisées pour calculer les rendements de l'OXPHOS sont NADH = 2.7 ATP, FADH₂ = 1.6 ATP.

Le tableau 2 présente la comparaison des rendements fournis par l'oxydation d'une molécule de glucose ou d'un acide gras. Par soucis de pertinence, c'est l'oxydation de l'acide héxanoïque qui, comme le glucose, contient 6 carbones, qui sert ici d'exemple. Néanmoins, le cœur utilise principalement des acides gras à longue chaîne, qui ont un rendement en ATP par molécule oxydée bien plus important. Dans des conditions où l'oxygène n'est pas limitant, le rendement en ATP par carbone de la β -oxydation est plus élevé que celui de l'oxydation du glucose. L'utilisation des acides gras confère donc un avantage énergétique par rapport au glucose. (Lopaschuk *et al.*, 2010).

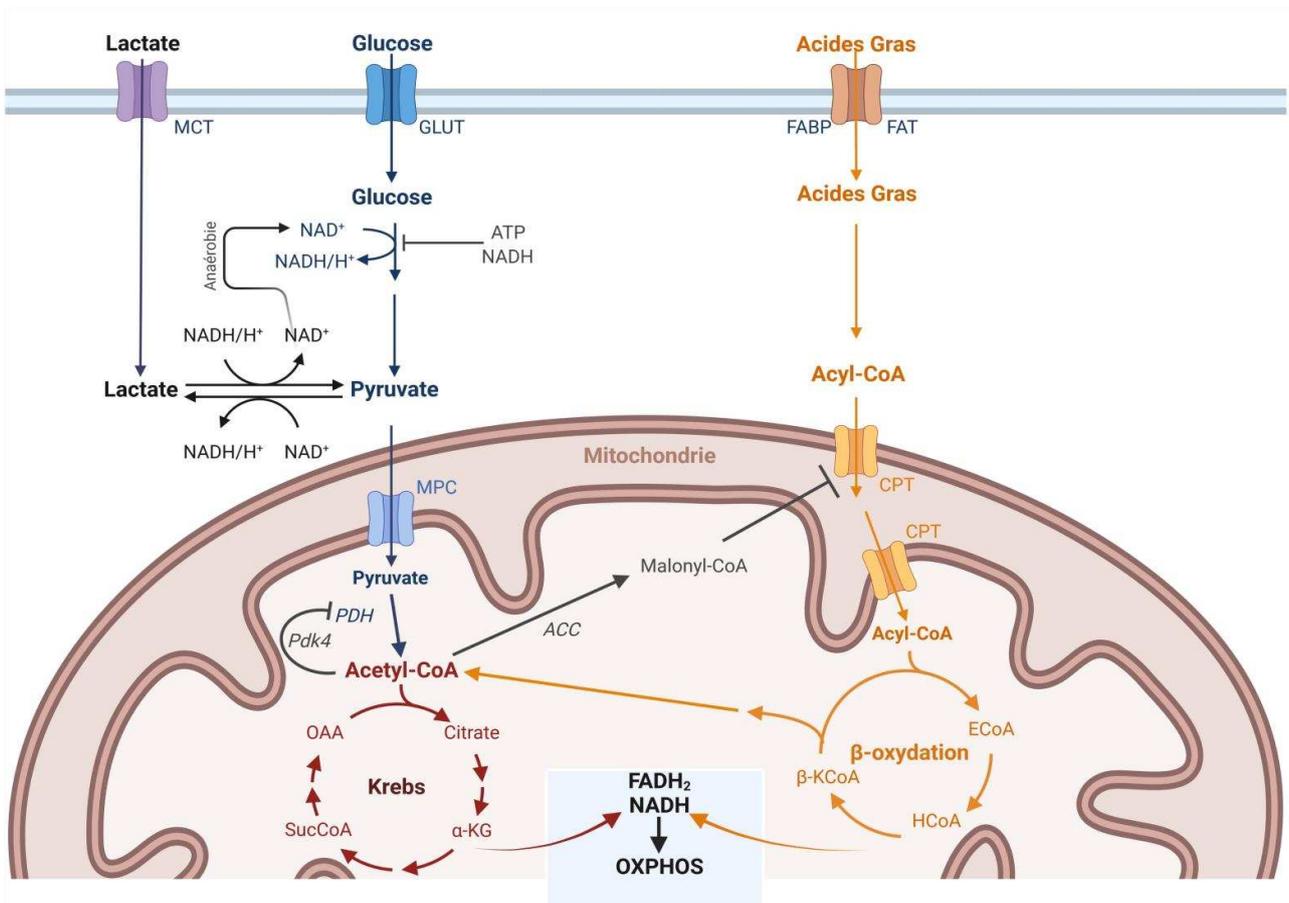


Figure 15. Le cœur, un organe « omnivore » : interactions entre métabolisme du glucose et des acides gras. Le cœur peut importer du lactate pour le convertir en pyruvate ou, en conditions anaérobies, convertir le pyruvate issu du glucose en lactate pour maintenir le flux glycolytique via la Gapdh NAD⁺-dépendante. L'acétyl-coA issu du pyruvate active l'Acc qui inhibe l'entrée de l'acyl-coA dans la matrice via les Cpt. Alternativement, l'ATP et le NADH produits par l'oxydation des acides gras inhibent le flux glycolytique au niveau de la Pfk et de la Gapdh et l'oxydation du pyruvate en activant Pdk4. Créé sur Biorender.com

Cependant, à la différence du glucose, les acides gras ne peuvent être utilisés pour la production d'ATP qu'en conditions aérobies. De plus, les acides gras sont dans état

relativement réduit en comparaison du glucose. En conséquence, l'oxydation des acides gras requiert plus de molécules d'oxygène par molécules d'ATP produites. Ainsi, bien qu'en conditions où l'oxygène n'est pas limitant, l'oxydation des acides gras permette une production plus importante d'ATP que celle du glucose, elle est également moins efficace du point de vue de la consommation (Lopaschuk *et al.*, 2010). Ainsi, bien que les acides gras représentent le substrat majoritaire du cœur adulte, la part de la production d'ATP issue de l'activité glycolytique et de l'oxydation du pyruvate ou du lactate augmente dans des conditions hypoxiques comme le milieu intra-utérin, l'exercice ou l'ischémie (Lopaschuk and Stanley, 1997; Lopaschuk and Jaswal, 2010; Lopaschuk *et al.*, 2010). Ainsi, plusieurs systèmes inter-connectés régulent la participation relative de la glycolyse, de l'oxydation du pyruvate et des acides gras à la production d'ATP. Pdk4 inhibe la conversion du pyruvate en acétyl-coA, tandis que Acc inhibe l'entrée des acyl-coA dans la matrice mitochondriale (Figure 15) (Cardoso *et al.*, 2020; Ritterhoff *et al.*, 2020a).

F. Chaîne respiratoire mitochondriale et production d'ATP

L'énergie convertie pendant la dégradation des différents substrats, si elle n'est pas employée dans des réactions anaboliques, est transférée à la chaîne respiratoire, ou chaîne de transport des électrons (ETC). Celle-ci est composée de 4 complexes protéiques localisés dans la membrane interne de la mitochondrie : le complexe NADH ubiquinone réductase (Complexe I), le complexe succinate déshydrogénase (Complexe II), le(s) complexe(s) dimérique(s) cytochrome b et c oxydoréductase (Complexe III), le complexe cytochrome c oxydase (Complexe IV) ainsi que de 2 porteurs mobiles d'électrons, l'ubiquinone (membranaire) et le cytochrome c (soluble) (Niemann and Rohrbach, 2016). La chaîne respiratoire utilise l'énergie contenue dans les coenzymes réduits NADH et FADH₂ en les oxydant. Cette oxydation libère les électrons des coenzymes qui sont transférés de complexe en complexe par des réactions d'oxydo-réduction, et *in fine*, à l'O₂, accepteur final d'électrons, qui sera réduit en H₂O. L'énergie libérée par ces réactions d'oxydo-réduction assure le pompage de protons dans l'espace intermembranaire (Figure 16).

Seuls les complexes I, III et IV ont des activités de pompage de protons. Le complexe I pompe des protons provenant du NADH, transfère ses électrons à l'ubiquinone, participant à sa réduction. Le complexe II couple le cycle de Krebs et le transfert d'électrons : il catalyse la conversion du succinate en fumarate et utilise le FADH₂ formé pour réduire l'ubiquinone. Le complexe III ré-oxyde l'ubiquinone réduite par les complexes I et II. Chaque réaction de réduction pompe des protons dans l'espace intermembranaire et participe à la réduction du cytochrome c. Enfin, le complexe IV oxyde le cytochrome c en transférant 4 électrons par molécules d'O₂ en entraînant sa réduction en H₂O. Cette réaction libère 4 protons dans l'espace intermembranaire (Niemann and Rohrbach, 2016).

Le gradient de protons formé par l'activité des complexes I, III et IV est ensuite utilisé par l'ATP synthase qui phosphoryle l'ADP en présence de phosphate inorganique. Son fonctionnement est régulé par le potentiel de membrane ($\Delta\Psi$) établi grâce au gradient électrochimique entre l'espace intermembranaire et la matrice (Figure 16).

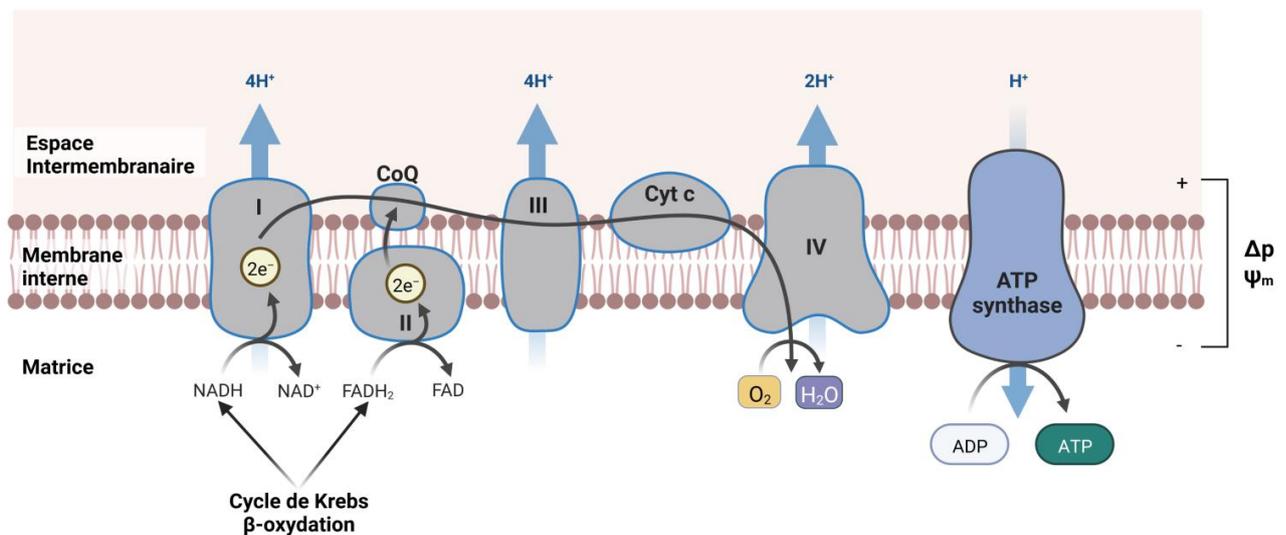


Figure 16. La chaîne respiratoire mitochondriale, siège de la production d'ATP cardiaque. L'oxydation des substrats par la β-oxydation et le cycle de Krebs permet la reformation des coenzymes réduits NADH et FADH₂. La chaîne respiratoire oxyde les coenzymes et en sépare les protons et les électrons. Les électrons sont transférés de complexe en complexe jusqu'au CIV qui réduit l'O₂, accepteur final d'électrons, en H₂O. L'énergie libérée permet le pompage de protons dans l'espace intermembranaire et permet la formation d'un gradient (Δp), qui assure l'existence du potentiel de membrane (Ψ_m) qui sert de force électrochimique pour faire fonctionner l'ATP synthase qui phosphoryle l'ADP en ATP. Créé sur Biorender.com

III. Signalisation redox

En plus du métabolisme énergétique, les mitochondries ont un rôle pivot dans la signalisation cellulaire. Elles régulent des processus variés tels que l'apoptose, la prolifération ou la différenciation d'un lignage (Zhang *et al.*, 2011; Chakrabarty and Chandel, 2021).

Cette signalisation se fait notamment via l'export d'intermédiaires du cycle de Krebs et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par la chaîne respiratoire. Les ROS sont des molécules dérivées de l'oxygène et sont formées par des réactions d'oxydoréduction ou par excitation électronique d'une molécule d'O₂. Ces espèces, en induisant des modifications réversibles ou non sur des macromolécules telles que les protéines, participent à ce que l'on appelle la « signalisation redox » (Sies and Jones, 2020; Santos, 2021).

A. Origine des espèces réactives de l'oxygène

La chaîne respiratoire fonctionne en effectuant des réactions d'oxydoréduction successives à partir des coenzymes réduits NADH et FADH₂. Les électrons sont transférés le long de la chaîne respiratoire jusqu'à l'O₂, accepteur final qui est réduit complètement en H₂O. Une proportion significative de l'O₂ (2% à 6%) échappe à cette réduction complète et subit une réduction mono ou bi-électronique au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire. Cette réduction incomplète donne naissance à deux espèces réactives de l'oxygène que sont l'anion superoxyde O₂⁻ et le peroxyde d'hydrogène, H₂O₂ (Figure 17) (Brand, 2016).

La mitochondrie n'est pas le seul site de production de ROS. Plus d'une quarantaine d'enzymes les produisant ont été identifiées dans les différents compartiments/organites cellulaires (Go, Chandler and Jones, 2015). La contribution de ces différentes sources, mitochondriale ou enzymatiques, dépend du contexte (stress, signal exogène) et de l'activité métabolique de la cellule (Sies and Jones, 2020).

Parmi les enzymes produisant le plus de ROS, figurent les NADPH oxydases (NOXs), protéines transmembranaires qui catalysent l'oxydation du NADPH par l'O₂, produisant ainsi du NADP⁺, de l'H⁺ et de l'O₂⁻ (Sies and Jones, 2020).

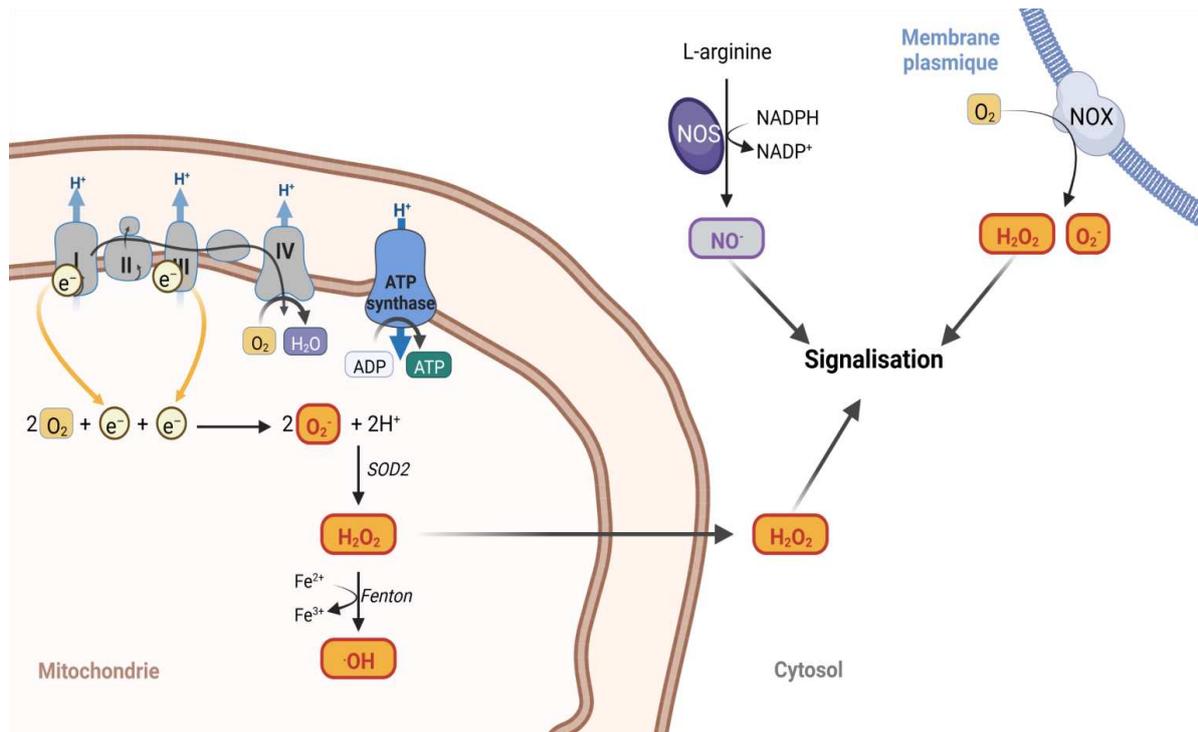


Figure 17. Les principaux sites de production des espèces réactives de l'oxygène. La chaîne respiratoire mitochondriale produit des espèces O_2^- qui sont rapidement converties en H_2O_2 . Les enzymes NOS et NOX produisent respectivement du NO^- et de l' H_2O_2 ou de l' O_2^- . Créé avec Biorender.com.

L'Electron Transfer Flavoprotein (ETF) et l'ETF-ubiquinone oxydoreductase (ETF-QO) sont deux enzymes qui participent aux cycles de la β -oxydation des acides gras en acheminant les électrons du $FADH_2$ aux quinones de la chaîne respiratoire. Lors de ce transfert, la fuite prématurée d'un (ou deux) électron(s) vers l' O_2 entraînent sa réduction incomplète en O_2^- ou en H_2O_2 (Seifert *et al.*, 2010). Ce processus permet d'expliquer pourquoi l'oxydation des acides gras entraîne une production de ROS plus importante que celle du glucose (Rosca *et al.*, 2012; Cortassa, Sollott and Aon, 2017).

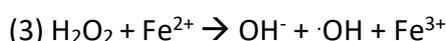
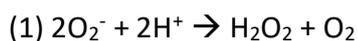
Enfin, les enzymes oxyde nitrique synthases (NOS) jouent un rôle non négligeable dans la signalisation redox en produisant de l'oxyde nitrique (NO) à partir d' O_2 , de NADPH (donneur d'électrons) et d'arginine (donneur d'azote).

B. Caractéristiques des différentes espèces réactives de l'oxygène

En raison de sa charge négative et de son instabilité, l'anion superoxyde O_2^- passe difficilement les membranes. Son rôle dans la signalisation cellulaire est donc restreint et dépend de son lieu de production et de sa conversion en d'autres espèces. Il est à l'origine du peroxy-nitrite ($ONOO^-/ONOOH$), formé par la réaction d'un O_2^- avec un oxyde nitrique (NO) (2), mais représente surtout une source importante d' H_2O_2 par dismutation (1) (Figure 17). (Barteseghi and Radi, 2018; Zhang *et al.*, 2019; Sies and Jones, 2020).

Contrairement à l'anion superoxyde, l' H_2O_2 est non chargé et peut traverser les membranes via les aquaporines pour diffuser loin de son site de production (Bertolotti *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019). Il est relativement stable et, à concentration physiologique, sa réactivité est restreinte à des résidus spécifiques sur certaines protéines : il réagit principalement avec les groupements thiols/thiolates des cystéines et, dans une moindre mesure, avec ceux des méthionines (Winterbourn, 2018). Ces deux propriétés en font un excellent messager secondaire et il est reconnu comme le ROS central de la signalisation redox (Sies and Jones, 2020).

Ses niveaux doivent néanmoins rester physiologiques car, lorsqu'il est présent en excès, il peut être converti en radical hydroxyle $\cdot OH$ par la réaction de Fenton (3) (Figure 17). Ce dernier est un des ROS les plus réactifs et présente une forte toxicité cellulaire en raison de sa capacité à oxyder de façon non-spécifique les lipides, protéines ou acides nucléiques. (Galaris, Barbouti and Pantopoulos, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Ainsi, la peroxydation des lipides par l' $\cdot OH$ entraîne la production de radicaux peroxy hautement réactifs comme le 4-HNE (Ayala, Muñoz and Argüelles, 2014).



Bien que d'autres espèces réactives puissent être générées (Annexe 1), l' H_2O_2 et le NO représentent les espèces les mieux caractérisées pour leur fonction de signalisation.

C. L'état redox résulte d'un équilibre production/dégradation

L'état redox désigne l'équilibre entre production et dégradation des ROS, c'est-à-dire entre les formes réduites et oxydées des composants de la cellule. En conditions physiologiques, la production de ROS est régulée et leurs niveaux sont contrôlés par un ensemble de systèmes anti-oxydants.

1. Les systèmes antioxydants non-enzymatiques

Parmi les systèmes non-enzymatiques, on compte plusieurs vitamines, qui ne sont pas synthétisables *de novo* par l'Homme et proviennent majoritairement de la nutrition (Samoylenko *et al.*, 2013). La vitamine E regroupe une famille de molécules liposolubles qui ont la capacité de réagir avec les ROS au sein des membranes, et donc de protéger les lipides de l'oxydation. L'antioxydant le plus efficace de cette famille est l' α -tocophérol, capable de réduire efficacement les lipides peroxydés (Samoylenko *et al.*, 2013). Sa forme oxydée, le radical α -tocophéroxyl, est ensuite réduite par la vitamine C, ou acide ascorbique, qui s'oxyde en radical ascorbyl (Buettner, 1993). L'acide ascorbique est aussi capable d'interagir et d'éliminer directement certains ROS tels que l' H_2O_2 ou l' $\cdot OH$ (Kaźmierczak-Barańska *et al.*, 2020).

Un système antioxydant central dans la gestion de l'équilibre redox de la cellule est le glutathion (GSH), un tri-peptide exprimé de manière ubiquitaire et contenant un glutamate, une glycine et une cystéine. C'est le résidu cystéine contenant un thiol qui lui confère son activité antioxydante. Il élimine ainsi des ROS et participe à la réduction d'enzymes antioxydantes ou d'antioxydants non-enzymatiques comme les vitamines C et E. Son oxydation entraîne la formation de ponts disulfures avec une autre molécule de glutathion, formant ainsi une molécule de GSSG, ou avec d'autres protéines (Samoylenko *et al.*, 2013; Mirończuk-Chodakowska, Witkowska and Zujko, 2018; Zhang *et al.*, 2019).

2. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Les superoxydes dismutases (SOD) représentent une première ligne de défense enzymatique contre les ROS. Ces enzymes catalysent la dismutation de $2O_2^-$ en H_2O_2 (1) (Figure 17) en utilisant un ion métallique Zinc (Zn), Cuivre (Cu) ou Manganèse (Mn) (Miller, 2012). Chacune d'elles possède une localisation spécifique. La SOD2, ou Mn-SOD, est localisée dans la matrice mitochondriale où elle permet la dismutation rapide des O_2^- formés par la phosphorylation oxydative. Les SOD1 et 3, toutes deux des Cu/Zn-SOD, sont respectivement dans le cytosol et le milieu extracellulaire où elles catalysent la dismutation des O_2^- produits principalement par les NOXs (Wang *et al.*, 2018).

Les glutathiones peroxydases (GPx) et les peroxyredoxines (Prx) contiennent respectivement une sélénocystéine et des cystéines sur leur site actif. Elles ont une forte affinité pour l' H_2O_2 , qu'elles convertissent en H_2O (Figure 18), ainsi que pour le peroxy-nitrite et les macromolécules peroxydées (R-OOH), comme les lipides, qu'elles convertissent en la fonction alcool correspondante (R-OH) (Winterbourn, 2018; Zhang *et al.*, 2019).

En réduisant les espèces réactives, ces enzymes s'oxydent et doivent être à nouveau réduites pour être fonctionnelles. Dans le cas des GPx, cette réduction est assurée par 2 GSH qui s'oxydent en GSSG. Les Prx sont réduites par les thioredoxines (Trx), et requièrent une réduction préalable par la sulfiredoxine en cas d'hyperoxydation en sulfinate. Le pool de GSH et la réduction des Trx sont ensuite régulés respectivement par les Glutathione Reductases (GR) et les Thioredoxines Reductases (TrxR) qui utilisent le NADPH comme donneur d'électrons (Figure 18) (Chang *et al.*, 2004; Mahmood *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2019).

Au vu de ces différentes réactions, les ratios GSH/GSSG et NADPH/NADP⁺ sont critiques pour le maintien de l'activité antioxydante de la cellule et représentent de bons marqueurs de son état redox (Aguilar *et al.*, 2019; Raho *et al.*, 2020).

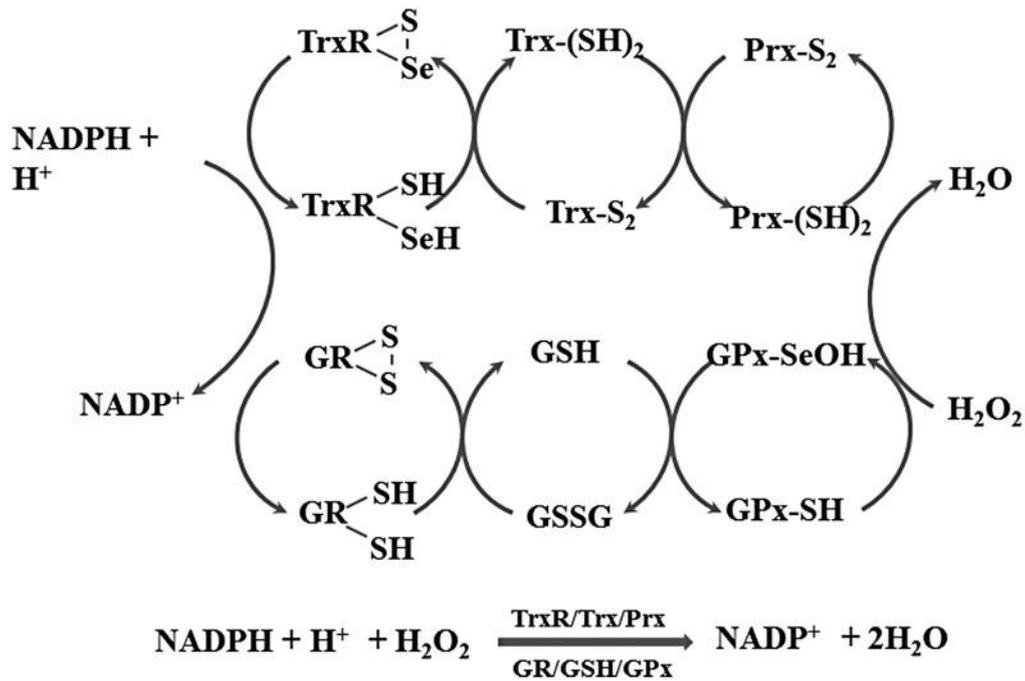


Figure 18. Conversion de l' H_2O_2 en H_2O par les systèmes TrxR/Trx/Prx et GR/GSH/GPx et oxydation du NADPH en NADP^+ . Les groupements Se et S indiquent respectivement la présence d'une sélénocystéine ou d'une cystéine dans le site catalytique. Tiré de Ren *et al.* 2017.

La catalase est une protéine à hème capable de dismuter l' H_2O_2 en H_2O et O_2 . A la différence des Gpx et des Prx, le maintien de son activité ne dépend pas de sa réduction. En effet, l'hème oxydé est aussitôt réduit par une deuxième réaction avec un H_2O_2 , lui-même converti en H_2O (Sies and Jones, 2020). La catalase possède une faible affinité pour l' H_2O_2 comparée à celle des Gpx et des Prx. Elle a donc peu de rôle dans la signalisation redox et intervient essentiellement en réponse à des augmentations importantes des niveaux d' H_2O_2 (Rindler *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019).

La production de ROS mitochondriaux étant liée au métabolisme oxydatif, les régulations de ces deux processus sont hautement intriquées. Ainsi, l'expression de gènes codant pour les SODs et certaines Gpxs est placée sous le contrôle de Pgc1 α via son interaction avec NE2FL2, un facteur de transcription essentiel pour l'expression de gènes antioxydants (St-Pierre *et al.*, 2003; Gureev, Shaforostova and Popov, 2019). Cette régulation parallèle des systèmes antioxydants et de la fonction mitochondriale permet ainsi à la cellule d'adapter son activité antioxydante à sa capacité oxydative (Lin, Handschin and Spiegelman, 2005).

D. Principes de la signalisation redox

En raison de leur potentiel délétère lorsqu'elles sont en excès, les ROS ont longtemps été considérées comme néfastes pour l'organisme. De nombreux travaux ont montré qu'elles participent à la régulation d'un grand nombre de fonctions cellulaires au même titre que la phosphorylation ou l'acétylation des protéines. Elles font aujourd'hui consensus en tant que molécules de signalisation dans ce que l'on appelle la signalisation redox (Sies and Jones, 2020).

La signalisation redox regroupe un ensemble de réactions d'oxydoréduction impliquant des ROS ou des RNS en tant que messagers pour transduire un signal et provoquer une réaction biologique. Elle repose sur des modifications réversibles de molécules, en particulier les résidus soufrés des protéines que sont les cystéines ou les méthionines.

1. Modifications réversibles des protéines

Un des points importants de la signalisation redox est la spécificité et la réversibilité des modifications post-traductionnelles induites par les ROS ou les RNS. Ces modifications sont retirées par des enzymes qui comportent elles-mêmes des résidus thiol. La signalisation redox repose donc sur la capacité de la cellule à réduire ces enzymes aussi vite qu'elles s'oxydent (Hanschmann *et al.*, 2013).

L' H_2O_2 peut réagir avec ses protéines cibles via plusieurs groupes, mais son affinité est la plus élevée pour les groupements thiols/thiolates (-SH/-S⁻) des résidus cystéines et méthionines (Winterbourn, 2013).

L'oxydation de ce groupement par une molécule d' H_2O_2 forme un groupement sulfenate (SO⁻). Celui-ci peut être maintenu tel quel, former un pont disulfure (S-S) intramoléculaire ou intermoléculaire en présence d'une autre cystéine, ou être glutathionylé dans le cas d'un pont avec une molécule de glutathion (GSH) (Hanschmann *et al.*, 2013). Ainsi, la disponibilité des ROS dans un compartiment cellulaire régule positivement ou négativement la fonction de leurs protéines cibles en modifiant leurs interactions, leurs structures ou leurs séquences. Pour citer des exemples, les protéines tyrosines phosphatases (PTP) sont connues pour être régulées par l' H_2O_2 . L'oxydation du résidu cystéine 215 de PTP1b inhibe son activité et permet la transduction de signaux via les tyrosines kinases (van Montfort *et al.*, 2003; Östman *et al.*, 2011). De même, la glutathionylation du co-activateur transcriptionnel TAZ

augmente sa stabilité et permet le maintien de l'expression de ses gènes cibles (Xin *et al.*, 2013; Gandhirajan *et al.*, 2016).

Le groupement sulfénate peut éventuellement subir de nouvelles oxydations en sulfinat ($-SO_2^-$) ou sulfonate ($-SO_3^-$), mais ces réactions sont environ 1000 fois plus lentes que la première oxydation. Leur présence est donc le reflet de conditions oxydantes relativement élevées (Winterbourn, 2018). Les groupements sulfinates sont pour certaines protéines, comme les Prx, réversibles par la sulfiredoxine. En revanche, une hyperoxydation en sulfonate n'est pas réversible, et altère la fonction des protéines (Chang *et al.*, 2004; Akter *et al.*, 2018; Sies and Jones, 2020).

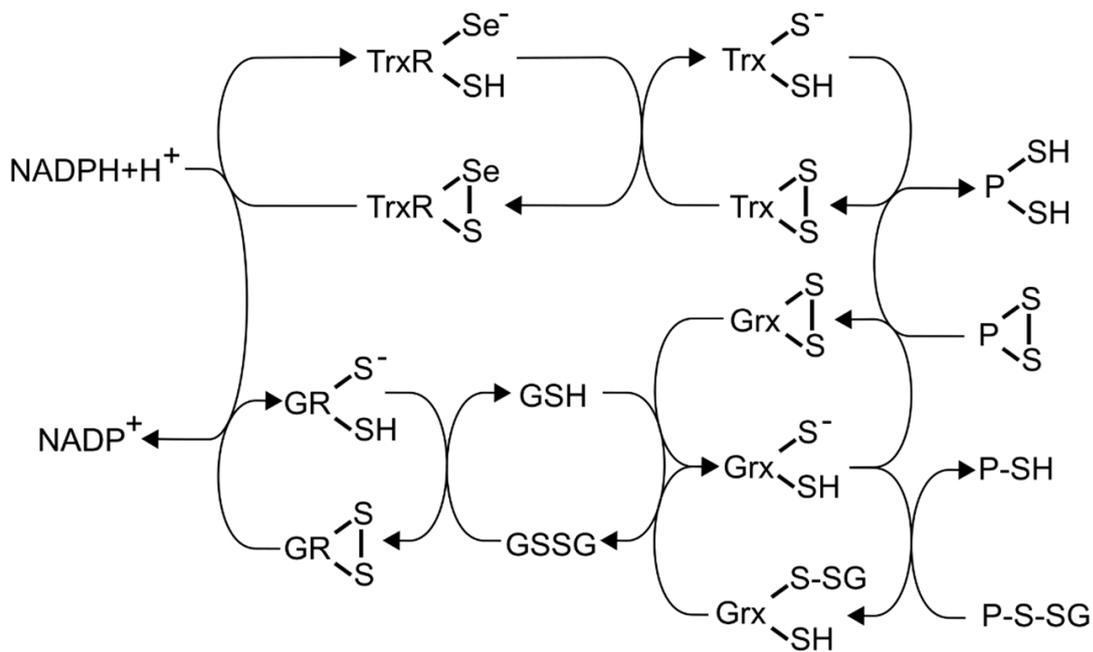


Figure 19. Réduction des disulfides via les systèmes TrxR/Trx et GR/GSH/Grx et oxydation du NADPH en NADP⁺. Les groupements Se et S indiquent respectivement la présence d'une sélénocystéine ou d'une cystéine dans le site catalytique. Tiré de Hanschmann *et al.* 2013

Les cystéines oxydées, de même que les ponts disulfures, sont réduits par les thioredoxines (Trx) et les glutaredoxines (Grx) qui possèdent un site catalytique conservé contenant deux résidus cystéines (Figure 19). Les Grx retrouvent leur forme réduite grâce aux glutathione réductases (GR) et au GSH, tandis que les Trx sont réduites par les thioredoxines réductases (TrxR). Dans les deux cas, le NADPH est nécessaire en tant que donneur d'électrons, ce qui

souligne l'importance de sa synthèse dans le maintien de l'équilibre redox (Figure 19). La déglutathionylation est quant à elle la spécialité des Grx (Hanschmann *et al.*, 2013).

Les résidus méthionines peuvent aussi être oxydés en méthionine sulfoxydes (Met-SO) puis en méthionine sulfones (-SO₂). Ces modifications, à l'instar de celles des cystéines, entraînent des modifications positives ou négatives de la fonction des protéines. Tandis que le groupement sulfoxyde est réduit par les méthionine sulfoxydes réductases, l'hydroxydation en sulfone est irréversible (Hoshi and Heinemann, 2001; Erickson *et al.*, 2008; Lourenço Dos Santos, Petropoulos and Friguet, 2018).

Les espèces réactives contenant un atome d'azote comme l'oxyde nitrique NO ou ses dérivés comme l'ONOO⁻/ONOOH peuvent provoquer la nitration des protéines. Les groupements thiols peuvent être S-nitrosylés, induisant des modifications de leurs interactions ou de leur fonction. Ainsi, les caspases doivent être dénitrosylées avant leur clivage et la transduction du signal apoptotique (Li *et al.*, 1997). Dans le cœur, la S-nitrosylation des RyR joue un rôle important dans la régulation du couplage excitation/contraction. Ainsi, l'hyponitrosylation des RyR entraîne une fuite calcique du sarcoplasme pendant la diastole, ce qui participe à l'altération de la fonction contractile associée à l'insuffisance cardiaque (Gonzalez *et al.*, 2010). La dénitrosylation est effectuée par les thiorédoxines et la S-nitrosoglutathione réductase, celle-ci utilisant un intermédiaire GSH-nitrosyl (Benhar, Forrester and Stamler, 2009).

Les résidus tyrosines de certaines protéines peuvent également subir une nitration après réaction avec une molécule d'ONOO⁻. Cette modification peut réguler la fonction de la protéine, comme cela a été démontré négativement pour la SOD2 (MacMillan-Crow *et al.*, 1996). Bien que la dénitration soit possible, le mécanisme et les enzymes mis en jeu n'ont pas encore été identifiés (Smallwood *et al.*, 2007; Deeb *et al.*, 2013). Enfin, le mécanisme de l'interaction entre la nitration et la phosphorylation des tyrosines, qu'elle se fasse sous forme de compétition ou par le recrutement de tyrosines kinases, est encore inconnu.

2. Modifications de molécules autres que les protéines

D'autres molécules que les protéines peuvent être modifiées et participer à la signalisation. Un des sous-produits majeurs et hautement réactifs de la peroxydation des lipides est le 4-hydroxynonanal (4-HNE). A des niveaux élevés, cette espèce est un messenger secondaire cytotoxique des ROS. Sa toxicité s'explique par sa capacité à oxyder des groupements comme les thiols ou à établir des liaisons covalentes avec les acides aminés (Ayala, Muñoz and Argüelles, 2014).

Lorsqu'il est présent à des niveaux modérés, le 4-HNE participe à la transduction du signal redox et à la régulation de la réponse antioxydante. Il joue ainsi un rôle dans la régulation de Nrf2, un facteur de transcription se liant aux séquences «Antioxidant Response Elements» (ARE) présentes dans les régions régulatrices de gènes codant pour des protéines antioxydantes. Nrf2 est réprimé par son interaction avec Keap1 qui entraîne sa dégradation. Le 4-HNE, en induisant l'oxydation de Keap1, permet à Nrf2 d'être transloqué au noyau pour activer la transcription de ses gènes cibles tels que *Trx*, *TrxR* et des enzymes clefs de la synthèse du GSH. Le 4-HNE est donc impliqué dans une boucle de régulation permettant sa propre élimination (Baldelli, Aquilano and Ciriolo, 2013; Ayala, Muñoz and Argüelles, 2014).

3. Carbonylation, hyperoxydation et dégradation des protéines

Pour fonctionner, les systèmes antioxydants impliqués dans la réversion de marques d'oxydations sur les protéines effectuent des réactions d'oxydoréduction. La capacité de la cellule à réduire ces systèmes aussi vite qu'ils s'oxydent est donc dépendante de l'état redox. Un déséquilibre modéré et/ou localisé de l'état redox déclenche une transmission du signal, tandis qu'un déséquilibre excessif ou généralisé entraîne des oxydations non-spécifiques et irréversibles, altérant les fonctions des molécules et représentant un danger pour l'intégrité cellulaire. On parle alors de stress oxydant (Sies and Jones, 2020).

Parmi les modifications irréversibles, outre l'hydroxydation des cystéines et des méthionines, on trouve la carbonylation. Celle-ci, qui correspond à l'ajout d'un groupement carbonyle C=O, peut être provoquée par la réaction des acides aminés avec des lipides, des sucres oxydés ou des radicaux OH[•] (Kehm *et al.*, 2021). Une conséquence de la présence de ces groupements sur les protéines est leur propension à former des ponts intra ou

intermoléculaires induisant la formation de structures aberrantes ou d'agrégats altérant la fonction des protéines impliquées (Cecarini *et al.*, 2007).

Cette modification de la structure des protéines expose les acides aminés hydrophobes et permet leur reconnaissance par le protéasome (Cecarini *et al.*, 2007; Jung, Höhn and Grune, 2014) ou par des systèmes de dégradation propres à certains organites tels que les protéases mitochondriales LONP1 et CLP (Szczepanowska and Trifunovic, 2021). Ainsi, la perte de fonction de LONP1 est associée à un stress oxydant mitochondrial dû à l'accumulation de protéines oxydées dans la matrice (Hamon *et al.*, 2020).

E. Exemples de voies de signalisation redox-dépendantes

1. Les p38MAPK

Les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) sont un ensemble de kinases impliquées dans la transduction de signaux biologiques variés comme la survie ou la mort cellulaire, la prolifération, ou la réponse au stress. Elles fonctionnent sous forme de cascades de phosphorylation et la durée de même que l'intensité de leur activation sont modulées par des phosphatases spécifiques, les MKPs (MAPK Phosphatases) (Son *et al.*, 2013).

Parmi les MAPK, certaines sont considérées comme spécialisées dans la réponse au stress. Ainsi, la famille des p38MAPK peut être activée par une augmentation des niveaux de ROS et transduire le signal en phosphorylant une ou plusieurs de leurs cibles. Ces différentes cibles peuvent ensuite réguler l'expression de gènes, la stabilité d'ARN messagers, le cycle cellulaire ou le métabolisme (Trempelec, Dave-Coll and Nebreda, 2013; Canovas and Nebreda, 2021).

L'isoforme la mieux caractérisée au sein de cette famille est la p38 α . Celle-ci a par exemple été démontrée comme un médiateur des ROS déclenchant la différenciation des cellules souches musculaires au cours de la régénération musculaire. Dans ce contexte, la diminution du niveau de ROS ou l'inhibition de la p38 retarde leur entrée en différenciation et permet leur amplification (L'honoré *et al.*, 2018).

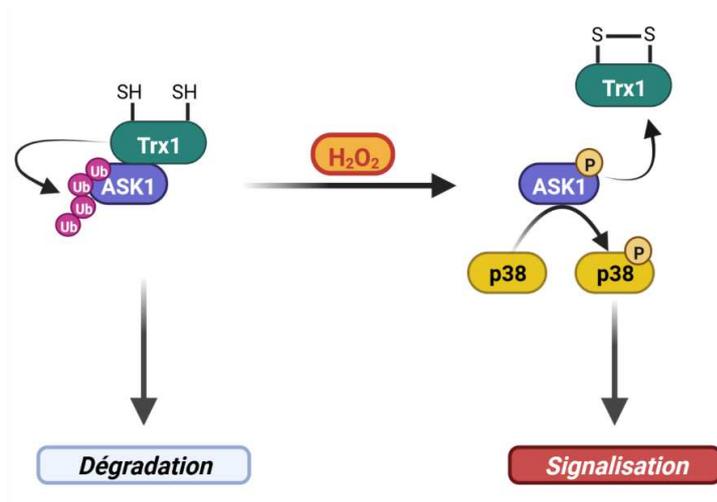


Figure 20. Activation ROS-dépendante de p38. La Trx sous forme réduite inhibe l'activité de ASK1 et entraîne son ubiquitinylation et sa dégradation. En conditions oxydantes, la formation d'un pont disulfure sur la Trx1 permet la libération de ASK1, sa dimérisation et son activation par autophosphorylation. Sous forme active, ASK1 phosphoryle ses cibles comme p38 qui participe à la signalisation. *Inspiré de Liu et Min, 2002, créé avec Biorender.com*

Chez le poisson zèbre, p38 possède une cystéine dont l'oxydation est nécessaire à sa phosphorylation en réponse à l' H_2O_2 . Bien que cette cystéine soit conservée chez les mammifères, la régulation de p38 via son oxydation reste une hypothèse (Templeton *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2021). En revanche, la kinase ASK-1, en amont de p38, est sujette à une activation dépendante des ROS : son activité kinase, inhibée par son interaction avec la Trx1 en conditions d'homéostasie, est induite par dissociation de cette interaction lorsque la Trx1 est oxydée. Ainsi, ce complexe agit comme senseur redox, permettant la phosphorylation de p38 par ASK1 en conditions oxydantes (Figure 20) (Saitoh *et al.*, 1998; Liu and Min, 2002).

2. La voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR)

Les bases azotées de l'ADN représentent une autre cible des ROS. La marque la plus connue de leur oxydation, la 8-oxoguanine entraîne des cassures simples ou doubles brins, provoquant l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DNA Damage Response, DDR) (Davalli *et al.*, 2018). Cette voie, dont l'acteur principal est la kinase ATM, a un double rôle de réparation et de signalisation. Elle peut bloquer la prolifération le temps de la réparation ou entraîner l'apoptose ou la sénescence des cellules si les dommages sont irréparables (Ciccia and Elledge, 2010). De plus, ATM possède un résidu cystéine sensible à l'oxydation. En présence d'une augmentation du niveau de ROS, son oxydation entraîne son activation, indépendamment de la présence de cassures double brins (Guo *et al.*, 2010).

Cette voie connecte ainsi la signalisation des dommages à l'ADN à la régulation du cycle cellulaire.

IV. Signalisation métabolique : contrôle de l'expression génique par l'activité métabolique

Les modifications épigénétiques influencent la fonction et le destin cellulaires en régulant le programme transcriptionnel. De nombreuses enzymes chargées de l'ajout ou de la suppression de marques sur les histones ou l'ADN utilisent des coenzymes ou des métabolites en tant que cofacteurs ou substrats, reliant ainsi l'activité métabolique à la fonction de la cellule (Martínez-Reyes and Chandel, 2020; Santos, 2021).

A. Régulation de l'acétylation et de la méthylation des histones par l'activité métabolique

Le profil d'acétylation et de méthylation des histones est critique au cours du développement cardiaque ou dans le cadre de pathologies comme le remodelage hypertrophique (Bucks and Olson, 2006; Zhang *et al.*, 2018).

L'acétylation des histones sur les résidus lysines, permet, en déstabilisant leur liaison avec l'ADN, de décondenser la chromatine et de la rendre accessible à la machinerie transcriptionnelle (Lee and Grant, 2019). Cette réaction réversible est catalysée par les Histones Acétyl Transférases (HATs), qui utilisent l'acétyl-CoA comme donneur d'acétyl, et dont l'acyl-coA est un inhibiteur compétitif (Figure 20) (Albaugh, Arnold and Denu, 2011; Lee *et al.*, 2014; Lee and Grant, 2019). Le niveau d'acétylation globale des histones, qui est ainsi corrélé aux concentrations d'acétyl-CoA et à l'activité du cycle de Krebs (Martínez-Reyes *et al.*, 2016), est aussi dépendant de l'activité dé-acétylase des sirtuines (Figure 20) (Houtkooper, Pirinen and Auwerx, 2012; Martínez-Reyes *et al.*, 2016). Ces enzymes, dont l'activité est dépendante des niveaux de NAD⁺, régulent de nombreux processus au cours du développement cardiaque, de même que chez l'adulte en conditions pathophysiologiques. Les différents membres de la famille des sirtuines résident dans des compartiments

cellulaires différents. Sirt1 et Sirt3, qui sont les membres les plus étudiés dans le cœur, sont localisées dans le noyau et la mitochondrie respectivement. Sirt1 est impliquée au cours du développement cardiaque en stimulant l'expression de *Nkx2.5*, un régulateur de la spécification du lignage des cardiomyocytes (Yuan *et al.*, 2017). Le contrôle de l'expression génique cardiaque effectuée par Sirt3 se fait majoritairement par le biais de la régulation de facteur(s) de transcription. Ainsi, la dé-acétylation de Foxo3a par Sirt3 permet sa translocation nucléaire et l'activation de l'expression de gènes codant pour des protéines antioxydantes (Matsushima and Sadoshima, 2015). De plus, l'activité dé-acétylase de Sirt3 participe au contrôle des niveaux d'acétylation des complexes de la chaîne respiratoire, des enzymes de la β -oxydation, et de la SOD2 (Ianni *et al.*, 2018). Il a été suggéré que les déacétylations effectuées par Sirt3 puissent réguler positivement la production d'ATP et l'activité antioxydante mitochondriale. Néanmoins, l'hyperacétylation des protéines mitochondriales cardiaques observée dans un modèle mutant de Sirt3 n'est pas associée à des altérations majeures de la fonction mitochondriale, ce qui suggère que la dé-acétylation catalysée par Sirt3 participerait à des processus de régulation fine, potentiellement nécessaires dans la réponse à des stress cellulaires spécifiques (Davidson *et al.*, 2020).

D'autres histones lysine dé-acétylases (KDACs) sont dépendantes de certains produits du métabolisme associés à des stress énergétiques (jeûne, exercice). Ainsi, le lactate ou le β -hydroxybutyrate sont des inhibiteurs des KDAC de type I (Figure 20) (Latham *et al.*, 2012; Shimazu *et al.*, 2013; Kinnaird *et al.*, 2016).

Outre l'acétylation, les résidus lysines des histones peuvent aussi être méthylés, avec des conséquences fonctionnelles diverses pour l'expression génique. Ainsi, la méthylation sur la lysine 4 (H3K4) est associée à l'activation transcriptionnelle, tandis que celle des résidus 9 et 27 (H3K9 et H3K27) est associée à la répression (Arifuzzaman, Khatun and Khatun, 2020). Tandis que la méthylation est réalisée par les histones méthyltransférases, la déméthylation est sous le contrôle des histones lysines déméthylases (KDMs). Les KDMs sont nombreuses et, au sein de cette famille, la sous-famille des KDM à domaine Jumonji-C (JHDM) est dépendante des niveaux d' α -cétoglutarate. Celui-ci, utilisé comme cofacteur, est converti en succinate, tandis que le fumarate, le succinate et 2-hydroxyglutarate agissent comme inhibiteurs (Figure 21) (Kinnaird *et al.*, 2016; Santos, 2021).

B. Régulation de la méthylation de l'ADN par les intermédiaires du cycle de Krebs

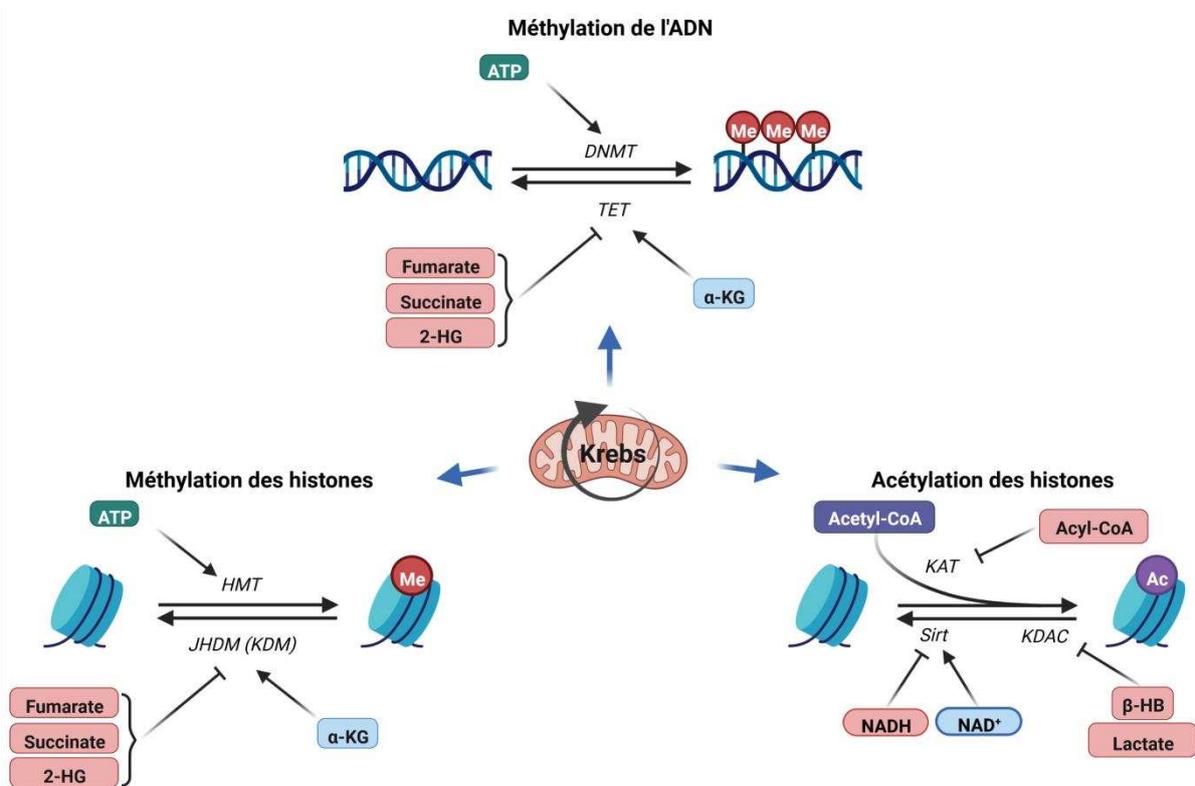


Figure 21. Impact de l'activité métabolique sur la régulation du paysage épigénétique et de l'expression génique. La méthylation de l'ADN et des histones requiert de l'ATP. La déméthylation de l'ADN et des histones requiert l'activité TET ou histone lysine déméthylase (KDM) respectivement. Ces deux types d'enzymes utilisent l' α -cétoglutarate (α -KG) comme cofacteur et sont inhibées par le fumarate, le succinate et le 2-hydroxyglutarate (2-HG). L'acétyl-coA est employé par les histones acétyl transférases (KAT) pour acétyler les histones. Les marques d'acétylation sont retirées par des réactions enzymatiques catalysées par des dé-acétylases (KDAC), dont l'activité peut être dépendante du NADH ou inhibée par l'activité glycolytique via la production de lactate. Inspiré de Kinnaird et al., 2016. Créé sur Biorender.com

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN consiste en l'ajout de groupements méthyles sur le carbone 5 des cytosines (5mC). Certaines zones riches en cytosines, ou îlots CpG, sont présents dans les promoteurs et leur méthylation assure la répression des gènes concernés (Greenberg and Bourc'his, 2019). Cette méthylation est dynamique et réversible pour permettre des réponses physiologiques, notamment au cours de la différenciation d'un lignage (Messerschmidt, Knowles and Solter, 2014). La déméthylation est initiée par les enzymes méthyl-cytosine dioxygénases TET (Ten Eleven Translocation) qui convertissent les 5mC en 5hmC (5-hydroxyméthyl-cytosine), 5fC (5-formyl-cytosine) ou 5caC (5-carboxyl-

cytosine). Ces versions oxydées des 5mC promeuvent la perte de méthylation par dilution au fil des réplifications de l'ADN (Otani *et al.*, 2013) ou peuvent être reconnues par le système BER (Base Excision Repair) qui remplace la cytosine modifiée par une cytosine non-méthylée (He *et al.*, 2011). L'activité TET, qui est une étape limitante de la déméthylation, est, comme celle de certaines KDMs, dépendante de l' α -cétoglutarate et inhibée par le fumarate, le succinate et le 2-hydroxyglutarate (Figure 21). Ainsi, en cas de dérégulation du métabolisme mitochondrial ou de mutation des enzymes du cycle de Krebs entraînant un déséquilibre de ses métabolites, l'activité des TETs et le profil de méthylation de l'ADN sont altérés (Figuroa *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2012). Ceci peut être particulièrement critique dans certains lignages tels que les cardiomyocytes dont la maturation néonatale dépend en partie de l'activité TET (Sim *et al.*, 2015; Greco *et al.*, 2016).

Chapitre 3 : Conséquences du métabolisme mitochondrial sur les propriétés des cardiomyocytes

I. Implications de la mitochondrie et du métabolisme oxydatif dans l'insuffisance cardiaque entraînée par l'ischémie/reperfusion

A. Ischémie/reperfusion

Les infarctus du myocarde sont les accidents vasculaires les plus courants (Metra and Teerlink, 2017). Ils sont causés par l'obstruction temporaire d'une artère coronaire alimentant le myocarde (Figure 22). Cette obstruction génère une ischémie, c'est-à-dire une privation des cellules en oxygène et en nutriments qui entraîne la mort de cardiomyocytes (Chiong et al., 2011; Heusch, 2020). Paradoxalement, bien que la restauration du flux sanguin soit nécessaire pour limiter la mort cellulaire, la reperfusion et l'apport brutal en O₂ aux cellules ayant subi cette hypoxie entraîne une production élevée de ROS, le relargage du cytochrome c mitochondrial et la mort de cardiomyocytes supplémentaires (Chiong et al., 2011; Heusch, 2020).

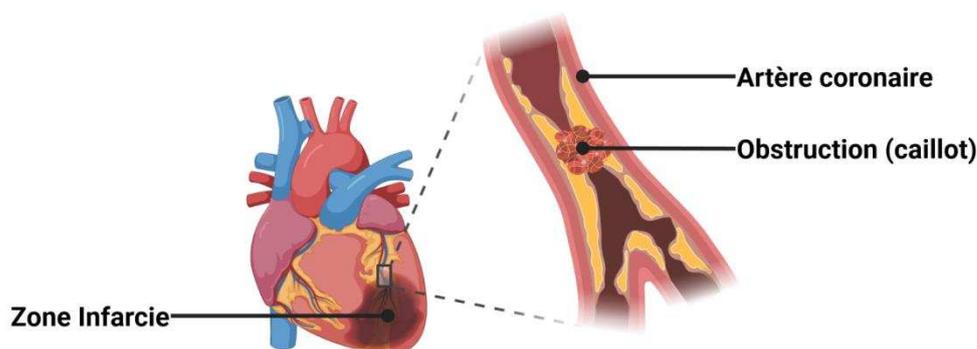


Figure 22. L'infarctus du myocarde est provoqué par l'obstruction de l'artère coronaire. L'arrêt de l'apport en O₂ et en nutriments (ischémie), et son retour brutal durant la reperfusion entraîne la mort de cardiomyocytes. Créé avec *Biorender.com*

B. Remodelage structurel

Les cardiomyocytes apoptotiques relarguent des protéines entraînant une réponse inflammatoire (Frangogiannis, Smith and Entman, 2002). Celle-ci permet d'éliminer les cellules mortes et les débris, et d'initier un remodelage tissulaire en stimulant la prolifération des fibroblastes cardiaques. En effet, les cardiomyocytes adultes n'étant pas ou peu capables de proliférer, ce sont les fibroblastes qui, en produisant de la matrice extracellulaire (collagène), remplacent les cellules mortes par une cicatrice fibrotique (Figure 23). Les cardiomyocytes restants étant moins nombreux, ils sont soumis à des contraintes mécaniques plus importantes, ce qui entraîne leur hypertrophie, notamment au niveau du ventricule gauche (Figure 23) (Burchfield, Xie and Hill, 2013).

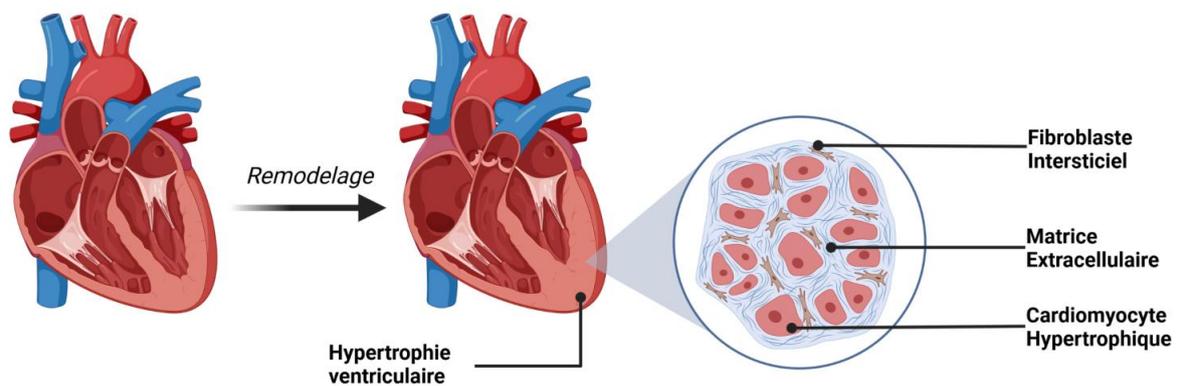


Figure 23. La perte de cardiomyocytes entraîne le remodelage structurel du ventricule. Celui-ci, qui implique la sécrétion de matrice extracellulaire, le développement d'une fibrose, ainsi que l'hypertrophie ventriculaire, participe à la dysfonction cardiaque. *Crée avec Biorender.com*

Ces changements sont initialement des mécanismes protecteurs et nécessaires au maintien de la fonction cardiaque. Cependant, la production de matrice extracellulaire, de même que l'hypertrophie ventriculaire, conduisent progressivement à des anomalies structurelles, telles que la rigidité et la dilatation du ventricule, qui diminuent l'efficacité de contraction des ventricules et sont à l'origine de l'insuffisance cardiaque, c'est-à-dire d'une diminution de la fonction cardiaque (Burchfield, Xie and Hill, 2013; Metra and Teerlink, 2017).

C. Remodelage métabolique

Comme indiqué précédemment, le cœur est un organe très énergivore dont le métabolisme est principalement orienté autour de l'oxydation des acides gras. Il est néanmoins flexible, c'est à dire capable d'utiliser différents substrats selon ses besoins et leur disponibilité. Le phénotype d'insuffisance cardiaque post-ischémie est caractérisé par une perte de cette flexibilité associée à une réduction de sa capacité oxydative. Le cœur post-ischémie est ainsi souvent décrit comme «une machine sans carburant», incapable d'utiliser les substrats disponibles dans la circulation pour assurer la production d'ATP nécessaire à sa contraction (Lopaschuk et al., 2021).

La baisse de capacité oxydative post-ischémie est partiellement expliquée par une altération de la dynamique mitochondriale et du métabolisme des acides gras. Ainsi, l'expression des protéines du processus de fusion diminue après une ischémie, tandis que celles de la fission sont surexprimées, entraînant une fragmentation du réseau mitochondrial (Chen et al., 2009; Chen and Knowlton, 2011; Chaanine et al., 2019). De même, les niveaux d'expression de Pgc-1 α et de Ppara diminuent, ce qui entraîne une réduction de la biogénèse mitochondriale et de l'expression des enzymes de la β -oxydation (Sack et al., 1996; Lopaschuk et al., 2010; Chaanine et al., 2019).

Cette difficulté à oxyder les substrats, notamment les acides gras, est partiellement compensée par une utilisation accrue de glucose (Lei et al., 2004). Néanmoins, le pyruvate dérivé de la glycolyse n'est que peu oxydé, et le rendement de cette dernière n'est pas suffisant pour assurer la fonction cardiaque (Diakos et al., 2016).

Malgré cette diminution de l'activité du métabolisme oxydatif, les niveaux de ROS augmentent et ce déséquilibre de l'état redox pourrait également participer à la détérioration de la fonction cardiaque (Lopaschuk et al., 2021). Cette élévation des niveaux de ROS peut s'expliquer par l'altération de la dynamique de fission/fusion mitochondriale. En effet, une détérioration de la mitophagie, qui est indispensable au contrôle qualité des mitochondries, entraîne l'accumulation de composants mitochondriaux endommagés. Ceci s'accompagne d'une altération de la fonction de la chaîne respiratoire et de la production d'ATP, une réduction de la capacité anti-oxydante, ainsi qu'une production accrue de ROS, qui peuvent entraîner la mort cellulaire (Dirks-Naylor *et al.*, 2014). Ce phénotype a été observé dans plusieurs modèles animaux et a permis d'identifier des molécules qui,

lorsqu'elles sont oxydées, sont utilisées comme biomarqueurs de l'insuffisance cardiaque chez l'humain (Sugamura and Keane, 2011; Hafstad, Nabeebaccus and Shah, 2013).

Chez les mammifères adultes, la perte de cardiomyocytes et l'incapacité des cardiomyocytes restants à proliférer représentent la cause majeure du remodelage ventriculaire et de l'insuffisance cardiaque à la suite d'accidents vasculaires. Une piste intéressante pour induire une régénération post-ischémie serait donc de stimuler la prolifération des cardiomyocytes adultes. Pour comprendre la régulation de leur cycle cellulaire, plusieurs modèles animaux ont été utilisés. L'étude du cœur murin néonatal ainsi que celui du poisson zèbre, tous deux capables d'une régénération efficace, a ainsi permis d'identifier certaines contraintes biochimiques et structurelles inhibant la prolifération des cardiomyocytes adultes chez les mammifères, et donc le potentiel régénératif cardiaque (Puente *et al.*, 2014; Honkoop *et al.*, 2019; Derks and Bergmann, 2020).

II. Maturation néonatale des cardiomyocytes

A. Sortie du cycle cellulaire

Au cours du développement embryonnaire puis fœtal, la croissance cardiaque est dépendante de la prolifération des cardiomyocytes. Celle-ci persiste pendant une courte période après la naissance, jusqu'à P7 chez la souris, et P2 chez le porc. Chez l'humain, le taux de prolifération des cardiomyocytes décroît progressivement pendant les dix premières années (Porrello *et al.*, 2011; Mollova *et al.*, 2013; Bergmann *et al.*, 2015).

Cette capacité proliférative des cardiomyocytes est corrélée au potentiel régénératif du cœur (Porrello *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2018; Cui *et al.*, 2020). Chez la souris, le cœur embryonnaire (E9) est capable de régénération suite à une ablation de plus de 50% (Sturzu *et al.*, 2015). 3 semaines après une résection apicale effectuée à P1, on observe une régénération très efficace sans cicatrice fibrotique ou altération de la fonction cardiaque (Porrello *et al.*, 2011). Ce phénomène a également été observé chez l'humain. Ainsi, la littérature rapporte le cas d'un nouveau-né présentant une occlusion de l'artère coronaire ayant pour conséquence un infarctus du myocarde suivi d'une altération de la fonction

cardiaque. Un an après ischémie, la fonction cardiaque de l'enfant était redevenue normale, indiquant une régénération efficace (Mollova *et al.*, 2013; Haubner *et al.*, 2016).

B. Croissance hypertrophique et maturation de la machinerie contractile

Après la naissance, la taille et le volume du cœur augmentent par hypertrophie des cardiomyocytes. Leur volume augmente, atteignant jusqu'à 10 fois sa valeur initiale, et ils changent de morphologie, adoptant une forme allongée et rectangulaire d'environ 150µm de longueur, 20µm de largeur et 15µm de hauteur (Mollova *et al.*, 2013). Cette augmentation, qui se fait grâce à l'expression accrue de gènes codant pour les protéines constituant les sarcomères, permet leur élongation et leur maturation en structures alignées longitudinalement qui optimisent la capacité du myocarde à se raccourcir pendant sa contraction (Figure 24) (Nassar, Reedy and Anderson, 1987; Guo *et al.*, 2018, 2021).

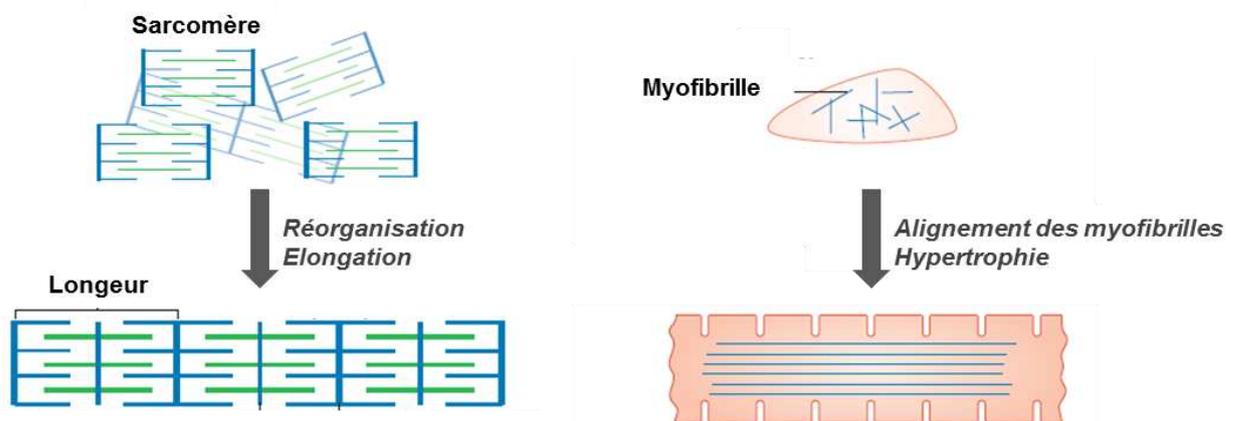


Figure 24. Les cardiomyocytes néonataux opèrent des changements structuraux pendant leur maturation. A la naissance, l'augmentation de l'expression des protéines sarcomériques, le réarrangement des sarcomères et l'élongation des myofibrilles permettent l'hypertrophie des cardiomyocytes et l'acquisition de leur morphologie allongée. D'après Karbassi *et al.*, 2020.

Cette réorganisation s'accompagne également de changements d'isoformes des protéines du cytosquelette. Chez la souris, la transition la plus connue est celle de la chaîne lourde de myosine MHC-β (Myh7) au stade fœtal vers l'isoforme MHC-α (Myh6), l'isoforme majoritaire des cardiomyocytes adultes/matures (Siedner *et al.*, 2003). Chez l'humain, l'isoforme MHC-α est majoritaire dans les oreillettes, tandis que l'isoforme MHC-β est majoritaire dans les ventricules pendant le développement fœtal comme après la maturation. Néanmoins, les cardiomyocytes immatures issus de la différenciation en culture de cellules IPS (IPS-CMs) se

caractérisent par une expression majoritaire de MHC- α , ce qui suggère qu'une transition d'isoforme des myosines pourrait s'effectuer plus tôt pendant le développement embryonnaire (Taegtmeier, Sen and Vela, 2010; Guo and Pu, 2020). De même, tandis que le cœur fœtal exprime principalement l'isoforme squelettique de la troponine I (*Tnni1*), c'est la troponine I cardiaque (*Tnni3*) qui est exprimée chez l'adulte (Siedner *et al.*, 2003). D'autres constituants des sarcomères sont modifiés pendant la maturation. Ainsi, les cardiomyocytes ventriculaires adultes expriment l'isoforme de la chaîne légère des myosines *My12/Mlc-2v* au dépens de *My17/Mlc-2a*, qui devient restreinte aux cardiomyocytes auriculaires et au tissu nodal (Chuva de Sousa Lopes *et al.*, 2006; Piccini *et al.*, 2015).

Enfin, de nombreuses variations d'épissage de constituants du sarcomère telles que la titine, la myoméline ou la tropomyosine sont observées lors de la maturation (Guo and Pu, 2020). Ces épissages alternatifs sont orchestrés par un ensemble de facteurs dont les protéines Mbn1/2, Rbfox1 et Cugbp1. Tandis que les niveaux cardiaques de la protéine Cugbp1 (Celf), fortement exprimée pendant le développement, diminuent pendant la première semaine postnatale, ceux de Mbn1/2 et Rbfox1 augmentent (Kalsotra *et al.*, 2008). L'expression ectopique Celf ou la délétion de Mbn1 entraînent une maintenance des isoformes fœtales de protéines sarcomériques et une dysfonction cardiaque, démontrant l'importance de ces protéines dans la maturation de la machinerie contractile. (Kalsotra *et al.*, 2008; Dixon *et al.*, 2015). De plus, la surexpression de Rbfox1 dans des cardiomyocytes néonataux en culture stimule l'acquisition d'une morphologie mature et de l'alignement des sarcomères (Lee *et al.*, 2019).

C. Maturation électrophysiologique

Les potentiels d'action du cardiomyocyte sont dus à des passages d'ions à travers la membrane plasmique et le réticulum sarcoplasmique. Comme les cardiomyocytes du tissu nodal, les cardiomyocytes immatures présentent une expression élevée de Hcn4 (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4*), responsable de l'entrée d'ions Na⁺ et K⁺ dans la cellule. Cette caractéristique rend les cardiomyocytes immatures capables d'initier spontanément la dépolarisation de leur membrane, générant ainsi un potentiel d'action et leur contraction. L'expression de Hcn4 diminue pendant la maturation,

ce qui entraîne une perte d'automatisme. La contraction du cardiomyocyte mature ne peut alors être déclenchée que par la dépolarisation d'une cellule adjacente (Stieber *et al.*, 2003).

Au cours de la période néonatale, la taille des sarcomères et le volume des cellules augmentant, les structures T-tubules, qui sont absentes des cardiomyocytes immatures, se développent pour assurer le rapprochement entre les canaux calciques voltage-dépendants de la membrane plasmique et les récepteurs à la ryanodine (RyR) Ca^{2+} -dépendants du réticulum sarcoplasmique (Figure 25). Ce rapprochement permet l'augmentation locale de la concentration des ions Ca^{2+} nécessaire au relargage des ions Ca^{2+} par le réticulum et à l'initiation de la contraction des sarcomères (Guo and Pu, 2020; Karbassi *et al.*, 2020). De plus, l'augmentation de l'expression des canaux potassiques *Kcnj2* et des protéines impliquées dans la prise en charge du calcium comme les RyR, la sous-unité β du LTCC ou le canal *Cacna1c*, participe à l'augmentation de la vitesse et de l'amplitude de dépolarisation,

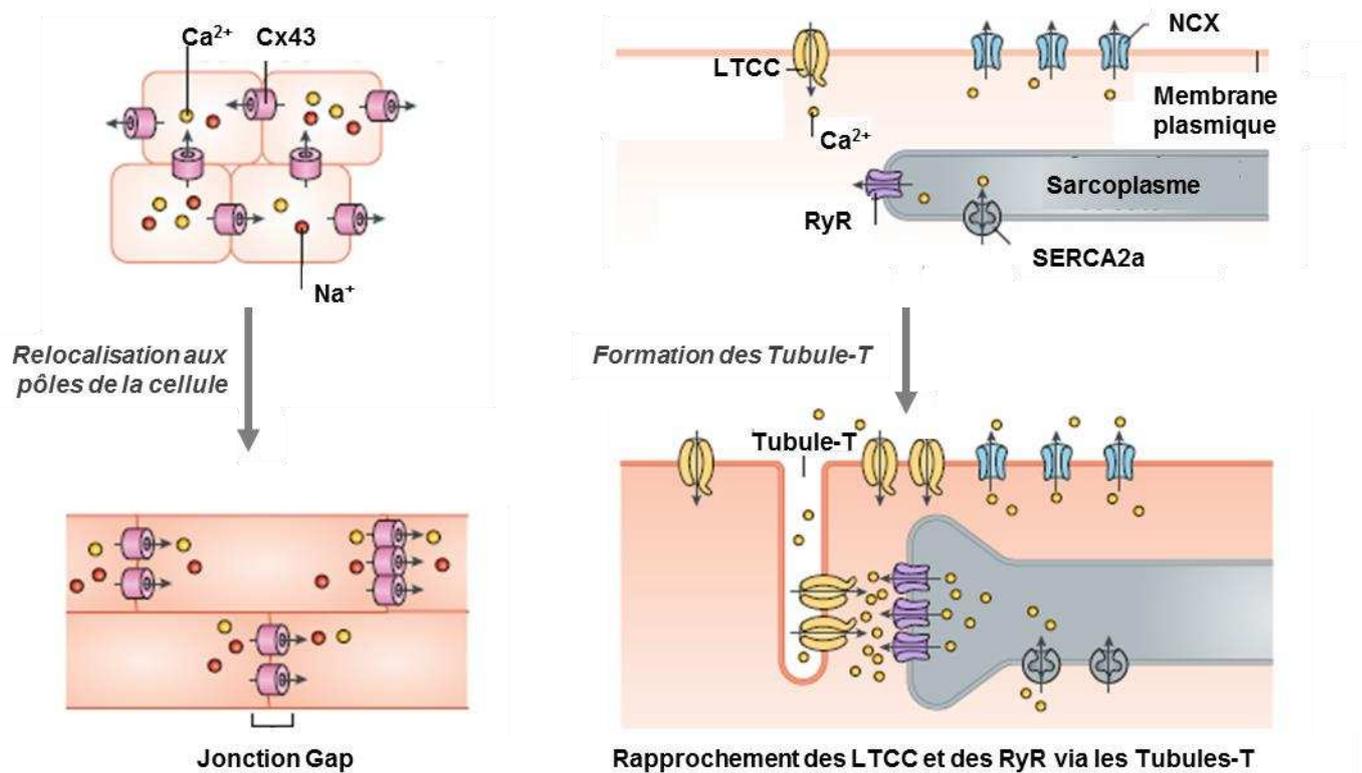


Figure 25. Modifications de la localisation des jonctions communicantes et formation des Tubules-T pendant la maturation. Lors de la maturation, les connexines 43 (Cx 43) sont relocalisées aux pôles des cardiomyocytes, permettant ainsi la transmission unidirectionnelle des potentiels d'actions. En parallèle, les invaginations formées par les T-tubules se forment et assurent la conduction rapide des potentiels d'actions via le rapprochement des canaux calciques de type L (LTCC) et les récepteurs à la Ryanodine (RyR). D'après Karbassi *et al.*, 2020.

ainsi qu'au retour plus lent du potentiel de membrane au repos (Satin *et al.*, 2008; Liu, Laksman and Backx, 2016; Karbassi *et al.*, 2020).

Ces modifications au niveau cellulaire s'accompagnent de changements à l'échelle tissulaire : les jonctions communicantes/gap composées de la connexine 43 (Cx43) et distribuées à la périphérie des cardiomyocytes néonataux adoptent une distribution polarisée aux extrémités du cardiomyocyte mature, permettant une conduction électrique rapide et unidirectionnelle (Figure 24) (Angst *et al.*, 1997; Vreeker *et al.*, 2014). Ces changements optimisent la réponse contractile aux potentiels d'action émis par les cellules adjacentes.

D. Binucléation et polyploïdisation

Deux autres caractéristiques de la maturation des cardiomyocytes sont la binucléation et la polyploïdisation. A la fin du développement fœtal et au cours de la période néonatale, une grande proportion des cardiomyocytes quitte le cycle cellulaire en fin de mitose, avant la cytokinèse, devenant ainsi binucléée. Pendant la maturation post-natale, puis à l'âge adulte, une partie des cardiomyocytes est capable de rentrer en phase S puis de sortir du cycle sans réaliser de karyokinèse, générant ainsi de la polyploïdie (Vliegen *et al.*, 1995; Mollova *et al.*, 2013; Senyo *et al.*, 2013). Ces deux particularités génomiques peuvent prendre plusieurs formes et leurs proportions varient selon les espèces. Chez les rongeurs, plus de 80% des cardiomyocytes ventriculaires ont effectué une mitose sans cytokinèse, produisant des cellules binucléées diploïdes. Chez l'humain, en revanche, seuls 25% des cardiomyocytes sont multinucléés, tandis que plus de 50% ont effectué au moins une phase S sans effectuer de karyokinèse, formant des cardiomyocytes mononucléés polyploïdes (Mollova *et al.*, 2013; Alkass *et al.*, 2015; Derks and Bergmann, 2020).

Bien que la fonction physiologique de la binucléation et/ou de la polyploïdie ne soit pas encore comprise, leur apparition coïncide avec la maturation des cardiomyocytes et avec l'augmentation de la force de contraction du myocarde. Ainsi, les espèces comme le poisson zèbre, dont le cœur ne possède que deux chambres et qui sont caractérisées par un faible rendement cardiaque, ont une fréquence de cardiomyocytes polyploïdes ou multinucléés très faible (environ 1%) comparée à celles dont l'activité cardiaque est plus intense (Hu, Yost and Clark, 2001; Derks and Bergmann, 2020). Enfin, chez ces dernières, comme la souris, les

cardiomyocytes ventriculaires, dont la force de contraction est élevée, sont à 80% binucléés, tandis que dans les oreillettes, dont la force de contraction est plus faible, la majorité des cardiomyocytes est mononucléée et diploïde (Raulf et al., 2015).

Une première hypothèse pour expliquer ces résultats serait que la polyploïdie, de même que la binucléation, permettraient d'augmenter l'expression de gènes impliqués dans la contraction et dans le métabolisme énergétique. De plus, au vu des conséquences de la cytokinèse et de la karyokinèse sur le désassemblage des sarcomères, et par conséquent sur la diminution de la force de contraction des cardiomyocytes, la polyploïdie et la binucléation pourraient être la marque de contraintes importantes inhibant leur progression dans le cycle cellulaire (Gabisonia *et al.*, 2019).

E. Changements métaboliques à la naissance.

1. Métabolisme fœtal

Chez les mammifères, le développement embryonnaire puis fœtal se déroule dans le milieu intra-utérin, c'est-à-dire un environnement hypoxique : la pression partielle d'oxygène (pO_2) artérielle de la circulation fœtale se situe entre 20 et 30 mm Hg, contre 100 mm Hg chez l'adulte (Patterson and Zhang, 2010). Ces niveaux d' O_2 faibles permettent la stabilisation du facteur de transcription Hif-1 α et l'expression de ses gènes cibles, notamment des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la glycolyse. Ainsi, *Glut1*, *Hk1* ou *Ldha* sont fortement exprimés dans le cœur fœtal, tandis que *Pgc-1 α* , *Cpt1B* et *Ppara*, acteurs du métabolisme oxydatif et de l'oxydation des acides gras sont faiblement exprimés (Lopaschuk and Jaswal, 2010; Birket *et al.*, 2013).

De plus, le système circulatoire fœtal montre des niveaux de glucose similaires à celui de l'adulte, des niveaux de lactate élevés (Fisher, Heymann and Rudolph, 1981) mais des niveaux d'acides gras faibles (Girard *et al.*, 1992). Ainsi, la production d'ATP du cœur foetal est principalement issue de la glycolyse (45%) plutôt que de l'oxydation des acides gras (15%) (Figure 25) (Lopaschuk, Spafford and Marsh, 1991; Itoi and Lopaschuk, 1993; Lopaschuk and Jaswal, 2010).

2. Transition métabolique à la naissance

A la naissance, l'exposition à l'oxygène atmosphérique entraîne une augmentation de la concentration d'oxygène dans le système circulatoire (Lopaschuk, Collins-Nakai and Itoi, 1992). Ceci a notamment un impact sur le cœur qui reçoit le sang fraîchement oxygéné provenant des poumons. De plus l'apport en substrat n'est plus pris en charge par le placenta mais par la nutrition lactée maternelle, riche en acides gras (Figure 25) (Cardoso *et al.*, 2020). Chez les mammifères, les niveaux d'acides gras circulants augmentent donc significativement après la naissance, tandis que les niveaux de lactate diminuent (Portman, Behrman and Soltys, 1969; Hamosh *et al.*, 1978; Girard *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 2007). Ces changements sont accompagnés par des modifications du transcriptome des cardiomyocytes. Les niveaux de Hif-1 α et de ses gènes cibles codant pour des enzymes de la glycolyse sont progressivement réprimés, tandis que l'expression du récepteur Glut1 diminue au profit de celle du récepteur Glut4. L'activité de ce dernier étant insulino-dépendante, son expression permet de restreindre l'entrée du glucose dans le cardiomyocyte (Bryant, Govers and James, 2002; Lopaschuk and Jaswal, 2010; Puente *et al.*, 2014).

Parallèlement à la diminution de l'expression des gènes glycolytiques, celle des facteurs de transcription NRF1 et ERR γ , ainsi que du co-activateur Pgc-1 α , augmentent. Ces derniers induisent l'expression des enzymes clés de la β -oxydation et du cycle de Krebs ainsi que l'augmentation de la masse mitochondriale (Sakamoto *et al.*, 2022). Ainsi, pendant la première semaine postnatale, on constate un doublement du nombre de copies d'ADN mitochondrial par cœur, ainsi qu'une augmentation du nombre de crêtes mitochondriales par cardiomyocyte (Figure 25) (Puente *et al.*, 2014). Ces mitochondries s'organisent progressivement en un réseau très ordonné, associé aux sarcomères et intercalé entre les myofibrilles, optimisant ainsi l'acheminement de l'ATP vers l'appareil contractile (Guo and Pu, 2020). Cette biogénèse mitochondriale s'effectue parallèlement à la mitophagie des mitochondries immatures fœtales. Ainsi, la perte d'activité de Parkin à la naissance entraîne la persistance du réseau mitochondrial fœtal et un retard de maturation métabolique qui résultent en une dysfonction cardiaque sévère (Gong *et al.*, 2015). Parallèlement à cette biogénèse et à ce remodelage mitochondriaux, l'activité AMPK augmente et inactive l'enzyme ACC, stimulant l'entrée des acides gras dans la mitochondrie via Cpt1 (Lopaschuk and Jaswal, 2010).

En conséquence, la dépendance du cœur au glucose/lactate pour la production d'ATP diminue au profit de celle aux acides gras (Lopaschuk and Jaswal, 2010). Cette transition métabolique permet un rendement en ATP beaucoup plus important et assure l'apport en énergie nécessaire pour subvenir aux besoins croissants du cœur (Figure 26) (Castellan *et al.*, 2020; Tan and Lewandowski, 2020). Un bilan de la maturation est présenté (Figure 27).

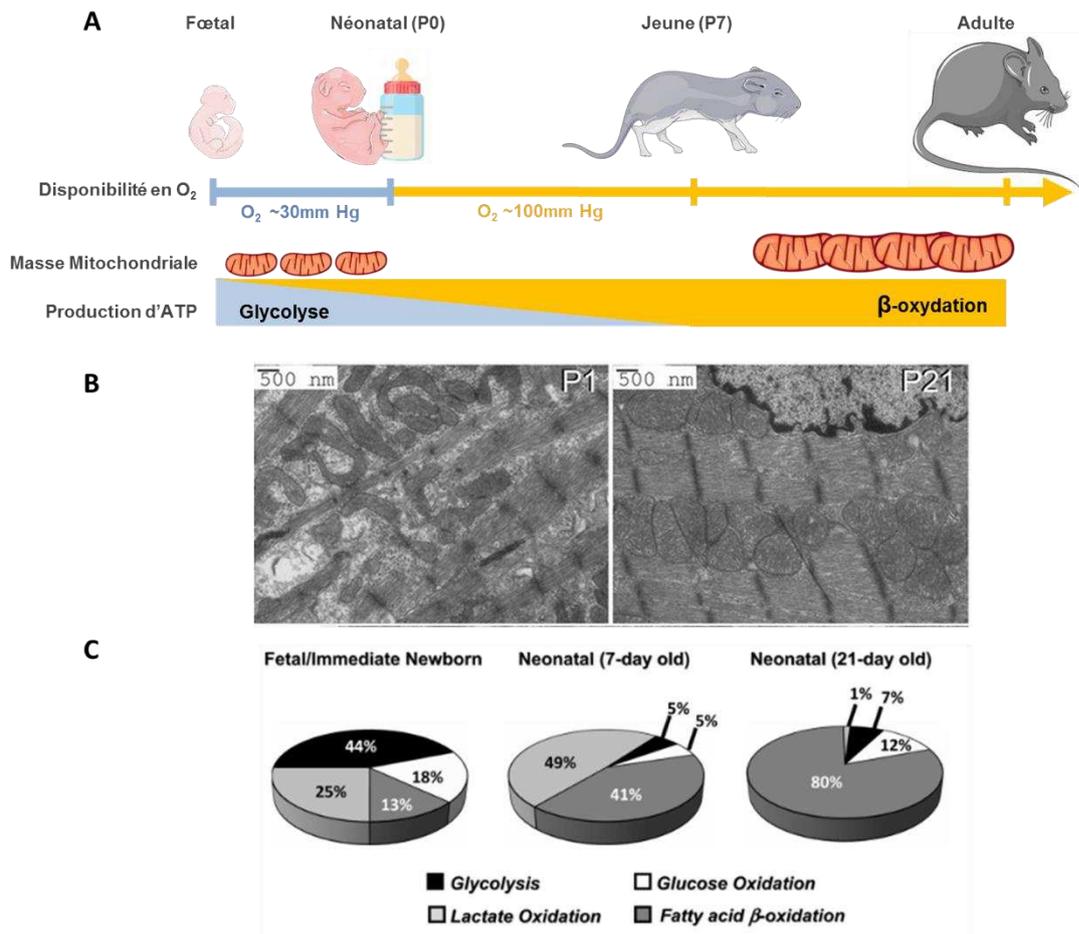
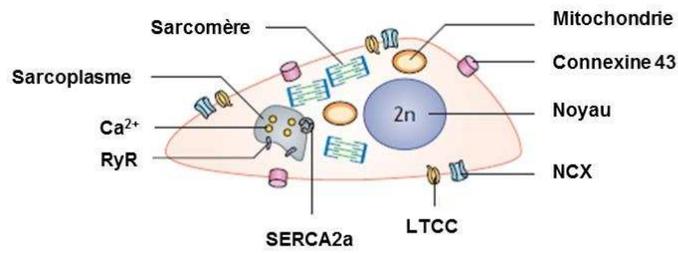


Figure 26. Remodelage métabolique du cœur vers le métabolisme mitochondrial et la β-oxydation pendant la période périnatale. (A) A la naissance, l'élévation des niveaux circulants d'acides gras provenant du lait maternel, et de la disponibilité en O₂ permettent l'induction de la β-oxydation. Ceci s'accompagne de l'élimination des mitochondries fœtales et d'une stimulation de la biogénèse mitochondriale. Créé à l'aide de Servier Medical Art. **(B)** Images de microscopie électronique à transmission sur coupes de cœurs murins à P1 et P21. A la naissance, le réseau mitochondrial est similaire au réseau fœtal, à savoir formé de mitochondries curvilinéaires peu organisées, tandis qu'à P21, les mitochondries sont ovoïdes, plus grosses, et disposées entre les myofibrilles. Tiré de Gong *et al.*, 2015. **(C)** Contributions relatives des différents substrats à la synthèse d'ATP dans des cœurs de lapins à différents âges perfusés avec du glucose, du lactate ou du palmitate marqués au ¹⁴C. Tiré de Lopaschuk and Jaswal, 2010.

Cardiomyocyte Néonatal (immature)



Maturation

Cardiomyocyte Adulte (mature)

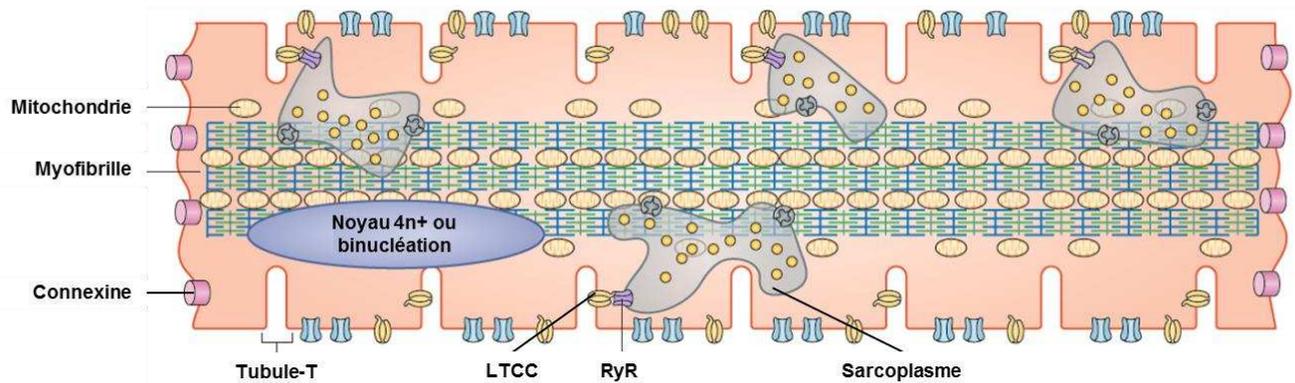


Figure 27. Bilan de la maturation structurelle et biochimique du cardiomyocyte pendant la période périnatale. L'induction du métabolisme oxydatif requiert la mitophagie des mitochondries foetales et la biogénèse de mitochondries matures dont le réseau s'organise longitudinalement autour des myofibrilles. Ce changement métabolique s'accompagne de la perte de la capacité proliférative, de l'acquisition de la binucléation ainsi que de la maturation contractile du cardiomyocyte. Celle-ci comprend l'hypertrophie, conséquence de l'augmentation de l'expression des protéines de la machinerie contractile, ainsi que la réorganisation des sarcomères et l'élongation des myofibrilles. La formation des tubules-T, la relocalisation des connexines 43 aux pôles de la cellule, ainsi que l'expression de canaux ioniques matures permettent l'induction rapide et synchrone de la contraction en réponse à la dépolarisation de la membrane et à l'entrée d'ions Ca²⁺ dans le cytosol. *Adapté de Karbassi et al. 2020.*

III. Impacts du métabolisme oxydatif sur la maturation des cardiomyocytes

A. L'élévation de la production de ROS à la naissance participe à la transition vers la croissance hypertrophique des cardiomyocytes

Plusieurs études ont permis d'établir un lien entre l'élévation de l'activité du métabolisme oxydatif pendant la période périnatale et la maturation des cardiomyocytes. D'une part, la supplémentation en acides gras du milieu de culture de cardiomyocytes dérivés d'iPSCs stimule leur hypertrophie, l'alignement des sarcomères, la transition vers une morphologie allongée, la dynamique des potentiels d'action, ainsi que leur force de contraction (Horikoshi *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019). De manière similaire, dans des iPSCs humaines, la stimulation de l'activité AMPK, une voie décrite comme favorisant l'entrée des acides gras dans la mitochondrie, stimule l'activité respiratoire, l'expression d'isoformes matures de protéines sarcomériques (TNNI3, TNNT2) ainsi que l'acquisition d'une morphologie mature du réseau mitochondrial et de la machinerie contractile (Sarikhani *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2021).

De plus, des études pionnières initiées par l'équipe du Dr. H. Sadek ont montré que le maintien de nouveaux-nés murins en conditions hypoxiques (7% O₂) inhibe la transition métabolique néonatale et s'accompagne d'un maintien des caractéristiques immatures des cardiomyocytes, dont la petite taille et l'activité proliférative, jusqu'à au moins P21 (Puente *et al.*, 2014). Des résultats similaires ont été obtenus dans les cardiomyocytes de souriceaux allaités par des mères mutantes pour l'enzyme lipogénique PERK, dont le lait maternel ne contient pas d'acides gras (Cardoso *et al.*, 2020). Ces résultats démontrent que l'augmentation de l'oxydation des acides gras à la naissance joue un rôle critique dans l'arrêt du cycle cellulaire des cardiomyocytes et dans leur maturation. Les travaux du Dr. H. Sadek ont identifié le rôle important des ROS mitochondriaux (mtROS) dans la signalisation redox de la maturation phénotypique. En effet, la transition néonatale vers la β -oxydation induit une augmentation de la production de niveaux de mtROS qui participent à l'arrêt du cycle cellulaire des cardiomyocytes. Ainsi, des traitements pro-oxydants (diquat) entraînent un arrêt prématuré de prolifération (à P3). A l'inverse, la réduction des niveaux de mtROS par

des traitements chimiques (N-acétyl-cystéine) ou génétiques (surexpression d'une catalase adressée à la mitochondrie) retarde la maturation des cardiomyocytes et prolonge leur fenêtre de prolifération. De plus, les modèles d'hypoxie ou de déplétion des acides gras du lait maternel diminuent les niveaux de ROS. Ces données étayent l'idée selon laquelle la perte de potentiel régénératif provoquée par la transition métabolique à la naissance est causée par l'élévation des niveaux de mtROS (Puente *et al.*, 2014; Cardoso *et al.*, 2020).

B. Régulation redox de la maturation des cardiomyocytes

Comme expliqué précédemment, la transition métabolique vers la β -oxydation confère un rendement en ATP élevé assurant la contraction. Néanmoins elle s'accompagne d'une production de ROS plus élevée qui entraîne la maturation et l'arrêt de prolifération (Rosca *et al.*, 2012; Cardoso *et al.*, 2020).

Au moins 2 voies sont impliquées dans la signalisation redox de la maturation. D'une part, le cardiomyocyte néonatal montre une activation ROS-dépendante de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (voie DDR) : les bases présentent des modifications par oxydation (8-oxoG), le recrutement de γ H2A.X est détecté et les niveaux d'ATM phosphorylée augmentent progressivement pendant les 7 premiers jours post-nataux chez la souris (Figure 28) (Puente *et al.*, 2014).

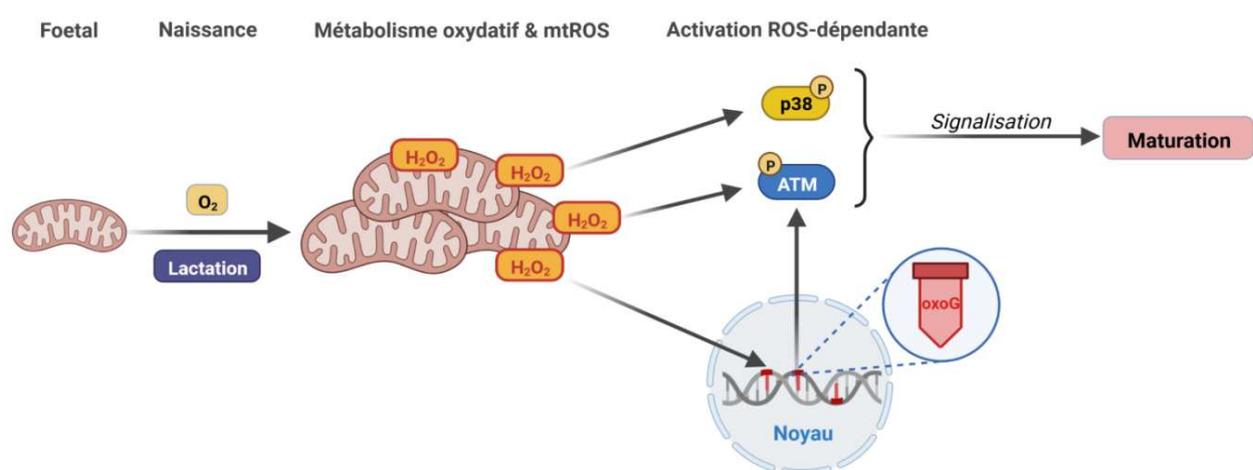


Figure 28. L'induction du métabolisme oxydatif à la naissance stimule la maturation des cardiomyocytes via l'activation ROS-dépendante des voies ATM et p38MAPK. A la naissance, le remodelage métabolique s'accompagne d'une augmentation de la production de mtROS et de l'activation ROS-dépendante de voies de signalisation impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire des cardiomyocytes. Créé avec Biorender.com

D'autre part, la voie p38 α est activée par les mtROS et son activation participe à l'arrêt de prolifération des cardiomyocytes, entraîne leur binucléation et leur hypertrophie pendant la période périnatale (Figure 28) (Engel, 2005; Matsuyama and Kawahara, 2011; Leone and Engel, 2019; Yokota *et al.*, 2020). Bien que l'impact des ROS sur leur activation n'ait pas été étudié, les voies p38 δ et p38 γ sont également impliquées dans la maturation cardiaque et leur surexpression dans le cœur néonatal est associée à une transition métabolique prématurée (Santamans *et al.*, 2021). La voie des p38MAPKs est donc un acteur important de la signalisation redox assurant l'acquisition des phénotypes matures des cardiomyocytes.

C. Signalisation métabolique et activation du programme transcriptionnel néonatal

La maturation du cœur néonatal décrite précédemment implique des modifications de l'expression génique, c'est-à-dire l'activation d'un programme transcriptionnel spécifique de la maturation (Cf. Chapitre 3.2 Maturation néonatale des cardiomyocytes). De plus, le métabolisme mitochondrial participe au contrôle de l'expression génique en fournissant des molécules servant de cofacteurs aux enzymes modulant la compaction de la chromatine (Cf. Chapitre 2.4 : Signalisation métabolique). Ainsi, la transition métabolique à la naissance pourrait participer à l'initiation du programme transcriptionnel néonatal en modifiant l'activité d'enzymes contrôlant l'expression génique.

Le profil de méthylation de l'ADN des cardiomyocytes pendant le développement et après la naissance est dynamique et notamment régulé par les enzymes Dnmt et TET (Gilsbach *et al.*, 2014; Greco *et al.*, 2016). L'activité des TETs augmente pendant la période périnatale et participe à l'hydroxy-méthylation des cytosines (5-hmC) des promoteurs de gènes clefs de la maturation. Ainsi, l'inhibition de l'expression de *Tet2* dans des cardiomyocytes néonataux entraîne un défaut d'expression de gènes impliqués dans la maturation contractile (hypertrophie et réorganisation du sarcomère) et métabolique (biogénèse mitochondriale, activation du cycle de Krebs et β -oxydation) (Greco *et al.*, 2016). Bien que l'expression des TETs augmente légèrement à la naissance (Greco *et al.*, 2016), les mécanismes mis en jeu dans la régulation de leur activité ne sont pas élucidés. Ainsi, l'élévation de l'activité du cycle de Krebs provoquée par l'apport en O₂ et en acides gras pourrait permettre une

augmentation de la synthèse d' α -cétoglutarate et donc stimuler l'activité des TETs, qui utilisent ce dernier comme co-facteur.

D. Maturation et régulation de la prolifération des cardiomyocytes

1. Immaturité métabolique des cardiomyocytes prolifératifs

Une étude transcriptomique sur cellules uniques a permis l'identification d'une population de cardiomyocytes murins persistant jusqu'à P7 et responsable de la capacité régénérative du cœur néonatal. Cette population, qui se caractérise par un fort niveau d'expression des systèmes antioxydants est capable, en réponse à une ischémie, de réprimer le métabolisme oxydatif au profit de la glycolyse, préalablement à l'activation des gènes associés à la prolifération (Cui *et al.*, 2020).

Tout comme la régénération chez le mammifère néonatal, la régénération cardiaque du poisson zèbre adulte est dépendante de la prolifération de cardiomyocytes préexistants, majoritairement diploïdes (González-Rosa *et al.*, 2018). Après ischémie, les cardiomyocytes situés près de la blessure se différencient : les cellules se détachent les unes des autres, leurs sarcomères se désassemblent et des programmes transcriptionnels embryonnaires/fœtaux sont réactivés. Cela permet d'inhiber le métabolisme oxydatif au profit de la glycolyse préalablement à la réentrée en prolifération (Jopling *et al.*, 2010; Honkoop *et al.*, 2019). Ces observations soulignent l'impact du métabolisme oxydatif et et/ou des mtROS sur la maturité des cardiomyocytes et la perte de leur capacité proliférative.

2. Le cœur, un organe post-mitotique ?

Il a longtemps été suggéré que les cardiomyocytes adultes étaient post-mitotiques et que le cœur n'effectuait pas d'auto-renouvellement (Soonpaa and Field, 1998; Hsieh *et al.*, 2007).

En 2009, Bergmann et ses collègues ont exploité les conséquences de l'incorporation de ^{14}C dans l'ADN humain au cours des essais nucléaires effectués pendant la Guerre Froide. En se servant du ^{14}C incorporé dans le génome des cardiomyocytes, ils ont effectué une analyse rétrospective et ont montré que, chez un individu de 75 ans, 39% des cardiomyocytes ont été générés après la naissance, dont 36% pendant la période périnatale. Ainsi, grâce à un

modèle mathématique, ils ont pu conclure à un taux de renouvellement de 0.8% par an chez le jeune adulte, décroissant jusqu'à 0.3% par an chez l'individu âgé de 75 ans (Bergmann *et al.*, 2009, 2015). En utilisant une méthode analogue, Senyo et ses collègues ont démontré l'existence d'un renouvellement des cardiomyocytes murins, avec un taux de 0.76% par an (Senyo *et al.*, 2013).

Des études de lignage ont montré que les cardiomyocytes nouvellement formés sont issus de la prolifération de cardiomyocytes différenciés préexistants (Senyo *et al.*, 2013; Kimura *et al.*, 2015). Les caractéristiques de ces cardiomyocytes maintenant une capacité de prolifération sont remarquables : ils résident loin de la vascularisation et montrent une stabilité élevée de Hif-1 α , ainsi qu'un métabolisme glycolytique. Ils sont également plus petits que leurs équivalents non-prolifératifs et sont mononucléés et diploïdes (Kimura *et al.*, 2015). Ces cardiomyocytes possèdent donc des caractéristiques immatures similaires à celles des cardiomyocytes néonataux.

E. Plasticité des cardiomyocytes adultes

L'étude du cœur de poisson zèbre et de mammifère néonatal, ainsi que la caractérisation phénotypique des cardiomyocytes responsables de l'auto-renouvellement dans le cœur mammifère adulte, ont mis en évidence la relation étroite entre métabolisme oxydatif et maturation des cardiomyocytes. Cette dernière impliquant l'arrêt du cycle cellulaire des cardiomyocytes, plusieurs approches ont été utilisées pour retarder ou inverser cette maturation.

Sur la base de la stabilisation de Hif-1 α dans les cardiomyocytes responsables de l'auto-renouvellement chez l'adulte, l'équipe d'H. Sadek a placé des souris adultes en conditions hypoxiques. Cette expérience a montré que l'inhibition partielle du métabolisme oxydatif aux dépens d'une utilisation accrue de la glycolyse s'accompagne d'une réduction de la production de ROS mitochondriaux et par conséquent d'une absence d'activation de la voie DDR. Les cardiomyocytes issus de ce remodelage métabolique sont plus petits et présentent un taux de binucléation réduit par rapport aux contrôles. Enfin, le pourcentage de cellules prolifératives augmente, ce qui améliore la régénération post-ischémie (Nakada *et al.*, 2017).

Cette étude a ainsi été pionnière dans la démonstration de la plasticité phénotypique des cardiomyocytes à l'âge adulte.

La délétion de *Pdk4* dans les cardiomyocytes adultes (α MHC-Cre :*Pdk4*^{flox/flox}) stimule l'oxydation du glucose aux dépens de celle des acides gras sans inhiber le métabolisme oxydatif (Cardoso *et al.*, 2020). Cette ré-orientation métabolique, qui, contrairement à la condition hypoxique, n'altère pas ou peu la production d'ATP, entraîne une augmentation significative du pourcentage de cardiomyocytes prolifératifs en conditions d'homéostasie, mais aussi après ischémie, permettant une réduction de la zone fibrotique et une restauration de la fonction cardiaque à long terme (Cardoso *et al.*, 2020).

Le récepteur à la neuréguline-1, ErbB2, est exprimé au cours du développement cardiaque des mammifères. Chez le poisson zèbre, sa ré-expression dans les cardiomyocytes est nécessaire pour la régénération cardiaque après ischémie via l'induction d'un métabolisme glycolytique (Honkoop *et al.*, 2019). Chez la souris, la surexpression d'une forme constitutivement active de ErbB2 dans les cardiomyocytes est suffisante pour provoquer une cardiomégalie aux stades néonatal et adulte (D'Uva *et al.*, 2015).

Chez l'adulte, elle entraîne une réexpression de marqueurs foetaux tels que Nkx2.5 et le désassemblage des sarcomères, suggérant une dé-différenciation ou perte de maturation. Celle-ci s'accompagne d'une restauration du potentiel régénératif foetal/néonatal, prouvant ainsi qu'il est possible d'induire un retour au programme immature pour soutenir la prolifération des cardiomyocytes dans le cœur de mammifère adulte (D'Uva *et al.*, 2015).

Enfin, les travaux de Chen ont montré que l'expression transitoire des facteurs de pluripotence (OSKM) dans le cœur adulte entraîne un phénotype similaire, c'est-à-dire la dé-différenciation des cardiomyocytes, leur entrée en prolifération et une restauration de la régénération cardiaque (Chen *et al.*, 2021)

Ces différentes études ont révélé de nombreuses similitudes entre les cardiomyocytes de poissons zèbre et les cardiomyocytes immatures du mammifère. Il est donc possible que le cœur de mammifère adulte soit le fruit d'un compromis évolutif entre la nécessité d'utiliser le métabolisme oxydatif, pour produire l'énergie nécessaire à la contraction, et la capacité de régénération. Les caractéristiques du cœur foetal/néonatal de mammifère pourraient

ainsi être un reliquat d'un fonctionnement ancestral du cœur de vertébré (Elhelaly *et al.*, 2016).

Chapitre 4 : Ucp2, un membre de la famille des protéines découplantes mitochondriales

Ucp2 (Uncoupling protein 2) appartient à la superfamille des échangeurs mitochondriaux (SLC25) et à la famille des protéines découplantes mitochondriales. Au sein de cette famille, dont tous les membres sont localisés dans la membrane interne de la mitochondrie, Ucp1 est le premier à avoir été découvert, et à ce jour le mieux caractérisé (Ricquier, 2017).

I. Ucp1, la protéine clef de la thermogénèse chez les mammifères

Comme indiqué précédemment, la chaîne respiratoire effectue des réactions d'oxydo-réduction et utilise l'énergie libérée pour former un gradient de protons dans l'espace intermembranaire. Ce gradient est ensuite utilisé par l'ATP synthase pour la production d'ATP. Il existe donc un couplage entre l'oxydation O_2 -dépendante des coenzymes réduits NADH et $FADH_2$ par les complexes I et III et la production d'ATP. Pourtant, l'énergie issue du fonctionnement de la chaîne respiratoire ne correspond pas totalement à celle utilisée pour la production d'ATP (Gaspar *et al.*, 2021). Ceci est illustré par l'utilisation de l'oligomycine : en inhibant l'ATP synthase, l'oligomycine entraîne une chute de la consommation d' O_2 qui correspond à la respiration dédiée à la production d'ATP. Cette valeur n'est pas égale à la consommation basale d' O_2 , ce qui indique la présence d'une respiration non-phosphorylative, appelée « fuite de protons » : une partie des protons pompés dans l'espace intermembranaire ne sert pas à la synthèse d'ATP, mais fuit à travers la membrane interne, indiquant un découplage entre respiration et production d'ATP (Divakaruni and Brand, 2011; Bouillaud, Alves-Guerra and Ricquier, 2016). Ainsi, une mitochondrie couplée montre une faible fuite de protons, avec une respiration majoritairement dédiée à la synthèse d'ATP. A l'inverse, une mitochondrie peu couplée présente une fuite de protons importante et une dissipation partielle de l'énergie produite par la chaîne respiratoire sans que cette énergie soit employée à la synthèse d'ATP. Dans le tissu adipeux brun (BAT), un tissu hautement

thermogénique, les mitochondries sont naturellement découplées et l'énergie produite par la chaîne respiratoire sous forme de gradient de protons est utilisée pour la production de chaleur plutôt que d'ATP (Gaspar *et al.*, 2021).

Cette dissipation du gradient de protons est en grande partie provoquée par l'activité d'Ucp1. Celui-ci permet le passage de protons depuis l'espace intermembranaire vers la matrice. Cette fonction produit de la chaleur car elle entraîne l'accélération des réactions thermogéniques du catabolisme permettant de réduire le NAD⁺ et le FADH et de maintenir le potentiel de membrane mitochondrial. Les souris *Ucp1*^{-/-} présentent ainsi une sensibilité accrue au froid (Enerbäck *et al.*, 1997).

II. Ucp2, structure, expression et régulation

A. Structure du gène et de la protéine

UCP2 a été cloné en 1997 sur la base de son homologie avec *UCP1*. Le gène *Ucp2* est localisé sur le chromosome 11 chez l'humain et sur le chromosome 7 chez la souris (Fleury *et al.*, 1997). Il mesure approximativement 8kb et 6.3kb chez l'humain et chez la souris respectivement. Dans les deux espèces, il est composé de 8 exons et le codon d'initiation de la traduction est situé dans l'exon 3, bien que d'autres ATG existent. Les deux protéines possèdent 59% d'homologie, ainsi que des motifs conservés, communs aux transporteurs mitochondriaux ainsi qu'à l'interaction avec l'ATP, ce qui suggère une proximité fonctionnelle (Fleury *et al.*, 1997).

Chez la souris comme chez l'Homme, les gènes *Ucp2* et *Ucp3* sont distants d'un peu moins de 10kb, et leur organisation hautement similaire (exons, introns) suggère un événement de duplication relativement récent. L'homologie des deux protéines est d'ailleurs la plus importante de tous les Ucp, avec une séquence en acides aminés identique à 71% chez l'humain (Vidal-Puig *et al.*, 1997; Pecqueur *et al.*, 1999).

La protéine UCP2 est une protéine de 33kDa et 309 acides aminés possédant une structure en tonneau formée par 3 régions de structures équivalentes composées chacune de 2

domaines transmembranaires (Figure 29). Son repliement ressemble ainsi à d'autres transporteurs mitochondriaux comme le transporteur ADP/ATP (Fleury *et al.*, 1997; Berardi and Chou, 2014).

Les séquences en acides aminé des protéines humaine et murine sont identiques à 95%, témoignant d'une pression de sélection importante, et donc d'une fonction conservée (Fleury *et al.*, 1997).

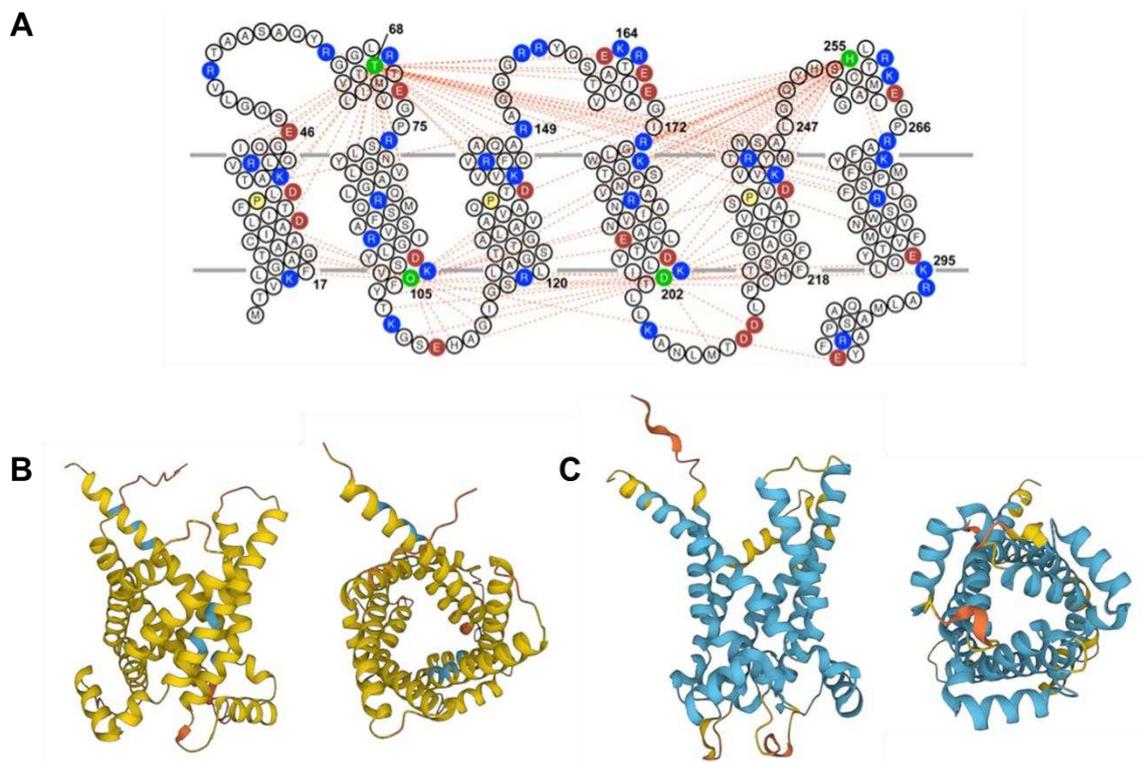


Figure 29. La structure d'Ucp2 présente les caractéristiques des échangeurs mitochondriaux et est similaire à celle d'Ucp1. (A) Séquence et topologie 2D de la protéine UCP2 humaine. La protéine humaine contient 3 régions structurellement équivalentes contenant chacune 2 domaines transmembranaires. Les résidus acides et basiques sont représentés en rouge et bleu respectivement. *Tiré de Berardi et al. 2011.* **(B et C)** Prédiction du repliement et de la structure 3D d'Ucp2 **(B)** et Ucp1 **(C)** murines. On constate la conservation de la structure en tonneau des deux homologues. Les zones en bleu et jaune indiquent respectivement des prédictions à des niveaux de confiance élevés et faibles. *Tiré de <https://alphafold.ebi.ac.uk>*

D'autres protéines apparentées à Ucp1 ont été découvertes chez les mammifères telles que Ucp4 et Bmcp1/Ucp5, mais également dans d'autres clades comme les oiseaux (Avian UCP, avUCP) ou même d'autres phyla comme celui des végétaux (plant UCPs) (Figure 30). Ucp2 et Ucp3 sont fortement apparentés à Ucp1 comparativement à Ucp4 et 5. Ucp4 et Ucp5 sont fortement apparentés entre eux et semblent avoir divergé il y a beaucoup plus longtemps que les autres membres de la famille, avant même d'autres transporteurs mitochondriaux qui ne sont pas considérés comme des protéines découplantes (Figure 30). Cela suggère un rôle différent pour ces protéines (Borecký, Maia and Arruda, 2001; Bouillaud *et al.*, 2001; Nedergaard and Cannon, 2003).

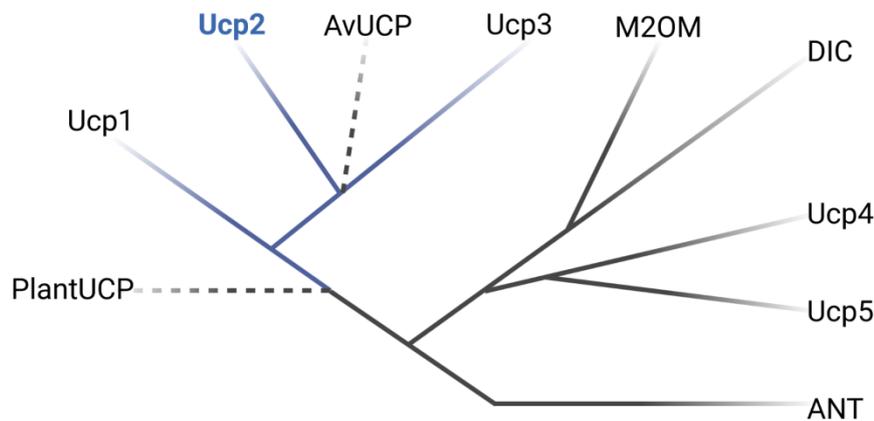


Figure 30. Phylogénie simplifiée d'Ucp2 et de ses homologues. Les traits pointillés indiquent la proximité entre les protéines Ucp provenant de phyla différents des mammifères. Les branches d'Ucp2 et de ses homologues les plus proches sont indiquées en bleu. ANT = Adenine Nucleotide Translocases; M2OM = Mitochondrial 2-oxoglutarate/Malate carrier; DIC = Dicarboxylate carrier. Inspiré de Borecký, Maia and Arruda, 2001 et Nedergaard and Cannon, 2003. Créé avec Biorender.com

B. Régulation de l'expression d'Ucp2

1. Profil d'expression d'Ucp2

Contrairement à *Ucp1* dont l'expression est spécifique du tissu adipeux brun, *Ucp2* est exprimé dans un grand nombre de tissus comme les reins, les poumons, le foie, les muscles du squelette, la moelle osseuse, le système digestif et le cœur (Fleury *et al.*, 1997; Pecqueur *et al.*, 2001; Couplan *et al.*, 2002; van Dierendonck *et al.*, 2020).

Cette expression est indépendante de la température. En revanche, elle augmente dans des souches de souris résistantes à l'obésité, et est induite *in vivo* par un régime riche en graisse (high-fat diet) ou *in vitro* par les acides gras (Fleury *et al.*, 1997; Medvedev *et al.*, 2002; van Dierendonck *et al.*, 2020). Cette réponse s'explique par la présence d'une séquence SRE (Sterol Regulatory Element) dans le promoteur d'*Ucp2*, rendant sa transcription inductible par une augmentation de la concentration d'acides gras ou de cholestérol intracellulaires (Medvedev *et al.*, 2002). L'expression d'*Ucp2* peut par ailleurs être induite par la surexpression de Ppar α , Pgc-1 α , ou par le jeûne, une condition impliquant une limitation de l'utilisation du glucose et une élévation des niveaux d'acides gras circulants (Figure 31) (Cadenas *et al.*, 1999; Tordjman *et al.*, 2002; Oberkofler *et al.*, 2006).

2. Régulation par les microARN

L'ARNm *Ucp2* est régulé par des microARN (miR). A ce jour, 4 miR, le miR-133a, le miR-24-3p, le miR-15a et le miR-503, ont été montrés comme capables de lier spécifiquement l'ARNm d'*Ucp2* et d'entraîner une diminution de ses niveaux *in vitro* et/ou *in vivo* (Chen *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011; Rubattu *et al.*, 2017; Wei, Peng and Shen, 2019). Ce contrôle par les miR semble spécifique d'*Ucp2*. Ainsi, le miR-133a n'affecte pas *Ucp3*, ce qui suggère des implications de ces 2 gènes dans des processus biologiques différents, malgré leur homologie et leur possible redondance fonctionnelle (Figure 31) (Chen *et al.*, 2009).

3. Régulation traductionnelle et profil d'expression de la protéine

Le profil d'expression protéique d'*Ucp2* n'est que partiellement corrélé à son profil d'expression génique, ce qui montre l'importance de sa régulation traductionnelle. Par exemple, bien que les niveaux de l'ARNm *Ucp2* soient élevés dans le muscle squelettique adulte, ses niveaux protéiques sont trop faibles pour y être détectés. Chez l'adulte, la protéine *Ucp2* est détectée dans la rate, le poumon, l'estomac, l'intestin, le tissu adipeux blanc, le cerveau et le pancréas (Fleury *et al.*, 1997; Couplan *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2009). Bien que le jeûne n'ait pas d'effet sur l'expression génique dans le poumon et l'estomac, il entraîne une élévation des niveaux protéiques. Ce schéma est également retrouvé dans le poumon en réponse à des injections de LPS (Pecqueur *et al.*, 2001). Dans le cœur, bien que l'ARNm d'*Ucp2* soit détectable à l'âge adulte, son expression protéique est restreinte à la fin du développement foetal et à la période néonatale (Couplan *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2009;

Hilse *et al.*, 2018) (Annexe 11). Cependant, sa ré-expression après ischémie suggère que la disponibilité de l'ARNm *Ucp2* dans le cœur permette une traduction rapide de la protéine en réponse à des stimuli (Wu, Ye, Liu, Yang, J.-W. Ding, *et al.*, 2019).

La traduction d'*Ucp2* augmente en présence de glutamine, substrat utilisé par plusieurs tissus dans lesquels *Ucp2* est détecté, comme l'intestin (Figure 31) (Hurtaud *et al.*, 2006, 2007). Cette traduction inductible d'*Ucp2* met en jeu une seconde ORF en amont de l'ORF codante. Celle-ci possède son propre ATG et coderait pour une séquence de 36 acides aminés (Pecqueur *et al.*, 2001). Bien qu'elle ne semble pas entraîner la traduction d'un peptide, sa présence en amont de l'ORF codante contrôle négativement la traduction de la protéine *Ucp2* (Pecqueur *et al.*, 2001; Hurtaud *et al.*, 2006). La conservation de cette ORF inhibitrice de la souris aux marsupiaux indique une pression de sélection forte sur le contrôle glutamine-dépendant de la traduction d'*Ucp2* (Jastroch, Withers and Klingenspor, 2004; Hurtaud *et al.*, 2007).

L'expression d'*Ucp2* est donc fortement associée au métabolisme et dépendant de la disponibilité des substrats (acides gras et glutamine) dans la cellule ou le tissu (Figure 31).

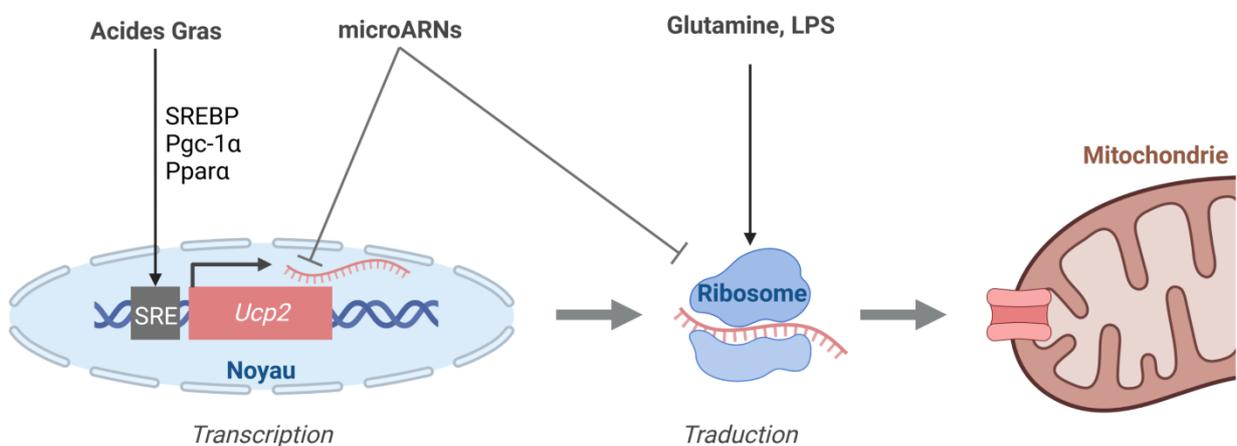


Figure 31. Régulation de l'expression d'*Ucp2* par la disponibilité des substrats, les microARNs et le LPS. L'expression d'*Ucp2* est finement régulée : sa transcription est associée au métabolisme des acides gras via une séquence SRE, et sa traduction est stimulée par la glutamine et le LPS. Enfin, plusieurs microARN participent à la modulation de son expression. Inspiré de Emre and Nübel, 2010. Créé avec Biorender.com

III. Fonction d'Ucp2 et phénotypes associés

A. La conductance protonique effectuée par Ucp2 permet le contrôle de la production de ROS mitochondriaux

1. Conductance protonique d'Ucp2

Sur la base de son homologie avec Ucp1, la communauté s'est initialement intéressée à la fonction découplante d'Ucp2 et à sa capacité à conduire des protons à travers la membrane interne de la mitochondrie. Des modèles de reconstitution de ces membranes dans des levures, chez *E. coli* ou dans des protéo-liposomes, ont permis l'étude de la fonction de la protéine indépendamment du contexte cellulaire natif et sa comparaison avec celle d'UCP1 (Fleury *et al.*, 1997; Jabůrek *et al.*, 1999).

La surexpression d'UCP2 dans des levures est associée à une diminution du potentiel de membrane mitochondrial, ainsi qu'à une augmentation de la respiration basale, deux phénotypes attendus en cas d'augmentation de la conductance protonique (Fleury *et al.*, 1997). Tout comme pour UCP1, la conduction de protons effectuée par UCP2 est stimulée par la présence d'acides gras et est inhibée par les nucléotides (Figure 32) (Jabůrek *et al.*, 1999). Ces observations sont en faveur d'une fonction similaire pour les deux protéines.

L'étude de Berardi *et al* a pu préciser ce mécanisme : Ucp2 est capable de se lier à des acides gras membranaires et possède une activité flippase, c'est-à-dire qu'elle peut entraîner le retournement des acides gras de part et d'autre de la bicouche lipidique (Figure 32). Cette activité flippase est requise pour la translocation de protons à travers la membrane. Les nucléotides sont des inhibiteurs allostériques de l'interaction d'Ucp2 avec les acides gras, entraînant ainsi l'inhibition du passage des protons. Ces observations les ont conduits à proposer un modèle dans lequel les lipides protonés tournés vers l'espace intermembranaire sont flippés par Ucp2 et relâchent le proton qu'ils portent dans la matrice mitochondriale (Figure 32) (Berardi and Chou, 2014).

Contrairement à Ucp1, l'inhibition d'Ucp2 par les nucléotides requiert des concentrations très élevées (de l'ordre du mM), ce qui rend ce processus peu probable en conditions physiologiques, et suggère que l'activité de conductance protonique de ces deux protéines s'effectue dans des contextes cellulaires différents (Berardi and Chou, 2014)

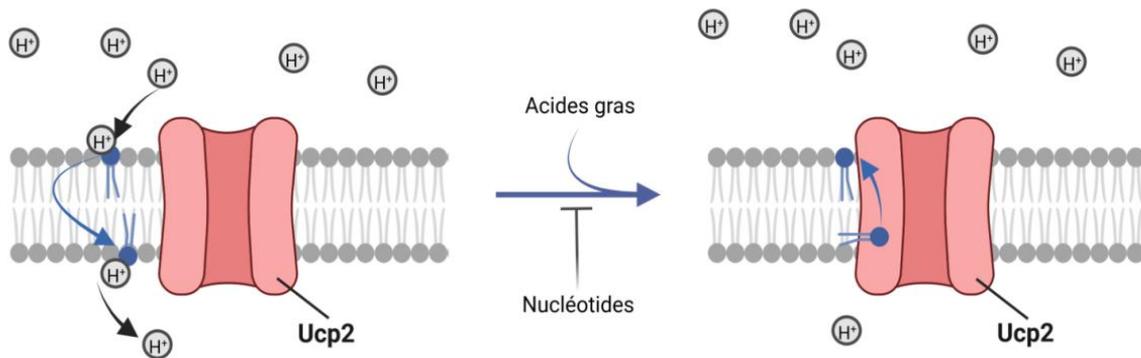


Figure 32. Activité flippase d'Ucp2 et conductance protonique à travers la bicouche lipidique. Inspiré de Berardi and Chou, 2014. Créé avec Biorender.com

2. L'activité découplante d'Ucp2 n'est pas associée à la thermogénèse

Contrairement à Ucp1, l'expression d'Ucp2 ne semble pas correspondre à une production de chaleur. Sa demi-vie très courte, environ 30 minutes, contre 30 heures pour Ucp1, suggère des adaptations rapides de son niveau protéique en réponse à des changements physiologiques aigus, ce qui n'est pas le cas de la production de chaleur, processus adaptatif qui s'étend dans la durée (Rousset *et al.*, 2007).

Un rôle d'Ucp2 dans la stimulation du métabolisme oxydatif du BAT après stimulation adrénergique a été démontré avec notamment des conséquences sur la production de chaleur (Caron *et al.*, 2017). Néanmoins, contrairement aux souris *Ucp1*^{-/-}, les mutants *Ucp2*^{-/-} ne sont pas sensibles au froid ou à l'obésité comme ce qui serait attendu dans le cas de la perte d'une protéine critique dans la thermogénèse (Enerbäck *et al.*, 1997; Denis Arsenijevic *et al.*, 2000). Par conséquent, la fonction première du découplage par Ucp2 ne semble pas être la régulation de la température corporelle.

3. Contrôle du potentiel de membrane mitochondrial et régulation de la production de ROS

Comme indiqué précédemment, la chaîne respiratoire mitochondriale peut laisser échapper des singulets d'électrons depuis les complexes sous forme réduite vers des accepteur O_2 , ce qui forme des anions superoxydes. La production de ROS par la chaîne respiratoire est donc dépendante de la proportion de complexes sous forme réduite et, par extension, du potentiel de membrane mitochondrial (Bouillaud, Alves-Guerra and Ricquier, 2016).

Dans une mitochondrie couplée, la ré-oxydation des complexes est hautement dépendante de la consommation du potentiel de membrane par l'ATP synthase. Ainsi, un ralentissement de l'activité de l'ATP synthase entraîne une augmentation du potentiel de membrane et un ralentissement de la ré-oxydation des complexes, et donc de la production de ROS par la chaîne respiratoire (Figure 33). Il existe donc une relation étroite entre la force protomotrice/potentiel de membrane et la production de mtROS (Murphy, 2009). Diminuer le potentiel de membrane en découplant partiellement la respiration de la synthèse d'ATP constitue donc un mécanisme protecteur en réduisant la production d'anions superoxydes. Ucp2 a donc été proposé, rapidement après sa découverte, comme un régulateur redox capable de moduler la production de mtROS (Nègre-Salvayre *et al.*, 1997).

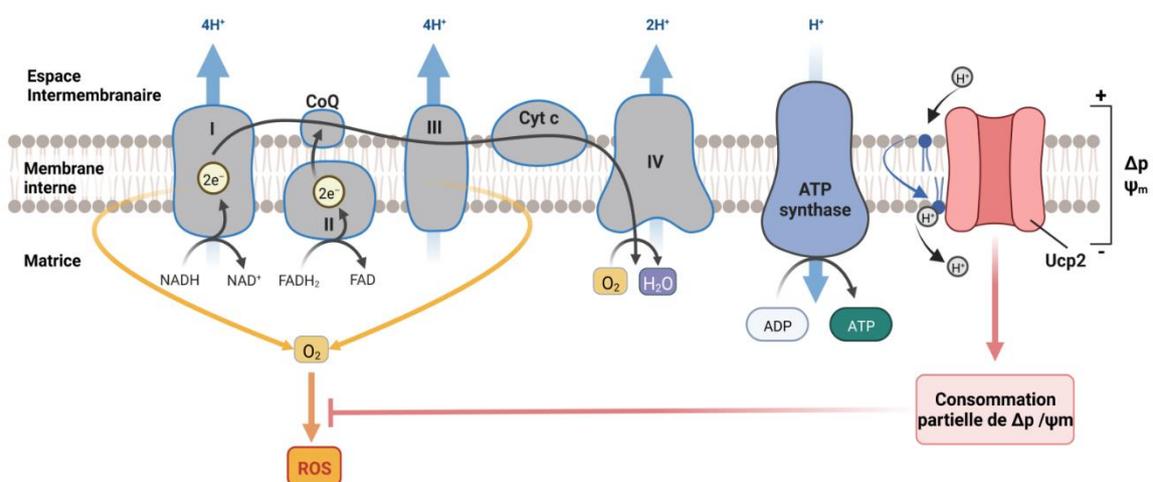


Figure 33. Le découplage partiel effectué par Ucp2 peut réguler le potentiel de membrane (ψ_m) et la production de ROS mitochondriaux. Créé avec Biorender.com

4. Régulation de l'activité découplante par les ROS

Plusieurs études ont montré un lien entre l'expression d'Ucp2 et les niveaux de ROS. Des manipulations sur mitochondries isolées ont mis en évidence que la conductance protonique peut être induite par les anions superoxydes ou des radicaux peroxydes comme le 4-HNE. L'inhibition de ce phénotype par l'ajout de nucléotides a conduit les auteurs à proposer que le découplage observé en présence de ROS ou de radicaux peroxydes soit dû à une activité des protéines découplantes (Echtay *et al.*, 2002, 2003). D'autre part, Mailloux et ses collègues ont démontré qu'Ucp3 peut être inhibé par glutathionylation sur des résidus cystéines spécifiques, et que cette marque est réversible en présence de ROS. Ucp2 est également sujet à une inhibition de son activité découplante par glutathionylation, suggérant une régulation similaire à Ucp3 (Mailloux *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces résultats indique qu'Ucp2, via son activité découplante, pourrait participer à la réponse de la mitochondrie à l'élévation aigüe du niveau de ROS et contribuerait à un mécanisme protecteur face aux déséquilibres de l'état redox.

5. Signalisation et protection via le contrôle des niveaux de ROS par Ucp2

La manipulation de l'expression d'Ucp2 dans différents tissus a montré son rôle en tant que régulateur négatif de la production de ROS par la mitochondrie, et/ou participant au maintien des systèmes antioxydants et de l'état redox de la cellule.

Dans les macrophages de souris *Ucp2*^{-/-}, l'élévation de la production mitochondriale d'O₂⁻ et d'H₂O₂ conduit à une suractivation de la voie Nf-κb, à un phénotype inflammatoire et à une activité phagocytaire plus élevée que chez les contrôles (Denis Arsenijevic *et al.*, 2000; Bai *et al.*, 2005). L'expression d'*Ucp2* est par ailleurs réprimée pour permettre l'élévation des niveaux de ROS et la réponse inflammatoire en réponse à une stimulation au LPS (Emre *et al.*, 2007). Son activité dans le maintien de l'état redox est également critique pour lutter contre l'athérosclérose associée à un régime riche en graisse chez la souris (Moukdar *et al.*, 2009). Dans d'autres tissus comme le cerveau, en régulant l'activité mitochondriale et la production de ROS, Ucp2 agit sur le contrôle de l'appétit par la ghréline (Andrews *et al.*, 2008). Cette protéine agit donc comme un médiateur redox de la réponse aux stimuli hormonaux ou inflammatoires.

Grâce à cette fonction de régulateur redox, Ucp2 a également été associé à des effets protecteurs dans différents types de pathologies. Son expression réduit les dommages rénaux induits par des concentrations élevées en sels (Forte *et al.*, 2021) et confère aux cellules β du pancréas une protection contre le stress oxydant et la glucotoxicité (Li, Karaca and Maechler, 2017). Chez l'humain, certains variants d'*UCP2* sont d'ailleurs associés à des pathologies métaboliques comme le diabète (Li *et al.*, 2019).

Ucp2 joue un rôle de protection dans les ischémies, processus au cours desquels la production de mtROS est centrale dans l'induction de la mort cellulaire. Ainsi, la surexpression de la protéine humaine chez la souris réduit l'apoptose des neurones et les dommages dus à l'ischémie cérébrale en diminuant la production de mtROS (Mattiasson *et al.*, 2003; Haines and Li, 2012). Dans un modèle d'hypoxie/réoxygénation sur la lignée cardiaque H9c2, l'expression d'*Ucp2* est induite et participe au contrôle négatif de la production de ROS mitochondriaux et au maintien de la viabilité cellulaire (McLeod *et al.*, 2005). Enfin, la protéine Ucp2 est également surexprimée dans plusieurs types de cancers humains ou induits chez la souris, et sa perte provoque le déséquilibre de l'état redox des cellules tumorales, entraînant une perte de leur capacité antioxydante (Voza *et al.*, 2014; Aguilar *et al.*, 2019; Raho *et al.*, 2020).

B. Ucp2, protéine découplante, mais également membre de la superfamille des échangeurs mitochondriaux

1. Un autre mécanisme pour Ucp2

En dépit de sa capacité à effectuer la conductance protonique et à contrôler les niveaux de ROS, le mécanisme de fonctionnement d'Ucp2 n'est que partiellement compris, et sa fonction découplante ne permet pas d'expliquer tous les phénotypes associés à son expression ou sa perte d'expression (Cannon *et al.*, 2006; Bouillaud, Alves-Guerra and Ricquier, 2016).

Plusieurs études ont mis en évidence des conséquences de la perte d'Ucp2 sur l'activité mitochondriale sans variation du couplage mitochondrial ou de la production de ROS, ou sans que ces phénotypes puissent s'expliquer uniquement par une régulation de la

conductance protonique (Pecqueur *et al.*, 2008; Kukat *et al.*, 2014; Aguilar *et al.*, 2019).

Des transporteurs mitochondriaux capables d'effectuer de la conductance protonique dépendante des acides gras et inhibée par les nucléotides possèdent aussi des fonctions de transport de métabolites bien caractérisées. C'est le cas de transporteurs structurellement et phylogénétiquement proches des Ucp, comme l'Adenine Nucleotide Translocase (ANT) ou le transporteur d'oxaloacétate chez le champignon *Yarrowia lipolytica* (Brand *et al.*, 2005; Azzu, Parker and Brand, 2008; Luévano-Martínez *et al.*, 2010). Ces données ont permis d'émettre l'hypothèse d'un rôle d'Ucp2 en tant que transporteur de métabolites (Pecqueur *et al.*, 2009; Vozza *et al.*, 2014; Raho *et al.*, 2020).

2. Export de métabolites et import de phosphate inorganique par UCP2

En insérant UCP2 dans des protéo-liposomes reconstitués ou en l'exprimant de manière ectopique dans des levures, Vozza et ses collègues ont démontré sa capacité à échanger des intermédiaires du cycle de Krebs à 4 carbones contre du phosphate inorganique couplé à un proton H^+ (Figure 34). Leurs résultats montrent une spécificité du transport d'UCP2 pour l'aspartate, l'oxaloacétate et le malate, tandis que la perte d'UCP2 dans des lignées cancéreuses entraîne une accumulation mitochondriale de ces intermédiaires (Vozza *et al.*, 2014; Raho *et al.*, 2020). Ucp2 apparaît d'ailleurs comme la seule protéine capable d'échanger l'aspartate contre du phosphate inorganique (Pi) (Palmieri, 2013).

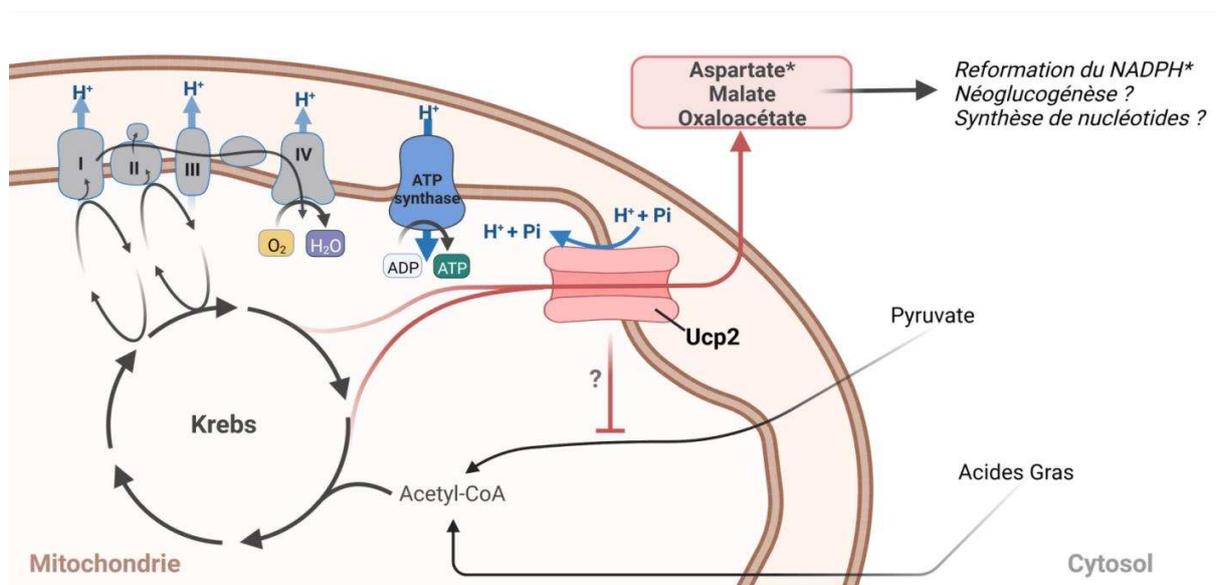


Figure 34. Modèle de l'export de métabolites par Ucp2. Ucp2 peut réguler l'abondance relative des intermédiaires du cycle de Krebs en exportant des métabolites à 4 carbones (aspartate, malate et oxaloacétate) de la matrice vers le cytoplasme. *In vitro*, cet export se fait via l'échange contre du phosphate inorganique et nécessite la présence de protons. « * » indique une preuve du processus *in vivo*. Créé avec Biorender.com

L'effet inducteur des protons suggère que ce transport serait stimulé *in vivo* par le potentiel électrochimique et le gradient de pH existant entre l'espace intermembranaire et la matrice. Ce transport ne serait donc pas actif dans le cas où l'activité mitochondriale est réduite et que le potentiel de membrane est faible. Dans ce modèle, Ucp2 ferait également passer des protons et effectuerait un découplage partiel en consommant le potentiel de membrane.

Outre la consommation du potentiel de membrane, l'export de métabolites, et notamment de malate et d'oxaloacétate en échange de phosphate inorganique, entraînerait une diminution de la quantité relative de certains intermédiaires du cycle de Krebs dans la mitochondrie, tout en réduisant le ratio ATP/ADP. Ces échanges réguleraient négativement l'entrée d'acétyl-CoA dérivé du pyruvate dans le cycle de Krebs et stimuleraient la consommation du potentiel de membrane pour effectuer la synthèse d'ATP. La proportion de complexes de la chaîne respiratoire sous forme réduite diminuerait ainsi que sa production de ROS et ce, sans déperdition d'énergie (Vozza *et al.*, 2014; Bouillaud, Alves-Guerra and Ricquier, 2016). Ceci pourrait expliquer la surexpression d'Ucp2 induite par le jeûne, cet état induisant un processus de néoglucogénèse dépendant de l'export d'intermédiaires du cycle de Krebs (Han *et al.*, 2016).

De plus, le malate cytosolique permet la réduction du NADP⁺ en NADPH, nécessaire à la régénération des systèmes antioxydants. Ce mécanisme lierait ainsi Ucp2 au contrôle des niveaux de ROS par un processus parallèle à celui de sa fonction de découplage.

Cette capacité d'Ucp2 à exporter des métabolites de la matrice vers le cytosol permet donc de fournir des explications alternatives à certains phénotypes observés sans exclure une implication de son activité découplante.

C. Contrôle de l'orientation métabolique de la cellule par Ucp2

Des études récentes ont suggéré un lien entre l'expression d'Ucp2 et l'orientation métabolique d'une cellule, c'est-à-dire la préférence de substrat.

1. Inhibition de l'oxydation du pyruvate par Ucp2

Ucp2 régule négativement l'oxydation du pyruvate issu de la glycolyse au profit de celle des acides gras. Ainsi, Pecqueur et ses collègues ont montré que des MEFs *Ucp2*^{-/-} possèdent une dépendance accrue au glucose caractérisée par une augmentation du flux glycolytique et une diminution de l'oxydation des acides gras. La consommation d'O₂ n'étant pas réduite dans leur modèle, les auteurs proposent qu'en absence d'Ucp2, le pyruvate issu de la glycolyse soit oxydé par la mitochondrie. Ucp2 stimulerait donc l'oxydation des acides gras aux dépens du pyruvate (Pecqueur *et al.*, 2008). Dans un modèle murin de vieillissement prématuré (mtDNA mutator mice), l'expression cardiaque d'Ucp2 est augmentée et ralentit le développement des phénotypes délétères en stimulant l'oxydation des acides gras (Kukat *et al.*, 2014).

UCP2 participe également à la maintenance de la pluripotence des iPSCs humaines (hiPSCs) en inhibant l'oxydation du pyruvate et en favorisant la glycolyse anaérobie. Son expression ectopique conduit à un défaut de différenciation et à la répression du métabolisme oxydatif (Zhang *et al.*, 2011).

Enfin, UCP2 est surexprimé dans plusieurs types de cancers (Ayyasamy *et al.*, 2011; Vozza *et al.*, 2014; Aguilar *et al.*, 2019). L'utilisation de lignées tumorales a montré qu'il peut participer à l'effet Warburg en redirigeant le pyruvate vers la conversion en lactate plutôt que vers l'oxydation. Néanmoins, sa surexpression dans d'autres lignées cancéreuses est associée à une réduction de l'activité glycolytique, ce qui suggère que le contrôle du destin du pyruvate par Ucp2 est dépendant du contexte cellulaire (Esteves *et al.*, 2014).

Cet ensemble de données indique que l'activité d'Ucp2 régule négativement l'oxydation du pyruvate, nécessitant l'utilisation de voies alternatives comme la glycolyse aérobie ou l'oxydation des acides gras. Cet impact sur l'utilisation du glucose peut s'expliquer par son rôle d'export de métabolites comme l'oxaloacétate, accepteur d'acétyl-coA, et dont la disponibilité est nécessaire à l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs. Ucp2 est d'ailleurs associé à la sécrétion d'insuline et au diabète, possiblement via ce rôle d'export de métabolites. L'inhibition de son expression dans les cellules β entraîne la sécrétion d'insuline, tandis que les souris *Ucp2*^{-/-} souffrent d'hyper-insulinémie (Joseph *et al.*, 2002, 2002; Tordjman *et al.*, 2002). Enfin, l'un de ses variants associé à l'hyperinsulinisme chez l'humain montre une réduction importante de sa capacité à exporter les métabolites *in vitro* (González-Barroso *et al.*, 2008; Vozza *et al.*, 2014).

2. Implication d'Ucp2 dans le métabolisme de la glutamine

Comme indiqué précédemment, la traduction d'Ucp2 est dépendante de la glutamine. De plus, les macrophages issus de souris *Ucp2*^{-/-} se caractérisent par une altération du métabolisme de la glutamine ayant pour conséquence une accumulation d'aspartate mitochondrial (Hurtaud *et al.*, 2007; Nübel *et al.*, 2008). Dans plusieurs cas de cancers, le métabolisme de la glutamine, via la glutaminolyse ou plus rarement le GABA shunt, est impliqué dans la croissance tumorale via la production d'intermédiaires du cycle de Krebs qui sont exportés dans le cytoplasme pour participer à la synthèse de molécules (DeBerardinis *et al.*, 2007; Altman, Stine and Dang, 2016). Ce processus, dans lequel Ucp2 a été impliqué, forme également de l'aspartate via une réaction de transamination. Ce dernier est exporté vers le cytoplasme où il participe au maintien de l'état redox des tumeurs via la régénération du NADPH (Voza *et al.*, 2014; Alkan *et al.*, 2018; Raho *et al.*, 2020). De plus, Ucp2, en échangeant l'aspartate contre du phosphate inorganique, pourrait participer à une boucle de régulation positive en stimulant la glutaminolyse phosphate-dépendante (Cassago *et al.*, 2012). Dans des tissus peu glutaminolytiques, l'export de malate issu de l'oxydation d'autres substrats pourrait également participer à la reformation du NADPH par le biais des enzymes maliques (Pongratz *et al.*, 2007).

L'activité d'export d'Ucp2 est donc un élément important du métabolisme de la glutamine et participe au maintien de l'état redox de la cellule en soutenant la régénération des systèmes antioxydants.

D. Dans le cœur, Ucp2 régule le métabolisme, la production de ROS et la dynamique mitochondriale

Dans le cœur, la protéine Ucp2 est détectée à E18, ainsi qu'au cours de la période néonatale, de P1 à P7 (Hilse *et al.*, 2018) (Annexe 11). Une étude récente suggère un rôle dans le maintien de l'activité glycolytique et la capacité de prolifération des cardiomyocytes pendant la période néonatale (Kurian *et al.*, 2021). Chez l'adulte, l'expression protéique d'Ucp2 est indétectable dans les cardiomyocytes en conditions basales, tandis que le gène est très faiblement exprimé (Pecqueur *et al.*, 2001). Cette expression augmente en conditions pathologiques (Kukat *et al.*, 2014; Wu, Ye, Liu, Yang, J.-W. Ding, *et al.*, 2019). Ainsi, elle est induite suite à une ischémie, et sa surexpression est associée à un rôle cardioprotecteur lors

de la reperfusion en stimulant la mitophagie et en contrôlant le potentiel de membrane mitochondrial et sa production de ROS (Wu, Ye, Liu, Yang, J.-W. Ding, *et al.*, 2019). Cet effet protecteur d'Ucp2 après ischémie via la stimulation de la mitophagie a par ailleurs été observé dans d'autres tissus comme le rein (Ding *et al.*, 2019; Forte *et al.*, 2021).

Chez le mutant mtDNA mutator mice, sa surexpression permet de compenser les phénotypes délétères associés à des mutations de l'ADN mitochondrial en stimulant l'oxydation des acides gras (Kukat *et al.*, 2014).

Objectifs des travaux

Chez le mammifère foetal ou néonatal, la régénération cardiaque est dépendante de la prolifération des cardiomyocytes. A la naissance, les cardiomyocytes acquièrent leur capacité oxydative et leur organisation sarcomérique mature. Ils quittent le cycle cellulaire et le potentiel régénératif cardiaque est progressivement perdu. A l'âge adulte, une faible proportion de cardiomyocytes assure leur autorenouvellement. Ces cardiomyocytes, qui maintiennent une capacité de prolifération, conservent également d'autres caractéristiques immatures : leur taille est réduite, leur machinerie contractile n'est pas organisée longitudinalement et leur métabolisme est glycolytique.

Chez le poisson zèbre et le mammifère néonatal, tous deux capables de régénération cardiaque, un prérequis à l'entrée des cardiomyocytes en prolifération est l'inhibition du métabolisme oxydatif au profit de la glycolyse. Ainsi, tandis que le métabolisme oxydatif constitue la source principale d'ATP soutenant la fonction contractile cardiaque, il apparaît aussi comme un médiateur important de la maturité biochimique et contractile des cardiomyocytes. En vue du développement d'approches thérapeutiques, la compréhension des interactions entre le métabolisme mitochondrial et le phénotype des cardiomyocytes pourrait ainsi permettre de modéliser des pathologies cardiaques en améliorant l'efficacité des protocoles de différenciation *in vitro* de cardiomyocytes dérivés d'iPSCs, ou de stimuler leur prolifération *in vivo* pour induire la régénération cardiaque.

Dans ce but, mes travaux de thèse se sont concentrés sur le modèle du cœur néonatal et sur la régulation de son métabolisme par Ucp2.

Ucp2, ou protéine découplante 2 (Uncoupling protein 2) est une protéine de la membrane interne de la mitochondrie, membre de la superfamille des transporteurs mitochondriaux, et homologue d'Ucp1, responsable de thermogénèse dans le tissu adipeux brun. Bien que le fonctionnement d'Ucp2 soit encore sujet à controverse, deux mécanismes d'action non mutuellement exclusifs émergent. (1) Ucp2 peut consommer partiellement le potentiel de membrane mitochondrial en effectuant de la conductance protonique de l'espace intermembranaire vers la matrice. Cette fonction d'Ucp2 permet de réguler négativement la production de ROS par la chaîne respiratoire, cette dernière étant dépendante du potentiel

de membrane. (2) Ucp2 peut exporter des intermédiaires métaboliques de la matrice vers le cytoplasme. Par ce biais, Ucp2 contrôle l'orientation métabolique de la cellule et sa dépendance aux substrats et fournit les intermédiaires nécessaires à des réactions enzymatiques cytosoliques, comme l'aspartate, nécessaire à la régénération du NADPH et des systèmes antioxydants. Ucp2 est donc un régulateur de l'activité mitochondriale et de l'état redox de la cellule.

Ucp2 est faiblement exprimé dans le cœur fœtal et adulte, et montre un pic d'expression à la naissance, lorsque l'oxydation des acides gras devient centrale pour la production d'ATP des cardiomyocytes. A l'aide d'un modèle murin déficient pour Ucp2 (*Ucp2^{-/-}*) et d'un modèle inductible permettant sa délétion dans les cardiomyocytes néonataux *ex vivo* (*Ucp2^{F1/F1}*), les objectifs de mes travaux de thèse étaient de caractériser son rôle dans la régulation métabolique des cardiomyocytes néonataux, ainsi que de déterminer les interactions entre la mitochondrie et le noyau dans le contrôle de la maturation des cardiomyocytes.

Résultats

Partie 1 - La régulation du métabolisme par Ucp2 est requise pour assurer la maturation des cardiomyocytes néonataux

Préambule

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'un Consortium Leducq (Leducq Redox Network), financé par la Fondation du même nom. Ils sont en cours de rédaction pour une soumission à la revue Cell Metabolism. Ils ont été effectués en collaboration avec Marie-Clotilde Alves-Guerra qui nous a fourni les modèles animaux, Jean-François Ouimette qui a effectué l'analyse transcriptomique, Luke Szweda qui a pris en charge l'analyse protéomique par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), et Ivan Nemazanyy qui a effectué l'analyse métabolomique par LC-MS. Tous ces collaborateurs feront partie de la liste des auteurs. La liste des auteurs comprendra également plusieurs membres du laboratoire. Kevin Bassand et moi-même qui partagerons la position de premier auteur ; Rachel Gergondey, qui a effectué l'analyse des profils de carbonylation, ainsi que mes encadrants de thèse qui ont dirigé ce projet, Bertrand Friguet, en avant-dernier auteur, et Aurore L'honoré, en dernière auteure.

I. La perte d'Ucp2 est associée à la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la maturation néonatale des cardiomyocytes

Nous avons dans un premier temps déterminé les profils d'expression géniques des trois principaux membres de la famille Ucp dans le cœur fœtal, néonatal et adulte. Tandis qu'*Ucp1* et *Ucp3* ne sont pas ou peu détectés (Fig. 1A), *Ucp2* présente un profil d'expression dynamique au cours du temps (Fig. 1B). Faiblement exprimé à E16.5, son expression augmente à P1, est maintenue jusqu'à P7, avant de décroître chez l'adulte (Fig. 1B). Ces résultats, qui sont en accord avec les données de Hilse et al. montrant une expression protéique d'Ucp2 à P1 (Hilse et al., 2018) (Annexe 11), suggèrent un rôle de régulation du métabolisme et/ou de l'activité mitochondrial(e) à la naissance, période pendant laquelle les cardiomyocytes initient leur maturation, et où le métabolisme oxydatif devient critique pour la production d'ATP cardiaque (Yatscoff et al., 2008) (Puente et al., 2014; Cui et al., 2020).

Pour déterminer les conséquences de la perte d'Ucp2 dans le cœur néonatal, nous avons analysé le transcriptome de cardiomyocytes P0 contrôles et *Ucp2*^{-/-} par RNA-seq. Ces données, présentées dans les figures 1C et 1D, montrent que la perte d'Ucp2 entraîne une modification de l'expression de 1259 gènes, dont la grande majorité (85%) est sous-exprimée (fold-change seuil = 1.5 ; p-value ajustée < 0.15) (Fig. 1C et 1D). Tandis que l'analyse Gene Ontology n'a pas permis d'identifier des processus significativement enrichis au sein des 191 gènes surexprimés, celle des gènes sous-exprimés a révélé un enrichissement significatif de gènes associés à la régulation de la conduction, de la contraction et du rythme cardiaque, ainsi que de la morphogénèse (Fig. 1D). Une analyse plus fine a notamment démontré la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la transmission de l'influx nerveux de la contraction, dans la fonction mitochondriale, ou codant pour des constituants des Tubules T, des sarcomères et des myofibrilles (Fig. 1D et S1), c'est-à-dire un ensemble de gènes impliqués dans les processus de maturation des cardiomyocytes néonataux.

Au vu de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse d'un défaut de maturation des cardiomyocytes mutants *Ucp2*^{-/-} et avons choisi d'analyser chez ces mutants les différents processus métaboliques et contractiles impliqués dans la maturation néonatale.

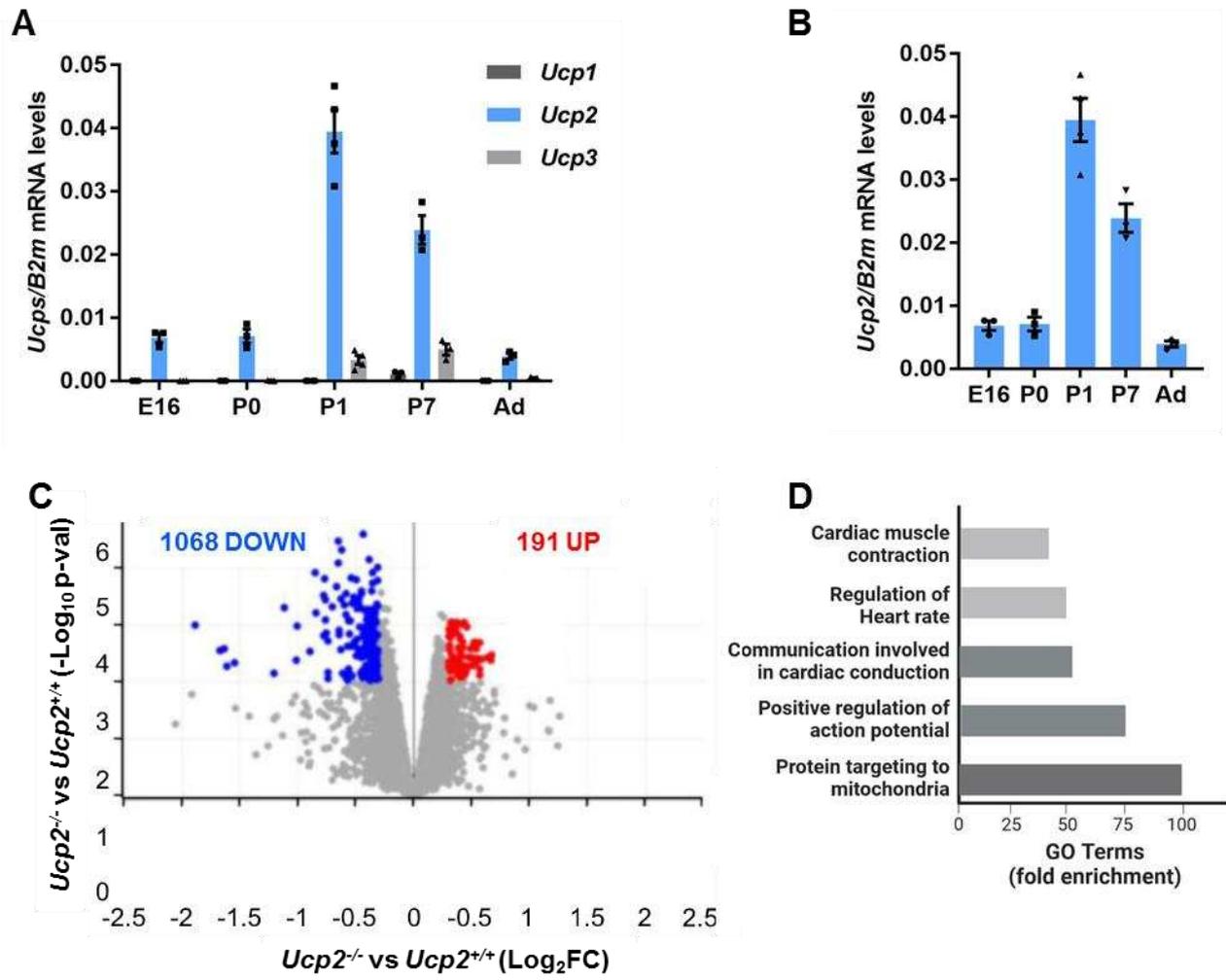


Figure 35. (Figure 1) L'absence d'Ucp2 dans les cardiomyocytes néonataux entraîne une réduction d'expression des gènes associés à la maturation cardiaque (A-B) Profil d'expression des trois gènes Ucp1, 2 et 3 (A), ou d'Ucp2 (B) par RT-qPCR dans le cœur foetal, néonatal et adulte. n=3. (C) Volcano plot représentant les gènes dont l'expression est significativement différente entre les cardiomyocytes contrôles et mutants. (D) Représentation graphique de l'analyse Gene Ontology identifiant des voies significativement enrichies au sein des gènes sous-exprimés dans les cardiomyocytes P0 $Ucp2^{-/-}$ en comparaison des contrôles $Ucp2^{+/+}$. Créé avec Biorender.com

GO biological process complete	Fold enrichment	raw P-value	FDR
ultradian rhythm (GO:0007624)	> 100	7.94E-05	8.29E-03
response to anesthetic (GO:0072347)	> 100	1.32E-04	1.25E-02
membrane depolarization during bundle of His cell action potential (GO:0086048)	> 100	1.32E-04	1.25E-02
cardiac muscle tissue regeneration (GO:0061026)	> 100	1.32E-04	1.24E-02
positive regulation of neuronal action potential (GO:1904457)	> 100	1.98E-04	1.76E-02
protein processing involved in protein targeting to mitochondrion (GO:0006627)	> 100	2.76E-04	2.24E-02
bundle of His cell action potential (GO:0086043)	> 100	2.76E-04	2.23E-02
bundle of His cell to Purkinje myocyte signaling (GO:0086028)	> 100	2.76E-04	2.22E-02
ventricular cardiac muscle cell membrane repolarization (GO:0099625)	90.52	3.67E-04	2.80E-02
cellular response to epinephrine stimulus (GO:0071872)	81.47	1.33E-05	1.92E-03
response to epinephrine (GO:0071871)	81.47	1.33E-05	1.90E-03
regulation of atrial cardiac muscle cell membrane repolarization (GO:0060372)	77.59	4.71E-04	3.36E-02
positive regulation of action potential (GO:0045760)	72.42	6.25E-07	1.73E-04
positive regulation of ryanodine-sensitive calcium-release channel activity (GO:0060316)	67.89	5.87E-04	3.95E-02
negative regulation of mesenchymal cell proliferation (GO:0072201)	67.89	5.87E-04	3.94E-02
regulation of relaxation of cardiac muscle (GO:1901897)	67.89	5.87E-04	3.92E-02
membrane depolarization during cardiac muscle cell action potential (GO:0086012)	67.89	2.10E-05	2.80E-03
bundle of His cell to Purkinje myocyte communication (GO:0086069)	62.67	2.57E-05	3.27E-03
regulation of ryanodine-sensitive calcium-release channel activity (GO:0060314)	54.31	1.69E-06	4.04E-04
cardiac muscle cell action potential (GO:0086001)	51.38	2.36E-10	1.96E-07
cell communication involved in cardiac conduction (GO:0086065)	49.38	5.98E-09	3.14E-06
regulation of heart rate by cardiac conduction (GO:0086091)	47.52	3.84E-10	2.75E-07
cell-cell signaling involved in cardiac conduction (GO:0086019)	47.23	2.77E-06	5.98E-04
regulation of delayed rectifier potassium channel activity (GO:1902259)	42.88	6.97E-05	7.58E-03
regulation of cardiac muscle cell contraction (GO:0086004)	42.88	1.28E-08	6.10E-06
regulation of cardiac muscle cell membrane repolarization (GO:0099623)	41.78	4.28E-06	8.77E-04
regulation of membrane repolarization (GO:0060306)	39.94	3.06E-07	8.78E-05
regulation of ventricular cardiac muscle cell membrane repolarization (GO:0060307)	37.03	1.03E-04	1.02E-02
regulation of actin filament-based movement (GO:1903115)	35.42	3.59E-08	1.45E-05
regulation of calcium ion release into cytosol by sarcoplasmic reticulum (GO:0010880)	35.42	1.16E-04	1.13E-02
regulation of cardiac muscle contraction (GO:0055117)	34.42	1.43E-11	1.74E-08
cardiac muscle cell action potential involved in contraction (GO:0086002)	33.95	9.06E-06	1.43E-03
cardiac conduction (GO:0061337)	33.35	3.60E-09	2.03E-06
membrane depolarization during action potential (GO:0086010)	32.59	1.46E-04	1.34E-02
regulation of action potential (GO:0098900)	31.95	3.55E-10	2.80E-07
regulation of striated muscle contraction (GO:0006942)	30.86	2.69E-12	4.24E-09
mRNA splice site selection (GO:0006376)	30.17	1.80E-04	1.64E-02
regulation of cardiac muscle cell action potential (GO:0098901)	30.17	1.80E-04	1.63E-02
cardiac muscle cell contraction (GO:0086003)	28.59	1.69E-05	2.34E-03
positive regulation of heart rate (GO:001)	26.28	2.62E-04	2.21E-02
regulation of heart rate (GO:0002027)	25.98	1.16E-12	2.29E-09
rhythmic behavior (GO:0007622)	25.46	2.86E-04	2.28E-02
regulation of muscle contraction (GO:0006937)	22.77	4.21E-15	1.33E-11
regulation of heart contraction (GO:0008016)	22.17	5.72E-17	2.26E-13
cellular response to catecholamine stimulus (GO:0071870)	21.55	5.10E-06	9.81E-04
cellular response to monoamine stimulus (GO:0071868)	21.55	5.10E-06	9.69E-04
cellular response to cAMP (GO:0071320)	21.44	4.59E-04	3.30E-02

Figure 36. (Figure S1) L'absence d'Ucp2 dans les cardiomyocytes néonataux entraîne une réduction d'expression des gènes associés à la maturation cardiaque. Liste des voies les plus enrichies parmi celles identifiées par l'analyse Gene Ontology au sein des gènes sous-exprimés dans les cardiomyocytes P0 *Ucp2*^{-/-} en comparaison des contrôles *Ucp2*^{+/+}.

II. Les cardiomyocytes mutants *Ucp2*^{-/-} sont caractérisés par une réduction de la masse mitochondriale et par un défaut de biogénèse mitochondriale

A la naissance, le cœur effectue un remodelage métabolique de la glycolyse vers la phosphorylation oxydative. Cette transition, qui permet une augmentation de la production d'ATP nécessaire à la fonction contractile mature, requiert une induction de la biogénèse et de la masse mitochondriale (Puente *et al.*, 2014). Nos données transcriptomiques ayant montré une diminution de l'expression de *Errg* (codant pour Err-γ) et *Smyd1*, deux gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale cardiaque (Sakamoto *et al.*, 2022, Warren *et al.*, 2018), ainsi que de *Atp50*, *Atpaf2* et *Ndufaf2* impliqués dans l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire (ETC) (Fig. 2A), nous avons quantifié le ratio ADNmitochondrial/ADNnucléaire (ADNmt/ADNnuc) de cœurs néonataux contrôles et *Ucp2*^{-/-} (Fig. 2B) ainsi que de cardiomyocytes purifiés après 72h de culture (Fig. 2C). Tandis qu'à P0, ce ratio est similaire chez les mutants et les contrôles, il est significativement réduit à P3 chez les mutants (Fig. 2B) ainsi que dans les cardiomyocytes purifiés en culture (Fig. 2C). Cette baisse de l'abondance relative du génome mitochondrial chez les mutants s'accompagne d'une diminution de l'expression des sous-unités de la chaîne respiratoire (ETC) qui est détectée à P0 et significative pour l'ensemble des complexes à P3 (Fig. 2D-2G). Pour déterminer si cette réduction de la masse mitochondriale est une conséquence d'un défaut de biogénèse, nous avons quantifié l'expression des principaux acteurs de la biogénèse mitochondriale NRF1, Pgc-1α et Sirt1 dans des ventricules contrôles et mutants à P0 et P3. Tandis que l'expression de mARN et protéique de Pgc1α est déjà réduite à P0 (Fig. 2H et S2A) dans les cœurs et les cardiomyocytes mutants par rapport aux contrôles, les niveaux de NRF1 et de Sirt1 diminuent à P0 (Fig. S2B-D) et sont significativement altérés dans les cœurs mutants à P3 (Fig. S2B-D). Cette réduction de l'expression de Sirt1 s'accompagne d'une diminution des quantités relative de NAD⁺, suggérant une réduction de son activité (Fig. S2E). Ces données montrent que la perte d'*Ucp2* entraîne une altération de la biogénèse mitochondriale après la naissance, responsable d'une absence d'induction de la masse mitochondriale chez les cœurs mutants par rapport aux contrôles.

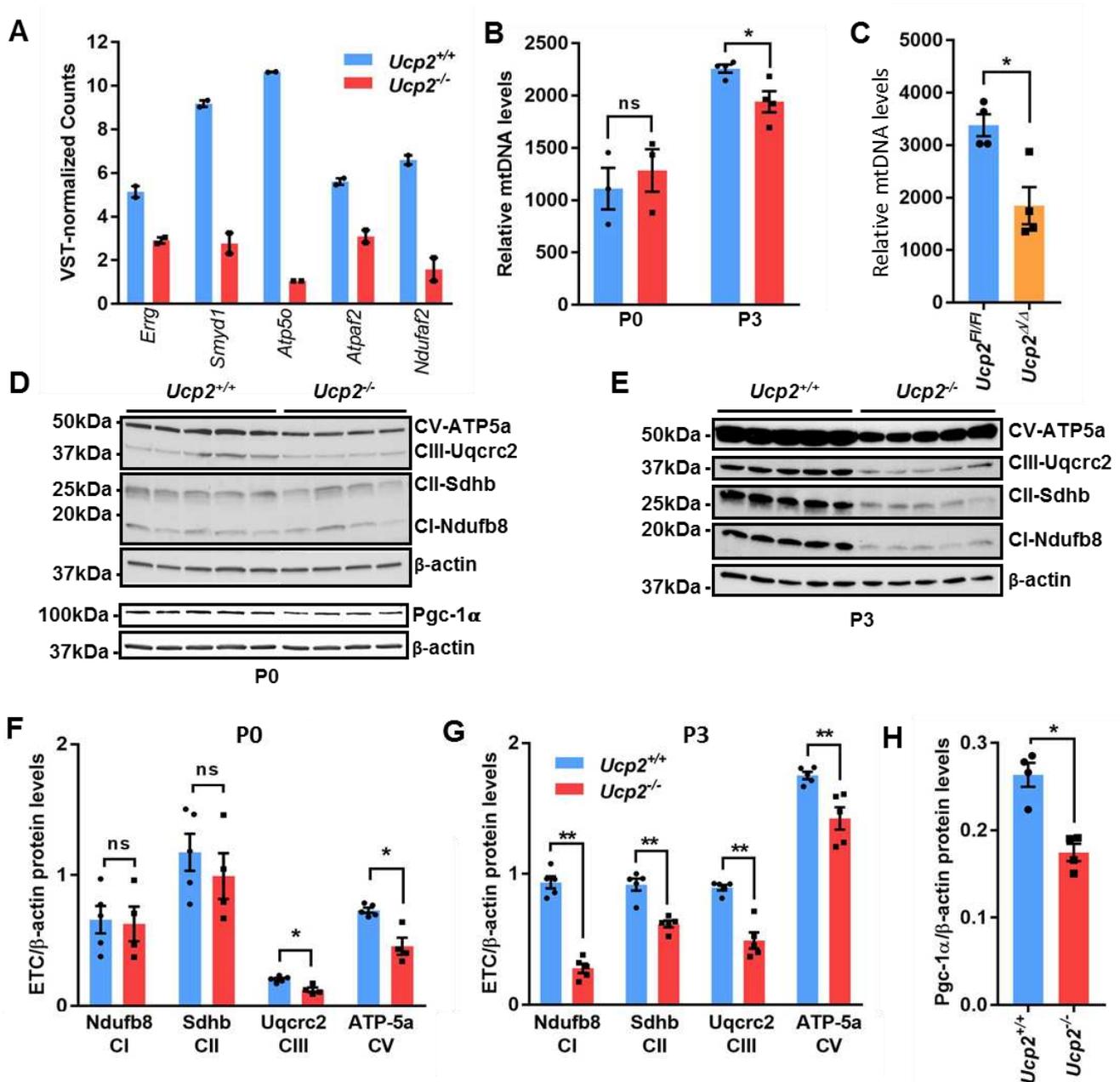


Figure 37. (Figure 2) Les cardiomyocytes néonataux *Ucp2*^{-/-} présentent une réduction de la masse mitochondriale ainsi que de l'expression des acteurs de la biogénèse mitochondriale. (A) Quantification par RNAseq de l'expression de gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale et dans l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (ETC). Données exprimées en nombre de reads normalisés par la méthode *Variance Stabilizing Transformation* (VST). (B-C) Mesure par qPCR du ratio mtADN/nucADN (*Cytb*, mitochondrial/*Ndufv1*, nucléaire) dans des ventricules contrôles et mutants à P0 et P3 (B) ou dans des cardiomyocytes contrôles *Ucp2*^{Fl/Fl} et mutants *Ucp2*^{Δ/Δ} après 72h de culture (C). (D-G) Western-blot (D, E) et quantification (F, G) de l'expression protéique de Ndufb8 (CI), Sdhb (CII), Uqcrc2 (CIII), ATP-5a (CV) des complexes de l'ETC dans des ventricules contrôles et mutants à P0 (D, F) et P3 (E, G). (H) Quantification de l'expression protéique de Pgc-1α dans des ventricules contrôles et mutants à P3. (A-C, F-H) Les données sont représentées en tant que moyenne +/- SEM. * = p-value < 0,05 ; ** = p-value < 0,01.

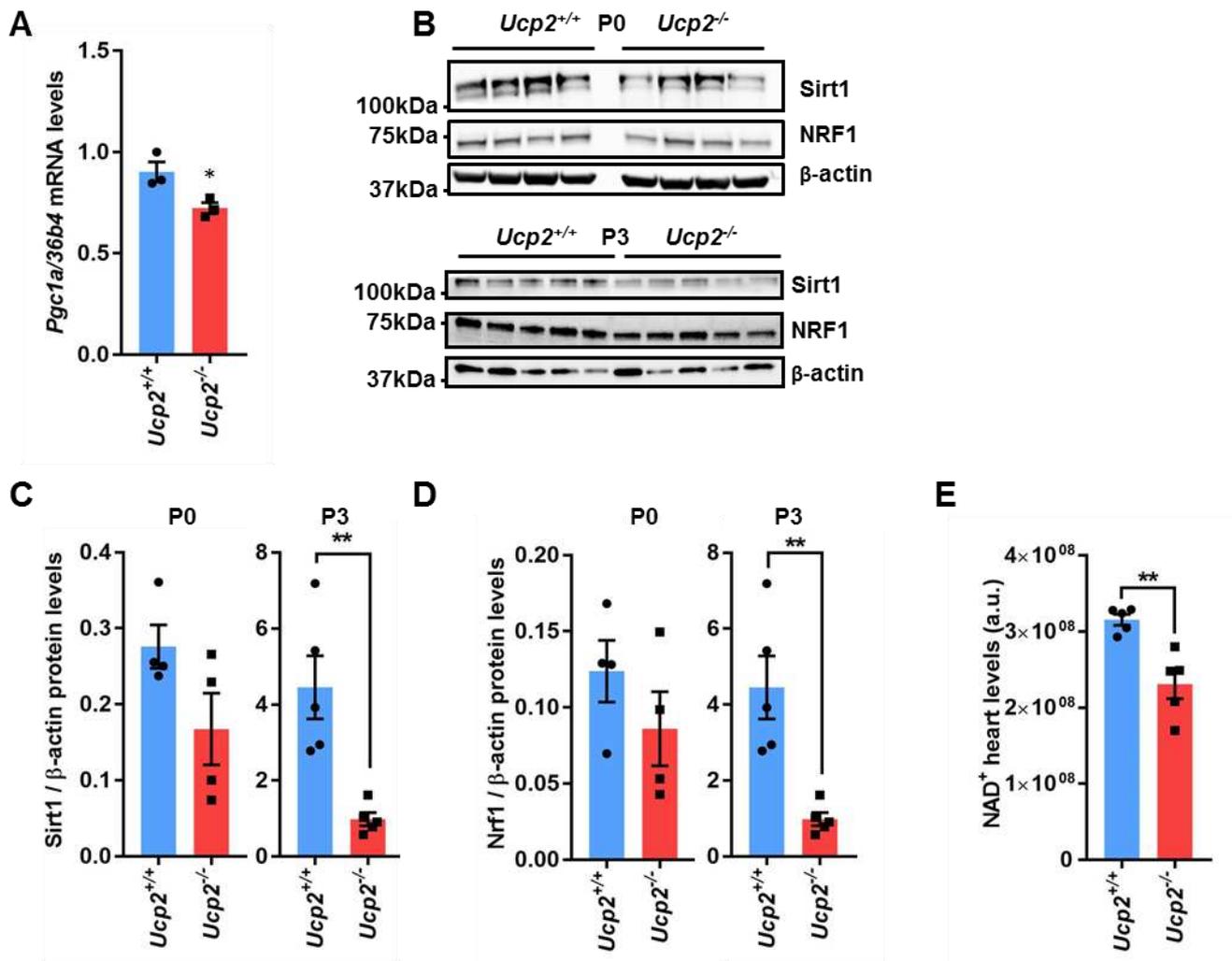


Figure 38. (Figure S2) Les cardiomyocytes néonataux *Ucp2*^{-/-} se caractérisent par une réduction de l'expression des protéines Sirt1 et NRF1 impliquées dans la biogénèse mitochondriale. (A) Mesure par RT-qPCR de l'expression de *Pgc1-α* dans des cardiomyocytes contrôles et mutants à P0. (B- D) Western-blot (B) et Quantification (C, D) de l'expression protéique de Sirt1 (C) et NRF1 (D) dans des ventricules cardiaques contrôles et mutants à P0 et P3 (E) Quantification par LC-MS des niveaux relatifs de NAD⁺ dans des ventricules contrôles et mutants à P3. (A, C-E) Les données sont représentées en tant que moyenne +/- SEM. * = p-value < 0,05 ; ** = p-value < 0,01.

III. Les cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} néonataux présentent une altération du métabolisme énergétique.

Au vu de la réduction de masse mitochondriale des cardiomyocytes mutants, nous avons ensuite déterminé les conséquences de cette réduction sur leur métabolisme énergétique à l'aide du Seahorse XF^e24. Comme attendu, les cardiomyocytes *Ucp2*^{Δ/Δ} présentent une réduction importante des différents paramètres de la respiration (Fig. 3A), c'est-à-dire la consommation d'O₂ (OCR) basale, maximale, et dédiée à la synthèse d'ATP (Fig. 3B). De façon surprenante, cette altération du métabolisme oxydatif n'est pas associée à une activité glycolytique accrue (Fig 3C). En effet, l'analyse du taux d'acidification extracellulaire (ECAR) montre qu'en dépit d'une augmentation des niveaux de lactate dans les ventricules mutants (Fig. 3E), les cardiomyocytes *Ucp2*^{Δ/Δ} possèdent une capacité glycolytique basale et maximale significativement réduites par rapport aux contrôles (Fig 3D). Cette incapacité à compenser la baisse d'activité respiratoire par la glycolyse peut s'expliquer par l'augmentation du ratio NADH/NAD⁺ (Fig 3F), suggérant une inhibition du flux glycolytique, ainsi que par la réduction de l'expression de la glucokinase (*Gck*) et de l'hexokinase2 (*Hk2*) (Fig 3G), deux enzymes dont l'expression est spécifiquement induite lors de la maturation néonatale des cardiomyocytes (Calmettes *et al.*, 2013; Barisón *et al.*, 2021). Ces altérations du métabolisme énergétique entraînent une diminution importante du ratio ATP/ADP dans les cardiomyocytes mutants à P0 ainsi que dans les ventricules mutants à P3 (Fig. 3H et Annexe 3/4). Ces résultats montrent que l'incapacité des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} à initier la biogénèse mitochondriale pendant la période néonatale est associée à une altération du métabolisme et à un déficit énergétique.

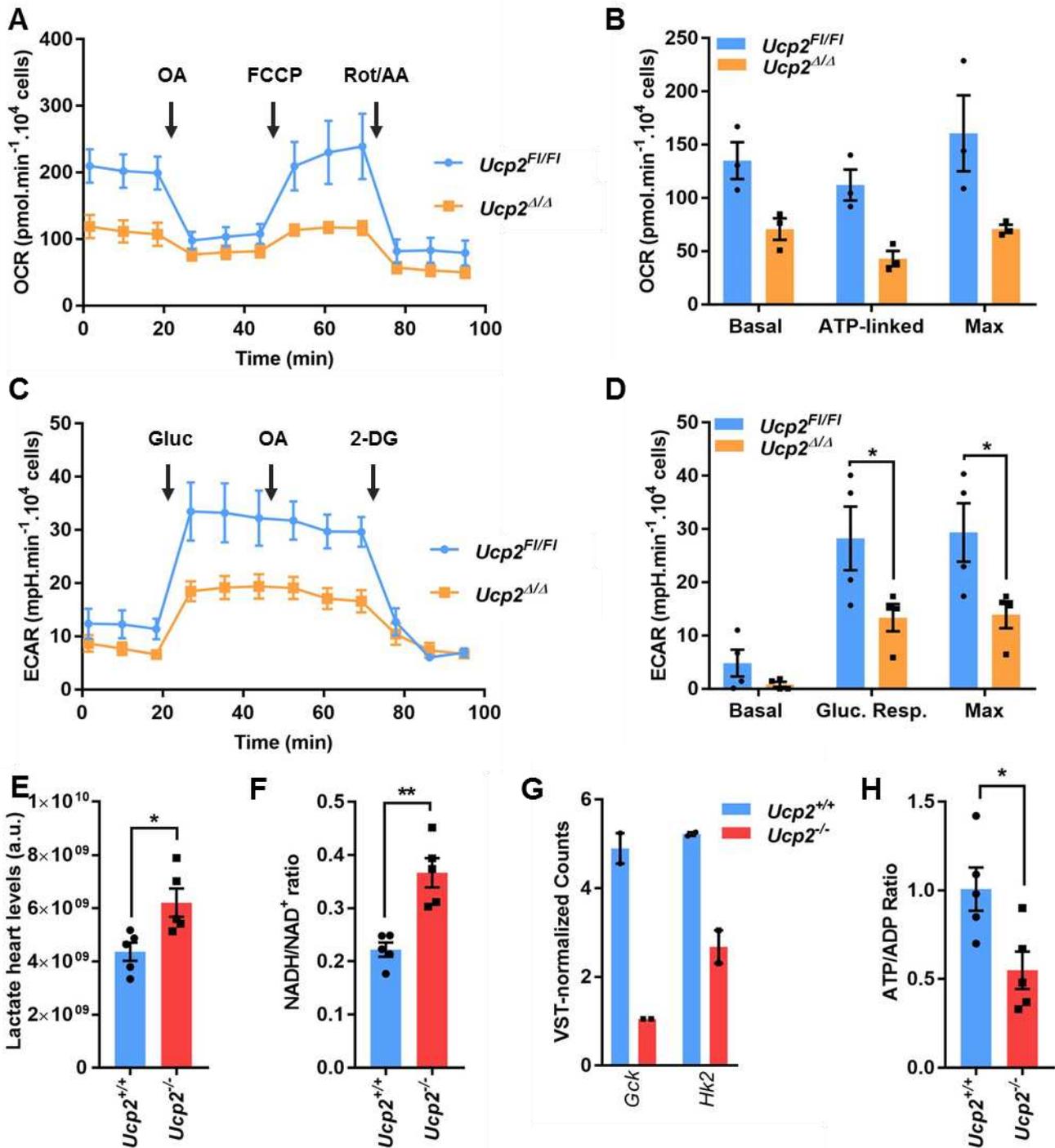


Figure 39. (Figure 3) Le métabolisme énergétique des cardiomyocytes néonataux est altéré en absence d'Ucp2. (A) Courbe représentative de la consommation d'O₂ (OCR) de cardiomyocytes P0 (72h de culture) contrôles *Ucp2^{F1/F1}* et mutants *Ucp2^{F1/F1};AdCRE (Ucp2^{Δ/Δ})* en réponse à l'ajout successif d'Oligomycine A (OA), de FCCP, de Roténone (Rot) et d'Antimycine (AA). (B) Paramètres OCR calculés à partir de (A). (C) Courbe d'acidification extracellulaire (ECAR) de cardiomyocytes P0 (72h de culture) contrôles *Ucp2^{F1/F1}* et mutants *Ucp2^{F1/F1};AdCRE (Ucp2^{Δ/Δ})* en réponse à l'ajout successif de Glucose (Gluc), d'oligomycine A (OA) et de 2-déoxyglucose (2-DG). (D) Paramètres ECAR calculés à partir de (C). (E) Niveaux relatifs de lactate quantifiés par LC-MS à partir de ventricules contrôles et mutants à P3. (F) Ratio NADH/NAD⁺ quantifié par LC-MS à partir de ventricules contrôles et mutants à P3. (G) Quantification par RNAseq de l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse. Données exprimées en nombre de reads normalisés par la méthode *Variance Stabilizing Transformation (VST)*. (H) Ratio ATP/ADP dans des cardiomyocytes P0. (B, D, E-H) Les données sont représentées en tant que moyenne +/- SEM. * = p-value < 0,05 ; ** = p-value < 0,01.

IV. L'absence d'Ucp2 dans les cardiomyocytes néonataux inhibe leur transition métabolique vers la β -oxydation et l'activation de la signalisation redox

Durant la période néonatale, l'induction du métabolisme oxydatif des cardiomyocytes s'accompagne d'un changement de substrat, avec l'acquisition d'une dépendance accrue aux acides gras aux dépens du glucose (Yatscoff *et al.*, 2008). Cette activation de la β -oxydation requiert un programme transcriptionnel similaire à celui de la biogénèse mitochondriale avec notamment l'implication de Pgc-1 α et Err- γ (Sakamoto *et al.*, 2022). Au vu de la réduction d'expression de ces deux facteurs (Fig. 2A, 2D, 2H et S2A), et d'activité du métabolisme oxydatif dans les cardiomyocytes mutants (Fig. 3A-B), nous avons émis l'hypothèse d'un défaut de remodelage métabolique des cœurs mutants *Ucp2*^{-/-}.

Une analyse par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) des protéines impliquées dans les principales voies métaboliques a révélé chez les cœurs mutants une maintenance de l'expression de Glut1 et Pfk1 (Fig. S4A et Annexe 6/7), protéines dont l'expression, majoritairement foétale, est normalement réprimée après la naissance au profit de Glut4 et Pfk2 (Wang and Hu, 1991; Puente *et al.*, 2014).

Nous avons également observé une réduction de l'expression de Pdk4 (Fig. S4A et Annexe 6), qui stimule l'oxydation des acides gras en inhibant la conversion du pyruvate en acétyl-CoA (Cardoso *et al.*, 2020), des Carnitine-palmitoyl transférases 1 et 2 (Cpt1b, Cpt2), impliquées dans l'internalisation des acides gras dans la mitochondrie, ainsi que de nombreuses enzymes de la β -oxydation, comme les acyl-CoA et hydroxy-acyl-CoA déshydrogénases (Acads et Hadhs), l'enoyl-CoA hydratase 1 (Ech1) et l'acyl-CoA longue chaîne synthétase (Acsl1) (Fig. 4A et Annexe 5). En outre, la baisse d'expression des protéines Cpt1/2 s'accompagne d'une diminution de l'activation de l'AMPK (Fig. 4B et 4C), qui stimule la β -oxydation via son rôle d'inhibition de l'enzyme ACC et d'activation des Cpt1/2 (Makinde, Gamble and Lopaschuk, 1997; Sarikhani *et al.*, 2020). Cette baisse d'activité AMPK peut par ailleurs s'expliquer par la très forte diminution d'expression de *Cab39l*, qui active Lkb1, un régulateur positif de la phosphorylation d'AMPK (Fig. S4B) (Li *et al.*, 2018).

En parallèle de cette étude par spectrométrie de masse, l'analyse du métabolome de ventricules contrôles et mutants à P3 a révélé chez les mutants une accumulation d'acides gras (Fig. S4C, 4E), ainsi qu'une diminution des quantités relatives des intermédiaires Acyl-CoA-carnitine (Fig. 4D et 4E), révélant une absence d'oxydation des acides gras et leur accumulation dans les cardiomyocytes mutants.

L'ensemble de ces résultats démontre donc un défaut d'activation du métabolisme mitochondrial, et notamment de la β -oxydation dans le cœur néonatal *Ucp2*^{-/-}.

L'activation de la β -oxydation dans le cœur néonatal est requise pour l'augmentation de la synthèse d'ATP des cardiomyocytes, mais aussi de leur production de ROS mitochondriaux. Ces derniers participent à la signalisation redox pendant la maturation, notamment via l'activation de la voie de réponse des dommages à l'ADN (Puente *et al.*, 2014; Cardoso *et al.*, 2020). Comme attendu, les cardiomyocytes mutants se caractérisent par une diminution significative des niveaux de ROS mitochondriaux (mtROS) (Fig. 4G) sans que cela puisse s'expliquer par une altération de l'expression des systèmes antioxydants (Annexe 8). En outre, en dépit d'une diminution de l'expression de la protéase mitochondriale LonP1 chargée de la dégradation des protéines oxydées (Fig. S4E) (Hamon *et al.*, 2020), cette baisse des niveaux de mtROS est corrélée à une réduction des dommages oxydatifs aux protéines dans les cardiomyocytes mutants à P0 et P3 (Fig. 4G, 4H, Fig. S4F) et de l'activation des protéines ATM à P0 (Fig. S4G, S4H) et γ H2A.X à partir de P3 (Fig. S4G, S4I, 4I et 4J) de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR), dont l'activation participe à la signalisation redox initiée par la mitochondrie (Puente *et al.*, 2014; Cardoso *et al.*, 2020).

Ces résultats démontrent donc que la perte d'*Ucp2* dans le cœur néonatal entraîne une absence de maturation métabolique qui s'accompagne d'un défaut d'initiation de la signalisation redox par la mitochondrie.

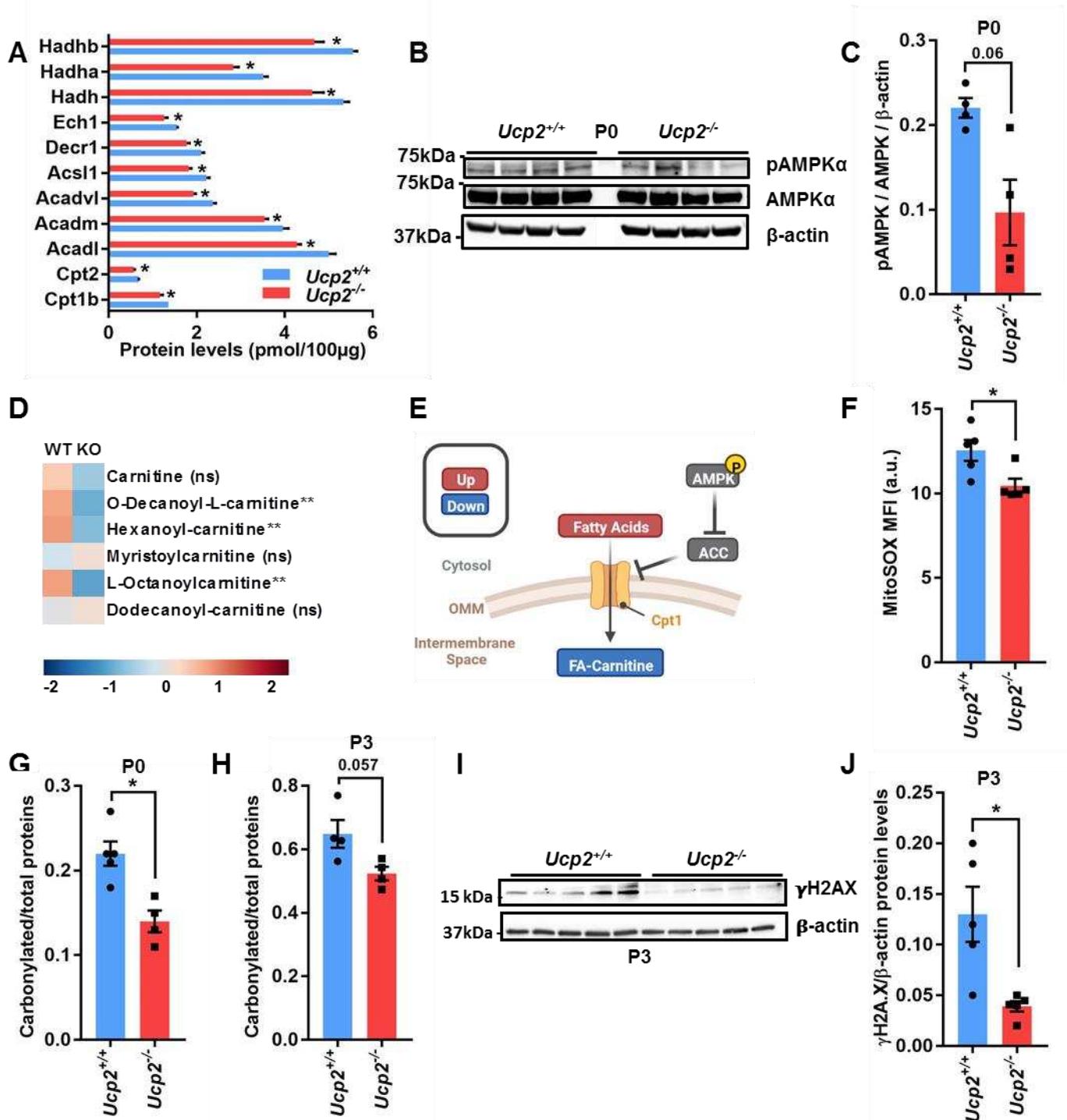


Figure 40. (Figure 4) Le coeur *Ucp2*^{-/-} néonatal se caractérise par un défaut d'activation de la β -oxydation et d'augmentation du niveau de ROS. (A) Analyse quantitative par spectrométrie de masse des enzymes impliquées dans le transport des acides gras et la β -oxydation dans des ventricules contrôles et mutants à P3. (B, C) Western blots (B) et quantification (C) de l'expression protéique pAMPK α et AMPK α dans des ventricules contrôles et mutants à P0 et P3 (D) Heatmap représentant les niveaux relatifs de différents intermédiaires «Acides gras-carnitines» quantifiés par LC-MS dans des ventricules contrôles et mutants à P3. (E) Représentation schématique des données obtenues en (D) Créé avec Biorender.com. (F) Quantification des niveaux de ROS mitochondriaux de cardiomyocytes contrôles et mutants P0 à l'aide de la sonde MitoSOX. (G) Quantification des niveaux de carbonyles totaux de ventricules contrôles et mutants à P0 (G) et P3 (H). (I, J) Western blots (I) et quantification (J) de l'expression protéique γ H2A.X dans des ventricules contrôles et mutants à P3. (A, C-D, F-H, J) Les données sont représentées en tant que moyenne +/- SEM. * = p-value < 0,05; ** = p-value < 0,01.

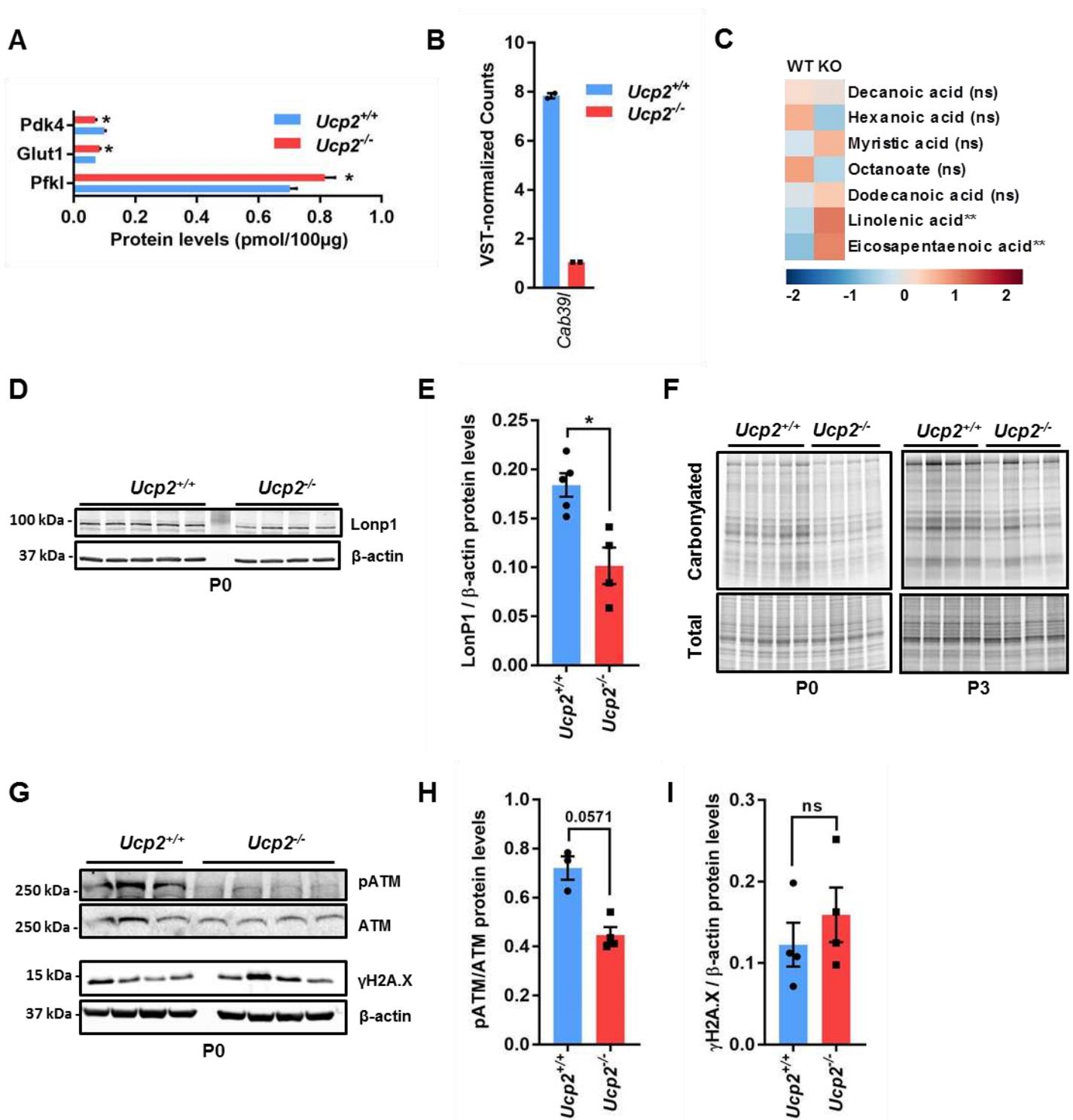


Figure 41. (Figure S4) Le coeur *Ucp2*^{-/-} néonatal se caractérise par un défaut d'activation de la β-oxdation et des voies de réponse aux dommages à l'ADN. (A) Analyse quantitative par spectrométrie de masse des protéines Pdk4, Glut1 et Pfk1 dans des ventricules contrôles et mutants à P3. (B) Quantification par RNAseq de l'expression de *Cab39l*. Données exprimées en nombre de reads normalisés par la méthode *Variance Stabilizing Transformation* (VST). (C) Heatmap représentant les niveaux relatifs de différents acides gras quantifiés par LC-MS dans des ventricules contrôles et mutants à P3. (D, E) Western blot (D) et quantification (E) de l'expression de LonP1 dans des ventricules contrôles et mutants à P3. (F) Oxyblots de ventricules contrôles et mutants à P0. (G-I) Western blot (G) et quantification (H, I) de l'expression de pATM, ATM (H) et γH2A.X (I) dans des ventricules contrôles et mutants à P3. (A-C, E, H-I) Les données sont représentées en tant que moyenne +/- SEM. * = p-value < 0,05.

V. Les cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} se caractérisent par un défaut de maturation contractile

Au cours du développement embryonnaire puis fœtal, les cardiomyocytes participent à la croissance cardiaque par leur prolifération (Sturzu *et al.*, 2015). Après la naissance, la transition métabolique vers la β -oxydation et sa production de ROS associée entraînent la sortie du cycle cellulaire des cardiomyocyte par activation de la voie DDR, et l'initiation d'une croissance hypertrophique (Porrello *et al.*, 2011; Puente *et al.*, 2014). Ce changement, qui est permis par une réorganisation des unités sarcomériques et un allongement des myofibrilles, requiert une augmentation de la synthèse des protéines myofibrillaires, ainsi que l'expression de variants et/ou d'isoformes matures des protéines impliquées dans la régulation de la contraction (Karbassi *et al.*, 2020).

L'étude du transcriptome des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} à P0 a montré une diminution de l'expression des facteurs de transcription et co-activateurs contrôlant l'expression des protéines sarcomériques tels que *FoxP1* (Fig. 5A) (Zhang *et al.*, 2010), *Gata4* (Fig. 5A) et ses partenaires *Errg* (*Err- γ*) (Fig. 2A) et *Pgc1 α* (Fig. 2H, S2A) (Sakamoto *et al.*, 2022), ainsi que de *Mbnl1/2*, *Celf2/4* et *Rbfox1* (Fig. 5B), impliqués dans l'épissage alternatif des ARNs codant pour des protéines sarcomériques (Kalsotra *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2019). Cela s'accompagne d'une réduction de l'expression de gènes codant pour des protéines du cytosquelette comme *Dys*, *Sspn*, *Myl4*, *Myo3a* et *Myo5b* (Fig. 5A) et de la protéine Myh6/MHC- α (Fig. S5A et Annexe 9), qui représente l'isoforme de myosine majoritaire du cœur murin adulte (Nassar, Reedy and Anderson, 1987). Comme attendu, cette baisse d'expression des gènes impliqués dans le développement de la machinerie contractile s'accompagne d'une diminution significative de la taille des cardiomyocytes mutants (Fig. 5C, 5D). Parallèlement à cette absence d'hypertrophie, les cardiomyocytes mutants se caractérisent par une réduction d'expression de nombreux gènes codant pour des sous-unités ou des partenaires de canaux calciques, sodiques et potassiques comme *Cacna* et *Kcnip* (Fig. 5E). Au vu du rôle de ces gènes dans la maturation électrophysiologique des cardiomyocytes, nous avons choisi d'étudier l'activité contractile des cardiomyocytes contrôles et mutants à l'aide du modèle sphéroïde. Ce dernier permet de quantifier la dynamique de contraction et de relaxation de sphéroïdes cardiaques contrôles et mutants après stimulations électriques de fréquences croissantes (Fig. 5F).

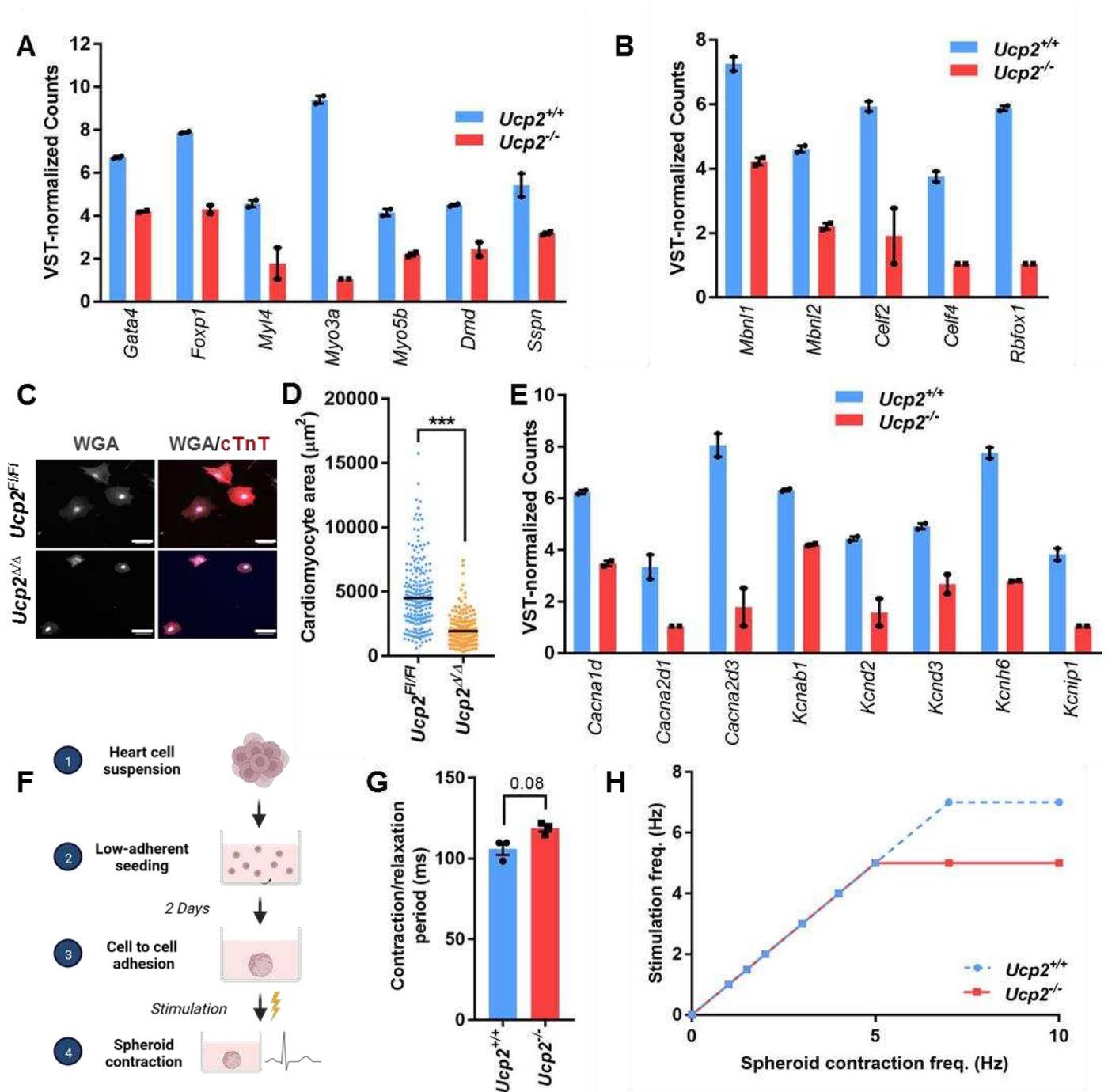


Figure 42. (Figure 5) Les cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} présentent un défaut de maturation contractile. (A, B, E) Quantification par RNAseq de l'expression de gènes codant pour des facteurs de transcription impliqués dans la synthèse des protéines myofibrillaires et pour des protéines sarcomériques du cœur néonatal (A), pour des facteurs d'épissage impliqués dans la maturation contractile (B) et pour des protéines impliquées dans le transport d'ions au cours de la contraction cardiaque (E) dans des cardiomyocytes contrôles et mutants à P0. Données exprimées en nombre de reads normalisés par la méthode *Variance Stabilizing Transformation* (VST). (C) Images représentatives de marquages membranaires (WGA, blanc) et de la troponine T (TnT, rouge) par immunofluorescence de cardiomyocytes contrôles et mutants après 72h de culture. (D) Quantification de la taille de cardiomyocytes contrôles et mutants après 72h de culture. (F) Représentation schématique du protocole d'obtention de sphéroïdes cardiaques à partir de ventricules néonataux contrôles et mutants à P2. (G) Mesure du temps de contraction de sphéroïdes contrôles et mutants en réponse à une stimulation d'intensité et de fréquence constante (n=3). (H) Quantification de la fréquence de contraction de sphéroïdes mutants et contrôles en réponse à des stimulations de fréquences croissantes. (A, B, D, E, G, H) Les données sont représentées en tant que moyenne +/- SEM. *** = p-value < 0,001.

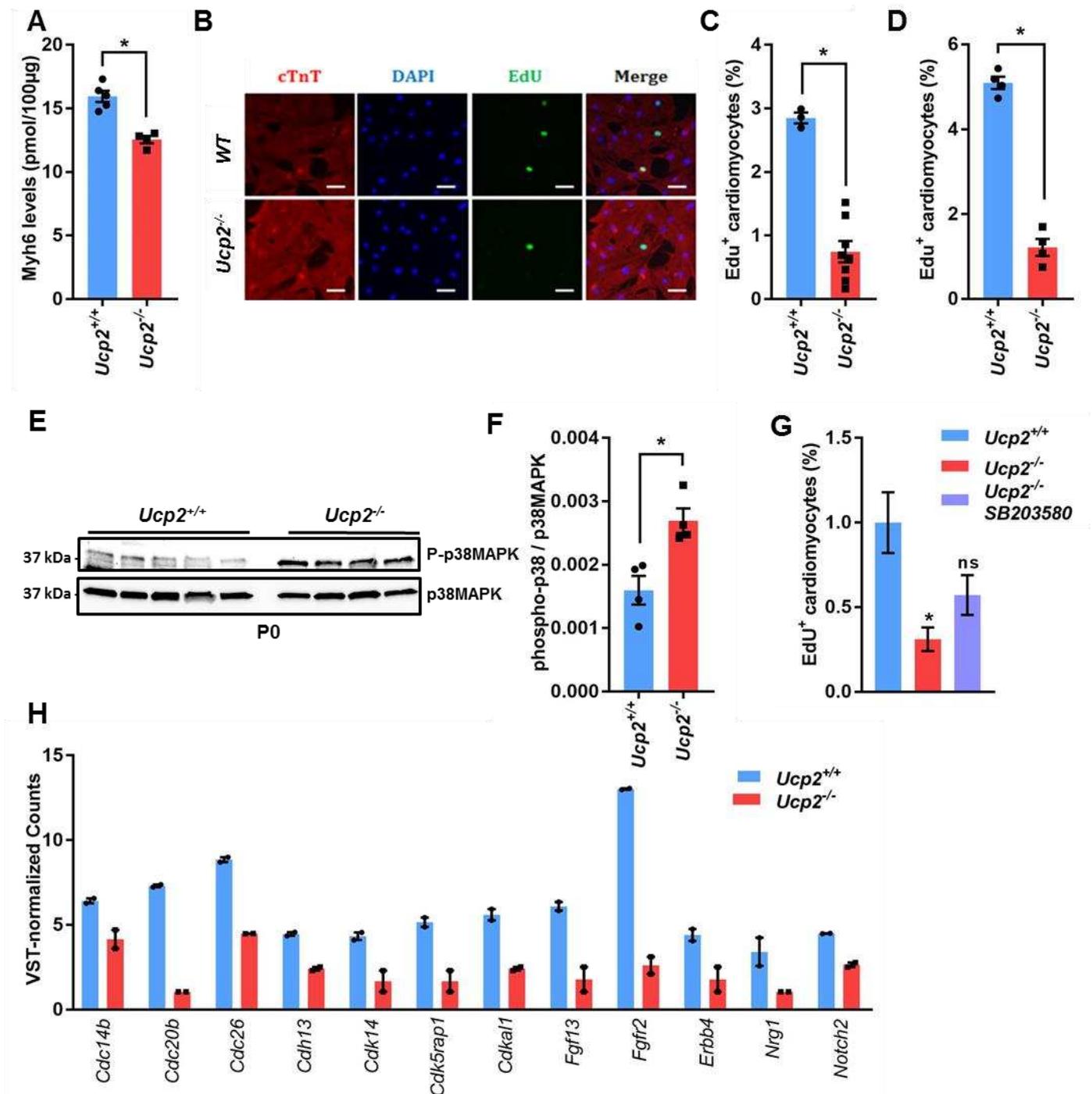


Figure 43. (Figure S5) Les cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} se caractérisent par un défaut de prolifération. (A) Analyse quantitative par spectrométrie de masse de la chaîne lourde de myosine (Myh6/MHC- α) dans des ventricules contrôles et mutants à P3. **(B-D)** Images représentatives **(B)** et quantification du pourcentage de cardiomyocytes (cTnT+) contrôles et mutants ayant incorporé de l'Edu **(C)** *ex vivo* ou **(D)** *in vivo*. **(E, F)** Western blot **(E)** et quantification des niveaux protéiques de phospho-p38MAPK et p38MAPK dans des ventricules contrôles et mutants à P0. **(G)** quantification du pourcentage de cardiomyocytes (cTnT+) contrôles et mutants ayant incorporé de l'Edu *ex vivo* en absence ou présence de l'inhibiteur de la p38MAPK (SB203580, 10 μ M). Données représentées en pourcentage du contrôle. **(F)** Quantification par RNAseq de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire dans les ventricules contrôles et mutants à P3. Données exprimées en nombre de reads normalisés par la méthode *Variance Stabilizing Transformation* (VST). **(A, C, D, F-H)** Les données sont représentées en tant que moyenne \pm SEM. * = p-value < 0,05.

Les sphéroïdes mutants *Ucp2*^{-/-} se caractérisent par un allongement de la période de contraction/relaxation (Fig. 5G) qui se traduit par une incapacité à s'adapter à des fréquences de stimulation supérieures à 5Hz (Fig. 5H). Ces données démontrent que la perte d'Ucp2 induit une dysfonction contractile dans les cardiomyocytes.

L'ensemble de ces résultats démontrent donc que l'absence d'Ucp2 s'accompagne d'un défaut de maturation structurale et contractile des cardiomyocytes néonataux.

Au vu de la diminution du niveau de ROS, de la perte d'activation de la voie DDR et de l'absence d'hypertrophie des mutants *Ucp2*^{-/-}, nous avons ensuite quantifié leur prolifération (Fig. S5B-D). De manière surprenante, les cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} néonataux se caractérisent par une diminution du pourcentage de cellules positives pour l'incorporation EdU par rapport aux contrôles, révélant un défaut de prolifération *ex vivo* (Fig. S5B, S5C) et *in vivo* (Fig. S5D). Cette baisse de prolifération, qui s'accompagne d'une activation de la voie p38MAPK (Fig. S5E, S5F) peut être partiellement compensée par un traitement avec un inhibiteur des p38MAPK, le SB203580 (Fig. S5G), ce qui démontre le rôle de cette voie dans la diminution de l'activité du cycle cellulaire des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-}. En outre, cette diminution de la prolifération, qui se traduit par une réduction de l'expression d'un ensemble de gènes codant pour des cyclines et Cdks (Fig. S5H), peut aussi s'expliquer par la dérégulation de l'expression du corécepteur *ErbB4* et de son ligand *Nrg1* (Fig. S5H), impliqués dans la régulation de la prolifération des cardiomyocytes pendant la période néonatale (D'Uva *et al.*, 2015).

VI. Dans les cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-}, l'altération du métabolisme mitochondrial entraîne une réduction de la quantité relative d' α -cétoglutarate, co-facteur des enzymes TETs

L'ensemble des résultats obtenus ci-dessus démontre que la perte d'*Ucp2* dans les cardiomyocytes néonataux entraîne un défaut de maturation métabolique et contractile. Au vu du rôle d'*Ucp2* dans l'export de métabolites de la matrice vers le cytoplasme, et de la très faible utilisation du glucose (Fig. 3C, 3D, S4A) et des acides gras (Fig. 4A, D, S4C) par les cardiomyocytes mutants, nous avons émis l'hypothèse d'une compensation par une voie métabolique alternative. Pour répondre à cette question, nous avons dans un premier temps quantifié la dépendance respiratoire de cardiomyocytes contrôles et mutants à la glutamine en utilisant le BPTES, un inhibiteur des glutaminases.

Tandis que la respiration maximale des cardiomyocytes contrôles *Ucp2*^{Fl/Fl} apparaît indépendante de la glutamine, suggérant une utilisation majoritaire des acides gras et du pyruvate, les cardiomyocytes mutants *Ucp2*^{Δ/Δ} présentent une réduction d'environ 50% de leur respiration maximale en présence de BPTES (Fig. 6A). Ils possèdent donc une forte dépendance respiratoire à la glutamine. Cette modification de l'orientation métabolique des cardiomyocytes mutants est confirmée par l'analyse métabolomique de ventricules contrôles et mutants à P3. Les cœurs *Ucp2*^{-/-} se caractérisent en effet par des concentrations significativement réduites d'acétyl-CoA (Fig. 6B, 6C et S6C) et d'intermédiaires Acyl-CoA-carnitine (Fig. 4D et 4E) par rapport aux contrôles, confirmant la faible oxydation du glucose et des acides gras par la mitochondrie (Fig. 6A-C). Au contraire, ils présentent une concentration significativement plus élevée de glutamine (Fig. 6B, 6C et S6D), ainsi qu'un déséquilibre des concentrations relatives d'intermédiaires du cycle de Krebs. Ainsi, tandis que les concentrations des intermédiaires à 5 et 6 carbones (citrate, cis-aconitate, α -cétoglutarate) sont significativement réduits (Fig. 6C, 6D et 6E), les intermédiaires à 4 carbones (succinate, fumarate, malate et oxaloacétate) ont des niveaux significativement plus élevés ou inchangés (Fig. 6B, 6E).

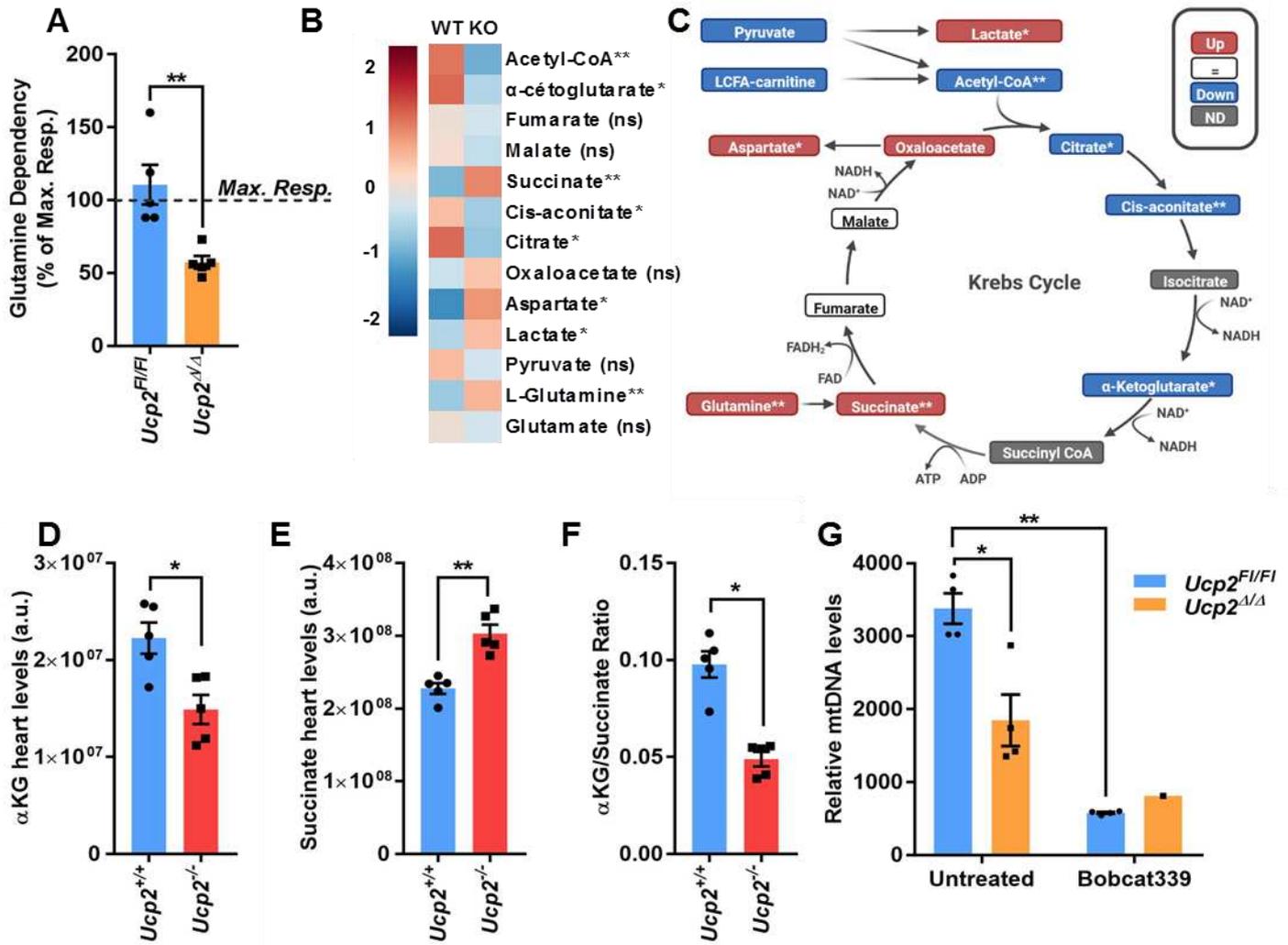


Figure 44. (Figure 6) La dépendance des cœurs *Ucp2^{-/-}* à la glutamine entraîne une disponibilité réduite en α-céto glutarate, utilisé comme cofacteur par les TETs. (A) Dépendance de cardiomyocytes contrôles ou mutants à la glutamine calculée à partir de la respiration maximale en présence de l'inhibiteur des glutaminases BPTES 3μM (A). (B) Heatmap représentant les quantités relatives d'intermédiaires métaboliques du cycle de Krebs mesurées par LC-MS dans des ventricules contrôles et mutants à P3. (C) Représentation schématique des données de (B). Créé avec Biorender.com. (D, E) Niveaux relatifs d'α-KG (D) et de succinate (E) quantifiés par LC-MS dans les ventricules contrôles et mutants à P3. (F) Ratio α-céto glutarate(α-KG)/succinate calculé à partir de (D). (G) Mesure par qPCR du ratio mtADN/nucADN (Cytb, mitochondrial/Ndufv1, nucléaire) dans des cardiomyocytes contrôles cultivés ou non en présence d'un inhibiteur des enzymes TET (Bobcat339). (A-G) Les données sont représentées en tant que moyenne +/- SEM. * = p-value < 0,05 ; ** < 0,01 ; * < 0,001.**

Ces résultats suggèrent le blocage de la première branche du cycle de Krebs, probablement induit par l'absence d'export de métabolites de la matrice vers le cytoplasme normalement effectué par Ucp2. Ils suggèrent également que dans les cardiomyocytes mutants, l'entrée de la glutamine dans le cycle de Krebs se fait sous forme de succinate via le GABA shunt (Fig.

S6A) plutôt que sous forme d' α -cétoglutarate (α -KG) par la glutaminolyse classique (Yogeeswari, Sriram and Vaigundaragavendran, 2005).

Ainsi, l'altération du métabolisme provoquée par la perte d'Ucp2 conduit à un déséquilibre des concentrations relatives d'intermédiaires métaboliques. Parmi ces intermédiaires, certains sont considérés comme des « épi-métabolites » car ils régulent l'activité d'enzymes contrôlant la compaction de la chromatine et l'expression génique (Kinnaird *et al.*, 2016), telles que les TETs ou les histones dé-acétylases et dé-méthylases. De façon intéressante, bien que la régulation de ces enzymes par les intermédiaires métaboliques se fasse majoritairement au niveau de leur activité, un grand nombre d'entre elles sont significativement moins exprimées dans les cardiomyocytes mutants par rapport aux contrôles (Fig. S6E). La plupart des gènes dont l'expression est modifiée dans les cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} sont sous-exprimés (Fig. 1C et 1D). Nous nous sommes donc particulièrement intéressées à la méthylation de l'ADN et aux enzymes TET. En effet, dans les cardiomyocytes néonataux, ces dernières ont été démontrées comme requises pour initier l'activation du programme transcriptionnel de maturation en participant à la dé-méthylation de promoteurs impliqués dans la maturation métabolique (*Ppara*, *Acadm*) et contractile (*Gata*), (Greco *et al.*, 2016). Ces enzymes utilisent l' α -KG comme cofacteur et sont inhibées par le succinate (Xiao *et al.*, 2012). Nous avons émis l'hypothèse que la déplétion en α -KG (Fig. 6B, 6C et 6D), de même que l'accumulation de succinate (Fig. 6B, 6C et 6E) observées dans les cardiomyocytes mutants, en altérant le ratio α -KG/succinate (Fig. 6F) pourrait inhiber l'activité TET, et par conséquent l'activation transcriptionnelle des différents groupes de gènes associés à la maturation. Pour tester cette hypothèse, nous avons cultivé des cardiomyocytes contrôles *Ucp2*^{F1/F1} et mutants *Ucp2* ^{Δ/Δ} avec le Bobcat339, un inhibiteur spécifique des enzymes TET (Chua *et al.*, 2019). Tandis que l'inhibition de l'activité TET entraîne une réduction massive du ratio mtADN/ADNnuc dans les cardiomyocytes contrôles, elle n'a pas d'effet significatif dans les cardiomyocytes mutants (Fig. 6G). Ce résultat, qui confirme que l'activité TET est requise pour l'induction de la biogénèse mitochondriale de cardiomyocytes néonataux contrôles, soutient l'hypothèse selon laquelle le défaut de maturation des cœurs et des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} est provoqué par une baisse d'activité de ces enzymes.

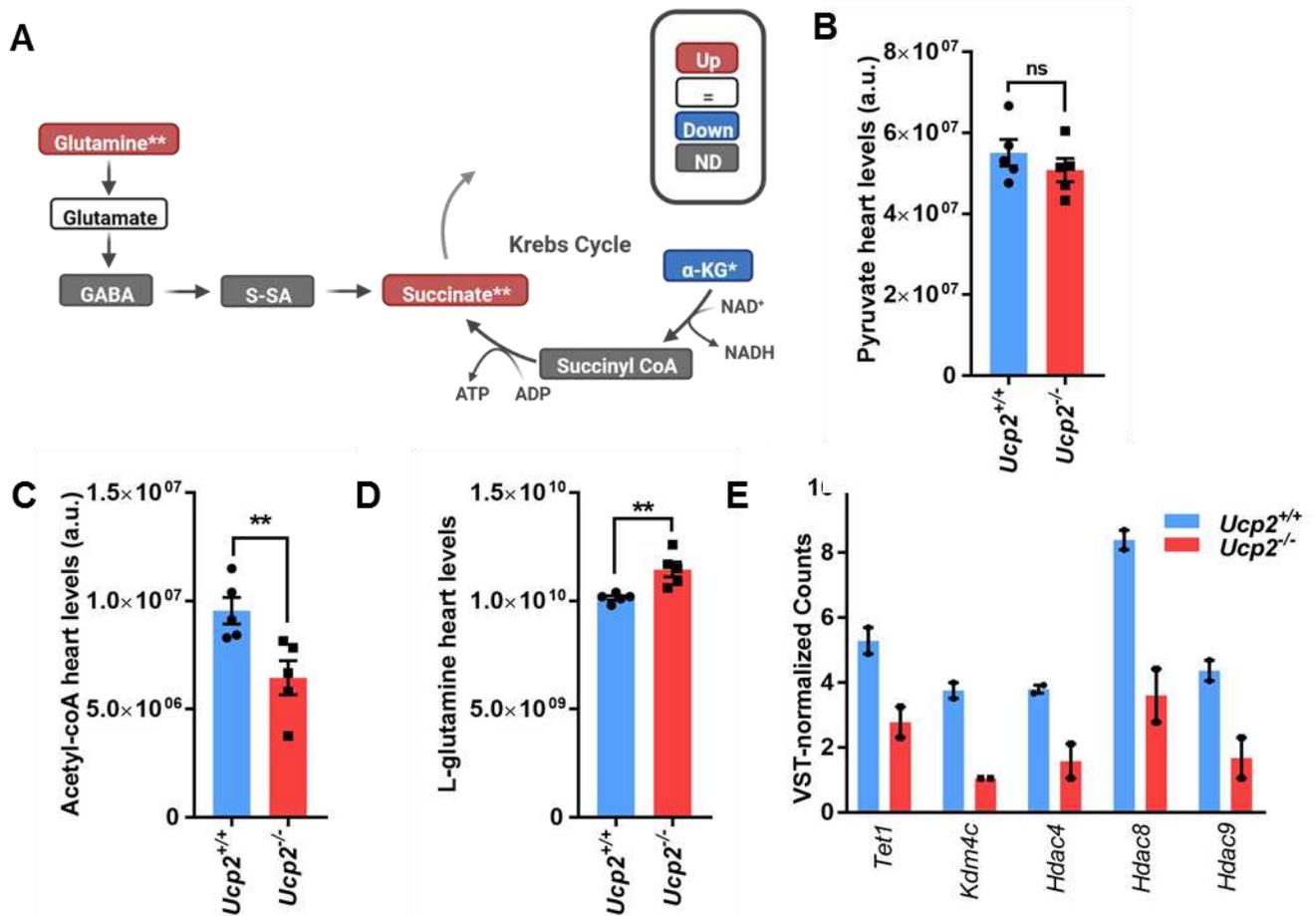


Figure 45. (Figure S6) La dépendance métabolique des cœurs *Ucp2*^{-/-} à la glutamine entraîne un déséquilibre dans les niveaux relatifs d'intermédiaires métaboliques. (A) Schéma du GABA Shunt incluant les données de métabolomique présentées dans la Fig. 6D. (B-E) Niveaux relatifs de pyruvate (B), d'acétyl-coA (C) et de glutamine (D) quantifiés par LC-MS dans les ventricules contrôles et mutants à P3. (E) Quantification par RNAseq de l'expression de gènes codant pour Tet1 ainsi que des histones dé-méthylases et dé-acétylases dans des ventricules contrôles et mutants à P3. Données exprimées en nombre de reads normalisés par la méthode *Variance Stabilizing Transformation* (VST). (A-E) Les données sont représentées en tant que moyenne +/- SEM. ** = p-value < 0,01; * < 0,005.**

Ces résultats démontrent que la perte d'Ucp2 entraîne des altérations métaboliques ayant pour conséquences un déséquilibre de l'abondance relative des intermédiaires du cycle de Krebs (Fig. 7). Nos données suggèrent que parmi ces intermédiaires, l'altération du ratio α -KG/succinate, en inhibant l'activité TET, serait responsable du défaut de maturation des cardiomyocytes mutants *Ucp2*^{-/-} néonataux (Fig. 7).

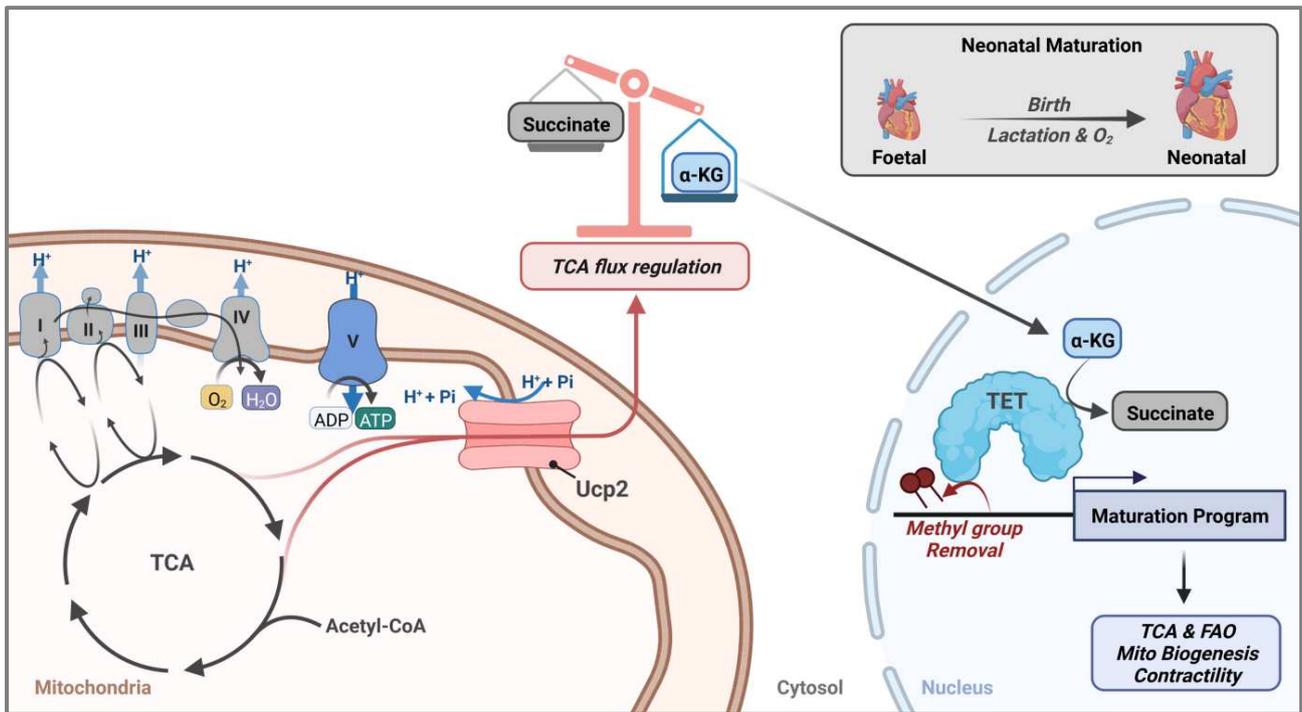


Figure 46. (Figure 7) Représentation schématique de la fonction d'Ucp2 dans les cardiomyocytes néonataux. Grâce à l'export de métabolites de la mitochondrie vers le cytoplasme, Ucp2 régule le flux du cycle de Krebs, et permet l'établissement d'un ratio α -KG/succinate optimal pour activer les enzymes TET et déclencher l'initiation du programme transcriptionnel de maturation des cardiomyocytes. Créé avec Biorender.com

VII. Conclusion et Discussion

L'ensemble des résultats présentés dans cette publication démontrent que l'absence d'Ucp2 entraîne un défaut de maturation métabolique, structurale et contractile des cardiomyocytes mutants néonataux. Nous avons montré que l'absence d'Ucp2 entraîne une altération du fonctionnement du cycle de Krebs, avec un blocage de la première branche d'intermédiaires à 5 et 6 carbones (Fig. 6B et 6C). Par compensation, les cardiomyocytes mutants se ré-orientent métaboliquement en utilisant la glutamine, probablement via le GABA-shunt, aux dépens du glucose et des acides gras. Cette ré-orientation, qui permet d'alimenter le cycle de Krebs par la seconde branche des intermédiaires à 4 carbones, entraîne une déplétion en α -KG, et l'accumulation de succinate (Fig. 6E). Nos données suggèrent que chez les mutants, l'altération de ce ratio, en inhibant l'activité des enzymes TET, bloque l'initiation du programme transcriptionnel de maturation des cardiomyocytes, et suggère l'existence d'un nouveau mode de signalisation mitochondriale contrôlant la maturation cardiaque (Fig. 6G). Pour confirmer cette hypothèse, nous souhaitons quantifier l'activité des enzymes TETs et les niveaux relatifs de leur produit, la 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC) dans les cardiomyocytes contrôles et mutants, et tester un sauvetage phénotypique des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} par une supplémentation en α -KG.

Les résultats présentés dans cette publication décrivent des altérations métaboliques, structurales et fonctionnelles des cardiomyocytes pendant les trois premiers jours après la naissance, avec une aggravation du phénotype à P3 par rapport à P0. Une partie de ces altérations persiste jusqu'au stade P15. Ainsi, bien que les cœurs mutants à P15 présentent des niveaux de Pgc-1 α (Fig S7D et S7F), un ratio mtDNA/nucDNA (Fig S7A) et une activation de la voie DDR (Fig S7E et S7J) similaires aux contrôles, les niveaux d'expression de NRF1, Sirt1 et des sous-unités de la chaîne respiratoire (Fig S7D-E ; S7G-I), ainsi que les niveaux de carbonylation des protéines sont toujours réduits par rapport aux contrôles (Fig S7B). Il serait donc important d'analyser le phénotype des mutants à des stades plus tardifs, comme P30, et de voir si ces altérations sont compensées ou persistent jusqu'à l'âge adulte, créant ainsi potentiellement une altération de la fonction cardiaque.

Pour conclure, l'analyse du phénotype cardiaque du mutant *Ucp2*^{-/-} a permis de révéler un nouveau mode de régulation de la maturation cardiaque néonatale. Celui-ci a pour origine le

métabolisme mitochondrial et agit en amont de la signalisation redox initiée par le β -oxydation.

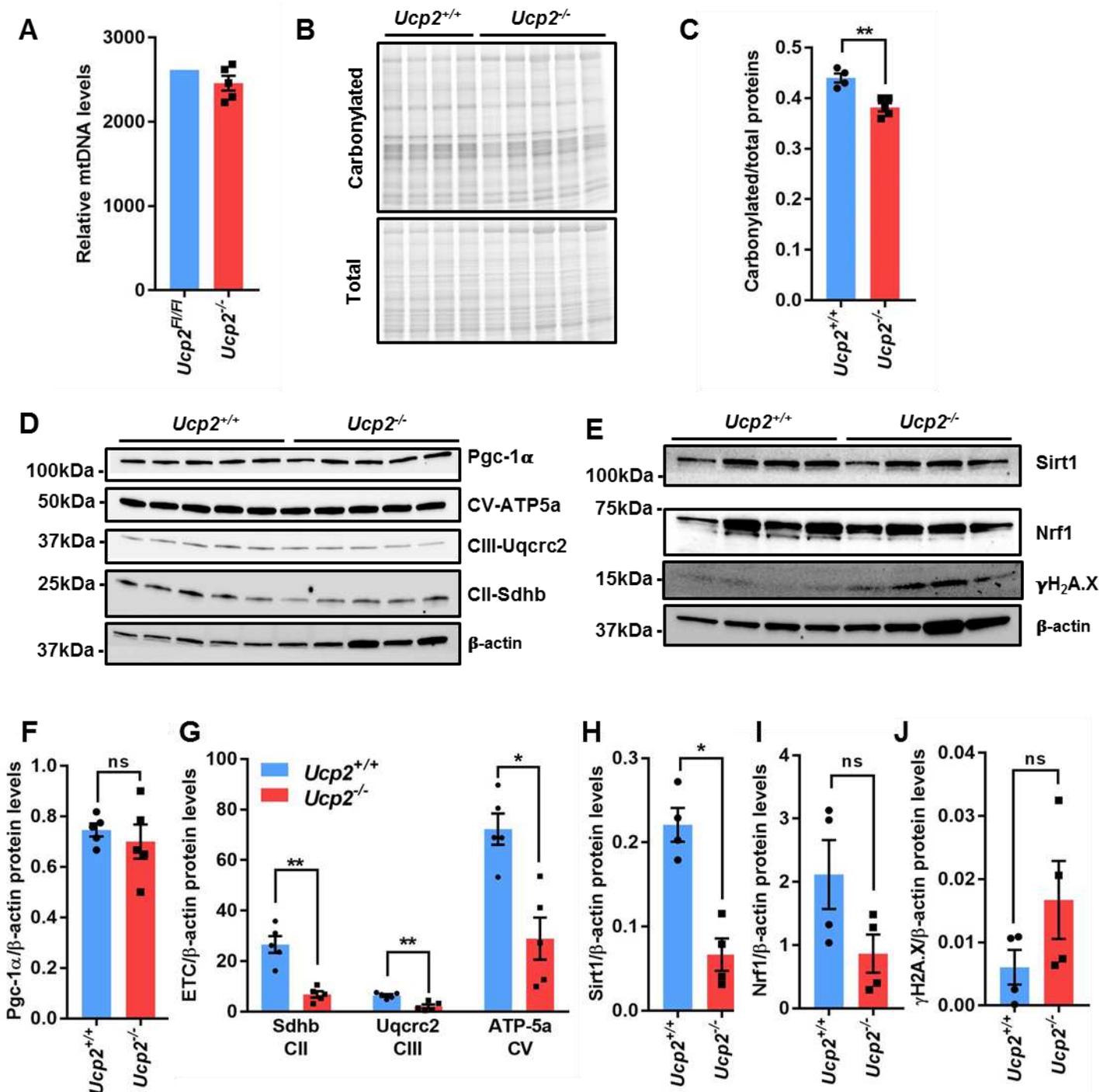


Figure 47. (Figure S7) Le défaut de maturation métabolique des mutants *Ucp2^{-/-}* est partiellement compensé à P15. (A) Mesure par qPCR du ratio mtADN/nucADN (*Cytb*, mitochondrial/*Ndufv1*, nucléaire) de ventricules contrôles et mutants à P15 (B, C) Oxy-blot (B) et quantification des niveaux de carbonylation des protéines de ventricules contrôles et mutants à P15. (D-I) Western blots sur ventricules contrôles et mutants à P15 (D, E) et quantifications des niveaux protéiques de Pgc-1 α (F), des sous-unités des différents complexes de l'ETC, Sdhb (CII), Uqcrc2 (CIII) et ATP-5a (CV) (G), de Sirt1 (H), NRF1 (I) et p- γ H2AX (J). Les données sont représentées en tant que moyenne \pm SEM. * = p-value < 0,05 ; ** = p-value < 0,01.

VIII. Matériel et Méthodes

A. Modèles expérimentaux

1. Animaux, élevage et génotypage

Tous les animaux ont été traités conformément à la directive 2010/63/EU du parlement Européen et aux normes d'éthique et de bien-être animale, et approuvées par un comité d'éthique (Agrément B750524). Des souris Swiss C57BL/6Jrj fournies par les laboratoires Janvier ont servi de contrôles. Les modèles murins *Ucp2^{-/-}* et *Ucp2^{F1/F1}* ont été fournis gracieusement par le Dr. Marie-Clotilde Alves Guerra (Institut Cochin) et génotypés comme précédemment décrit dans (D. Arsenijevic *et al.*, 2000) et (Kong *et al.*, 2010) respectivement. Pour différencier les loci *Ucp2^{+/+}* et *Ucp2^{F1/F1}*, les oligonucléotides suivants sont utilisés : le couple sens p1 (5'-CGTTCTGGGTACCATCCTAACC-3') et anti-sens p2 (5'-CAAGCCTCCATCCAAGTGTCAC-3') produit un amplicon de 374 pb dans le locus *Ucp2^{+/+}*; le couple sens p3 (5'-GCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGCC-3') et anti-sens p4 (5'-ACCCGACCTTTGGCAAACCCTACGC - 3') produit un amplicon de 1726 pb dans le locus *Ucp2^{-/-}*. Pour différencier les loci *Ucp2^{+/+}* et *Ucp2^{F1/F1}*, le couple sens DK-UCP2F: (5'-ACCAGGGCTGTCTCCAAGCAGG-3') et anti-sens DK-UCP2R1 (5'-AGAGCTGTTCGAACACCAGGCCA-3') est utilisé. Il permet l'obtention d'amplicons de 270pb et 400pb dans les loci *Ucp2^{+/+}* et *Ucp2^{F1/F1}* respectivement.

2. Purification et culture de cardiomyocytes murins néonataux.

Pour purifier les cardiomyocytes néonataux murins, des cœurs de souris P0 sont dissociés à l'aide du Neonatal Heart Dissociation kit (Miltenyi Biotec, 130-098-373). Après élimination des érythrocytes à l'aide du Red Blood Cell Lysis Solution (Miltenyi Biotec, 130-094-183), le Neonatal Isolation Kit (Miltenyi Biotec, 130-100-825) est utilisé pour purifier les cardiomyocytes sur colonne MS (Miltenyi Biotec, 130-042-201) en suivant les instructions du fournisseur. 3.5×10^5 cellules/puit ou 10^5 cellules/puit sont ensuite respectivement mises en culture dans des plaques 12 puits ou XF^e24. Le milieu de culture (DMEM 4.5g/L glucose, L-glutamine, pyruvate, Sigma, D6429) supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal (Life Technologies, 10270-106), 10% de sérum de cheval (Life Technologies, 16050-122) et 1X de Pénicilline/Streptomycine (Sigma, P4333), est changé 24h après la mise en culture pour

éliminer les débris cellulaires. Pour étudier l'impact de l'activité p38MAPK ou des enzymes TETs, les cellules sont traitées pendant 24h avec 10 μ M de SB203580 (Sigma, S8307) ou 10 μ M de Bobcat339 hydrochloride (MedChemExpress, HY-111558A) respectivement.

3. Infection virale avec un adenovirus CRE-recombinase

24h après la purification, les cardiomyocytes P0 *Ucp2^{Fl/Fl}* sont traités avec 10⁷ particules/mL d'un adénovirus contenant une cassette CRE-recombinase-GFP (Ad-CRE) ou une cassette contrôle GFP (Ad-GFP). Pour confirmer la transduction virale, la fluorescence GFP est vérifiée par microscopie en fluorescence et l'efficacité de recombinaison par PCR à l'aide d'oligonucléotides précédemment décrits dans (Kong *et al.*, 2010) : DK-UCP2F : 5'-ACCAGGGCTGTCTCCAAGCAGG-3'; DK-UCP2R1 : 5'-AGAGCTGTTCGAACACCAGGCCA -3'; DK-UCP2R2: 5'-TAGAGGAGGGTGGTGTCCAGCTC-3'. Après séparation des produits de PCR sur gel d'agarose, les cardiomyocytes *Ucp2^{Fl/Fl}* traités avec le contrôle Ad-GFP présentent uniquement la bande de 400 pb correspondant au locus *Ucp2^{Fl/Fl}*, tandis que ceux traités avec l'Ad-CRE (*Ucp2^{Δ/Δ}*) présentent uniquement une bande de 550pb, indiquant une efficacité de recombinaison de 100%.

B. Détail des méthodes utilisées

1. Extraits protéiques et Western blots

Immédiatement après sacrifice, les ventricules cardiaques P0, P3 ou P15 sont disséqués froid sur glace et lavés dans du PBS, puis congelés et réduits en poudre dans de l'azote liquide. Ces poudres sont ensuite lysées dans du tampon RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% déoxycholate de sodium, 0.1% SDS) (Sigma, R0278) supplémenté en EDTA (5mM), et en inhibiteurs de phosphatases (3X) et de protéases Halt (1X) (ThermoFisher Scientific, 78420 et 78429). Après centrifugation et récupération du surnageant contenant les protéines solubles, la concentration protéique est déterminée à l'aide du test BCA (Thermo, 23225). Pour chaque échantillon, 30 μ g de protéines sont réduits et dénaturés à 95°C, 5min, dans du tampon Laemmli puis séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) à l'aide de gels pré-coulés Tris-glycine Any-KD (Biorad, 5671123) ou 7% Tris-Acétate (Invitrogen, EA03552BOX, uniquement pour pATM/ATM).

Après transfert sur membrane de nitrocellulose 0.45µm, puis blocage dans un tampon de TBS-Tween 0.1% (Thermo, 28358), contenant 5% lait écrémé ou 5% BSA pendant 1h à température ambiante, les membranes sont incubées pendant la nuit à 4°C dans du TBS-Tween 0.1%, 5% lait/BSA avec les anticorps primaires. Les références des anticorps, les dilutions utilisées et leur solution de blocage sont décrites dans le tableau 4 ci-dessous. Après incubation avec les anticorps secondaires anti-IgG de souris HRP (1 :10000) ou anti-IgG de lapin HRP (1 :10000) (GE Healthcare UK, NA934V et NA931V) à température ambiante pendant 2h, les révélations sont faites à l'aide du lecteur ChemiDoc MP Imaging System (Biorad) en présence du substrat chemiluminescent Clarity ou Clarity Max (Biorad, 170-5060 et 170-5062). L'intensité relative des bandes correspondant aux protéines d'intérêt sont quantifiées à l'aide du logiciel Image J. La révélation des formes phosphorylée et totale est réalisée sur la même membrane, la forme totale servant de normalisateur. Dans le cas où cette dernière montre des niveaux variables entre les échantillons, une seconde normalisation par la β -actine est réalisée. Les autres protéines sont uniquement normalisées avec la β -actine.

2. Analyse d'incorporation EdU ex vivo et in vivo

Pour les analyses *ex vivo*, après 24h de culture, les cellules sont incubées avec 10 µM de 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (ThermoFisher Scientific, C10337) pendant 24h. Les cellules sont fixées dans la formaline 10%, puis perméabilisées avec du PBS-Triton 0.5% pendant 15min. L'incorporation d'EdU est détectée par incubation pendant 30min à température ambiante avec le mix réactionnel Alexa Fluor 488 Click-iT (ThermoFisher Scientific, C10337). Après lavages au PBS, les cellules sont bloquées 1h à température ambiante dans une solution de PBS-Gélatine 0.02%, puis pendant la nuit à 4°C avec l'anticorps anti-cTnT (ThermoFisher Scientific, MS-295-P1, 1:100 dans du PBS-Gélatine 0.02%). Après lavages et un second blocage, les cellules sont incubées pendant 30 min avec une solution de PBS-Gélatine 0.02% contenant l'anticorps secondaire anti-souris Alexa 546 (1 :250, ThermoFisher Scientific, A-11003) et du Hoechst 33342 (1:2000, ThermoFisher Scientific, H3570). La fluorescence est détectée par microscopie optique à l'aide du microscope à fluorescence motorisé (Dmi8, Leica Microsystems) et du logiciel associé LASX, puis analysée à l'aide du logiciel Image J. 1000 à 1500 noyaux sont analysés par condition et réplicat pour mesurer l'incorporation EdU. Pour les analyses de prolifération *in vivo*, des souriceaux P1 sont

injectés en sous-cutané avec du PBS ou de l'EdU 0.1 mg/30g de masse corporelle. Après 24h, les ventricules cardiaques sont disséqués, puis dissociés, fixés et perméabilisés avec le Kit Inside Stain (Miltenyi, 130-090-477). Ils sont ensuite incubés pendant 30 min à température ambiante avec le kit Click iT EdU-Alexa 647 (ThermoFisher Scientific, C10340). Après plusieurs lavages au PBS-BSA 0.05%, ils sont incubés pendant 10min à température ambiante avec un anticorps anti-cTnT couplé FITC (Miltenyi, 130-119-575, 1 :50) dilué dans la solution de perméabilisation du kit InsideStain. La proportion de cellules co-marquées EdU-647/cTnT-FITC (cardiomyocytes ayant incorporé l'EdU) est mesurée à l'aide du cytomètre MACS Quant Flow Cytometer (Miltenyi) et à l'analyse effectuée sur le logiciel FlowJo.

3. Analyse de la taille des cardiomyocytes ex vivo par Immunofluorescence

Les cardiomyocytes P0 *Ucp2^{Fl/Fl}* sont mis en culture à faible confluence ($5 \cdot 10^3$ cellules/cm²) traités avec l'Ad-CRE ou contrôle Ad-GFP pendant 48h puis fixés. Les cellules fixées et non-perméabilisées sont incubées à température ambiante pendant 15min avec une solution contenant 5µg/mL d'agglutinine de germe de blé (Wheat Germ Agglutinin, WGA) couplée à un Alexa Fluor 647 (ThermoFisher Scientific, W32466). Après perméabilisation, les cellules sont incubées avec un anticorps anti-cTnT et du Hoechst 33342 (voir partie incorporation EdU). L'analyse de la fluorescence est effectuée à l'aide du microscope à fluorescence motorisé (Dmi8, Leica Microsystems) et du logiciel associé LASX. Pour déterminer l'aire des cardiomyocytes (cTnT positifs), la fluorescence 647 du WGA est utilisée, le contour de la cellule est dessiné manuellement et la surface en cm² est mesurée avec le logiciel Image J.

4. Quantification des niveaux de ROS mitochondriaux

Après 48h de culture, les cardiomyocytes néonataux *Ucp2^{+/+}* et *Ucp2^{-/-}* sont incubés pendant 45 min, 5% CO₂ dans du milieu de culture sans rouge phénol contenant 5 µM de sonde MitoSOX Red probe (Molecular Probes, M36008). Un traitement avec 5 µM d'Antimycine A (Sigma-Aldrich, A8674) sert de contrôle positif. Les cellules sont ensuite dissociées avec de l'Accutase (Life Technologies, A11105-01), puis lavées dans du PBS, centrifugées et resuspendues dans du PBS pour lecture au cytomètre. L'émission de fluorescence à 580 nm ($\lambda_{ex} = 510nm$) est quantifiée avec le cytomètre en flux MACSQuant (Miltenyi Biotec).

5. Quantification des niveaux de carbonylation des protéines

Les poudres issues de ventricules cardiaques sont homogénéisées dans du tampon de lyse (8M urée, 2M thiourée, 4% CHAPS et 10 mM DTT). Après 30min sur la glace, les lysats sont centrifugés 20 000g pendant 15min à 4°C. La concentration protéique des surnageants est déterminée à l'aide de la méthode Bradford. Le marquage des groupements carbonyles des protéines est obtenu suite à l'incubation de 20µg d'extraits protéiques avec un CF555DI Hydrazide (Biotium, #92164), à 4°C pendant la nuit, sous une légère agitation et à l'abri de la lumière. Les échantillons marqués sont ensuite séparés sur gel de polyacrylamide précoulés AnykD (Biorad). Après 3 lavages dans une solution 7% acide acétique, 10% éthanol, le marquage CF555DI Hydrazide est détecté en utilisant un Chemidoc MP Imaging System (Biorad). La quantification du profil protéique total est effectuée à l'aide d'une solution InstantBlue® Protein Stain (Expedeon). Les données brutes sont analysées à l'aide du logiciel Image J. Les marquages CF555DI ou du profil protéique sont analysés en quantifiant l'intensité de chaque piste. Le marquage CF555DI correspondant au niveau de carbonylation protéique de l'échantillon est ensuite normalisé par la quantité de protéines totales (Ratio CF555Di/InstantBlue).

6. Quantification du ratio ATP/ADP

Le ratio ATP/ADP est mesuré à l'aide du kit ADP/ATP Ratio Assay Kit (Sigma-Aldrich, MAK135). Ce kit est basé sur l'émission de bioluminescence par une luciférase au travers d'une réaction dépendante de l'ATP et donnant de l'AMP comme produit. En suivant les instructions du fournisseur, 5000 cardiomyocytes P0 fraîchement isolés par génotype et par réplicat technique sont lysés dans un tampon spécifique et placés dans une plaque 96-puits. La bioluminescence associée à l'ATP est mesurée à l'aide du luminomètre FluoSTAR OPTIMA (BMG Labtech), puis l'ADP contenu dans l'échantillon est converti en ATP et la bioluminescence est à nouveau mesurée.

7. Quantification du ratio ADN mitochondrial / ADN nucléaire

L'ADN est extrait des cardiomyocytes en culture ou de poudres issues de ventricules cardiaques *Ucp2^{+/+}* et *Ucp2^{-/-}* à l'aide du kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, 69504). Les cellules ou les tissus sont grattés et/ou lysés directement dans le tampon de lyse fourni par le kit. L'ADN est purifié sur colonne (Qiagen, 69504). La concentration en ADN est déterminée à l'aide du spectrophomètre Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific). La quantification des ADNs mitochondrial et génomique sont réalisées par qPCR à l'aide du marqueur fluorescent SYBR (ThermoFisher Scientific, 4309155) et des primers dirigés contre le locus mitochondrial *CytB* (Fw : 5'-CATTATTATCGCGGCCCTA-3'; Rev : 5'-TGTTGGGTTGTTTGATCCTG-3') et le locus nucléaire *Ndufv1* (Fw : 5'-CTTCCCCACTGGCCTCAAG-3'; Rev : 5'-CCAAAACCCAGTGATCCAGC-3'). L'abondance relative de l'ADN mitochondrial est ensuite estimée à l'aide de la méthode de calcul $2^{-\Delta C_p}$ en utilisant le locus nucléaire *Ndufv1* comme référence.

8. Purification d'ARN et RT-qPCR

La purification d'ARN à partir de tissu cardiaque en poudre ou de cellules est effectuée à l'aide du réactif TRIzol® (Life Technologies, 15596026). Les concentrations en ARN sont déterminées avec un spectrophotomètre Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific) puis reverse-transcrits en utilisant le Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher Scientific, K1622) selon les instructions du fournisseur. Pour amplifier les cDNA par qPCR, le réactif fluorescent GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, A6002) et le thermocycleur LightCycler 480 (Roche) sont utilisés. Les niveaux relatifs d'ARN cibles sont déterminés grâce à une normalisation avec un gène de ménage, *36B4* ou *B2m* en utilisant le calcul $2^{-\Delta C_p}$.

9. Mesure de la consommation d'O₂ (Oxygen Consumption Rate, OCR) par Seahorse XF^e24

Après 48h de traitement avec les adénovirus Ad-CRE ou Ad-GFP, soit 72h après purification, et 1h avant l'analyse, le milieu des cardiomyocytes néonataux *Ucp2^{F1/F1}* (et *Ucp2^{Δ/Δ}*) est remplacé par du milieu non tamponné, pH 7.4 (Agilent, 103575-100) supplémenté avec 10mM de glucose (Agilent, 103577-100), 2mM de L-glutamine (Agilent, 103579-100) et 1 mM de pyruvate (Life Technologies, 11360-039). Au cours du Mitostress test, l'ajout successif d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire permet de mesurer les différents paramètres

de l'OCR. L'inhibition de l'ATP synthase par l'oligomycine A 10 μ M (Sigma, 75351) permet de calculer la respiration dédiée à la synthèse d'ATP. La respiration maximale est quantifiée après ajout de 10 μ M de FCCP (Sigma, C2920), agent protonophore et découplant. Enfin, la respiration non-mitochondriale est déterminée après ajout simultané de 0.5 μ M de roténone (Sigma, R8875) et d'antimycine A (Sigma, A8674) qui sont respectivement des inhibiteurs des complexes I et III de la chaîne respiratoire. Les données d'OCR sont ensuite normalisées par le nombre de cellules par puit. Pour l'analyse de la dépendance à la glutamine, le MitoStress Test est précédé de l'injection de l'inhibiteur de glutaminase BPTES (3 μ M). Son effet est quantifié par le calcul du ratio des respirations maximales des cardiomyocytes en présence de BPTES ou en condition contrôle des cardiomyocytes $Ucp2^{Fl/Fl}$ et $Ucp2^{\Delta/\Delta}$ respectivement.

10. Mesure de la contractilité de sphéroïdes cardiaques en 3D

Après dissociation cellulaire des ventricules cardiaques P2 $Ucp2^{+/+}$ et $Ucp2^{-/-}$, une suspension mixte de cellules (sans purification de cardiomyocytes) est mise en culture dans des plaques 96-puits (5000 cellules/puit) à très faible adhérence et à fond en U (SBio, M9096MZ) pendant 48h pour former des sphéroïdes cardiaques en 3 dimensions. Les sphéroïdes cardiaques sont stimulés électriquement (15V) à différentes fréquences (1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 7Hz) au moyen du stimulateur MyoPacer Field Stimulator (IonOptics) dans une chambre thermorégulée à 37°C (Incubator I8, Pecon) associée à une pompe péristaltique (RegpoICC, Ismatech) assurant le renouvellement du milieu (10 tours/min) durant les manipulations. La contractilité des sphéroïdes est mesurée à l'aide d'enregistrements vidéos (10sec, 84 images par seconde, 760 x 920 pixels) à l'aide du microscope optique Leica Dmi8 (20X) et du plug-in MuscleMotion du logiciel ImageJ. Ce plug-in mesure la dynamique des mouvements des pixels des enregistrements de sphéroïdes et permet la mesure du temps de contraction et de relaxation (Sala *et al.*, 2018).

11. Analyses ciblées des métabolites par chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS)

Les ventricules cardiaques de souris P3 WT et $Ucp2^{-/-}$ sont rapidement prélevés sur glace et rincés dans du PBS froid, puis immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Les échantillons sont conservés à -80°C. Les métabolites sont extraits selon le protocole décrit

(Mackay *et al.*, 2015). Les ventricules sont repris dans la solution d'extraction (50% méthanol, 30% acétonitrile et 20% H₂O), le volume d'extraction est ajusté en fonction de la masse du tissu (250µL pour 10mg de tissu). Les échantillons sont ensuite vortexés pendant 5min à 4°C, puis centrifugés 16 000g, 15 min, à 4°C. Les surnageants sont collectés et conservés à -80°C jusqu'aux analyses. Les analyses sont effectuées avec le Spectromètre Orbitrap Q Exactive™ Plus équipé d'une source Ion Max et d'une sonde d'ionisation par électrospray à chaud (HESI-II) et couplé à un système UHPLC Dionex™ UltiMate™ 3000 (Thermo Scientific™). L'étalonnage externe de la masse est réalisé une fois par semaine avec une solution étalon, conformément aux recommandations du fournisseur. Pour la séparation par chromatographie en phase liquide, 5µL de chaque échantillon sont injectés dans une colonne SeQuant® ZIC®-pHILIC (150 mm × 2.1 mm i.d. 5 µm) avec une colonne de garde (20 mm × 2.1 mm i.d. 5 µm) (Merck Millipore).

Tampon A (carbonate d'ammonium 20mM ; hydroxide d'ammonium 0,1% pH 9,2) ; tampon B (Acétonitrile).

Le gradient d'élution linéaire est mis en place avec un débit de 0.2 µL/min comme suit : 0-20 min : gradient linéaire de 80 à 20% B ; 20-20.5 min : gradient linéaire de 20 à 80% B ; 20.5 min-28min : maintenu à 80% B. Le spectromètre de masse a été utilisé en mode spectre complet « full scan », l'analyseur en changement de polarité, électrospray fixé à 2.5 kV, le capillaire maintenu à 320°C. Le débit de gaz d'enveloppe est réglé sur 20 unités, le débit de gaz auxiliaire sur 5 unités et celui de balayage sur 0. Les métabolites sont détectés au sein d'un intervalle de masse de 75-1000 m/z à une résolution de 35 000 (à 200 m/z) avec la cible AGC à 106 et le temps d'injection maximum à 250ms. Des masses standard ont été introduites pour assurer la précision des masses mesurées en dessous de 5ppm. Les données sont obtenues en utilisant le programme Thermo Scientific™ Xcalibur™ 4.0.27.13. L'aire du pic des métabolites est obtenue avec le logiciel Thermo Scientific™ TraceFinder™ 3.3 SP1, identifiées par la masse exacte de chaque ion monochargé et le temps de rétention connu sur la colonne HPLC. Les représentations sous forme de heatmaps, l'analyse en composante principale, l'analyse des voies métaboliques et les tests statistiques sont effectués en utilisant le programme en accès libre Métaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) (Xia and Wishart, 2011).

12. Analyses protéomiques par chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

Les ventricules cardiaques de souris P3 WT et *Ucp2*^{-/-} sont rapidement prélevés sur glace et rincés dans du PBS froid, puis immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Les échantillons sont conservés à -80°C. L'extraction protéique est réalisée selon le protocole en vigueur sur la plateforme (UT SouthWestern). Les extraits protéiques sont mélangés (1 :1) avec une solution de SDS 1% et chauffés à 70°C pendant 15 min. Après dosage des protéines totales, 60µg de protéines par échantillon sont mélangés avec 100 µL de SDS 1% contenant les standard internes (BSA). Les échantillons sont chauffés puis ramenés à température ambiante puis les protéines précipitées avec 1 ml d'acétone, à froid, pendant la nuit. Les culots protéiques obtenus par centrifugation sont séchés puis repris dans 50 µL de SDS 1%, puis 20 µL sont déposés et séparés en migration courte par SDS-PAGE. Le gel est ensuite fixé et coloré avec le réactif de coloration bleue GelCode™ (ThermoFisher Scientific). Chaque piste est traitée comme un échantillon distinct, découpée du gel puis en plusieurs petits morceaux avant d'être décolorée. Les échantillons sont alors réduits, alkylés et digérés avec 1 µg de trypsine pendant la nuit à température ambiante. Les peptides obtenus sont extraits du gel, les échantillons évaporés puis repris dans 200 µL d'acide acétique 1%.

Ces échantillons sont ensuite analysés en LC-MS/MS au moyen d'un instrument TSQ, en mode SRM (*Selected Reaction Monitoring*). Des panels spécifiques sont utilisés pour mesurer les différents groupes de protéines. Un total de 6 panels protéiques est mesuré au cours de 4 passages LC-Tandem Mass Tag différents. Ces mesures ont été testées et validées au cours de manipulations ultérieures (Puente *et al.*, 2014). La résolution pour Q1 et Q2 est de 0.7FWHM. Un cycle de 2sec est utilisé pour obtenir approximativement 15 valeurs pour les pics de chromatographie typiques de 30 sec. Un gradient d'élution linéaire de 2%B à 45%B en 60 min est utilisé pour la chromatographie liquide. Le temps total d'analyse est d'environ 1.5h par échantillon. Le HRAM (*High Resolution Accurate Mass*) est effectué avec l'instrument QEX Plus (ThermoFisher Scientific) en mode MS complet scannant un intervalle de 350-1500 m/z, avec une résolution de 140 000 et des temps de scan de 1scan/s basé sur 2 microscans. Les données SRM et HRAM sont analysées en utilisant le programme Skyline (<https://skyline.ms/project/home/begin.view>), qui trouve et intègre les pics de chromatographie sur la base de données déjà établies de CID (Collision-Induced Dissociation)

ou de données m/z de haute résolution. Les temps de rétention sont prédits sur la base des temps de rétention de la calibration utilisant les peptides issus de la BSA et de la trypsine. Puis le protocole est édité après une vérification manuelle des données en fonction des besoins. Les aires sous la courbe des pics sont utilisées pour la quantification des protéines correspondantes.

13. Analyse transcriptomique par RNA-seq

Les librairies sont préparées avec le kit TruSeq total RNA puis séquencées sur un appareil NextSeq (Institut Cochin, plateforme Genom'IC) afin d'obtenir au minimum 20M de lectures *paired-end* de 75 bp par échantillon. Les fichiers de sortie du séquenceur (*.fastq) sont alignés sur la version mm10 du génome murin à l'aide de l'outil HISAT2 (Galaxy Version 2.2.1). L'outil HTseq-count (Galaxy Version 0.9.1) permet ensuite de générer pour chaque échantillon une table de comptage des lectures alignées de façon unique sur le transcriptome de l'annotation Gencode (GRCm38, version M25 - Ensembl 100). Les tables de comptage de l'ensemble des échantillons sont utilisées pour l'analyse différentielle de l'expression des gènes grâce à l'outil DESeq2 (Galaxy Version 2.11.40.7).

L'analyse en composante principale montre que 2 échantillons (1 de chaque génotype) divergent et ne forment pas de cluster avec leurs équivalents du même génotype. Ces 2 échantillons sont exclus de l'analyse. Les données présentées sont donc en n=2, et le fichier d'expression normalisée VST permet d'identifier les gènes dont l'expression varie avec un ratio de 1.5x entre les groupes contrôle et *Ucp2*^{-/-} (p-value adj < 0,15). Cette p-value seuil permet de sélectionner uniquement des gènes fortement dérégulés et montrant peu de variabilité entre les répliquats biologiques d'un même génotype. Pour garantir une différence statistique, les gènes d'intérêt apparaissant comme différentiellement exprimés dans les analyses de RNA-seq sont en ce moment en cours de confirmation par RT-qPCR.

14. Analyses Statistiques

Chaque expérience est effectuée au moins 3 fois avec des échantillons indépendants. Les analyses statistiques sont produites à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Des t-tests ou des tests ANOVA non-pairés et non-paramétriques (Mann-Whitney tests et Kruskal-Wallis respectivement) sont utilisés, à l'exception des données de spectrométrie de masse en

tandem, considérés comme suivant une loi normale par nos collaborateurs. Une p-value inférieure à 0.05 est considérée comme statistiquement significative.

Oligonucléotides RT-qPCR et PCR (Eurofins)	Séquence
Uncoupling Protein 1 (Ucp1) F	GGCCCTTGTAACAACAAAATAC
Uncoupling Protein 1 (Ucp1) R	GGCAACAAGAGCTGACAGTAAAT
Uncoupling Protein 2 (Ucp2) F	CCAGCCTACAGATGTGGTAAA
Uncoupling Protein 2 (Ucp2) R	CTCTCGTGAATGGTCTTCT
Uncoupling Protein 3 (Ucp3) F	GACTATGGATGCCTACAGAACC
Uncoupling Protein 3 (Ucp3) R	ACTCCAGCAACTTCTCCTTG
Beta 2 globuline (B2m)	CACACTGAATTCACCCCCAC
Beta 2 globuline (B2m)	GTCTCGATCCCAGTAGACGG
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (Pgc1a) F	GGAATGCACCGTAAATCTGC
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (Pgc1a) R	TTCTCAAGAGCAGCGAAAGC
36B4 F	AGCTGAAGCAAAGGAAGAGTCGGA
36B4 R	ACTTGGTTGCTTTGGCGGGATTAG
Cytochrome B (Cytb) (mitochondrial) F	CATTTATTATCGCGGCCCTA
Cytochrome B (Cytb) (mitochondrial) R	TGTTGGGTTGTTTGATCCTG
NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit V1 (Ndufv1) (genomic) F	CTCCCCACTGGCCTCAAG
NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit V1 (Ndufv1) (genomic) R	CCAAAACCCAGTGATCCAGC
Forward p1	CGTTCTGGGTACCATCCTAACC
Reverse p2	CAAGCCTCCATCCAAGTGTCAC
Forward p3	GCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGCC
Reverse p4	ACCCGACCTTTGGCAAACCTACGC
DK-UCP2F	ACCAGGGCTGTCTCCAAGCAGG
DK-UCP2R1	AGAGCTGTTCGAACACCAGGCCA
DK-UCP2R2	TAGAGGAGGGTGGTGTCCAGCTC

Tableau 3. Liste des oligonucléotides employés pour les RT-qPCR, la quantification du ratio ADNmt/ADNnuc et le génotypage des modèles murins mutants pour Ucp2.

Anticorps	Source (Référence)	Blocking (Dilution)
Total OXPHOS Human WB Antibody Cocktail	Abcam (ab110411)	Lait (1:500)
Anti-PGC1 antibody - BSA and Azide free	Abcam (ab54481)	BSA (1:1000)
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (28B10) Mouse mAb	Cell Signaling Technology (#9216)	Lait (1:1000)
p38 MAPK Antibody	Cell Signaling Technology (#9212)	Lait (1:500)
NRF1 (D9K6P) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology (#46743)	Lait (1:1000)
Sirt1 (D1D7) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology (#9475)	Lait (1:1000)
Phospho-ATM (Ser1981) (10H11.E12) Mouse mAb	Cell Signaling Technology (#4526)	Lait (1:500)
ATM (D2E2) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology (#2873)	Lait (1:500)
Phospho-AMPK α (Thr172) (40H9) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology (#2535)	Lait (1:1000)
AMPK α Antibody	Cell Signaling Technology (#2532)	BSA (1:1000)
Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab	GE Healthcare (NA934)	(1:10000)
Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab	GE Healthcare (NA931)	(1:10000)
Cardiac Troponin T Antibody FITC, REAfinity™	Miltenyi Biotec (130-119-575)	(1:50)
Anticorps β -Actin (C4)	Santa Cruz Biotechnology (sc-47778)	BSA (1:1000)
Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301	Sigma-Aldrich (05-636-I)	BSA (1:500)
Troponin T, Cardiac Isoform Ab-1	ThermoFisher Scientific (MS-295-P1)	Gélatine (1:100)
Goat anti-Mouse secondary Alexa Fluor™ 546	ThermoFisher Scientific (A-11003)	Gélatine (1:250)
LONP1 Polyclonal Antibody	ThermoFisher Scientific (PA5-49215)	BSA (1:1000)

Tableau 4. Liste des anticorps utilisés, références, fournisseurs, dilution et solution de blocage associée

IX. Références Bibliographiques

1. Aguilar, E. et al. (2019) 'UCP2 Deficiency Increases Colon Tumorigenesis by Promoting Lipid Synthesis and Depleting NADPH for Antioxidant Defenses', *Cell Reports*, 28(9), pp. 2306-2316.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.097>.
2. Arsenijevic, D. et al. (2000) 'Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production', *Nature Genetics*, 26(4), pp. 435–439. Available at: <https://doi.org/10.1038/82565>.
3. Barisón, M.J. et al. (2021) 'Reorganization of Metabolism during Cardiomyogenesis Implies Time-Specific Signaling Pathway Regulation', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), p. 1330. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22031330>.
4. Berardi, M.J. and Chou, J.J. (2014) 'Fatty Acid Flippase Activity of UCP2 Is Essential for Its Proton Transport in Mitochondria', *Cell Metabolism*, 20(3), pp. 541–552. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.004>.
5. Calmettes, G. et al. (2013) 'Hexokinase–mitochondrial interactions regulate glucose metabolism differentially in adult and neonatal cardiac myocytes', *Journal of General Physiology*, 142(4), pp. 425–436. Available at: <https://doi.org/10.1085/jgp.201310968>.
6. Cardoso, A.C. et al. (2020) 'Mitochondrial substrate utilization regulates cardiomyocyte cell-cycle progression', *Nature Metabolism*, 2(2), pp. 167–178. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0169-x>.
7. Chua, G.N.L. et al. (2019) 'Cytosine-Based TET Enzyme Inhibitors', *ACS medicinal chemistry letters*, 10(2), pp. 180–185. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00474>.
8. Cui, M. et al. (2020) 'Dynamic Transcriptional Responses to Injury of Regenerative and Non-regenerative Cardiomyocytes Revealed by Single-Nucleus RNA Sequencing', *Developmental Cell*, 53(1), pp. 102-116.e8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.02.019>.
9. D'Uva, G. et al. (2015) 'ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation', *Nature Cell Biology*, 17(5), pp. 627–638. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb3149>.
10. Greco, C.M. et al. (2016) 'DNA hydroxymethylation controls cardiomyocyte gene expression in development and hypertrophy', *Nature Communications*, 7, p. 12418. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms12418>.
11. Hamon, M.-P. et al. (2020) 'Mitochondrial Lon protease - depleted HeLa cells exhibit proteome modifications related to protein quality control, stress response and energy metabolism', *Free Radical Biology and Medicine*, 148, pp. 83–95. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.039>.
12. Hilse, K.E. et al. (2018) 'The Expression of Uncoupling Protein 3 Coincides With the Fatty Acid Oxidation Type of Metabolism in Adult Murine Heart', *Frontiers in Physiology*, 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.00747> (Accessed: 20 May 2022).
13. Honkoop, H. et al. (2018) A metabolic switch from OXPHOS to glycolysis is essential for cardiomyocyte proliferation in the regenerating heart. preprint. *Cell Biology*. Available at: <https://doi.org/10.1101/498899>.

14. Hubert, F. et al. (2021) 'FGF10 promotes cardiac repair through a dual cellular mechanism increasing cardiomyocyte renewal and inhibiting fibrosis', *Cardiovascular Research*, p. cvab340. Available at: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab340>.
15. Kalsotra, A. et al. (2008) 'A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), pp. 20333–20338. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0809045105>.
16. Karbassi, E. et al. (2020) 'Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine', *Nature Reviews. Cardiology*, 17(6), pp. 341–359. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0331-x>.
17. Kimura, W. et al. (2015) 'Hypoxia fate mapping identifies cycling cardiomyocytes in the adult heart', *Nature*, 523(7559), pp. 226–230. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature14582>.
18. Kinnaird, A. et al. (2016) 'Metabolic control of epigenetics in cancer', *Nature Reviews Cancer*, 16(11), pp. 694–707. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.82>.
19. Kong, D. et al. (2010) 'Glucose Stimulation of Hypothalamic MCH Neurons Involves KATP Channels, Is Modulated by UCP2, and Regulates Peripheral Glucose Homeostasis', *Cell Metabolism*, 12(5), pp. 545–552. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.09.013>.
20. Kukat, A. et al. (2014) 'Loss of UCP2 Attenuates Mitochondrial Dysfunction without Altering ROS Production and Uncoupling Activity', *PLoS Genetics*. Edited by N.-G. Larsson, 10(6), p. e1004385. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004385>.
21. Lee, J.Z. et al. (2019) 'Abstract 409: Regulation of Cardiomyocyte Maturation by an RNA Splicing Regulator Rbfox1', *Circulation Research*, 125(Suppl_1), pp. A409–A409. Available at: https://doi.org/10.1161/res.125.suppl_1.409.
22. Li, W. et al. (2018) 'CAB39L elicited an anti-Warburg effect via a LKB1-AMPK-PGC1 α axis to inhibit gastric tumorigenesis', *Oncogene*, 37(50), pp. 6383–6398. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0402-1>.
23. Mackay, G.M. et al. (2015) 'Analysis of Cell Metabolism Using LC-MS and Isotope Tracers', *Methods in Enzymology*, 561, pp. 171–196. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.05.016>.
24. Makinde, A.-O., Gamble, J. and Lopaschuk, G.D. (1997) 'Upregulation of 5'-AMP-Activated Protein Kinase Is Responsible for the Increase in Myocardial Fatty Acid Oxidation Rates Following Birth in the Newborn Rabbit', *Circulation Research*, 80(4), pp. 482–489. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.RES.80.4.482>.
25. Murphy, M.P. (2009) 'How mitochondria produce reactive oxygen species', *Biochemical Journal*, 417(Pt 1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>.
26. Nassar, R., Reedy, M.C. and Anderson, P.A. (1987) 'Developmental changes in the ultrastructure and sarcomere shortening of the isolated rabbit ventricular myocyte.', *Circulation Research*, 61(3), pp. 465–483. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.RES.61.3.465>.
27. Porrello, E.R. et al. (2011) 'Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart', *Science*, 331(6020), pp. 1078–1080. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1200708>.

28. Puente, B.N. et al. (2014) 'The Oxygen-Rich Postnatal Environment Induces Cardiomyocyte Cell-Cycle Arrest through DNA Damage Response', *Cell*, 157(3), pp. 565–579. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.032>.
29. Raho, S. et al. (2020) 'KRAS-regulated glutamine metabolism requires UCP2-mediated aspartate transport to support pancreatic cancer growth', *Nature Metabolism*, 2(12), pp. 1373–1381. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00315-1>.
30. Sakamoto, T. et al. (2022) 'The nuclear receptor ERR cooperates with the cardiogenic factor GATA4 to orchestrate cardiomyocyte maturation', *Nature Communications*, 13(1), p. 1991. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29733-3>.
31. Sala, L. et al. (2018) 'MUSCLEMOTION: A Versatile Open Software Tool to Quantify Cardiomyocyte and Cardiac Muscle Contraction In Vitro and In Vivo', *Circulation Research*, 122(3), pp. e5–e16. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312067>.
32. Sarikhani, M. et al. (2020) 'Sustained Activation of AMPK Enhances Differentiation of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes via Sirtuin Activation', *Stem Cell Reports*, 15(2), pp. 498–514. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.06.012>.
33. Senyo, S.E. et al. (2013) 'Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes', *Nature*, 493(7432), pp. 433–436. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature11682>.
34. Sturzu, A.C. et al. (2015) 'Fetal Mammalian Heart Generates a Robust Compensatory Response to Cell Loss', *Circulation*, 132(2), pp. 109–121. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011490>.
35. Vozza, A. et al. (2014) 'UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3), pp. 960–965. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1317400111>.
36. Wang, C. and Hu, S.M. (1991) 'Developmental regulation in the expression of rat heart glucose transporters', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 177(3), pp. 1095–1100. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)90651-m](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)90651-m).
37. Xia, J. and Wishart, D.S. (2011) 'Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst', *Nature Protocols*, 6(6), pp. 743–760. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.319>.
38. Xiao, M. et al. (2012) 'Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors', *Genes & Development*, 26(12), pp. 1326–1338. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.191056.112>.
39. Yatscoff, M.A. et al. (2008) 'Myocardial hypertrophy and the maturation of fatty acid oxidation in the newborn human heart', *Pediatric Research*, 64(6), pp. 643–647. Available at: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318184d281>.
40. Yogeewari, P., Sriram, D. and Vaigundaragavendran, J. (2005) 'The GABA shunt: an attractive and potential therapeutic target in the treatment of epileptic disorders', *Current Drug Metabolism*, 6(2), pp. 127–139. Available at: <https://doi.org/10.2174/1389200053586073>.
41. Zhang, Y. et al. (2010) 'Foxp1 coordinates cardiomyocyte proliferation through both cell-autonomous and nonautonomous mechanisms', *Genes & Development*, 24(16), pp. 1746–1757. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1929210>.

Partie 2 – L'inhibition d'Ucp2 par la génipine entraine l'activation rédox-dépendante de la voie p38MAPK et l'inhibition de la prolifération des cardiomyocytes néonataux

I. Introduction

A la différence de l'adulte, le cœur néonatal dispose d'un potentiel régénératif important et des études chez la souris ont démontré que ce potentiel est directement corrélé à la capacité proliférative des cardiomyocytes. Tandis qu'ils sont prolifératifs à la naissance (P0), cette capacité décroît progressivement jusqu'au jour postnatal 7 (P7), où la grande majorité devient post-mitotique (Porrello *et al.*, 2011). Cette sortie du cycle cellulaire est en partie provoquée par un changement métabolique à la naissance. Les cardiomyocytes, majoritairement glycolytiques pendant le développement, deviennent dépendants de la β -oxydation mitochondriale. Ce remodelage assure un rendement en ATP nécessaire à leur fonction de contraction, mais il entraîne également une production accrue de ROS mitochondriaux (mtROS), molécules décrites comme responsables de l'arrêt de la prolifération des cardiomyocytes (Yatscoff *et al.*, 2008; Puente *et al.*, 2014). Il est donc possible de raccourcir ou de prolonger la capacité régénérative du cœur néonatal en modifiant génétiquement ou chimiquement le niveau de mtROS cardiaque (Puente *et al.*, 2014).

Localisées dans la membrane interne de la mitochondrie, les Ucps sont capables de découpler la chaîne de transport d'électrons (ETC) et la respiration de la production d'ATP en dissipant le potentiel de membrane. Contrairement à son homologue Ucp1 dont l'activité permet la production de chaleur, Ucp2 est associé à une régulation de la production de mtROS : la dissipation partielle du gradient de protons par Ucp2 diminue la proportion de complexes de l'ETC sous forme réduite, et donc la fuite d'électron(s) à l'origine de la production de mtROS ($O_2^{\cdot-}$). De plus, des études récentes montrent qu'Ucp2 participe d'une

autre manière à la régulation redox : en exportant de l'aspartate de la matrice mitochondriale vers le cytosol, Ucp2 contribue à la reformation des systèmes antioxydants (Vozza *et al.*, 2014; Raho *et al.*, 2020). Via cette fonction de régulateur redox, Ucp2 a été montré comme régulant la prolifération de différents types cellulaires (Elorza *et al.*, 2008; Raho *et al.*, 2020).

Dans le cœur murin, la protéine Ucp2 n'est exprimée que pendant une courte période : de E18.5 aux premiers jours postnataux (Hilse *et al.*, 2018) (Annexe 11). Par conséquent, Ucp2 pourrait être un acteur clef de la production de mtROS des cardiomyocytes et participer ainsi à la régulation de leur prolifération. Parallèlement à l'étude de l'inactivation du gène *Ucp2* (Résultats Partie 1), nous avons étudié les conséquences d'une inhibition pharmacologique d'Ucp2 dans les cardiomyocytes murins néonataux P0.

II. L'inhibition d'Ucp2 par la génipine altère la fonction mitochondriale sans affecter la viabilité des cardiomyocytes

Ucp2 étant le membre de la famille Ucp le plus largement exprimé dans le cœur murin néonatal (Hilse *et al.*, 2018 et Kovacs *et al.* en rédaction) (Annexe 11), la génipine, décrite comme inhibiteur spécifique de cette famille, apparaît comme un modèle pertinent pour étudier Ucp2 (Zhang *et al.*, 2006; Kreiter *et al.*, 2019).

La consommation d'O₂ (OCR) de cardiomyocytes néonataux WT cultivés pendant 48h en présence de doses croissantes de génipine a été mesurée. Tandis qu'une concentration de 10 µM n'affecte pas la respiration, les respirations basale, maximale, et dédiée à la synthèse d'ATP sont fortement réduites de façon dose-dépendante en présence de 50 (G50) et 100 µM (G100) d'inhibiteur (Fig. 1A et 1B).

En tant que protéine découplante, Ucp2 est capable de moduler le potentiel de membrane mitochondrial. Au vu de la diminution significative des différents paramètres de la respiration en présence de génipine, et de la dépendance entre l'OCR et le potentiel de membrane mitochondrial, ce potentiel a été mesuré à l'aide de la sonde ratiométrique JC-10. A l'état basal celle-ci émet une fluorescence à 525nm. Lorsque le potentiel de membrane augmente, la sonde s'agrège dans la mitochondrie, et émet alors une fluorescence rouge à

590nm. Ainsi, la quantification du ratio 590/525 par cellule permet d'estimer le potentiel de membrane mitochondrial. Tandis que le traitement avec le découplant mitochondrial FCCP entraîne comme attendu une réduction drastique du potentiel, les cardiomyocytes traités avec 50 μ M ou 100 μ M de génipine présentent un ratio similaire aux contrôles suggérant un potentiel de membrane mitochondrial normal (Fig. 1C).

La masse mitochondriale pouvant affecter l'OCR et l'agrégation du JC-10, la masse mitochondriale des cardiomyocytes traités à la génipine a été quantifiée à l'aide du ratio ADN mitochondrial/ADN nucléaire. L'inhibition d'Ucp2 n'entraîne pas de diminution du nombre de génomes mitochondriaux par cellule (Fig. 1D). En revanche, elle induit une légère augmentation compensatoire de la baisse d'OCR. Celle-ci peut par ailleurs expliquer la légère augmentation du potentiel de membrane des cardiomyocytes traités avec 100 μ M de génipine (Fig. 1C). La diminution d'OCR des cardiomyocytes traités à la génipine n'est donc pas due à une réduction de la masse mitochondriale ou du potentiel de membrane.

Enfin, pour évaluer une éventuelle toxicité du traitement à la génipine, l'apoptose des cardiomyocytes contrôles et traités a été mesurée. Les résultats montrent que le traitement à la génipine n'entraîne pas l'apoptose des cardiomyocytes néonataux (Fig. 1E et 1F).

L'ensemble de ces données démontre donc que l'inhibition de l'activité d'Ucp2 dans des cardiomyocytes néonataux altère la fonction mitochondriale sans modifier la masse mitochondriale ou la viabilité cellulaire.

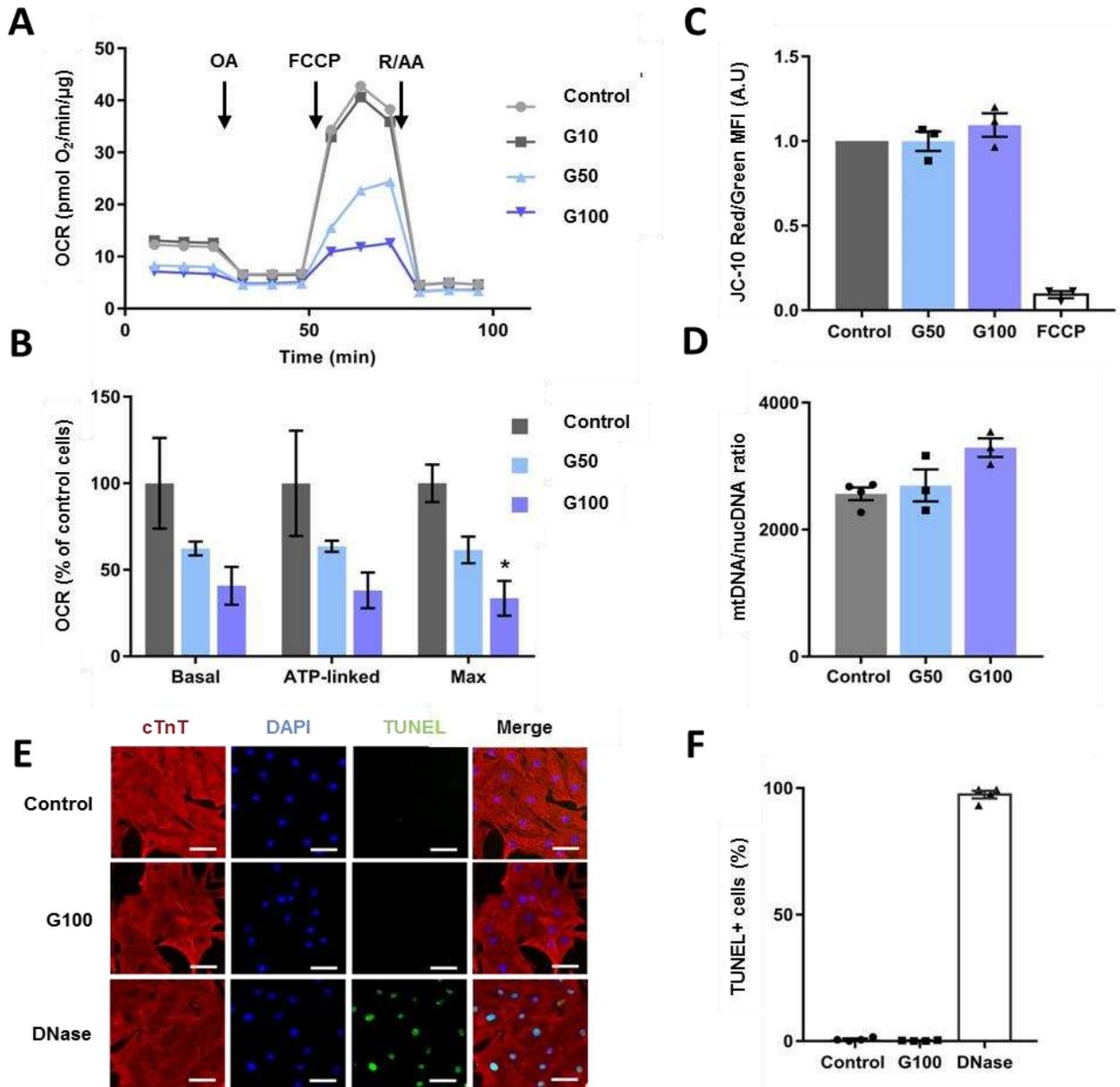


Figure 48. (Figure 1) Altération de la respiration des cardiomyocytes néonataux traités avec la génipine. (A) Courbe représentative de la consommation d'O₂ (OCR) en réponse à différents inhibiteurs de l'ETC de cardiomyocytes P0 cultivés en présence de concentrations croissantes de génipine pendant 48h. **(B)** Paramètres de l'OCR des cardiomyocytes traités à la génipine, exprimés en pourcentage du contrôle (n=3). **(C)** Quantification du potentiel de membrane mitochondriale des cardiomyocytes traités à la génipine par la sonde JC-10. L'agent découplant FCCP (10μM) est utilisé comme contrôle positif. Données représentées en proportion du contrôle non-traité (n=3). **(D)** Mesure par qPCR de l'impact de la génipine sur le ratio ADN mitochondrial / ADN nucléaire des cardiomyocytes (n=3). **(E-F)** Immunofluorescence et quantification du pourcentage de cardiomyocytes (cellules cTnT positives) positifs au marquage TUNEL en présence/absence de génipine. Une digestion avec la DNase a été utilisée en tant que contrôle positif. Echelle = 50μm. Control = Véhicule DMSO ; G10 = Génipine 10μM ; G50 = Génipine 50μM ; G100 = Génipine 100μM ; OA = Oligomycine A ; R = Rotenone ; AA = Antimycine A. « * » indique une p-value < 0.05.

III. L'inhibition de l'activité d'Ucp2 par la génipine entraîne l'augmentation des niveaux de ROS et l'activation ROS-dépendante de la voie p38MAPK dans les cardiomyocytes néonataux

Au vu du rôle de la génipine sur l'inhibition de l'activité découplante des protéines Ucps (Zhang *et al.*, 2006), la baisse d'OCR observée en présence de génipine pourrait être due à un ralentissement du fonctionnement de la chaîne respiratoire provoqué par un défaut de consommation du potentiel de membrane. Ce ralentissement entraînerait une augmentation de la fuite des électrons au niveau des complexes I et III, et par conséquent, une production accrue de mtROS. Pour tester cette hypothèse, nous avons quantifié les niveaux de ROS totaux de cardiomyocytes néonataux contrôles ou traités à la génipine à l'aide de la sonde CellROX. Les résultats montrent que l'inhibition d'Ucp2 entraîne une augmentation dose-dépendante du niveau de ROS des cardiomyocytes (Fig. 2A et 2B).

J'ai ensuite cherché à déterminer les conséquences de cette modification de l'état redox sur le phénotype des cardiomyocytes. La voie p38MAPK étant bien décrite comme modulée par les ROS, notamment dans le cœur, (Matsuyama and Kawahara, 2011), nous avons étudié son niveau d'activation dans des cardiomyocytes néonataux contrôles ou traités. Ces données révèlent une activation dose-dépendante de la p38 dans les cardiomyocytes traités avec la génipine. Elle est inhibée en présence de l'antioxydant N-acétyl-cystéine (NAC), démontrant l'activation redox-dépendante de la p38 en présence de génipine (Fig. 2C et 2D).

Ces résultats montrent que la dysfonction mitochondriale provoquée par l'inhibition d'Ucp2 entraîne une augmentation du niveau de ROS et l'activation redox-dépendante de la voie p38 dans les cardiomyocytes néonataux.

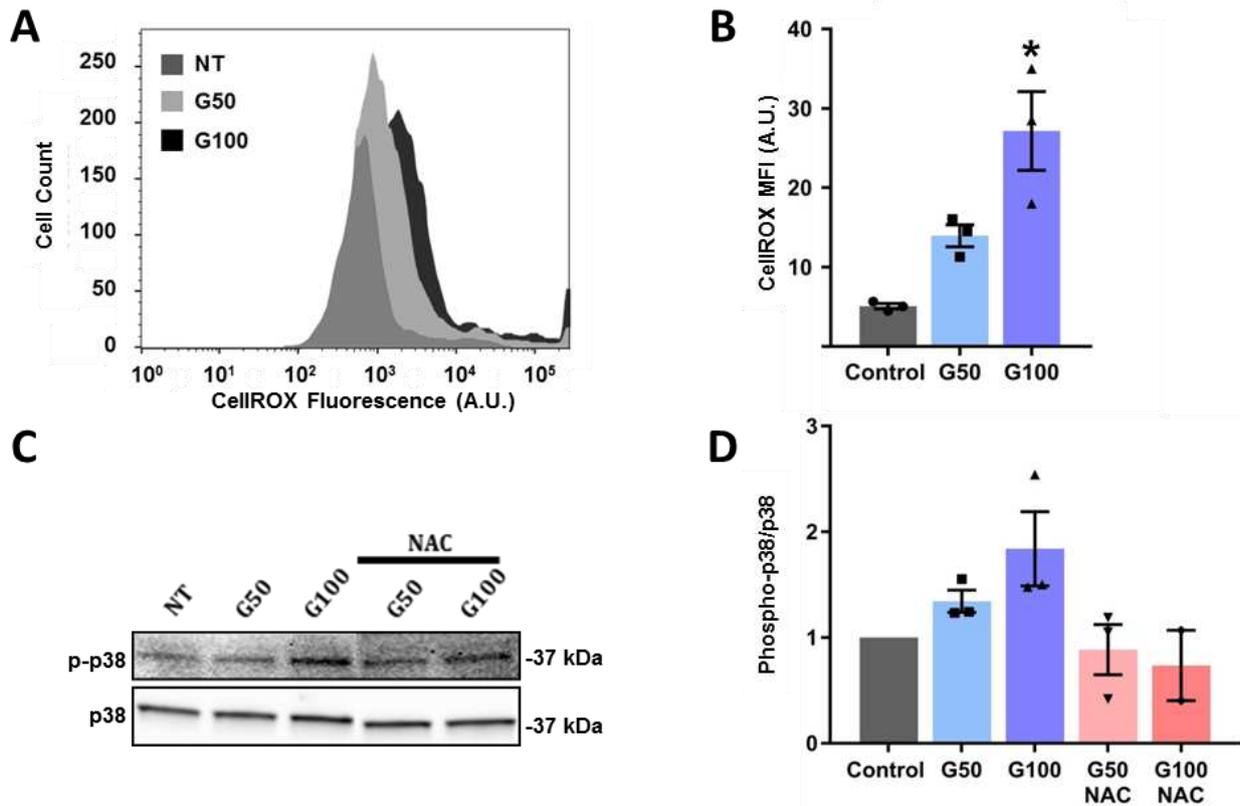


Figure 49. (Figure 2) L'inhibition d'Ucp2 dans les cardiomyocytes néonataux entraîne une augmentation des niveaux de ROS totaux ainsi que l'activation redox-dépendante de la p38MAPK. (A-B) Données représentatives de cytométrie (A) et quantification relative du niveau de ROS totaux (n=3) de cardiomyocytes néonataux cultivés en condition contrôle (DMSO) ou en présence de 50 (G50) et 100 (G100) μ M de génipine (B). (C-D) Western blot et quantification (C) et quantification du ratio phospho-p38/p38 (n=3) (D) de cardiomyocytes cultivés en condition contrôle (NT) ou traités avec de la génipine en présence/absence de NAC (5mM). Les données sont représentées sous forme de pourcentage du contrôle non-traité (n=3). *, p-value < 0.05.

IV. L'augmentation des niveaux de ROS et l'activation prématurée de la voie p38MAPK entraînent une baisse de prolifération des cardiomyocytes néonataux

Au cours du développement et pendant les premiers jours post-nataux, les cardiomyocytes participent à la croissance cardiaque par leur prolifération (Mollova *et al.*, 2013; Sturzu *et al.*, 2015). A la naissance, l'augmentation de la production de mtROS provoquée par leur remodelage métabolique entraîne l'arrêt de leur cycle cellulaire (Puente *et al.*, 2014). L'activation de la voie p38MAPK par les ROS étant impliquée dans cet arrêt (Matsuyama and Kawahara, 2011; Yokota *et al.*, 2020), nous avons évalué les conséquences de l'inhibition

d'Ucp2 sur la prolifération des cardiomyocytes néonataux. Les résultats, présentés dans les figures 3A et 3B, révèlent une réduction de la prolifération des cardiomyocytes traités par la génipine comparés aux contrôles. Cette réduction est partiellement prévenue par l'utilisation du NAC ou du SB203580, inhibiteur spécifique des p38MAPK α/β (Fig. 3A et 3B). En conclusion, cet ensemble de résultats démontre que l'inhibition de l'activité découplante d'Ucp2 dans des cardiomyocytes néonataux entraîne une dysfonction mitochondriale qui provoque l'arrêt de leur prolifération induite en partie par l'activation redox-dépendante de la p38MAPK.

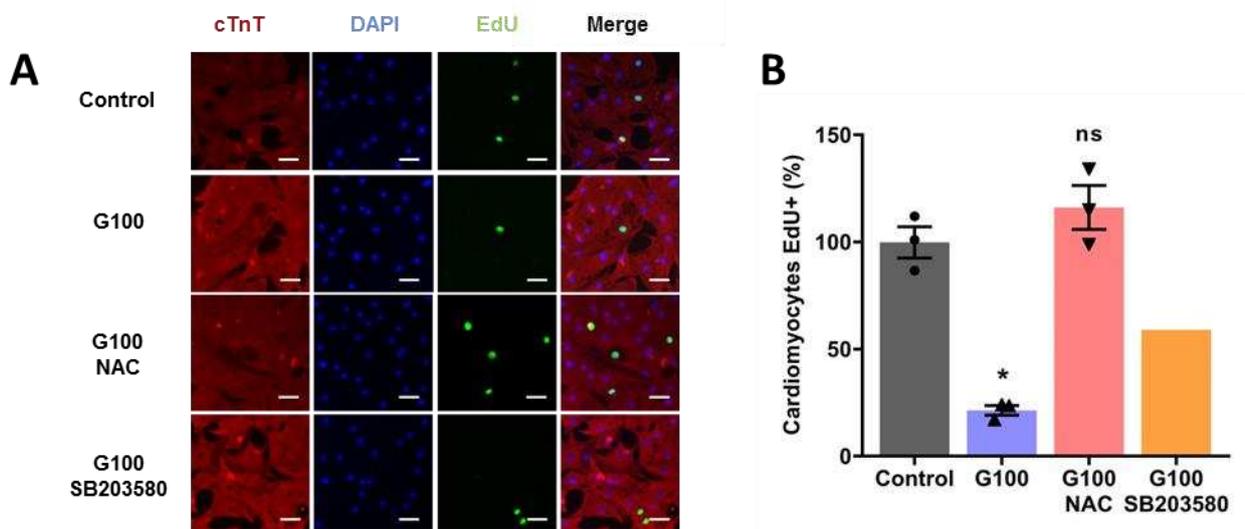


Figure 50. (Figure 3) La diminution du niveau de ROS ou l'inhibition de la P38MAPK préviennent la réduction de prolifération des cardiomyocytes observée après inhibition d'Ucp2. (A) Immunofluorescence présentant l'incorporation EdU de cardiomyocytes cultivés en condition contrôle (DMSO) ou en présence de génipine (100 μ M, G100, n=3), et/ou NAC (5 mM, n=3) et/ou SB203580 (10 μ M, n=1). **(B)** Quantification du pourcentage de cardiomyocytes positifs (cTnT+) pour l'incorporation EdU. Les données sont représentées sous forme de pourcentage du contrôle non-traité. Echelle = 50 μ m. *, p-value < 0.05.

V. Discussion

Nos résultats démontrent que l'inhibition de l'activité découplante d'Ucp2 par la génipine dans les cardiomyocytes néonataux provoque un ralentissement du fonctionnement de la chaîne respiratoire. Cette altération de la fonction mitochondriale s'accompagne d'une augmentation des niveaux de ROS qui entraînent une réduction de la prolifération des cardiomyocytes en activant la voie p38MAPK α , précédemment démontrée comme un acteur important de l'arrêt de prolifération des cardiomyocytes après la naissance (Matsuyama and Kawahara, 2011; Yokota *et al.*, 2020). La réduction de la respiration n'entraînant pas d'altération du potentiel de membrane mitochondrial, il serait intéressant d'étudier l'activité de l'ATP synthase, et de quantifier les niveaux d'ATP des cardiomyocytes traités à la génipine. Cela permettrait de mieux caractériser l'impact de cet inhibiteur sur la fonction mitochondriale et le métabolisme énergétique des cardiomyocytes.

De plus, au vu des résultats obtenus sur les cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} (Résultats Partie 1), il est intéressant de comparer le phénotype de ces mutants avec celui obtenu après inhibition de l'activité découplante de la protéine par la génipine. Ainsi, de façon similaire aux mutants *Ucp2*^{-/-}, le traitement à la génipine entraîne une diminution de la prolifération des cardiomyocytes via l'activation de la voie p38MAPK (Résultats Partie 1/Fig.S5 et Partie 2/Fig2C, 2D, 3A et 3B). L'expression et/ou l'activité d'Ucp2 semble donc critique pour la maintenance de la prolifération des cardiomyocytes néonataux, et il serait intéressant d'étudier l'impact de sa perte sur la croissance cardiaque *in vivo*.

D'autre part, l'absence ou la perte d'activité de la protéine ont toutes deux pour conséquence une diminution de la capacité oxydative des cardiomyocytes néonataux (Résultats Partie 1/Fig. 3A, 3B et Partie 2/Fig. 1A et 1B). Cependant, tandis que la délétion du gène (modèle *Ucp2*^{-/-} ou *Ucp2* ^{Δ/Δ}) entraîne une réduction de la masse mitochondriale qui s'accompagne d'une baisse de la production de mtROS (Résultats Partie 1/Fig. 4G), les cardiomyocytes traités avec la génipine possèdent une masse mitochondriale similaire aux contrôles et une augmentation significative de leurs niveaux de ROS (Résultats Partie 2/Fig. 1D, 2A et 2B). Ceci peut s'expliquer par la double fonction d'Ucp2 de découplant et d'échangeur de métabolite(s). En effet, bien que la génipine ait été démontrée comme capable d'inhiber la conductance protonique d'Ucp2 (Zhang *et al.*, 2006), elle n'a pas d'effet sur sa capacité à exporter le malate, l'aspartate ou l'oxaloacétate *in vitro* (Voza *et al.*, 2014).

Il est donc probable qu'en présence de génipine, l'échange de métabolites, et par conséquent, la régulation du flux du cycle de Krebs effectuée par Ucp2, soient maintenus. L'équilibre de concentrations des différents métabolites comme le succinate et l' α -cétoglutarate serait donc conservé, et permettrait l'expression du programme transcriptionnel post-natal, notamment l'induction de la biogénèse mitochondriale. En revanche, l'inhibition de l'activité découplante d'Ucp2 engendrerait un ralentissement de la chaîne respiratoire et une fuite d'électrons accrue à l'origine d'une augmentation de la production de mtROS. Ceci pourrait expliquer les disparités observées sur les masses mitochondriales et les niveaux de ROS entre les 2 modèles. Une cinétique de l'évolution de la masse mitochondriale, ainsi qu'une analyse métabolomique et/ou transcriptomique des cardiomyocytes cultivés en présence de génipine permettrait de vérifier cette hypothèse. En conclusion, ces résultats montrent que l'utilisation de la génipine représente une approche d'intérêt pour l'étude fonctionnelle d'Ucp2 en permettant de discriminer entre ses 2 activités de découplant et d'export de métabolites.

VI. Matériel et Méthodes

1. Animaux, purification et culture de cardiomyocytes murins néonataux

Tous les animaux ont été traités conformément à la directive 2010/63/EU du parlement Européen et aux normes d'éthique et de bienveillance animale. Des souris Swiss CD-1, fournies par les laboratoires Janvier, sont utilisées pour purifier les cardiomyocytes néonataux. Les cœurs de souris P0 ou P1 sont dissociés à l'aide du Neonatal Heart Dissociation kit (Miltenyi Biotec, 130-098-373). Après élimination des érythrocytes à l'aide du Red Blood Cell Lysis Solution (Miltenyi Biotec, 130-094-183), le Neonatal Cardiomyocyte Isolation Kit (Miltenyi Biotec, 130-100-825) est utilisé pour purifier les cardiomyocytes sur colonne MS (Miltenyi Biotec, 130-042-201) en suivant les instructions du fournisseur. 3.5×10^5 cellules/puit ou 10^5 cellules/puit sont ensuite respectivement mises en culture dans des plaques 12 puits ou XF^e24. Le milieu de culture (DMEM 4.5g/L glucose, L-glutamine, pyruvate, Sigma, D6429) supplémenté avec 5% de serum de veau fœtal (Life Technologies, 10270-106), 10% de sérum de cheval (Life Technologies, 16050-122) et 1X de Pénicilline/Streptomycine (Sigma, P4333), est changé 24h après la mise en culture pour éliminer les débris cellulaires.

2. Traitements des cellules en culture

Après 24h de culture, les cardiomyocytes néonataux sont incubés avec la génipine (Sigma, G4796) ou le DMSO (0.001%) et en présence ou absence de 5mM de N-acétyl-cystéine (NAC, Sigma, A9165) ou de 10 μ M de SB203580 (Sigma, S8307) pendant 48h. La génipine est resuspendue dans le DMSO et conservée à -80°C. Le NAC est conservé à 4°C et resuspendu extemporanément dans l'H₂O puis filtré 0.2 μ M avant chaque utilisation. Le SB203580 est stocké à -20°C dans le DMSO et dilué extemporanément dans le PBS avant chaque traitement.

3. Mesure de la consommation d'O₂ (Oxygen Consumption Rate, OCR) par Seahorse XFe24

Après dissociation et purification, les cardiomyocytes néonataux sont cultivés pendant 48h en condition contrôle (DMSO) ou en présence de concentrations croissantes (10 à 100 μ M)

de génipine. Une heure avant l'analyse, le milieu de culture est remplacé par du milieu non tamponné, pH 7.4 (Agilent, 103575-100) supplémenté avec 10mM de glucose (Agilent, 103577-100), 2mM de L-glutamine (Agilent, 103579-100) et 1mM de pyruvate (Life Technologies, 11360-039). Au cours du Mitostress test, l'ajout successif d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire permet de mesurer les différents paramètres de l'OCR. L'inhibition de l'ATP synthase par l'ajout de 10 μ M d'oligomycine A (Sigma, 75351) permet de calculer la respiration dédiée à la synthèse d'ATP. La respiration maximale est quantifiée après ajout de 10 μ M de FCCP (Sigma, C2920), agent protonophore et découplant. Enfin, la respiration non-mitochondriale est déterminée après ajout simultané de 0.5 μ M de roténone (Sigma, R8875) et d'antimycine A (Sigma, A8674) qui sont respectivement des inhibiteurs des complexes I et III de la chaîne respiratoire. Les données d'OCR sont ensuite normalisées par la quantité totale de protéines par puit.

4. Quantification du potentiel de membrane mitochondrial

Après dissociation et purification, les cardiomyocytes néonataux sont cultivés en condition contrôle (DMSO) ou en présence de 50 et 100 μ M de génipine. Après 48h de culture, les cardiomyocytes sont dissociés avec de l'Accutase (Life Technologies, A11105-01) puis incubés pendant 10min dans du milieu de culture contrôle ou contenant 10 μ M de FCCP. La sonde JC-10 (Sigma, MAK159) est ensuite ajoutée conformément aux instructions fournisseur, soit 1X. Après 30 min d'incubation à 37°C, 5% CO₂ à l'abri de la lumière, le ratio 590/525nm (forme monomérique λ_{ex} = 490nm; λ_{em} = 525nm; forme agrégée λ_{ex} = 540nm; λ_{em} = 590nm) est quantifié par cytométrie à l'aide du MACSQuant VYB (Miltenyi Biotec).

5. Quantification des niveaux de ROS totaux

Après dissociation et purification, les cardiomyocytes néonataux sont cultivés en condition contrôle (DMSO) ou en présence de 50 et 100 μ M de génipine. Après 48h de culture, les cardiomyocytes sont incubés pendant 30 min, 5% CO₂ avec 5 μ M de sonde CellROX DeepRed (Life Technologies, C10422). Les cellules sont ensuite dissociées avec de l'Accutase (Life Technologies, A11105-01), fixées avec de la formaline 10% pendant 10min, puis centrifugées et resuspendues dans du PBS. L'émission de fluorescence à 665 nm (λ_{ex} = 640nm) est quantifiée par cytométrie avec le MACSQuant (Miltenyi Biotec).

6. Incorporation EdU, marquage TUNEL, immunofluorescence

Après dissociation et purification, les cardiomyocytes néonataux sont cultivés en condition contrôle (DMSO) ou en présence de 50 et 100 μM de génipine. Après 24h de culture, les cellules sont incubées avec 10 μM d'EdU (ThermoFisher Scientific, C10337) pendant 24h. Les cellules sont fixées dans la formaline 10%, puis perméabilisées au PBS-Triton 0.5% pendant 15min. L'incorporation d'EdU est détectée par incubation pendant 30min à température ambiante avec le mix réactionnel Alexa Fluor 488 Click-iT (ThermoFisher Scientific, C10337). Après lavages PBS, les cellules sont incubées 1h à température ambiante dans une solution de PBS-Gélatine 0.02%, puis sur la nuit à 4°C avec l'anticorps anti-cTnT (ThermoFisher Scientific, MS-295-P1, 1:100 dans du PBS-Gélatine 0.02%). Après lavages, les cellules sont incubées pendant 30 min avec une solution de PBS-Gélatine 0.02% contenant l'anticorps secondaire anti-souris Alexa 546 (1 :250, ThermoFisher Scientific, A-11003) et du Hoescht 33342 (1:2000, ThermoFisher Scientific, H3570).

Pour quantifier l'apoptose, les cellules fixées puis perméabilisées sont traitées ou non à la DNase (Macherey-Nagel, 740963) pendant 20min à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1h à 37°C avec le mix réactionnel du Kit *In Situ* Cell Death Detection (Roche, 11684-1795-910). Après lavages PBS, les cellules sont marquées cTnT et Hoescht 33342 comme décrit ci-dessus.

La fluorescence est détectée par microscopie optique à l'aide du microscope à fluorescence motorisé (Dmi8, Leica Microsystems) et du logiciel associé LASX, puis analysée à l'aide du logiciel Image J.

7. Extraits protéiques et Western blots

Les cardiomyocytes sont lavés au PBS froid puis grattés et lysés dans du tampon RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% déoxycholate de sodium, 0.1% SDS) (Sigma, R0278) supplémenté en EDTA (5mM), et en inhibiteurs de phosphatases (1X) et de protéases Halt (ThermoFisher Scientific, 78420 et 78429). Après centrifugation et récupération du surnageant contenant les protéines solubles, la concentration protéique est déterminée à l'aide du test BCA. Pour chaque échantillon, 30 μg de protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) à l'aide de gels pré-coulés Tris-glycine Any-KD (Biorad, 5671123). Après transfert sur membrane de nitrocellulose 0.45 μm , puis blocage dans une solution de TBS-Tween 0.1%, 5% lait pendant 1h à température

ambiante, les membranes sont incubées sur la nuit à 4°C en TBS-Tween 0.1%, 5% lait écrémé avec l'anticorps primaire anti-phospho-p38MAPK (Cell Signaling Technologies, #9216) (1 :1000) ou anti-p38MAPK (Cell Signaling Technologies, #9212) (1 :1000). Après incubation avec les anticorps secondaires anti-IgG de souris HRP (1 :10000) ou anti-IgG de lapin HRP (1 :10000) (GE Healthcare UK, NA934V et NA931V) à température ambiante pendant 2h, les révélations sont faites à l'aide du lecteur ChemiDoc MP Imaging System (Biorad) en présence du substrat chemiluminescent Clarity ou Clarity Max (Biorad, 170-5060 et 170-5062). Les révélations des formes phosphorylée et totale sont réalisées sur la même membrane. L'intensité relative des bandes correspondant à p38 ou à phospho-p38 ont été quantifiées à l'aide du logiciel Image J.

8. Quantification du ratio ADN mitochondrial / ADN nucléaire

L'ADN est extrait des cardiomyocytes en culture à l'aide du DNA Mini Kit (Qiagen, 69504). Les cellules ont été grattées et lysées directement dans le tampon de lyse fourni par le kit, et l'ADN est purifié sur colonne (Qiagen, 69504). La concentration en ADN est déterminée à l'aide du spectrophomètre Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific). La quantification des ADNs mitochondrial et génomique ont été réalisées par qPCR à l'aide du marqueur fluorescent SYBR (ThermoFisher Scientific, 4309155) et des primers dirigés contre le locus mitochondrial *CytB* (Fw : 5'-CATTTATTATCGCGGCCCTA-3'; Rev : 5'-TGTTGGGTTGTTTGATCCTG-3') et le locus nucléaire *Ndufv1* (Fw : 5'-CTTCCCCACTGGCCTCAAG-3'; Rev : 5'-CCAAAACCCAGTGATCCAGC-3'). L'abondance relative de l'ADN mitochondrial est ensuite estimée à l'aide de la méthode de calcul $2^{-\Delta C_p}$ en utilisant le locus nucléaire *Ndufv1* comme référence.

VII. Références Bibliographiques

1. Elorza, A. et al. (2008) 'UCP2 modulates cell proliferation through the MAPK/ERK pathway during erythropoiesis and has no effect on heme biosynthesis', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(45), pp. 30461–30470. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M805400200>.
2. Hilse, K.E. et al. (2018) 'The Expression of Uncoupling Protein 3 Coincides With the Fatty Acid Oxidation Type of Metabolism in Adult Murine Heart', *Frontiers in Physiology*, 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.00747> (Accessed: 20 May 2022).
3. Kreiter, J. et al. (2019) 'Molecular Mechanisms Responsible for Pharmacological Effects of Genipin on Mitochondrial Proteins', *Biophysical Journal*, 117(10), pp. 1845–1857. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.10.021>.
4. Matsuyama, D. and Kawahara, K. (2011) 'Oxidative stress-induced formation of a positive-feedback loop for the sustained activation of p38 MAPK leading to the loss of cell division in cardiomyocytes soon after birth', *Basic Research in Cardiology*, 106(5), pp. 815–828. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00395-011-0178-8>.
5. Mollova, M. et al. (2013) 'Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(4), pp. 1446–1451. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1214608110>.
6. Porrello, E.R. et al. (2011) 'Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart', *Science*, 331(6020), pp. 1078–1080. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1200708>.
7. Puente, B.N. et al. (2014) 'The Oxygen-Rich Postnatal Environment Induces Cardiomyocyte Cell-Cycle Arrest through DNA Damage Response', *Cell*, 157(3), pp. 565–579. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.032>.
8. Raho, S. et al. (2020) 'KRAS-regulated glutamine metabolism requires UCP2-mediated aspartate transport to support pancreatic cancer growth', *Nature Metabolism*, 2(12), pp. 1373–1381. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00315-1>.
9. Sturzu, A.C. et al. (2015) 'Fetal Mammalian Heart Generates a Robust Compensatory Response to Cell Loss', *Circulation*, 132(2), pp. 109–121. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011490>.
10. Vozza, A. et al. (2014) 'UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3), pp. 960–965. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1317400111>.
11. Yatscoff, M.A. et al. (2008) 'Myocardial hypertrophy and the maturation of fatty acid oxidation in the newborn human heart', *Pediatric Research*, 64(6), pp. 643–647. Available at: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318184d281>.
12. Yokota, T. et al. (2020) 'p38 Mitogen-activated protein kinase regulates chamber-specific perinatal growth in heart', *Journal of Clinical Investigation*, 130(10), pp. 5287–5301. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI135859>.
13. Zhang, C.-Y. et al. (2006) 'Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced β cell dysfunction in isolated pancreatic islets', *Cell Metabolism*, 3(6), pp. 417–427. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.04.010>.

Conclusions générales

Préambule

En tant que protéine découplante, Ucp2 a été majoritairement étudié pour son rôle de régulateur redox. Néanmoins, plusieurs études ont démontré son implication dans la régulation des préférences métaboliques de la cellule, privilégiant l'oxydation de substrats alternatifs au glucose, ou stimulant la glycolyse plutôt que l'oxydation du pyruvate (Pecqueur *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Cette fonction peut s'expliquer par un nouveau mécanisme découvert pour Ucp2, qui est capable d'échanger des intermédiaires métaboliques à 4 carbones (*ie.* oxaloacétate, malate, aspartate) de la matrice mitochondriale vers le cytosol (Vozza *et al.*, 2014; Raho *et al.*, 2020). Par conséquent, selon le contexte cellulaire, Ucp2 peut être un régulateur de l'activité métabolique de la mitochondrie, et/ou de sa production de ROS. Ucp2 a été étudié dans une variété importante de tissus, mais son rôle dans le cœur est peu connu. Chez la souris, l'expression cardiaque de la protéine Ucp2 est élevée pendant la première semaine post-natale, puis diminue jusqu'à être indétectable chez l'adulte (Hilse *et al.*, 2018). Nos résultats de RT-qPCR présentent un profil d'expression cardiaque de l'ARNm d'*Ucp2* similaire : *Ucp2* est exprimé relativement faiblement à la fin de la gestation (E16.5), montre un pic à P1, et ses niveaux d'ARNm sont drastiquement réduits dans le cœur adulte. Ce profil d'expression temporellement restreint suggère une fonction spécifique d'*Ucp2* dans le cœur néonatal, qui est soumis à une transition phénotypique importante, dans laquelle la mitochondrie joue un rôle central de signalisation. Mes travaux de thèse se sont attachés à caractériser le phénotype cardiaque des souris néonatales *Ucp2*^{-/-}, et démontrent l'importance de l'activité d'*Ucp2* pour assurer la maturation du cœur.

Conclusions générales

Après la naissance, les cardiomyocytes effectuent une maturation structurale et biochimique importante. Leur métabolisme énergétique s'oriente vers la phosphorylation oxydative mitochondriale et la β -oxydation, tandis que leurs myofibrilles subissent une élongation et un réarrangement assurant la croissance hypertrophique des cardiomyocytes aux dépens de la prolifération. Pendant la période néonatale, le métabolisme mitochondrial est à la fois un producteur d'ATP nécessaire à la fonction de contraction et un médiateur de la signalisation permettant l'acquisition d'un phénotype cardiaque mature. Ucp2 étant un régulateur de l'activité mitochondriale dont l'expression est temporellement restreinte à la période périnatale, nous nous sommes intéressés à l'effet potentiel de la délétion d'Ucp2 sur la maturation des cardiomyocytes néonataux.

L'étude du transcriptome du cœur néonatal *Ucp2*^{-/-} a montré des dérégulations importantes des gènes impliqués dans le fonctionnement du cœur adulte. Ainsi, nous avons détecté une sous-expression de gènes codant pour des protéines chargées de l'épissage alternatif (*Mbnl1/2*, *Rbfox1*, *Celf2/4*) permettant la transition vers des variants matures de protéines sarcomériques. De plus, plusieurs gènes associés à l'électrophysiologie du cardiomyocyte adulte (*Kcnq1*, *Cacna1d*), son cytosquelette (*Dmd*), sa machinerie contractile (*Gata4*, *Myl4*, *Myo3a*) ou son métabolisme (*Errg*, *Pgc1a*, *Hk2*) sont également sous-exprimés. Ces résultats montrent que la perte d'Ucp2 entraîne un défaut d'initiation de l'expression des gènes associés à la maturation contractile et métabolique. Nous avons donc caractérisé les conséquences phénotypiques de ces dérégulations en nous intéressant aux voies de signalisation caractéristiques de la maturation cardiaque, ainsi qu'au comportement métabolique et à la contractilité des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-}.

Nous avons montré que les niveaux d'expression de protéines régulatrices de la biogénèse mitochondriale et de la β -oxydation (*Pgc-1 α* , *Sirt1*, *Nrf1*, *pAMPK*) dans les cœurs *Ucp2*^{-/-} néonataux sont réduits, entraînant une diminution de la masse mitochondriale, une dérégulation de l'expression relative des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire ainsi qu'une diminution de l'expression des enzymes de la β -oxydation. A cela s'ajoute la maintenance de l'expression du transporteur de glucose *Glut1*, qui diminue normalement au profit de celle de l'isoforme *Glut4*, plus efficace mais insulino-dépendant, pendant la

maturation. En conséquence, le cœur *Ucp2*^{-/-} présente une utilisation réduite des acides gras pour assurer la phosphorylation oxydative et cette altération du métabolisme oxydatif n'est pas compensée par l'activité glycolytique. Il en résulte des niveaux d'ATP fortement réduits, indiquant que les cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} présentent un déficit énergétique. L'ensemble de ces résultats démontre un défaut de transition métabolique vers le métabolisme oxydatif mitochondrial et la β -oxydation. Nous avons également constaté une diminution des niveaux de ROS mitochondriaux (mtROS), qui sont normalement impliqués dans la signalisation redox initiée par la mitochondrie et dans l'arrêt du cycle cellulaire des cardiomyocytes à la naissance. Cette diminution s'accompagne d'une dérégulation des voies impliquées dans la signalisation redox initiée par la mitochondrie (DDR, p38MAPK) et d'une réduction de la prolifération des cardiomyocytes.

L'étude de la dynamique de contraction de sphéroïdes cardiaques *Ucp2*^{-/-} en réponse à la stimulation électrique démontre que le temps de contraction/relaxation est prolongé en absence d'Ucp2. Ceci se traduit par une réduction de la fréquence de battement maximale en comparaison avec des sphéroïdes contrôles. Ces observations indiquent une dysfonction contractile et corrélerent donc à nos données transcriptomiques, qui montrent une sous-expression de gènes assurant la maturation contractile des cardiomyocytes.

Enfin, l'étude du métabolisme des cœurs *Ucp2*^{-/-} a démontré que la perte d'Ucp2 entraîne une dépendance au métabolisme de la glutamine semblant s'opérer via le GABA shunt, permettant ainsi de maintenir une activité oxydative. Cependant, ce phénotype compensatoire implique le déséquilibre de l'abondance relative des intermédiaires du cycle de Krebs, en particulier, la réduction des niveaux d' α -cétoglutarate (α -KG) et l'élévation des niveaux de succinate. Ces deux intermédiaires du cycle de Krebs sont respectivement cofacteur et inhibiteur des enzymes TET, qui sont des acteurs clés de l'activation de la transcription du programme transcriptionnel mature à la naissance. Bien que nous n'ayons pas encore quantifié l'activité TET, nous avons montré que l'utilisation d'un inhibiteur de ces dernières sur des cardiomyocytes WT provoquait une baisse de la masse mitochondriale similaire à celle observée dans les cardiomyocytes mutants *Ucp2*. Nous proposons donc qu'en absence d'Ucp2, la dérégulation du cycle de Krebs entraîne une baisse d'activité TET, qui expliquerait les dérégulations transcriptomiques, ainsi que les défauts de maturation métabolique et contractile observés dans les cardiomyocytes mutants.

En conclusion, nos résultats démontrent l'importance de l'activité d'Ucp2 pour initier le programme transcriptionnel permettant la maturation des protéines sarcomériques et de celles impliquées dans l'électrophysiologie et le métabolisme des cardiomyocytes. La perte d'Ucp2 est associée à la dérégulation d'acteurs clefs de la maturation tels que Pgc-1 α , Nrf1, *Gata4*, *Errg* ou les voies de signalisation DDR et AMPK, qui entraîne une inhibition de la biogénèse mitochondriale et de la β -oxydation ainsi qu'une altération de la contractilité. Ce défaut d'initiation de la maturation s'explique par les niveaux réduits d' α -KG, cofacteurs des enzymes TET qui participent à l'activation transcriptionnelle à la naissance. Le mécanisme mis en jeu reste cependant à éclaircir. En effet, nous pouvons supposer que la capacité d'Ucp2 à exporter les intermédiaires du cycle de Krebs permettrait d'assurer la disponibilité des cofacteurs nécessaires à la modification du paysage épigénétique impliqués dans l'initiation du programme transcriptionnel mature. Ceci suggère donc l'existence d'une signalisation rétrograde mitochondriale en amont de la signalisation redox induite par l'élévation de la capacité oxydative et la production de mtROS par la chaîne respiratoire mitochondriale.

Discussion et Perspectives

Discussion

I. Défaut de maturation et insuffisance cardiaque associés à la perte d'Ucp2

A. Dérégulation de la transition du métabolisme oxydatif en absence d'Ucp2 et conséquences sur la maturation structurelle du cœur et des cardiomyocytes

Nous avons montré que la perte d'Ucp2 est associée à l'immaturation métabolique et contractile du cœur néonatal. Ainsi, la perte d'Ucp2 entraîne des phénotypes similaires à ceux observés par l'équipe d'Hesham Sadek sur des souris placées en conditions hypoxiques à la naissance, qui est associée à un retard de transition vers le métabolisme oxydatif (Puente *et al.*, 2014). Tout comme eux, nous avons observé une diminution de la production de mtROS et de l'activation de la voie DDR en comparaison avec nos souris contrôles. Cette observation, faite peu de temps après la naissance (P0), peut s'expliquer par le défaut d'activation de l'AMPK que nous avons observé. Cette voie, en inhibant ACC1/2, permet l'entrée des acides gras dans la matrice mitochondriale (Makinde, Gamble and Lopaschuk, 1997) et donc, la β -oxydation, qui est associée à une production de mtROS plus élevée que l'oxydation du pyruvate (Rosca *et al.*, 2012). Ce constat est confirmé par le cœur des souris $\alpha MHC::Pdk4^{-/-}$ qui utilise majoritairement le pyruvate et qui montre des marques de dommages oxydatifs à l'ADN réduits (Cardoso *et al.*, 2020). Le défaut d'activation de la voie AMPK peut être dû à la forte diminution de l'expression de *Cab39l* observée dans les cardiomyocytes P0. En effet, les travaux de Li *et al.* ont révélé un rôle positif de CAB39L (humain), dans l'activation de l'AMPK dépendante de Lkb1, ainsi que dans la stimulation du métabolisme oxydatif et la biogénèse mitochondriale (Li *et al.*, 2018). *Cab39l* est fortement exprimé dans les cardiomyocytes P0 contrôles, et il est possible que son expression, en stimulant la phosphorylation de l'AMPK, soit un élément important de la maturation métabolique cardiaque.

De plus, les données de LC/MS de Puente *et al.* montrent que la transition vers le métabolisme oxydatif implique une élévation de l'expression des enzymes de la β -oxydation détectables à partir du stade P4. L'augmentation du nombre de copies d'ADN mitochondrial et de crêtes est détectable au stade P7, bien que ces paramètres n'aient pas été mesurés ou présentés à des stades plus précoces (Puente *et al.*, 2014). Nos données de LC/MS obtenues à partir de cœurs P3 montrent une maintenance de l'expression de l'isoforme immature du transporteur de glucose Glut1, ainsi qu'une diminution de l'expression des enzymes de la β -oxydation. Ces résultats coïncident donc avec un défaut d'expression des protéines impliquées dans la transition vers le métabolisme oxydatif et la β -oxydation à la naissance. Le métabolisme mitochondrial étant central à la fois dans la production d'ATP et dans la signalisation impliquée dans la maturation, l'altération de la β -oxydation participe probablement au maintien dans le temps de phénotypes immatures dans le cœur *Ucp2*^{-/-}. Par exemple, les niveaux plus faibles de Sirt1, Nrf1 et de certaines sous-unités de la chaîne respiratoire observés à P3 se maintiennent jusqu'à P15. Par conséquent, la dérégulation de l'expression génique que nous avons observée dans les cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} pourrait elle aussi persister, au moins en partie, jusqu'au stade P15. De plus, à la naissance, la mitophagie assure l'élimination des mitochondries fœtales au profit de nouvelles mitochondries utilisant la β -oxydation, dont la structure et le réseau sont différents. Tandis que les mitochondries fœtales sont allongées et curvilinéaires, les mitochondries du cœur adulte sont plus grosses et ovoïdes. L'inhibition de la mitophagie entraîne ainsi des défauts de maturation métabolique similaires à ceux que l'on observe dans le cas de la délétion d'*Ucp2*, à savoir, une inhibition de l'induction de la β -oxydation, et une dysfonction contractile. Cette altération métabolique associée à l'inhibition de la mitophagie à la naissance est accompagnée d'une morphologie aberrante du réseau mitochondrial, qui présente des similitudes avec le réseau fœtal (Gong *et al.*, 2015). En cas d'ischémie cardiaque, *Ucp2*, en stimulant la mitophagie, a été décrit comme ayant un effet cardioprotecteur (Wu, Ye, Liu, Yang, J. Ding, *et al.*, 2019). Il est donc possible que la perte d'*Ucp2* diminue l'efficacité de la mitophagie, et participe au défaut d'acquisition des phénotypes matures que nous avons observé.

Il serait donc intéressant de caractériser la cinétique des changements morphologiques des cardiomyocytes et de leur réseau mitochondrial. Pour ce faire, nous voudrions utiliser la

microscopie électronique sur coupe de ventricules cardiaques. Nous étudierions la morphologie des mitochondries, le volume qu'elles occupent au sein des cellules, le nombre de leurs crêtes, et ce, à plusieurs âges. De plus, pour évaluer la dynamique de la mitophagie, nous nous intéresserions au nombre de mitochondries présentes dans des vésicules lysosomales (augmentation de la mitophagie), ou ayant une morphologie altérée/fœtale (inhibition de la mitophagie). L'étude de la potentielle dérégulation des gènes codants pour des protéines participant à la fission ou à la mitophagie par Western blot viendrait par ailleurs compléter ces observations et confirmer ou infirmer le rôle éventuel d'Ucp2 dans la régulation de la dégradation des mitochondries cardiaques pendant la transition néonatale. La microscopie électronique nous servira également à caractériser la structure des sarcomères, et l'alignement des myofibrilles, qui sont une composante importante des changements structuraux que subit le cardiomyocyte en maturation (Karbassi *et al.*, 2020).

D'autres coupes associées à de la coloration au rouge Sirius ou au couple éosine/hématoxyline nous permettront d'évaluer la taille du myocarde, la présence de fibroblastes interstitiels qui serait le signe d'une cardiomyopathie, et d'identifier d'éventuels défauts de croissance ou de morphologie des chambres cardiaques. En parallèle, des expériences d'immunofluorescence sur coupe nous permettraient d'évaluer la cinétique de la maturation hypertrophique et de la binucléation des cardiomyocytes en absence d'Ucp2 en marquant leurs membranes au WGA. De plus, les cardiomyocytes matures adoptent une forme rectangulaire, et les connexines forment des jonctions gap localisées aux extrémités (Karbassi *et al.*, 2020). Nous pourrions donc marquer la connexine 43 pour conclure la caractérisation de la cinétique de la maturation morphologique et structurelle des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-}.

Bien que nos résultats actuels soient suffisants pour statuer sur un défaut de maturation, l'ensemble de ces manipulations supplémentaires donneraient une vue d'ensemble de l'impact de la perte d'Ucp2 sur les changements phénotypiques des cardiomyocytes mobilisés après la naissance.

B. Rôle potentiel d'Ucp2 dans le cœur fœtal

Bien que le pic d'expression cardiaque d'Ucp2 soit observé à P1, la protéine est détectable à E18, soit à la fin du développement fœtal (Hilse *et al.*, 2018) (Annexe 11). Les niveaux d'expression de la protéine Ucp2 à des stades antérieurs sont à ce jour inconnus. Ces observations corrént avec le profil d'expression mARN cardiaque que nous avons mesuré. En effet, Ucp2 est exprimé à E16.5, fortement à P1, et faiblement chez l'adulte. Le profil d'expression ARN corréle donc avec le profil d'expression protéique présenté par les travaux de Hilse *et al.*, suggérant ainsi une possible expression protéique d'Ucp2 à E16.5. Il est donc probable qu'Ucp2 participe à la maturation cardiaque pendant le développement fœtal.

Les travaux de Menendez-Montes *et al.* ont démontré que, pendant la transition du cœur embryonnaire au cœur fœtal, la surexpression de Hif-1 α via la délétion cardiomyocyte-spécifique de son répresseur *Vhl*, entraîne une répression de *Pgc1 α* . Cette diminution des niveaux de *Pgc1 α* conduit à une inhibition de la biogénèse mitochondriale, des aberrations morphologiques des chambres cardiaques ainsi qu'une létalité prénatale. Cette étude révèle que dans le cœur, l'expression spatiotemporelle de Hif-1 α est strictement régulée : ses niveaux dans les ventricules diminuent autour de E14.5 pour permettre l'expression de *Pgc-1 α* , une augmentation de la masse mitochondriale et de la capacité oxydative qui prélude à la naissance (Menendez-Montes *et al.*, 2016). La maturation métabolique des cardiomyocytes débute donc pendant le développement fœtal, et Ucp2 pourrait y participer. A P0, soit avant le pic d'expression d'Ucp2, nous avons détecté une diminution de l'expression de *Pgc-1 α* (significative), *Nrf1* et *Sirt1* (non-significative) dans les cœurs *Ucp2*^{-/-}. Nous observons également une diminution de l'expression ARNm de deux partenaires importants de *Pgc1 α* pour assurer la maturation, *Errg*, et *Gata4*, qui assurent la synchronisation de la maturation du métabolisme et de la machinerie contractile (Figure 51) (Sakamoto *et al.*, 2022), dans les cardiomyocytes mutants. De plus les niveaux de ROS mitochondriaux des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} sont réduits. En revanche, la masse mitochondriale, à la différence du stade P3, est similaire au contrôle dans les cœurs *Ucp2*^{-/-} P0. En outre, la dérégulation de l'expression des sous-unités de la chaîne respiratoire est beaucoup moins importante que celle observée à P3. Par conséquent, bien que les

dérégulations à P0 puissent résulter de l'absence d'Ucp2 pendant le développement foetal, l'aggravation au fil du temps atteste de son rôle durant la période périnatale.

Un argument pour conclure quant à l'effet post-natal d'Ucp2 est notre modèle induit. En effet, la délétion d'Ucp2 par un adénovirus permettant l'expression de la CRE recombinase (Ad-CRE) dans des cardiomyocytes P0 *Ucp2^{Fl/Fl}* purifiés, montre des phénotypes similaires au cœur et aux cardiomyocytes *Ucp2^{-/-}*. Ainsi, 72h après le traitement avec l'Ad-CRE, nous avons observé une diminution de presque 50% du nombre de copies d'ADN mitochondrial par cellule, ainsi qu'une diminution importante de la respiration mitochondriale et une dépendance à la glutamine. D'une part, ces données suggèrent que la mise en culture des cardiomyocytes P0 reproduit une partie des éléments de la maturation. Ceci pourrait être dû à l'exposition à des niveaux d'O₂ atmosphérique, ou à la présence d'acide gras dans le milieu de culture. En tout état de cause, ces observations sur le modèle induit sont tout à fait en accord avec les données obtenues sur le cœur *Ucp2^{-/-}*, comme la diminution de l'expression des sous-unités de la chaîne respiratoire, du ratio mtDNA/nucDNA et des protéines de la β -oxydation, et la surreprésentation de la glutamine et des intermédiaires à 4 carbones du cycle de Krebs. Cette délétion spécifique d'Ucp2 dans les cardiomyocytes postnataux confirme donc qu'Ucp2 joue un rôle important de régulation du métabolisme après la naissance et que les phénotypes observés ne peuvent pas être inférés uniquement à une altération de la maturation foetale. Néanmoins, ils n'excluent pas un rôle potentiel d'Ucp2 à la fin du développement.

Il serait donc intéressant de vérifier si les dérégulations que nous avons observées à P0 sont déjà détectables dans les cœurs *Ucp2^{-/-}* aux stades E16.5 et E18, et donc, de vérifier si Ucp2 joue un rôle pendant la transition métabolique prénatale.

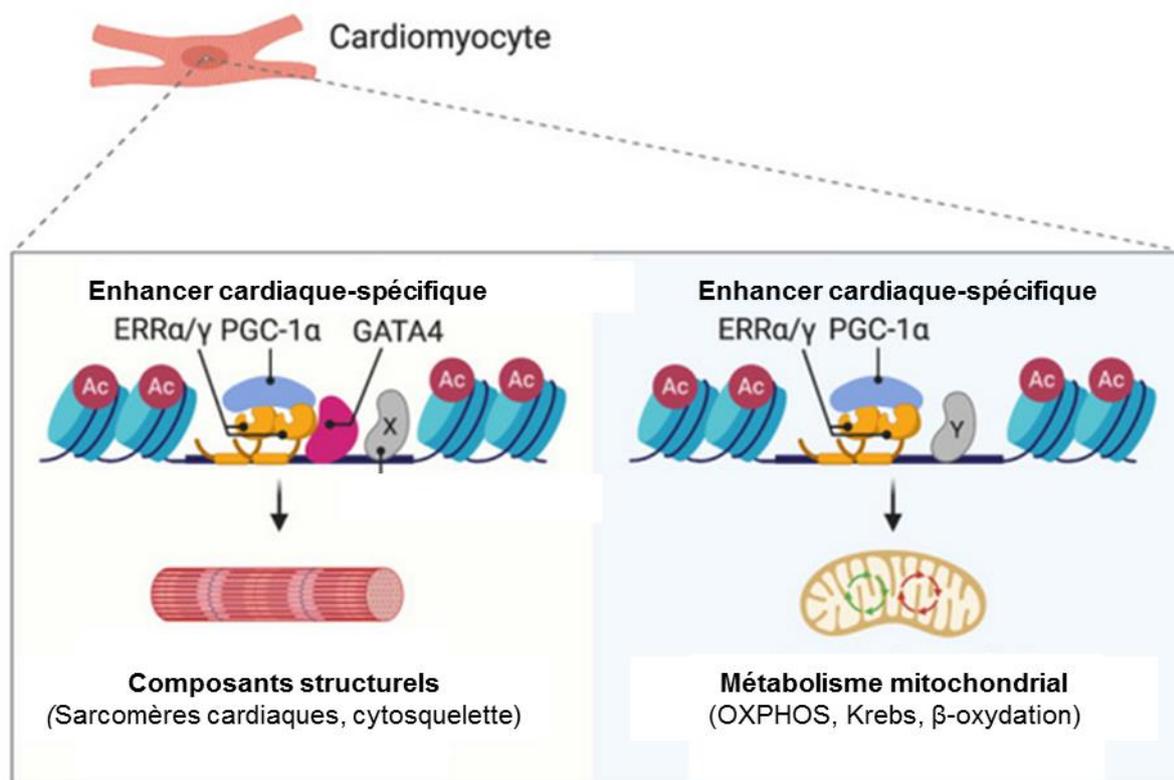


Figure 51. ERR α , ERR γ , GATA4 et PGC-1 α coordonnent la maturation contractile et métabolique des cardiomyocytes. L'expression des composants de la machinerie contractile requièrent leur interaction avec le facteur de transcription GATA4, tandis que la régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'OXPHOS et la β -oxydation sont indépendants de ce dernier. Adapté de Sakamoto et al., 2022 dans des CMs dérivés d'iPSC humaines.

C. Potentielle insuffisance cardiaque de long terme associée à la perte d'Ucp2

Mes travaux de thèse ont démontré que la perte d'Ucp2 est associée à une dysfonction contractile des cardiomyocytes néonataux. Bien qu'elle atteste d'une capacité contractile réduite, l'approche sphéroïde que nous avons employée pose la question de la traduction de ces interprétations à un modèle *in vivo*, où la physiologie et la structure des chambres cardiaques sont conservées. Les cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} présentent un temps de contraction/relaxation plus long, et une incapacité à suivre des fréquences de stimulation élevées, qui se traduit probablement au niveau cardiaque par une capacité de contraction du myocarde altérée, et donc, à un phénotype d'insuffisance cardiaque.

Cette altération de la contractilité peut s'expliquer par plusieurs de nos données. Tout d'abord, nous avons montré que le phénotype métabolique des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-}

entraîne un déficit énergétique. La contraction des myofibrilles nécessite l'hydrolyse d'ATP par les myosines et la relaxation requiert le pompage actif de Ca^{2+} par les SERCA2a, qui sont des ATPases (Zhihao *et al.*, 2020). Ainsi, une difficulté à produire de l'ATP peut expliquer une dysfonction contractile. En outre, nous avons détecté une baisse de prolifération des cardiomyocytes néonataux, *in vitro* comme *in vivo*. Les sphéroïdes cardiaques, pour être au plus proche de la composition des cœurs *Ucp2^{-/-}*, n'ont pas été produits à partir de suspensions de cardiomyocytes purifiés comme dans nos autres manipulations (ex. mesure de l'OCR via Seahorse). Ainsi, une baisse de prolifération a pu entraîner une diminution de la proportion de cardiomyocytes dans la suspension, et donc, un défaut de contractilité des sphéroïdes. Il faut néanmoins noter que les fibroblastes cardiaques expriment des canaux calciques et des connexines et sont donc capables, dans une certaine mesure, de conduire les potentiels d'action (Gaudesius *et al.*, 2003). Ainsi, la diminution modérée de la proportion de cardiomyocytes dans les sphéroïdes, bien qu'elle puisse induire une diminution de la force de contraction, ne devrait pas avoir de répercussions sur la fréquence de battements maximale ou le temps de contraction/relaxation.

Enfin, nos données de transcriptomique montrent une dérégulation de l'expression de gènes qui sont impliqués dans la maturation de la machinerie contractile comme le facteur de transcription *Gata4*, ou les gènes associés à l'épissage alternatif comme *Mbl1/2* et *Celf2/4*. (Kalsotra *et al.*, 2008; Sakamoto *et al.*, 2022). Ceci s'accompagne de la sous-expression de canaux ioniques et d'isoformes matures des protéines sarcomériques. Nous proposons que cette dérégulation joue un rôle majeur dans le défaut de contractilité des cardiomyocytes *Ucp2^{-/-}*. Par exemple, les canaux ioniques matures participent au changement de comportement électrophysiologique des cardiomyocytes, notamment, l'intensité de leur réponse à la dépolarisation de leur membrane. Le potentiel de repos des cardiomyocytes matures est plus faible, ce qui empêche l'automaticité, mais en contrepartie, permet une induction de potentiel d'action plus rapide et de plus grande amplitude en réponse à la dépolarisation (Peinkofer *et al.*, 2016). La stimulation électrique entraîne ainsi plus rapidement la contraction des cardiomyocytes matures, et ce retard de maturation électrophysiologique des cardiomyocytes *Ucp2^{-/-}* pourrait expliquer la contractilité altérée observée dans le modèle sphéroïde. Cette altération de la maturation électrophysiologique pourrait se traduire *in vivo* par une persistance de l'automaticité normalement restreinte

aux cardiomyocytes nodaux après la maturation, et entraîner des arythmies localisées dans les cœurs *Ucp2^{-/-}*.

En outre, la difficulté à suivre des fréquences de contraction élevée (>5Hz) des sphéroïdes *Ucp2^{-/-}* pourrait suggérer une incapacité à augmenter la fréquence cardiaque *in vivo* en conditions de stress ou d'effort, sans que cela soit détectable en conditions basales. Pour affiner nos approches, confirmer l'insuffisance cardiaque et la potentielle incapacité du cœur *Ucp2^{-/-}* à se soumettre à une élévation de la fréquence de battements, il serait intéressant de procéder à des échocardiographies ou des électrocardiogrammes en conditions basales et pendant un test d'effort. Dans ce dernier cas, un autre problème se pose : comment effectuer un test d'effort sur des souriceaux néonataux ? Une solution alternative pourrait être d'étudier la capacité des cœurs *Ucp2^{-/-}* à augmenter leur fréquence de battements en réponse à une stimulation β -adrénergique.

Nous avons observé que plusieurs voies dérégulées à P3 le sont aussi à P15. A P15, Les niveaux de Pgc-1 α sont de nouveaux comparables aux contrôles. Néanmoins, les niveaux de ses régulateurs positifs pAMPK et Sirt1 sont réduits, tout comme ceux de Nrf1 et des sous-unités de la chaîne respiratoire. Nous n'avons pas vérifié le retour à des niveaux contrôles de l'expression des partenaires de Pgc-1 α sous-exprimés à P0, comme *Errg* et *Gata4*. Néanmoins, ces données montrent que le défaut de biogénèse mitochondriale se prolonge jusqu'à P15 et pourrait contribuer à perpétuer l'altération de la signalisation redox mitochondriale impliquée dans la maturation. De plus, nous avons observé une diminution importante de l'activité du cycle cellulaire des cardiomyocytes *Ucp2^{-/-}*. Or, la prolifération des cardiomyocytes à la naissance participe à la croissance cardiaque, et un arrêt prématuré du cycle cellulaire entraîne des altérations de la structure des chambres cardiaques (Mollova *et al.*, 2013; D'Uva *et al.*, 2015). Ainsi, l'absence d'Ucp2 dans le cœur néonatal a probablement des conséquences se prolongeant à long terme. Dans le cas d'une confirmation d'un phénotype d'insuffisance cardiaque ou d'altérations structurelles des chambres cardiaques à des stades assez tardifs comme P15, il serait pertinent d'effectuer un test d'effort et d'étudier la capacité des souris *Ucp2^{-/-}* à augmenter leur rythme cardiaque. Enfin, le maintien des altérations de la signalisation jusqu'à P15 pose la question du phénotype cardiaque des souris *Ucp2^{-/-}* à l'âge adulte. Par exemple, les études de Dixon et

Gong montrent que les défauts de maturation cardiaque associés à la persistance de mitochondries fœtales (Gong *et al.*, 2015), ou de variants d'épissage immatures (Dixon *et al.*, 2015) ont un impact délétère sur la fonction contractile et la structure cardiaque à l'âge adulte. Ucp2 n'est que peu exprimé dans le cœur adulte en conditions physiologiques, et la découverte de son expression cardiaque à partir de la fin du développement fœtal est récente. En conséquent, le phénotype cardiaque des souris *Ucp2^{-/-}* adultes n'a été que peu étudié. L'induction de l'expression cardiaque d'Ucp2 est possible en conditions pathologiques et montre un effet protecteur (Kukat *et al.*, 2014). Néanmoins, la longévité réduite des souris *Ucp2^{-/-}* démontrée par les travaux d'Andrews *et al.* (environ 15 mois contre 22 mois pour les contrôles), n'a jamais été inférée à une altération de la fonction cardiaque (Andrews and Horvath, 2009). De plus, comme suggéré précédemment, une insuffisance cardiaque d'intensité modérée pourrait ne pas résulter en phénotypes comportementaux importants, et donc ne pas être détectée sans effectuer d'échocardiographie ou de test d'effort. Il serait donc intéressant d'étudier le cœur adulte chez ces animaux. En effet, il se pourrait que l'altération de la maturation cardiaque soit compensée et/ou que l'insuffisance cardiaque qui y est associée soit d'intensité modérée.

La compensation par les autres membres de la famille Ucp est discutable. Tout d'abord, Ucp1 n'a jamais été montré comme étant capable de réorienter le métabolisme mitochondrial ou d'avoir une fonction d'échangeur métabolique. Quant à Ucp3, bien que son activité potentielle de régulateur de métabolisme soit inconnue, son expression montre une corrélation forte avec le métabolisme des acides gras, et pourrait stimuler la β -oxydation des cœurs *Ucp2^{-/-}*. Nous avons quantifié ses niveaux mARN, qui montrent une légère augmentation dans les cœurs *Ucp2^{-/-}* à P3. Cependant, les niveaux d'expression d'*Ucp3* restent faibles comparativement aux niveaux mARN d'*Ucp2* chez les individus WT. Il est ainsi peu probable qu'*Ucp3* puisse compenser la perte d'*Ucp2*, et la compensation éventuelle pourrait être assurée par d'autres transporteurs mitochondriaux. La régulation traductionnelle des Ucp étant importante, nous pourrions cependant confirmer ces résultats par Western blot.

II. Mécanismes de fonctionnement d'Ucp2 et conséquences phénotypiques

A. Ucp2 en tant que messenger critique de la signalisation rétrograde mitochondriale via l'export de métabolites

Mes travaux de thèse ont débuté en émettant l'hypothèse qu'Ucp2 pourrait être un régulateur redox impliqué dans la maintenance de la prolifération des cardiomyocytes pendant la période périnatale. Ucp2 étant associé à une régulation négative de la production de mtROS, et les cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} présentant un taux de prolifération plus faible que les contrôles, nous nous attendions à ce que la perte d'Ucp2 soit associée à une élévation de la production de ROS mitochondriaux, et à l'acquisition prématurée du phénotype cardiaque mature. Néanmoins, nous avons observé une diminution des niveaux de mtROS associée à une diminution de l'activité du métabolisme oxydatif et de la biogénèse mitochondriale, ce qui nous a orienté vers les autres fonctions décrites pour Ucp2, à savoir, le contrôle de l'orientation métabolique de la cellule, et le transport de métabolites de la matrice au cytosol. En effet, la perte d'Ucp2 entraîne la dérégulation de l'abondance relative de plusieurs intermédiaires du cycle de Krebs, dont certains sont considérés comme « épi-métabolites », c'est-à-dire, capables de contrôler l'expression génique en servant de cofacteurs ou d'inhibiteurs d'enzymes modifiant le paysage épigénétique.

Néanmoins, nos données ne permettent pas de statuer sur le mécanisme de fonctionnement de cette régulation. La fonction d'export de métabolites d'Ucp2, dans ce contexte, peut avoir 2 rôles. Ucp2 exporte des métabolites critiques dans la signalisation ou dans la régulation de l'expression génique, et agit donc comme un intermédiaire dans la communication entre la mitochondrie et le noyau (Figure 52 (1)). Ces intermédiaires métaboliques pourraient également participer à des réactions anaboliques dans le cytoplasme en participant à la synthèse de biomolécules. Les métabolites qu'Ucp2 est capable d'exporter *in vitro* sont l'oxaloacétate, le malate et l'aspartate. Ces métabolites n'ont pas été démontrés comme étant des épi-métabolites, mais pourraient être convertis en d'autres intermédiaires dans le cytosol. Par exemple, l'oxaloacétate peut être converti en α -KG par l'enzyme cytosolique Got1 (Glutamate-oxaloacétate transaminase 1) (Alkan *et al.*, 2018). Ils pourraient aussi être convertis localement dans le noyau, à proximité de promoteurs de gènes spécifiques,

comme suggéré pour l'acétyl-coA et l'acétylation des histones (Kinnaird *et al.*, 2016). L'alternative proposée dans la partie résultats est présentée en Figure 52 (2). Ucp2 serait un régulateur du flux du cycle de Krebs. En effet, certaines étapes du cycle sont inhibées par leur produit (Cf. Introduction, Chapitre 2), et la perte de la fonction d'export d'Ucp2 pourrait entraîner l'accumulation d'intermédiaires dans la matrice, inhibant les réactions en amont. Dans notre contexte, l'inhibition du cycle de Krebs entraînerait le déséquilibre de l'abondance relative des intermédiaires, notamment des épi-métabolites, et entraînerait la dérégulation de l'expression génique, et donc, l'inhibition de la biogénèse mitochondriale et l'initiation de l'expression des protéines de la β -oxydation. Dans ce modèle, l'export des épi-métabolites serait pris en charge par d'autres transporteurs/échangeurs mitochondriaux. Par exemple, l'export d'isocitrate de la mitochondrie par le CIC (Citrate Isocitrate Carrier) peut permettre la synthèse d' α -KG cytosolique via l'enzyme IDH1 (Isocitrate deshydrogénase 1) (Dang, Yen and Attar, 2016).

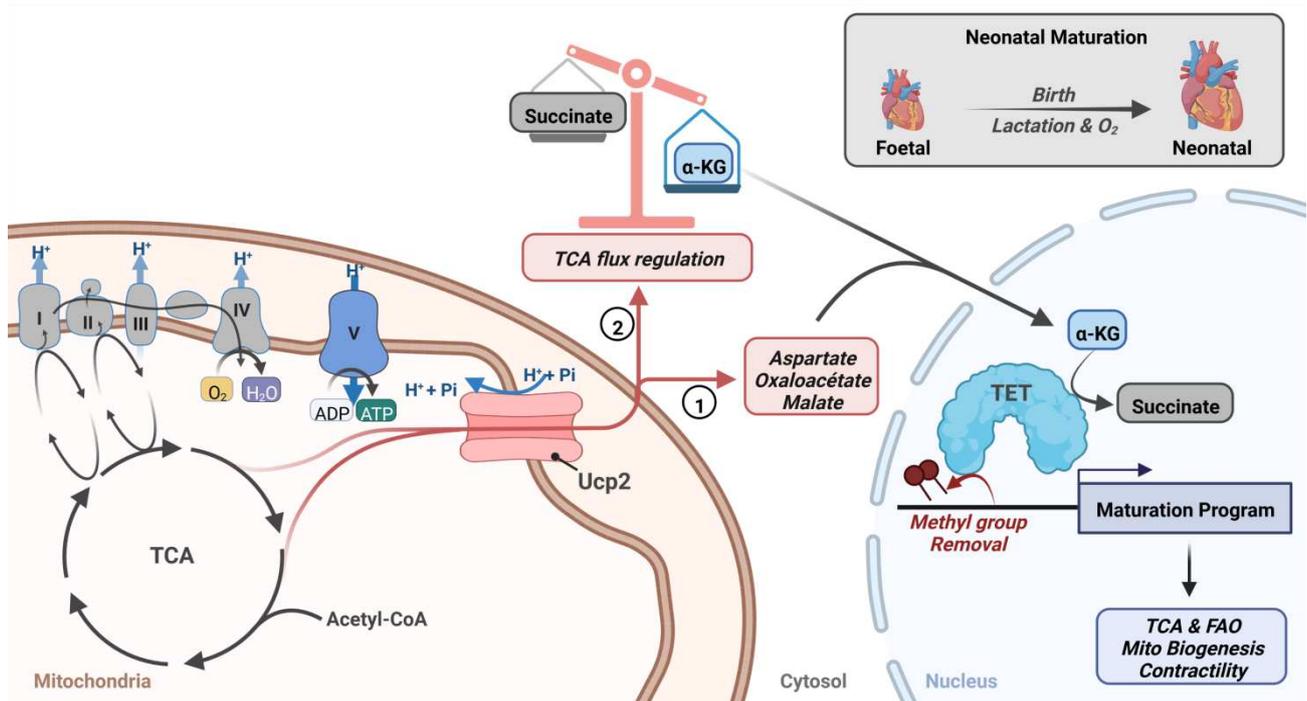


Figure 52. Modèles de fonctionnement possible d'Ucp2 pendant la maturation cardiaque néonatale. (1) Ucp2 exporte des intermédiaires à 4 carbones dont la conversion cytosolique ou nucléaire en épi-métabolite assure l'activité TET et l'initiation du programme transcriptionnel de maturation. **(2)** L'activité d'export de métabolites d'Ucp2 régule le flux du cycle de Krebs pour assurer la disponibilité d'épi-métabolites qui sont exportés par d'autres transporteurs.

Nos données de métabolomique montrent une accumulation cardiaque d'aspartate et d'oxaloacétate, deux métabolites qu'Ucp2 est capable d'exporter (Vozza *et al.*, 2014; Raho *et al.*, 2020). Néanmoins, ces données, constatées sur ventricules cardiaques entiers, ne permettent pas de statuer sur la localisation subcellulaire de ces intermédiaires accumulés. Par conséquent, pour confirmer qu'Ucp2 joue bien un rôle d'export de métabolite, nous pourrions employer des manipulations de fractionnement et étudier les abondances relatives de certains métabolites clefs dans des fractions mitochondriales et cytosoliques. Une élévation des niveaux d'aspartate, de malate ou d'oxaloacétate dans les fractions mitochondriales des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} en comparaison des contrôles soutiendrait l'hypothèse de l'export par Ucp2. De plus, pour trancher entre les deux modèles proposés, nous pourrions étudier le devenir de différents substrats en effectuant des manipulations de flux métabolique, c'est-à-dire en fournissant des substrats marqués aux cellules. En couplant le flux métabolique au fractionnement, nous pourrions étudier le devenir de l'aspartate par exemple, et voir s'il est converti en un épi-métabolite dans le cytosol. Si c'est le cas, nous pourrions valider le rôle (Figure 52 (1)) d'Ucp2 en tant que messenger de la signalisation rétrograde mitochondriale, et confirmer le rôle des épi-métabolites identifiés en tentant des manipulations de sauvetage phénotypique, par exemple, en supplémentant le milieu des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} avec de l' α -KG, dont la présence dans le cytosol ne dépendrait donc plus de l'export depuis la matrice. Si ce n'est pas le cas, et que le modèle (Figure 52 (2)) est privilégié, l'étude des métabolites sous-représentés dans le cytosol ou accumulés dans la matrice pourrait permettre d'identifier un de leur(s) transporteur(s) spécifique(s), par exemple, le CIC mentionné précédemment. Nous pourrions par la suite confirmer le rôle de ce transporteur putatif à l'aide de siRNA. Il s'agira de voir si l'inhibition de ce transporteur dans des cardiomyocytes WT reproduit les phénotypes associés à la perte d'Ucp2.

Qu'Ucp2 soit un messenger ou un régulateur indirect, nos résultats semblent révéler un nouveau type de signalisation mitochondriale impliquée dans la maturation cardiaque. Cette signalisation, qui se fait via la régulation du paysage épigénétique par les métabolites du cycle de Krebs, apparaît comme nécessaire à l'activation de la biogénèse mitochondriale et à l'orientation métabolique vers la β -oxydation, mais également aux modifications transcriptomiques nécessaires à la transition morphologique et structurelle des cardiomyocytes. Par conséquent, en stimulant l'activité du métabolisme mitochondrial,

l'élévation de la disponibilité en O₂ et en acides gras à la naissance initierait une boucle de régulation positive dans laquelle la mitochondrie stimulerait sa propre biogénèse, et donc une production croissante d' α -KG et une accélération de la maturation. Cette signalisation se ferait donc en amont de la signalisation redox initiée par la transition vers le métabolisme oxydatif et sa production de mtROS associée démontrée par Puente *et al.* (Puente *et al.*, 2014).

B. La dérégulation du métabolisme associée à la délétion d'Ucp2 met en lumière une régulation épigénétique dépendante du métabolisme pendant la maturation cardiaque

Les gènes dérégulés dans nos analyses transcriptomiques des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} sont majoritairement sous-exprimés, orientant ainsi nos hypothèses vers l'étude des marques épigénétiques associées à la répression transcriptionnelle, comme la méthylation de l'ADN. Par ailleurs, les enzymes TET, en particulier TET2, montrent un pic d'expression cardiaque à la naissance et participent à la déméthylation des promoteurs de gènes impliqués dans la maturation cardiaque, notamment des gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif et la structure sarcomérique. Elles permettent ainsi l'initiation de leur transcription (Greco *et al.*, 2016). Ces enzymes nécessitent l' α -KG et sont inhibées par le succinate (Kinnaird *et al.*, 2016). Or nos données de métabolomique montrent une élévation des niveaux de succinate et une diminution de la concentration en α -KG dans les cœurs *Ucp2*^{-/-} P3. De plus, bien qu'elle soit la moins exprimée dans le cœur néonatal (Greco *et al.*, 2016), nous avons observé une diminution de l'expression de *Tet1* dans les cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-}. Par ailleurs, nos données transcriptomiques ont montré une perte d'expression de gènes dont les promoteurs subissent une déméthylation dépendante des TETs, comme *Myl4* (Myosin light polypeptide 4) (Greco *et al.*, 2016). Enfin, nous avons montré que l'inhibition de l'activité TET des cardiomyocytes WT entraîne une diminution de la masse mitochondriale similaire à celle observée dans les cardiomyocytes *Ucp2* ^{Δ/Δ} . L'activité TET est donc nécessaire à la stimulation de la biogénèse mitochondriale des cardiomyocytes néonataux. Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle le défaut d'initiation du programme transcriptionnel mature des

cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} et les altérations de la maturation qui y sont associées seraient dus à une dérégulation de l'activité TET.

Pour confirmer ces résultats, nous souhaitons quantifier l'activité TET totale (activité méthyle-cytosine deoxygénase) dans les cœurs *Ucp2*^{-/-}. Il serait également intéressant d'effectuer des précipitations de la chromatine dirigées contre cytosines méthylées (5mC) ou le produit de leur désoxygénation par les TET (5mC) et comparer les gènes dont les promoteurs sont enrichis pour ces marques avec ceux sous-exprimés en absence d'*Ucp2*. Pour aller plus loin, nous pourrions aussi, faire une CHIP directement dirigée contre une enzyme TET, pour comparer ses sites de fixation avec le profil de 5mC/5hmC et les gènes sous-exprimés. Ceci permettrait de confirmer l'impact de la dérégulation de l'activité TET dans les phénotypes immatures observés dans les cœurs déficients pour *Ucp2*.

Néanmoins, d'autres enzymes régulant le paysage épigénétique et dépendantes d'intermédiaires métaboliques pourraient être impliquées et il serait intéressant d'étudier leur activité et la présence des marques épigénétiques associées sur les gènes dérégulés. Tout d'abord, d'autres enzymes sont dépendantes du ratio α -KG/succinate. Notamment certaines lysines déméthylases (KDM), qui peuvent retirer des marques de méthylations sur les histones impliquées dans la répression transcriptionnelle, comme la marque H3K9 ou la marque H3K27 (Kinnaird *et al.*, 2016). Le rôle de ces enzymes est peu décrit dans le cœur néonatal, et notre modèle *Ucp2*^{-/-} permettrait de mettre en évidence une potentielle participation de ces enzymes dans la maturation cardiaque à la naissance.

Par ailleurs, plusieurs éléments suggèrent que le profil d'acétylation des histones est altéré en absence d'*Ucp2*. Tout d'abord, nous avons identifié une diminution des niveaux d'acétyl-coA, qui est un donneur de groupement acétyle pour les histones acétyl transférases (HAT). L'activité des HAT est donc probablement inhibée. De plus, nos données transcriptomiques montre une diminution de l'expression de plusieurs Hdac et nos données métabolomiques montrent une élévation des niveaux de NADH, d'hydroxy-butyrates (BHB), et de lactate, qui sont des inhibiteurs de certaines de ces dernières (Shimazu *et al.*, 2013; Kinnaird *et al.*, 2016). Enfin, la protéine Sirt1, qui est localisée dans le noyau et présente également une activité histone déacétylase, est sous-exprimée, tout comme un de ses régulateurs positif, p-

AMPK (Cantó *et al.*, 2009b). Il est donc très probable que le profil d'acétylation des histones soit altéré. L'acétylation étant responsable de la déstabilisation des liaisons entre histones et ADN, un défaut d'acétylation pourrait également participer à la répression du programme transcriptionnel mature dans les cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-}.

Par conséquent, approfondir nos données en effectuant des immunoprécipitations de la chromatine dirigées contre des marques d'acétylation ou de méthylation spécifique(s) permettrait de caractériser plus en profondeur les aberrations du paysage épigénétique des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-}, et de clarifier l'importance des différentes marques et de leurs acteurs respectifs dans le déclenchement de la maturation cardiaque.

C. Perte de capacité de prolifération et d'activité glycolytique malgré l'apparente immaturité des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-}

Comme décrit précédemment (Introduction, Chapitre 3), les cardiomyocytes immatures montrent une activité glycolytique importante, un métabolisme oxydatif réduit, et une activité proliférative. Cependant, bien que les cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} présentent un défaut de maturation, leur activité glycolytique et leur capacité de prolifération sont réduites.

Les cardiomyocytes néonataux contrôles montrent des taux d'acidification du milieu (ECAR) basal et maximal (après traitement avec l'oligomycine A) quasiment identiques. Cela suggère que l'activité glycolytique du cardiomyocyte fonctionne à flux tendu, et est maximale en conditions basales. Ainsi, la diminution de la capacité oxydative dans le cas de la perte d'*Ucp2* ne peut pas être compensée par une élévation de l'activité glycolytique, qui peut être due à des limites à l'internalisation du glucose ou à sa dégradation par les hexokinases. Ceci n'explique cependant pas la baisse d'activité glycolytique des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-}. L'implication d'*Ucp2* dans la stimulation de l'activité glycolytique a plusieurs fois été démontrée (Zhang *et al.*, 2011; Sreedhar *et al.*, 2017) et la fonction d'export de métabolites d'*Ucp2* pourrait, la aussi, expliquer ces phénotypes.

En exportant l'aspartate ou le malate, *Ucp2* pourrait alimenter la fermentation lactique (qui influe sur l'ECAR). En effet, les enzymes maliques convertissent le malate en pyruvate pour

reformer le NADPH et les systèmes antioxydants. La fonction d'export d'Ucp2 pourrait donc permettre de pourvoir la cellule en pyruvate en supplément de celui issu de la dégradation du glucose. Par conséquent, sa perte entraînerait une baisse d'activité glycolytique. La diminution du ratio NAD⁺/NADH et des niveaux de NADPH (Figure Annexe 3 et 4) dans les cœurs P3 *Ucp2*^{-/-} vont dans ce sens. De plus, le NAD⁺ est requis pour la fonction de la GAPDH, et une baisse d'activité de la fermentation lactique, productrice de NAD⁺ pourrait altérer d'autant plus le flux glycolytique. A cette régulation d'activité s'ajoute la baisse d'expression de *Hk2* et *Gck* dans les cardiomyocytes P0 *Ucp2*^{-/-}. Ces gènes codent respectivement pour l'Hexokinase l'isoforme majoritairement présente dans le cœur adulte, et la Gluconokinase (ou Hexokinase 4), toutes deux nécessaires au flux glycolytique en convertissant le glucose en glucose-6-P.

La diminution de la prolifération associée à la délétion d'*Ucp2*, malgré le phénotype immature, peut également s'expliquer par un défaut d'export d'aspartate. En effet, l'aspartate est un donneur d'azote pour la synthèse *de novo* de nucléotides (Sullivan *et al.*, 2015) et *Ucp2* a été démontré *in vivo* comme capable d'exporter ce métabolite de la matrice vers le cytosol (Raho *et al.*, 2020). En outre, des analyses de flux métabolique comparant des tumeurs contrôles et surexprimant *Ucp2* ont pu montrer une augmentation de l'activité de la voie de biosynthèse des nucléotides (Sreedhar *et al.*, 2019). Enfin, les travaux de Ritterhoff *et al.* ont démontré l'importance de l'aspartate dérivé du glucose pour assurer l'activité de la voie de biosynthèse des nucléotides dans les cardiomyocytes, et la croissance hypertrophique (qui est inhibée dans les cardiomyocytes *Ucp2*^{Δ/Δ}) (Ritterhoff *et al.*, 2020b). Cette hypothèse est soutenue par nos données de métabolomique, qui montrent une altération de la voie de biosynthèse des purines et des pyrimidines (Figure Annexe 2). Des expériences d'incorporation EdU sur des cardiomyocytes en conditions supplémentées avec de l'aspartate ou des nucléosides (qui passent les membranes) permettraient de conclure sur cette hypothèse. *Ucp2* pourrait donc à la fois participer à fournir du pyruvate pour la glycolyse, et des composants nécessaires à la synthèse de nucléotides.

La perte de prolifération s'explique également par la diminution de l'expression de plusieurs gènes associés à la prolifération des cardiomyocytes comme *ErbB4* et *Nrg1* (D'Uva *et al.*, 2015) et des *Cdks*. De plus, nous avons montré que les cœurs mutants P0 présentent une

activation accrue de la voie p38MAPK, qui est impliquée dans la maturation des chambres cardiaques et dans la perte de prolifération des cardiomyocytes durant la période néonatale (Engel, 2005). Dans notre modèle, l'inhibition par le SB203580 permet une restauration partielle de la prolifération des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-}, sans augmenter la prolifération des cardiomyocytes contrôles, indiquant un effet spécifique de l'inhibition de la voie p38MAPK sur les cardiomyocytes mutants. Néanmoins, l'origine de l'activation exacerbée/prématurée de la p38 reste incertaine. La p38 peut être activée par les ROS, cependant, les niveaux de mtROS des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} sont plus faibles que ceux des contrôles. Bien que la voie AMPK, considérée comme senseur de la diminution des niveaux d'ATP dans la cellule ne soit pas activée chez le mutant, la voie p38 est une voie de réponse aux stress, et il est possible que le stress métabolique et/ou le déficit énergétique entraîne son activation et permette l'économie d'énergie en limitant la prolifération.

D. Dépendance à la glutamine en absence d'Ucp2

Bien que l'expression d'Ucp2 soit associée à l'utilisation de la glutamine (Nübel *et al.*, 2008; Vozza *et al.*, 2014; Raho *et al.*, 2020), c'est ici sa délétion qui provoque une utilisation accrue de ce substrat. Compte tenu de la faible utilisation de la glutamine dans le cœur adulte, et de l'expression restreinte à la période périnatale d'Ucp2, il semble peu probable qu'Ucp2 soit *in vivo*, un inhibiteur de l'utilisation de la glutamine dans les mitochondries cardiaques. L'utilisation de la glutamine semble dans ce contexte, être un phénotype compensatoire de la perte d'Ucp2 et du déficit énergétique associé. Cette idée est soutenue par nos données LC-MS(/MS) qui montrent une élévation significative des niveaux cardiaques du β -hydroxybutyrate (BHB ou 3-OHB) (Figure Annexe 3 et 4) et de l'enzyme le produisant Bdh1 (données protéomiques de LC-MS/MS non-présentées). Le BHB est un corps cétonique qui peut permettre la formation d'acétyl-CoA en cas de faible disponibilité des autres substrats comme pendant le jeûne et l'exercice physique mais aussi en cas d'insuffisance cardiaque. (Horton *et al.*, 2019; Lopaschuk *et al.*, 2020).

Nous avons montré que le traitement des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} au BPTES, un inhibiteur des glutaminases, induit une baisse importante de la consommation d'O₂ (OCR). Bien que ce

résultat atteste d'une dépendance élevée à la glutamine, il ne rend pas forcément compte de la proportion d'ATP issue de l'oxydation du pyruvate et des acides gras. En effet, La glutamine n'étant pas un substrat donneur d'acétyl-coA, elle ne peut permettre d'assurer seule le fonctionnement du cycle de Krebs. Ainsi, l'effet positif de son utilisation sur l'activité respiratoire peut s'expliquer par sa participation aux processus anaplérotiques. Si Ucp2 est nécessaire au maintien de l'équilibre entre les différents intermédiaires du cycle de Krebs, alors sa perte pourrait conduire à un manque ou une accumulation de certains intermédiaires dans la matrice. L'utilisation accrue de la glutamine, en permettant de former les intermédiaires nécessaires à l'entrée de l'acétyl-coA, compenserait la perte d'Ucp2 en maintenant partiellement le fonctionnement du cycle de Krebs. Pour préciser la contribution du pyruvate et des acides gras dans la respiration des cardiomyocytes *Ucp2^{-/-}*, nous pourrions comparer l'effet de l'inhibiteur BPTES entre cardiomyocytes contrôles et mutants dans des conditions déplétées en pyruvate ou en acides gras.

A la lumière des mécanismes de fonctionnement d'Ucp2 déjà démontrés, une autre hypothèse pourrait expliquer l'utilisation accrue de la glutamine. L'équipe de Raho *et al* a pu montrer que la perte d'Ucp2, qui est capable d'exporter l'aspartate, entraînait une accumulation de ce dernier dans la matrice mitochondriale. Dans leur modèle, cette accumulation est compensée par la supplémentation en glutamate, un produit de la glutamine, qui peut être échangé contre de l'aspartate matriciel par les récepteurs AGC1/2 (Aspartate Glutamate Carrier 1 & 2) (Raho *et al.*, 2020). Ces transporteurs sont exprimés dans le cœur (Amoedo *et al.*, 2016). Ainsi, il est possible qu'en absence d'Ucp2, l'accumulation d'aspartate ou de ses dérivés dans la matrice ralentissent le cycle de Krebs. La production de glutamate à partir de la glutamine pourrait compenser l'altération du flux du cycle en participant à l'échange de métabolites via AGC1/2. Il serait donc intéressant d'étudier l'OCR en présence de glutamine dans des conditions où l'expression des *Agc* est réprimée, par exemple à l'aide de siRNA, et de voir si cette inhibition est suffisante pour reproduire la baisse de l'OCR observée en présence de BPTES. Ces manipulations permettraient d'expliquer le mécanisme de cette dépendance à la glutamine dans les cardiomyocytes *Ucp2^{-/-}*.

Des manipulations de flux métabolique pourraient par ailleurs élucider le destin du pyruvate et des acides gras en présence et en absence de glutamine, et confirmer l'hypothèse selon laquelle l'anaplérose associée à la dégradation de la glutamine permet l'oxydation des autres substrats dans notre modèle. Cela permettrait également de mieux cerner le destin de la glutamine dans les cardiomyocytes *Ucp2^{-/-}*. Bien que nous n'ayons pas quantifié les niveaux de l'intermédiaire GABA, nos données métabolomiques révèlent une surreprésentation du succinate, et une baisse des niveaux d' α -KG. Ceci suggère que la glutamine n'entre pas dans la voie glutaminolytique classique, mais plutôt dans la voie GABA, ce qui est à priori sous-optimal ([Introduction Chapitre 2](#)). La quantification de l'intermédiaire GABA permettrait de confirmer cette hypothèse. La glutamine n'étant pas le substrat normalement utilisé par le cœur, l'utilisation de la voie GABA pourrait être due à une faible expression des enzymes chargées de la glutaminolyse, qui pourrait être confirmée ou non par des analyses de protéomique (Western et/ou spectrométrie de masse). D'autre part, certaines glutaminases dépendent de la concentration en phosphate (Cassago *et al.*, 2012), et *Ucp2* serait capable d'importer du phosphate cytosolique en échange d'intermédiaires métaboliques matriciels (Vozza *et al.*, 2014). La perte d'*Ucp2* induirait donc une diminution de la disponibilité en phosphate dans la matrice. Ainsi, bien qu'elle entraîne une dépendance à la glutamine, la délétion d'*Ucp2* pourrait paradoxalement provoquer une difficulté à la métaboliser. La quantification du phosphate inorganique dans des fractions mitochondriales et cytosoliques permettrait de statuer à ce sujet.

Enfin, la perte de prolifération, la baisse d'activité du métabolisme oxydatif et l'utilisation accrue de la glutamine peuvent suggérer un phénotype similaire à celui de la sénescence. Nous avons donc effectué des Westerns blots dirigés contre p16, une protéine importante de la signalisation de la sénescence, et n'avons pas détecté de changements de son expression dans les cœurs *Ucp2^{-/-}* (*Données non-présentées*). Cela suggère que malgré l'observation de caractéristiques phénotypiques communes, la perte d'*Ucp2* n'induit pas de sénescence aberrante dans le cœur néonatal.

E. Quid de la régulation de la production de ROS mitochondriaux via le découplage partiel d'Ucp2 dans le cœur en maturation ?

En tant que protéine découplante, Ucp2 a initialement été étudié comme régulateur négatif de la production de mtROS. Cependant dans le modèle cardiaque, nous avons pu montrer que la perte d'Ucp2 entraîne une baisse de masse mitochondriale et de capacité oxydative, qui s'accompagne d'une diminution des niveaux de ROS mitochondriaux et d'une baisse de l'activation de voies ROS-dépendantes comme la voie DDR. Il est fort probable les niveaux de mtROS à l'échelle cellulaire globale soient plus faibles en raison de la diminution importante de la masse mitochondriale et de l'activité oxydative. Cela expliquerait que l'oxydation de l'ADN et l'activation consécutive de la voie DDR soient également réduites.

Il n'est néanmoins pas exclu que la perte d'Ucp2 et de son activité découplante entraîne un dysfonctionnement des mitochondries restantes et une élévation de ROS localisée. Nous avons constaté une diminution de l'expression de LonP1, une protéase importante dans la régulation du stress oxydant (Hamon *et al.*, 2020). Nous pouvons donc supposer que la perte d'Ucp2 et de son activité de contrôle du potentiel de membrane entraîne une élévation de la production d'anion superoxyde dans la matrice, qui, cumulée à la diminution de l'expression de LonP1 résulterait en une accumulation de dommages oxydatifs aux protéines mitochondriales. La possible réduction de l'activité mitophagique dont Ucp2 est un régulateur positif pourrait participer à l'exagération de ce phénotype.

Ainsi, il est possible que la perte d'Ucp2 entraîne une élévation de la production de ROS par mitochondrie et une perturbation localisée de la signalisation redox. Ceci pourrait expliquer l'activation prématurée/augmentée et ROS-dépendante de la voie p38MAPK malgré les niveaux de mtROS réduits à l'échelle cellulaire. Pour étudier cette hypothèse, il serait intéressant de tout d'abord quantifier le potentiel de membrane mitochondrial. Pour ce faire, nous pourrions utiliser des sondes fluorescentes permettant la quantification relative du potentiel de membrane, comme le TMRM/E et le JC-1. En raison de la baisse de masse mitochondriale des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-}, il sera nécessaire de normaliser ces données par la masse mitochondriale, en usant de la sonde MitoTracker ou d'un marquage mitochondrial comme Tom20.

L'étude des éventuelles augmentations locales des niveaux de ROS pourra s'effectuer en transfectant des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-} avec des constructions codant pour des sondes GFP modifiées, dont l'émission de fluorescence est dépendante de leur oxydation par les ROS (roGFP), et munies de séquences d'adressage à des compartiments cellulaires spécifiques (Gao *et al.*, 2021). Cette approche nous permettrait une mesure indirecte des niveaux de ROS avec une précision subcellulaire, compartiment par compartiment. Par exemple, une baisse de l'oxydation des sondes adressées au noyau en absence d'Ucp2 expliquerait la baisse de l'activation de la voie DDR ; tandis qu'une élévation localisée de la fluorescence des sondes adressées à la mitochondrie expliquerait une activation de la voie p38 par les mtROS, malgré une baisse de mtROS à l'échelle cellulaire.

F. La génipine, un inhibiteur d'Ucp2 ?

Avant d'employer des souris *Ucp2*^{-/-}, mes travaux de thèse étaient basés sur l'utilisation d'un inhibiteur d'Ucp2, la génipine. Cette molécule est capable d'inhiber la conductance protonique au travers de la membrane interne de la mitochondrie, d'augmenter les niveaux d'ATP et le potentiel de membrane mitochondrial. Ces effets sont négligeables dans les mitochondries de souris *Ucp2*^{-/-}, et cet inhibiteur a donc été considéré comme spécifique d'Ucp2 (Zhang *et al.*, 2006). Mes travaux ont montré que le traitement à 50 ou 100µM de génipine sur les cardiomyocytes WT entraîne une élévation importante des niveaux de ROS totaux, sans entraîner de modification de la masse mitochondriale. De plus, nous avons observé une activation ROS-dépendante de la p38MAPK entraînant une diminution importante de la prolifération des cardiomyocytes traités à la génipine. Ces phénotypes ne coïncident donc que partiellement avec celui des cardiomyocytes *Ucp2*^{-/-}. Les travaux de Vozza *et al.* ont démontré qu'à la différence des nucléotides, la génipine n'est pas capable d'inhiber la fonction d'échangeur métabolique d'Ucp2 (Vozza *et al.*, 2014). Par conséquent, la génipine constituerait un modèle d'intérêt pour discriminer les conséquences des deux fonctions d'Ucp2, la régulation du potentiel de membrane via la conductance protonique, et l'orientation métabolique / la signalisation rétrograde via l'export de métabolite. Enfin, l'action de la génipine a récemment été discutée. En effet, à partir de 50µM, la génipine peut se fixer sur les autres Ucp ainsi que sur le complexe III de la chaîne respiratoire

et sur l'échangeur mitochondrial DIC (Dicarboxylate Carrier). De plus, la génipine peut former des liaisons covalentes avec d'autres protéines de la membrane interne de la mitochondrie, et peut provoquer une altération de la perméabilité de la membrane (Kreiter *et al.*, 2019). Ces facteurs doivent donc être pris en compte lors de l'analyse des phénotypes associés à des traitements à la génipine.

Perspectives

I. Perspectives à court terme

Comme expliqué en détail dans la discussion, il me semble intéressant d'effectuer des manipulations supplémentaires pour parfaire notre compréhension du mécanisme de fonctionnement d'Ucp2, des conséquences de sa perte, et de la compréhension générale des voies et intermédiaires métaboliques impliqués dans la maturation cardiaque.

L'étude de la morphologie du réseau mitochondrial et de celle des cardiomyocytes me semble nécessaire pour finaliser la caractérisation de l'ampleur du défaut de maturation associé à la perte d'Ucp2. En parallèle, l'étude de la structure des chambres et de la fonction cardiaque à différents temps, E16.5, E18.5, P0, P7, P15 et adulte, permettrait de mieux cerner les conséquences de la perte d'Ucp2 sur la fonction contractile, de confirmer la potentielle insuffisance cardiaque ou de découvrir un effet d'Ucp2 pendant le développement.

De plus, la caractérisation du mécanisme de fonctionnement d'Ucp2 dans le cœur néonatal au travers de manipulations de flux métabolique et de quantification des métabolites dans les différentes fractions cellulaires nous assurerait une meilleure compréhension de la signalisation de la mitochondrie au noyau mise en jeu pendant la maturation, et surtout au travers de quels intermédiaires métaboliques cette signalisation s'effectue. Par ailleurs, le mode de fonctionnement d'Ucp2 reste à préciser dans des contextes physiologiques ou développementaux. Ainsi, mieux comprendre le mécanisme de fonctionnement d'Ucp2 permettrait d'éclairer la communauté scientifique sur l'impact de sa surexpression dans des cancers ou de l'implication de variants du gène humain dans des pathologies telles que le diabète.

II. Perspectives à long terme

A. Ucp2 en tant que modèle pour étudier la maturation cardiaque

Un modèle intéressant pour étudier les pathologies cardiaques est la différenciation en culture d'iPSCs en cardiomyocytes (iPS-CMs). Les cardiomyocytes issus de la différenciation d'IPS peinent à développer les caractéristiques d'un cardiomyocyte mature. En effet, Leur morphologie reste arrondie, leur taille relativement petite, leur ploïdie ou leur nucléation est relativement faible (Guo and Pu, 2020; Karbassi *et al.*, 2020; Garbern and Lee, 2021). De plus, leur comportement contractile est immature : à la différence des cardiomyocytes adultes dont la contraction dépend de l'envoi d'un potentiel d'action par les cardiomyocytes nodaux, les membranes des cardiomyocytes dérivés d'IPS se dépolarisent de manière autonome, et les cardiomyocytes se contractent spontanément. Cela rend difficile la modélisation de cardiomyopathies mettant en jeu la machinerie contractile, le test de composés à vocation thérapeutique ou même la greffe de cellules du soi pour améliorer la régénération (Karbassi *et al.*, 2020).

Cependant, le croisement des données obtenues à partir de modèles *in vivo* et sur des iPS-CMs a permis d'identifier certains évènements ou contraintes nécessaires à l'acquisition des phénotypes matures. Ainsi, l'utilisation de matrices de culture imitant la rigidité des tissus comme le matrigel (Herron *et al.*, 2016), les micropatterns (McDevitt *et al.*, 2002), l'étirement des cellules (*stretching*) (Salameh *et al.*, 2010; Abilez *et al.*, 2018), ou l'optogénétique pour imposer une fréquence de battements (Gruber *et al.*, 2022), sont autant de démonstrations de mécanismes améliorant la maturation cardiaque en culture au niveau de l'électrophysiologie, la structure des sarcomères, la taille des cellules ou la localisation de leurs connexines. Les différentes caractéristiques de la maturation sont donc intriquées, et la maturation d'un des critères de maturation peut influencer positivement sur la maturation morphologique ou biochimique des iPS-CMs dans leur ensemble. Par exemple, le traitement d'iPS-CMs humains avec des acides gras stimule le métabolisme oxydatif et entraîne des changements structuraux comme l'élongation des myofibrilles, l'augmentation du volume des cellules ou leur allongement (indice de sphéricité réduit) (Yang *et al.*, 2019).

Ce modèle reproduit donc au moins une partie de l'interaction *in vivo* entre métabolisme et maturation phénotypique des cardiomyocytes.

Par conséquent, la surexpression d'Ucp2, associée à des milieux de culture contenant des acides gras, pourrait stimuler la signalisation rétrograde mitochondriale dans les iPS-CMs, et donc, reproduire certains évènements initiant la maturation pendant la période périnatale. De plus, l'étude de la fonction d'Ucp2 permettrait de clarifier les intermédiaires mis en jeu dans cette discussion de la mitochondrie au noyau, et d'identifier les intermédiaires critiques pouvant améliorer les protocoles de différenciation. Dans cette optique, nous avons initié des expériences de sauvetage phénotypique dans des cardiomyocytes néonataux *Ucp2*^{-/-} en supplémentant les milieux de culture avec des intermédiaires putativement régulateurs de l'expression génique qui sont sous-représentés dans nos données de métaboliques, comme l' α -KG. Il serait néanmoins intéressant d'effectuer des manipulations similaires sur des cardiomyocytes dérivés d'IPS humaines, et d'étudier le possible effet potentialisateur d'UCP2 sur leur maturation.

B. Rôle d'Ucp2 dans des conditions pathologiques

Plusieurs études rapportent un effet bénéfique d'Ucp2 en cas d'ischémie rénale ou cérébrale (Haines and Li, 2012; Zhou *et al.*, 2017). Dans le cœur, son expression est également associée à des effets protecteurs. Pendant une ischémie de longue durée, l'interruption de l'apport en substrat et la diminution des niveaux d'O₂ entraîne une inhibition du métabolisme oxydatif, et un déficit énergétique car le pool d'ATP cellulaire est consommé rapidement. Paradoxalement, bien que la reperfusion soit nécessaire à la survie de la cellule, l'ischémie de longue durée rend les mitochondries incapables de fonctionner normalement lorsque l'apport en substrat(s) et en O₂ est restauré. De plus, pendant l'ischémie, l'inhibition du métabolisme oxydatif provoque l'accumulation de succinate qui est rapidement oxydé au moment de la reperfusion. En conséquence, les complexes de la chaîne respiratoire sont majoritairement sous forme réduite et la production de ROS explose, ce qui entraîne l'ouverture du mPTP (mitochondrial permeability transition pore). L'augmentation de la perméabilité de la membrane est suivie de sa rupture et du relargage de facteurs pro-

apoptotiques par la mitochondrie, comme le cytochrome c, qui entraîne la mort cellulaire (Chouchani *et al.*, 2016; Bugger and Pfeil, 2020).

L'expression d'Ucp2 a été associée au préconditionnement ischémique (IPC) dans différents organes. L'IPC consiste en de courtes ischémies/reperfusions (I/R) répétées préalables à une ischémie de longue durée. Ces manipulations protègent les organes des conséquences délétères de l'I/R, et Ucp2 apparaît comme un important médiateur des effets bénéfiques de l'IPC (McLeod *et al.*, 2005). En effet, la surexpression d'Ucp2 réduit les effets délétères de l'I/R et récapitule au moins en partie les effets bénéfiques de l'IPC. Dans des modèles d'hypoxie/réoxygénation, qui imitent l'I/R *in vitro*, l'expression d'Ucp2 limite l'apoptose, la production de ROS et l'élévation du potentiel de membrane mitochondrial (McLeod *et al.*, 2005; Wu, Ye, Liu, Yang, J. Ding, *et al.*, 2019). Cet effet protecteur d'Ucp2 via le contrôle des niveaux de ROS pourrait s'effectuer via le découplage partiel de la chaîne respiratoire. De plus, Ucp2 inhibe le métabolisme oxydatif dans des cellules pluripotentes (Zhang *et al.*, 2011). Sa capacité à exporter les métabolites pourrait ralentir le cycle de Krebs, limiter la reformation du NADH et du FADH₂/succinate, et donc diminuer la proportion de complexes sous forme réduite et la production de ROS mitochondriaux au moment de la reperfusion.

A plus long terme, les ischémies du myocarde se traduisent par une insuffisance cardiaque. Les cellules montrent une utilisation importante du glucose, qui est généralement considéré comme bénéfique. Cependant, cette modification du comportement métabolique conduit progressivement à une perte de flexibilité et à une efficacité réduite du métabolisme énergétique. L'équipe de Kukat *et al.*, a montré un effet protecteur d'Ucp2 dans un modèle de cardiomyopathie d'origine mitochondriale. Dans leur modèle, Ucp2 retarde l'apparition des phénotypes délétères associés à la dysfonction mitochondriale comme l'acidose lactique ou la lipotoxicité en stimulant l'oxydation des acides gras. Dans leur modèle, ces effets bénéfiques associés à Ucp2 sont indépendants de la fonction découplante ou de la régulation redox (Kukat *et al.*, 2014). Ainsi, en plus d'un effet cardioprotecteur pendant les ischémies, l'activité de contrôle du métabolisme d'Ucp2 pourrait avoir un effet bénéfique sur le remodelage ventriculaire, en contrecarrant les altérations de la flexibilité métabolique du cœur.

La surexpression d'Ucp2 présente donc un intérêt notable dans l'étude des pathologies cardiaques, et l'apparente dépendance de son/ses activités au contexte cellulaire rend d'autant plus intéressante la caractérisation des conséquences de sa surexpression après

une ischémie, ou pendant la cinétique du remodelage ventriculaire. Il serait donc très intéressant de développer une approche cinétique, en croisant par exemple les modèles murins existants *ROSA^{Flox-STOP-Flox-Ucp2-Lox}* avec des souris *MHC-CreERT2*. Ce modèle permettrait l'induction spécifique d'Ucp2 à des moments critiques de la pathophysiologie associée à l'ischémie : avant l'ischémie ou pendant la reperfusion pour mieux appréhender le rôle d'Ucp2 dans les effets bénéfiques du pré-conditionnement ischémique, ou peu de temps après la reperfusion pour étudier l'effet d'Ucp2 sur le développement de remodelage ventriculaire. Enfin, il serait intéressant d'étudier l'impact éventuel de l'activité d'Ucp2 dans un contexte où le remodelage est déjà installé. Son activité de réorientation métabolique pourrait diminuer les effets délétères du remodelage métabolique que les ventriculesnt opèrent pendant le remodelage. Dans le cas d'un effet bénéfique, identifier les mécanismes mis en jeu ouvrirait la voie à l'identification de composés thérapeutiques pouvant contrecarrer ou ralentir l'apparition du remodelage cardiaque responsable de l'insuffisance cardiaque associée aux ischémies.

Références Bibliographiques

1. Abilez, O.J. *et al.* (2018) 'Passive Stretch Induces Structural and Functional Maturation of Engineered Heart Muscle as Predicted by Computational Modeling', *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 36(2), pp. 265–277. Available at: <https://doi.org/10.1002/stem.2732>.
2. Aguilar, E. *et al.* (2019) 'UCP2 Deficiency Increases Colon Tumorigenesis by Promoting Lipid Synthesis and Depleting NADPH for Antioxidant Defenses', *Cell Reports*, 28(9), pp. 2306-2316.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.097>.
3. Akter, S. *et al.* (2018) 'Chemical proteomics reveals new targets of cysteine sulfinic acid reductase', *Nature Chemical Biology*, 14(11), pp. 995–1004. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0116-2>.
4. Alabduladhem, T.O. and Bordoni, B. (2021) 'Physiology, Krebs Cycle', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556032/> (Accessed: 6 December 2021).
5. Albaugh, B.N., Arnold, K.M. and Denu, J.M. (2011) 'KAT(ching) metabolism by the tail: insight into the links between lysine acetyltransferases and metabolism', *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 12(2), pp. 290–298. Available at: <https://doi.org/10.1002/cbic.201000438>.
6. Alkan, H.F. *et al.* (2018) 'Cytosolic Aspartate Availability Determines Cell Survival When Glutamine Is Limiting', *Cell metabolism*, 28(5), pp. 706-720.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.021>.
7. Alkan, H.F. and Bogner-Strauss, J.G. (2019) 'Maintaining cytosolic aspartate levels is a major function of the TCA cycle in proliferating cells', *Molecular & Cellular Oncology*, 6(5), p. e1536843. Available at: <https://doi.org/10.1080/23723556.2018.1536843>.
8. Alkass, K. *et al.* (2015) 'No Evidence for Cardiomyocyte Number Expansion in Preadolescent Mice', *Cell*, 163(4), pp. 1026–1036. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.035>.
9. Altman, B.J., Stine, Z.E. and Dang, C.V. (2016) 'From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy', *Nature Reviews. Cancer*, 16(10), pp. 619–634. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.71>.
10. Amaral, N. and Okonko, D.O. (2015) 'Metabolic abnormalities of the heart in type II diabetes', *Diabetes and Vascular Disease Research*, 12(4), pp. 239–248. Available at: <https://doi.org/10.1177/1479164115580936>.
11. Amoedo, N.D. *et al.* (2016) 'AGC1/2, the mitochondrial aspartate-glutamate carriers', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(10), pp. 2394–2412. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.011>.
12. Anderson, R.H. and Ho, S.Y. (1998) 'The architecture of the sinus node, the atrioventricular conduction axis, and the internodal atrial myocardium', *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 9(11), pp. 1233–1248. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.1998.tb00097.x>.

13. Anderson, S.M. *et al.* (2007) 'Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis!', *Breast Cancer Research*, 9(1), p. 204. Available at: <https://doi.org/10.1186/bcr1653>.
14. Andrews, Z.B. *et al.* (2008) 'UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals', *Nature*, 454(7206), pp. 846–851. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature07181>.
15. Andrews, Z.B. and Horvath, T.L. (2009) 'Uncoupling protein-2 regulates lifespan in mice', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 296(4), pp. E621–E627. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90903.2008>.
16. Angst, B.D. *et al.* (1997) 'Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium', *Circulation Research*, 80(1), pp. 88–94. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.res.80.1.88>.
17. Arifuzzaman, S., Khatun, M.R. and Khatun, R. (2020) 'Emerging of lysine demethylases (KDMs): From pathophysiological insights to novel therapeutic opportunities', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, p. 110392. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110392>.
18. Arsenijevic, Denis *et al.* (2000) 'Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production', *Nature Genetics*, 26(4), pp. 435–439. Available at: <https://doi.org/10.1038/82565>.
19. Arsenijevic, D. *et al.* (2000) 'Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production', *Nature Genetics*, 26(4), pp. 435–439. Available at: <https://doi.org/10.1038/82565>.
20. Ayala, A., Muñoz, M.F. and Argüelles, S. (2014) 'Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, p. 360438. Available at: <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
21. Ayyasamy, V. *et al.* (2011) 'Cellular Model of Warburg Effect Identifies Tumor Promoting Function of UCP2 in Breast Cancer and Its Suppression by Genipin', *PLoS ONE*, 6(9), p. e24792. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024792>.
22. Backs, J. and Olson, E.N. (2006) 'Control of Cardiac Growth by Histone Acetylation/Deacetylation', *Circulation Research*, 98(1), pp. 15–24. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000197782.21444.8f>.
23. Bai, Y. *et al.* (2005) 'Persistent Nuclear Factor- κ B Activation in Ucp2^{-/-} Mice Leads to Enhanced Nitric Oxide and Inflammatory Cytokine Production', *The Journal of biological chemistry*, 280(19), pp. 19062–19069. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M500566200>.
24. Baldelli, S., Aquilano, K. and Ciriolo, M.R. (2013) 'Punctum on two different transcription factors regulated by PGC-1 α : Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 and nuclear respiratory factor 2', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(8), pp. 4137–4146. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.006>.
25. Barisón, M.J. *et al.* (2021) 'Reorganization of Metabolism during Cardiomyogenesis Implies Time-Specific Signaling Pathway Regulation', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), p. 1330. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22031330>.

26. Bartesaghi, S. and Radi, R. (2018) 'Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration', *Redox Biology*, 14, pp. 618–625. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.009>.
27. Benhar, M., Forrester, M.T. and Stamler, J.S. (2009) 'Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(10), pp. 721–732. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2764>.
28. Berardi, M.J. and Chou, J.J. (2014) 'Fatty Acid Flippase Activity of UCP2 Is Essential for Its Proton Transport in Mitochondria', *Cell Metabolism*, 20(3), pp. 541–552. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.004>.
29. Bergmann, O. *et al.* (2009) 'Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans', *Science*, 324(5923), pp. 98–102. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1164680>.
30. Bergmann, O. *et al.* (2015) 'Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart', *Cell*, 161(7), pp. 1566–1575. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.026>.
31. Bertolotti, M. *et al.* (2016) 'AQP8 transports NOX2-generated H₂O₂ across the plasma membrane to promote signaling in B cells', *Journal of Leukocyte Biology*, 100(5), pp. 1071–1079. Available at: <https://doi.org/10.1189/jlb.2AB0116-045R>.
32. Birket, M.J. *et al.* (2013) 'PGC-1 α and Reactive Oxygen Species Regulate Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Function', *Stem Cell Reports*, 1(6), pp. 560–574. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.008>.
33. Birsoy, K. *et al.* (2015) 'An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis', *Cell*, 162(3), pp. 540–551. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.016>.
34. Bock, F.J. and Tait, S.W.G. (2020) 'Mitochondria as multifaceted regulators of cell death', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(2), pp. 85–100. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>.
35. Bogenhagen, D.F. (2012) 'Mitochondrial DNA nucleoid structure', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1819(9–10), pp. 914–920. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.11.005>.
36. Borecký, J., Maia, I.G. and Arruda, P. (2001) 'Mitochondrial Uncoupling Proteins in Mammals and Plants', *Bioscience Reports*, 21(2), pp. 201–212. Available at: <https://doi.org/10.1023/A:1013604526175>.
37. Bouillaud, F. *et al.* (2001) 'Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1504(1), pp. 107–119. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00241-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00241-3).
38. Bouillaud, F., Alves-Guerra, M.-C. and Ricquier, D. (2016) 'UCPs, at the interface between bioenergetics and metabolism', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1863(10), pp. 2443–2456. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.013>.
39. Boyman, L. *et al.* (2014) 'Calcium Movement in Cardiac Mitochondria', *Biophysical Journal*, 107(6), pp. 1289–1301. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.07.045>.

40. Brand, M.D. (2016) 'Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling', *Free Radical Biology and Medicine*, 100, pp. 14–31. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>.
41. Bryant, N.J., Govers, R. and James, D.E. (2002) 'Regulated transport of the glucose transporter GLUT4', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(4), pp. 267–277. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm782>.
42. Buettner, G.R. (1993) 'The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(2), pp. 535–543. Available at: <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1074>.
43. Bugger, H. and Pfeil, K. (2020) 'Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(7), p. 165768. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165768>.
44. Burchfield, J.S., Xie, M. and Hill, J.A. (2013) 'Pathological Ventricular Remodeling', *Circulation*, 128(4), pp. 388–400. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001878>.
45. Cadenas, S. *et al.* (1999) 'UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged', *FEBS Letters*, 462(3), pp. 257–260. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01540-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01540-9).
46. Calmettes, G. *et al.* (2013) 'Hexokinase–mitochondrial interactions regulate glucose metabolism differentially in adult and neonatal cardiac myocytes', *Journal of General Physiology*, 142(4), pp. 425–436. Available at: <https://doi.org/10.1085/jgp.201310968>.
47. Campbell, C.T., Kolesar, J.E. and Kaufman, B.A. (2012) 'Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1819(9–10), pp. 921–929. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.03.002>.
48. Cannon, B. *et al.* (2006) 'Uncoupling proteins: A role in protection against reactive oxygen species—or not?', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(5), pp. 449–458. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.05.016>.
49. Canovas, B. and Nebreda, A.R. (2021) 'Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, pp. 1–21. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00322-w>.
50. Cantó, C. *et al.* (2009a) 'AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity', *Nature*, 458(7241), pp. 1056–1060. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature07813>.
51. Cantó, C. *et al.* (2009b) 'AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity', *Nature*, 458(7241), pp. 1056–1060. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature07813>.
52. Cardoso, A.C. *et al.* (2020) 'Mitochondrial substrate utilization regulates cardiomyocyte cell-cycle progression', *Nature Metabolism*, 2(2), pp. 167–178. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0169-x>.

53. Caron, A. *et al.* (2017) 'Loss of UCP2 impairs cold-induced non-shivering thermogenesis by promoting a shift toward glucose utilization in brown adipose tissue', *Biochimie*, 134, pp. 118–126. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.01.006>.
54. Cassago, A. *et al.* (2012) 'Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), pp. 1092–1097. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1112495109>.
55. Castellan, R.F.P. *et al.* (2020) 'Electrocardiogram-gated KiloHertz Visualisation (EKV) Ultrasound Allows Assessment of Neonatal Cardiac Structural and Functional Maturation and Longitudinal Evaluation of Regeneration After Injury', *Ultrasound in Medicine & Biology*, 46(1), pp. 167–179. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2019.09.012>.
56. Cecarini, V. *et al.* (2007) 'Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1773(2), pp. 93–104. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.039>.
57. Chakrabarty, R.P. and Chandel, N.S. (2021) 'Mitochondria as Signaling Organelles Control Mammalian Stem Cell Fate', *Cell Stem Cell*, 28(3), pp. 394–408. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.02.011>.
58. Chang, T.-S. *et al.* (2004) 'Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(49), pp. 50994–51001. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M409482200>.
59. Chen, X. *et al.* (2009) 'In Vitro Evidence Suggests That miR-133a-mediated Regulation of Uncoupling Protein 2 (UCP2) Is an Indispensable Step in Myogenic Differentiation', *Journal of Biological Chemistry*, 284(8), pp. 5362–5369. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M807523200>.
60. Chen, Y. *et al.* (2021) 'Reversible reprogramming of cardiomyocytes to a fetal state drives heart regeneration in mice', *Science* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.abg5159>.
61. Chouchani, E.T. *et al.* (2016) 'A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury', *Cell Metabolism*, 23(2), pp. 254–263. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.009>.
62. Chua, G.N.L. *et al.* (2019) 'Cytosine-Based TET Enzyme Inhibitors', *ACS medicinal chemistry letters*, 10(2), pp. 180–185. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00474>.
63. Chuva de Sousa Lopes, S.M. *et al.* (2006) 'Patterning the heart, a template for human cardiomyocyte development', *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 235(7), pp. 1994–2002. Available at: <https://doi.org/10.1002/dvdy.20830>.
64. Ciccia, A. and Elledge, S.J. (2010) 'The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives', *Molecular cell*, 40(2), pp. 179–204. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>.
65. Cikes, M. and Solomon, S.D. (2016) 'Beyond ejection fraction: an integrative approach for assessment of cardiac structure and function in heart failure', *European Heart Journal*, 37(21), pp. 1642–1650. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv510>.

66. Cortassa, S., Sollott, S.J. and Aon, M.A. (2017) 'Mitochondrial respiration and ROS emission during β -oxidation in the heart: An experimental-computational study', *PLoS Computational Biology*, 13(6), p. e1005588. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005588>.
67. Couplan, E. *et al.* (2002) 'No Evidence for a Basal, Retinoic, or Superoxide-induced Uncoupling Activity of the Uncoupling Protein 2 Present in Spleen or Lung Mitochondria*', *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), pp. 26268–26275. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M202535200>.
68. Cui, M. *et al.* (2020) 'Dynamic Transcriptional Responses to Injury of Regenerative and Non-regenerative Cardiomyocytes Revealed by Single-Nucleus RNA Sequencing', *Developmental Cell*, 53(1), pp. 102–116.e8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.02.019>.
69. Dang, L., Yen, K. and Attar, E.C. (2016) 'IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics', *Annals of Oncology*, 27(4), pp. 599–608. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw013>.
70. Davalli, P. *et al.* (2018) 'Targeting Oxidatively Induced DNA Damage Response in Cancer: Opportunities for Novel Cancer Therapies', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, p. 2389523. Available at: <https://doi.org/10.1155/2018/2389523>.
71. Davidson, M.T. *et al.* (2020) 'Extreme Acetylation of the Cardiac Mitochondrial Proteome Does Not Promote Heart Failure', *Circulation research*, 127(8), pp. 1094–1108. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317293>.
72. DeBerardinis, R.J. *et al.* (2007) 'Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), pp. 19345–19350. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0709747104>.
73. Deeb, R.S. *et al.* (2013) 'Characterization of a cellular denitrase activity that reverses nitration of cyclooxygenase', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 305(5), pp. H687–H698. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00876.2012>.
74. Depre, C., Vanoverschelde, J.-L.J. and Taegtmeyer, H. (1999) 'Glucose for the Heart', *Circulation*, 99(4), pp. 578–588. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.4.578>.
75. Derks, W. and Bergmann, O. (2020) 'Polyploidy in Cardiomyocytes: Roadblock to Heart Regeneration?', *Circulation Research*, 126(4), pp. 552–565. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315408>.
76. Di, W. *et al.* (2018) 'PGC-1: The Energetic Regulator in Cardiac Metabolism', *Current Issues in Molecular Biology*, pp. 29–46. Available at: <https://doi.org/10.21775/cimb.028.029>.
77. van Dierendonck, X.A.M.H. *et al.* (2020) 'The role of uncoupling protein 2 in macrophages and its impact on obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance', *Journal of Biological Chemistry*, 295(51), pp. 17535–17548. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014868>.
78. Ding, Y. *et al.* (2019) 'UCP2 ameliorates mitochondrial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury', *International Immunopharmacology*, 71, pp. 336–349. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.03.043>.

79. Dirks-Naylor, A.J. *et al.* (2014) 'Doxorubicin alters the mitochondrial dynamics machinery and mitophagy in the liver of treated animals', *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 28(6), pp. 633–642. Available at: <https://doi.org/10.1111/fcp.12073>.
80. Divakaruni, A.S. and Brand, M.D. (2011) 'The regulation and physiology of mitochondrial proton leak', *Physiology (Bethesda, Md.)*, 26(3), pp. 192–205. Available at: <https://doi.org/10.1152/physiol.00046.2010>.
81. Dixon, D.M. *et al.* (2015) 'Loss of muscleblind-like 1 results in cardiac pathology and persistence of embryonic splice isoforms', *Scientific Reports*, 5, p. 9042. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep09042>.
82. Doenst, T., Nguyen, T.D. and Abel, E.D. (2013) 'Cardiac Metabolism in Heart Failure - Implications beyond ATP production', *Circulation research*, 113(6), pp. 709–724. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300376>.
83. D'Uva, G. *et al.* (2015) 'ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation', *Nature Cell Biology*, 17(5), pp. 627–638. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb3149>.
84. Echtay, K.S. *et al.* (2002) 'Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins', *Nature*, 415(6867), pp. 96–99. Available at: <https://doi.org/10.1038/415096a>.
85. Echtay, K.S. *et al.* (2003) 'A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling', *The EMBO journal*, 22(16), pp. 4103–4110. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg412>.
86. Elhelaly, W.M. *et al.* (2016) 'Redox Regulation of Heart Regeneration: An Evolutionary Tradeoff', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00137>.
87. Elorza, A. *et al.* (2008) 'UCP2 modulates cell proliferation through the MAPK/ERK pathway during erythropoiesis and has no effect on heme biosynthesis', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(45), pp. 30461–30470. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M805400200>.
88. Emre, Y. *et al.* (2007) 'Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages', *Biochemical Journal*, 402(Pt 2), pp. 271–278. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20061430>.
89. Enerbäck, S. *et al.* (1997) 'Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese', *Nature*, 387(6628), pp. 90–94. Available at: <https://doi.org/10.1038/387090a0>.
90. Engel, F.B. (2005) 'p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes', *Genes & Development*, 19(10), pp. 1175–1187. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1306705>.
91. Erickson, J.R. *et al.* (2008) 'A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation', *Cell*, 133(3), pp. 462–474. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.048>.
92. Esteves, P. *et al.* (2014) 'Mitochondrial Retrograde Signaling Mediated by UCP2 Inhibits Cancer Cell Proliferation and Tumorigenesis', *Cancer Research*, 74(14), pp. 3971–3982. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3383>.

93. Fan, M. *et al.* (2004) 'Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1 α : modulation by p38 MAPK', *Genes & Development*, 18(3), pp. 278–289. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1152204>.
94. Fernandez-Marcos, P.J. and Auwerx, J. (2011) 'Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis¹²³⁴', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(4), pp. 884S-890S. Available at: <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001917>.
95. Figueroa, M.E. *et al.* (2010) 'Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation', *Cancer Cell*, 18(6), pp. 553–567. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.015>.
96. Finck, B.N. and Kelly, D.P. (2002) 'Peroxisome Proliferator-activated Receptor α (PPAR α) Signaling in the Gene Regulatory Control of Energy Metabolism in the Normal and Diseased Heart', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(10), pp. 1249–1257. Available at: <https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2061>.
97. Fisher, D.J., Heymann, M.A. and Rudolph, A.M. (1981) 'Myocardial consumption of oxygen and carbohydrates in newborn sheep', *Pediatric Research*, 15(5), pp. 843–846. Available at: <https://doi.org/10.1203/00006450-198105000-00003>.
98. Fleury, C. *et al.* (1997) 'Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia', *Nature Genetics*, 15(3), pp. 269–272. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng0397-269>.
99. Forte, M. *et al.* (2021) 'An interplay between UCP2 and ROS protects cells from high-salt-induced injury through autophagy stimulation', *Cell Death & Disease*, 12(10), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04188-4>.
100. Fulghum, K. and Hill, B.G. (2018) 'Metabolic Mechanisms of Exercise-Induced Cardiac Remodeling', *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcvm.2018.00127> (Accessed: 26 March 2022).
101. Gabisonia, K. *et al.* (2019) 'MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs', *Nature*, 569(7756), pp. 418–422. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1191-6>.
102. Galaris, D., Barbouti, A. and Pantopoulos, K. (2019) 'Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(12), p. 118535. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118535>.
103. Gandhirajan, R.K. *et al.* (2016) 'Cysteine S-Glutathionylation Promotes Stability and Activation of the Hippo Downstream Effector Transcriptional Co-activator with PDZ-binding Motif (TAZ)', *Journal of Biological Chemistry*, 291(22), pp. 11596–11607. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.712539>.
104. Gao, L. *et al.* (2021) 'Using redox-sensitive fluorescent probes to record real-time reactive oxygen species production in cells from mouse carotid body slices', *STAR Protocols*, 2(2), p. 100535. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100535>.
105. Garbern, J.C. and Lee, R.T. (2021) 'Mitochondria and metabolic transitions in cardiomyocytes: lessons from development for stem cell-derived cardiomyocytes', *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), p. 177. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02252-6>.

106. Gaspar, R.C. *et al.* (2021) 'An update on brown adipose tissue biology: a discussion of recent findings', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 320(3), pp. E488–E495. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00310.2020>.
107. Gaudesius, G. *et al.* (2003) 'Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin', *Circulation Research*, 93(5), pp. 421–428. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000089258.40661.0C>.
108. Gautel, M. and Djinić-Carugo, K. (2016) 'The sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion', *Journal of Experimental Biology*. Edited by S.L. Lindstedt and H.H. Hoppeler, 219(2), pp. 135–145. Available at: <https://doi.org/10.1242/jeb.124941>.
109. Gilsbach, R. *et al.* (2014) 'Dynamic DNA methylation orchestrates cardiomyocyte development, maturation and disease', *Nature Communications*, 5(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms6288>.
110. Girard, J. *et al.* (1992) 'Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition', *Physiological Reviews*, 72(2), pp. 507–562. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.2.507>.
111. Go, Y.-M., Chandler, J.D. and Jones, D.P. (2015) 'The cysteine proteome', *Free Radical Biology and Medicine*, 84, pp. 227–245. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.022>.
112. Gong, G. *et al.* (2015) 'Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice', *Science*, 350(6265), p. aad2459. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aad2459>.
113. Gonzalez, D.R. *et al.* (2010) 'Impaired S-Nitrosylation of the Ryanodine Receptor Caused by Xanthine Oxidase Activity Contributes to Calcium Leak in Heart Failure', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(37), pp. 28938–28945. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.154948>.
114. González-Barroso, M.M. *et al.* (2008) 'Mutations in UCP2 in congenital hyperinsulinism reveal a role for regulation of insulin secretion', *PloS One*, 3(12), p. e3850. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003850>.
115. González-Rosa, J.M. *et al.* (2018) 'Myocardial Polyploidization Creates a Barrier to Heart Regeneration in Zebrafish', *Developmental Cell*, 44(4), pp. 433–446.e7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.021>.
116. Greco, C.M. *et al.* (2016) 'DNA hydroxymethylation controls cardiomyocyte gene expression in development and hypertrophy', *Nature Communications*, 7, p. 12418. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms12418>.
117. Greenberg, M.V.C. and Bourc'his, D. (2019) 'The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(10), pp. 590–607. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0159-6>.
118. Griffin, T.M. *et al.* (2016) 'Nutrient Sensing and Utilization: Getting to the Heart of Metabolic Flexibility', *Biochimie*, 124, pp. 74–83. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.10.013>.

119. Gruber, A. *et al.* (2022) 'Optogenetic Control of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Tissue Models', *Journal of the American Heart Association*, 11(4), p. e021615. Available at: <https://doi.org/10.1161/JAHA.121.021615>.
120. Guan, H.-P. *et al.* (2005) 'Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPAR γ in adipocytes', *Genes & Development*, 19(4), pp. 453–461. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1263305>.
121. Guo, Y. *et al.* (2018) 'Hierarchical and stage-specific regulation of murine cardiomyocyte maturation by serum response factor', *Nature Communications*, 9(1), p. 3837. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06347-2>.
122. Guo, Y. *et al.* (2021) 'Sarcomeres regulate murine cardiomyocyte maturation through MRTF-SRF signaling', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(2), p. e2008861118. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2008861118>.
123. Guo, Y. and Pu, W.T. (2020) 'Cardiomyocyte Maturation: New Phase in Development', *Circulation Research*, 126(8), pp. 1086–1106. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315862>.
124. Guo, Z. *et al.* (2010) 'ATM activation by oxidative stress', *Science (New York, N.Y.)*, 330(6003), pp. 517–521. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1192912>.
125. Gureev, A.P., Shaforostova, E.A. and Popov, V.N. (2019) 'Regulation of Mitochondrial Biogenesis as a Way for Active Longevity: Interaction Between the Nrf2 and PGC-1 α Signaling Pathways', *Frontiers in Genetics*, 10, p. 435. Available at: <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00435>.
126. Haines, B. and Li, P.A. (2012) 'Overexpression of mitochondrial uncoupling protein 2 inhibits inflammatory cytokines and activates cell survival factors after cerebral ischemia', *PloS One*, 7(2), p. e31739. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031739>.
127. Hamon, M.-P. *et al.* (2020) 'Mitochondrial Lon protease - depleted HeLa cells exhibit proteome modifications related to protein quality control, stress response and energy metabolism', *Free Radical Biology and Medicine*, 148, pp. 83–95. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.039>.
128. Hamosh, M. *et al.* (1978) 'Lipoprotein lipase activity and blood triglyceride levels in fetal and newborn rats', *Pediatric Research*, 12(12), pp. 1132–1136. Available at: <https://doi.org/10.1203/00006450-197812000-00006>.
129. Han, H.-S. *et al.* (2016) 'Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective', *Experimental & Molecular Medicine*, 48(3), pp. e218–e218. Available at: <https://doi.org/10.1038/emm.2015.122>.
130. Hanschmann, E.-M. *et al.* (2013) 'Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins—Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling', *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(13), pp. 1539–1605. Available at: <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4599>.
131. Hardie, D.G. (2007) 'AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), pp. 774–785. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2249>.

132. Haubner, B.J. *et al.* (2016) 'Functional Recovery of a Human Neonatal Heart After Severe Myocardial Infarction', *Circulation Research*, 118(2), pp. 216–221. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307017>.
133. He, Y.-F. *et al.* (2011) 'Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA', *Science (New York, N.Y.)*, 333(6047), pp. 1303–1307. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1210944>.
134. Herron, T.J. *et al.* (2016) 'Extracellular Matrix Mediated Maturation of Human Pluripotent Stem Cell Derived Cardiac Monolayer Structure and Electrophysiological Function', *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*, 9(4), p. 10.1161/CIRCEP.113.003638 e003638. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.113.003638>.
135. Hilse, K.E. *et al.* (2016) 'The expression of UCP3 directly correlates to UCP1 abundance in brown adipose tissue', *Biochimica et biophysica acta*, 1857(1), pp. 72–78. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.10.011>.
136. Hilse, K.E. *et al.* (2018) 'The Expression of Uncoupling Protein 3 Coincides With the Fatty Acid Oxidation Type of Metabolism in Adult Murine Heart', *Frontiers in Physiology*, 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.00747> (Accessed: 20 May 2022).
137. Honkoop, H. *et al.* (2019) 'Single-cell analysis uncovers that metabolic reprogramming by ErbB2 signaling is essential for cardiomyocyte proliferation in the regenerating heart', *eLife*, 8, p. e50163. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.50163>.
138. Horikoshi, Y. *et al.* (2019) 'Fatty Acid-Treated Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiomyocytes Exhibit Adult Cardiomyocyte-Like Energy Metabolism Phenotypes', *Cells*, 8(9), p. 1095. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8091095>.
139. Horton, J.L. *et al.* (2019) 'The failing heart utilizes 3-hydroxybutyrate as a metabolic stress defense', *JCI Insight*, 4(4), p. e124079. Available at: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.124079>.
140. Hoshi, T. and Heinemann, S.H. (2001) 'Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction', *The Journal of Physiology*, 531(Pt 1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0001j.x>.
141. Houtkooper, R.H., Pirinen, E. and Auwerx, J. (2012) 'Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(4), pp. 225–238. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm3293>.
142. Hsieh, P.C.H. *et al.* (2007) 'Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury', *Nature medicine*, 13(8), pp. 970–974. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm1618>.
143. Hurtaud, C. *et al.* (2006) 'Translation control of UCP2 synthesis by the upstream open reading frame', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 63(15), pp. 1780–1789. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6129-0>.
144. Hurtaud, C. *et al.* (2007) 'Glutamine stimulates translation of uncoupling protein 2mRNA', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 64(14), pp. 1853–1860. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7039-5>.

145. Ianni, A. *et al.* (2018) 'Sirtuins in the Cardiovascular System: Potential Targets in Pediatric Cardiology', *Pediatric Cardiology*, 39(5), pp. 983–992. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00246-018-1848-1>.
146. Itoi, T. and Lopaschuk, G.D. (1993) 'The Contribution of Glycolysis, Glucose Oxidation, Lactate Oxidation, and Fatty Acid Oxidation to ATP Production in Isolated Biventricular Working Hearts from 2-Week-Old Rabbits', *Pediatric Research*, 34(6), pp. 735–741. Available at: <https://doi.org/10.1203/00006450-199312000-00008>.
147. Jabůrek, M. *et al.* (1999) 'Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3', *The Journal of Biological Chemistry*, 274(37), pp. 26003–26007. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26003>.
148. Jäger, S. *et al.* (2007) 'AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(29), pp. 12017–12022. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0705070104>.
149. Jaka, O. *et al.* (2015) 'Costamere proteins and their involvement in myopathic processes', *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 17, p. e12. Available at: <https://doi.org/10.1017/erm.2015.9>.
150. Jastroch, M., Withers, K. and Klingenspor, M. (2004) 'Uncoupling protein 2 and 3 in marsupials: identification, phylogeny, and gene expression in response to cold and fasting in *Antechinus flavipes*', *Physiological Genomics*, 17(2), pp. 130–139. Available at: <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00165.2003>.
151. Johnson, B. *et al.* (2008) 'Cardiac Physiology', in *Essentials of Cardiac Anesthesia*. Elsevier, pp. 53–66. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-141603786-6.10003-8>.
152. Jopling, C. *et al.* (2010) 'Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation', *Nature*, 464(7288), pp. 606–609. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature08899>.
153. Joseph, J.W. *et al.* (2002) 'Uncoupling Protein 2 Knockout Mice Have Enhanced Insulin Secretory Capacity After a High-Fat Diet', *Diabetes*, 51(11), pp. 3211–3219. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.11.3211>.
154. Jung, T., Höhn, A. and Grune, T. (2014) 'The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part II – protein oxidation and proteasomal degradation', *Redox Biology*, 2, pp. 99–104. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.008>.
155. Kalsotra, A. *et al.* (2008) 'A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), pp. 20333–20338. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0809045105>.
156. Karbassi, E. *et al.* (2020) 'Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine', *Nature Reviews. Cardiology*, 17(6), pp. 341–359. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0331-x>.
157. Karwi, Q.G. *et al.* (2020) 'Insulin directly stimulates mitochondrial glucose oxidation in the heart', *Cardiovascular Diabetology*, 19(1), p. 207. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12933-020-01177-3>.

158. Kaźmierczak-Barańska, J. *et al.* (2020) 'Two Faces of Vitamin C—Antioxidative and Pro-Oxidative Agent', *Nutrients*, 12(5), p. 1501. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu12051501>.
159. Kehm, R. *et al.* (2021) 'Protein oxidation - Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases', *Redox Biology*, 42, p. 101901. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101901>.
160. Kennedy, A. *et al.* (2016) 'The Cardiac Conduction System: Generation and Conduction of the Cardiac Impulse', *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 28(3), pp. 269–279. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2016.04.001>.
161. Kimura, W. *et al.* (2015) 'Hypoxia fate mapping identifies cycling cardiomyocytes in the adult heart', *Nature*, 523(7559), pp. 226–230. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature14582>.
162. Kinnaird, A. *et al.* (2016) 'Metabolic control of epigenetics in cancer', *Nature Reviews Cancer*, 16(11), pp. 694–707. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.82>.
163. Kloska, S.M. *et al.* (2022) 'Queueing theory model of pentose phosphate pathway', *Scientific Reports*, 12(1), p. 4601. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08463-y>.
164. Kong, D. *et al.* (2010) 'Glucose Stimulation of Hypothalamic MCH Neurons Involves KATP Channels, Is Modulated by UCP2, and Regulates Peripheral Glucose Homeostasis', *Cell Metabolism*, 12(5), pp. 545–552. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.09.013>.
165. Kreiter, J. *et al.* (2019) 'Molecular Mechanisms Responsible for Pharmacological Effects of Genipin on Mitochondrial Proteins', *Biophysical Journal*, 117(10), pp. 1845–1857. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.10.021>.
166. Kukat, A. *et al.* (2014) 'Loss of UCP2 Attenuates Mitochondrial Dysfunction without Altering ROS Production and Uncoupling Activity', *PLoS Genetics*. Edited by N.-G. Larsson, 10(6), p. e1004385. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004385>.
167. Kummer, E. and Ban, N. (2021) 'Mechanisms and regulation of protein synthesis in mitochondria', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(5), pp. 307–325. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00332-2>.
168. Kurian, J. *et al.* (2021) 'Uncoupling protein 2-mediated metabolic adaptations define cardiac cell function in the heart during transition from young to old age', *STEM CELLS Translational Medicine*, 10(1), pp. 144–156. Available at: <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0123>.
169. Latham, T. *et al.* (2012) 'Lactate, a product of glycolytic metabolism, inhibits histone deacetylase activity and promotes changes in gene expression', *Nucleic Acids Research*, 40(11), pp. 4794–4803. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gks066>.
170. Lauzier, B. *et al.* (2013) 'Metabolic effects of glutamine on the heart: anaplerosis versus the hexosamine biosynthetic pathway', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 55, pp. 92–100. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.008>.
171. Lee, C.Y. and Grant, P.A. (2019) 'Role of Histone Acetylation and Acetyltransferases in Gene Regulation', in *Toxicopigenetics*. Elsevier, pp. 3–30. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812433-8.00001-0>.

172. Lee, J.V. *et al.* (2014) 'Akt-dependent metabolic reprogramming regulates tumor cell histone acetylation', *Cell Metabolism*, 20(2), pp. 306–319. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.06.004>.
173. Lee, J.Z. *et al.* (2019) 'Abstract 409: Regulation of Cardiomyocyte Maturation by an RNA Splicing Regulator Rbfox1', *Circulation Research*, 125(Suppl_1), pp. A409–A409. Available at: https://doi.org/10.1161/res.125.suppl_1.409.
174. Leone, M. and Engel, F.B. (2019) 'Pseudo-bipolar spindle formation and cell division in postnatal binucleated cardiomyocytes', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 134, pp. 69–73. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.07.005>.
175. LeWinter, M.M. and Granzier, H. (2010) 'Cardiac Titin', *Circulation*, 121(19), pp. 2137–2145. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.860171>.
176. L'honoré, A. *et al.* (2018) 'The role of Pitx2 and Pitx3 in muscle stem cells gives new insights into P38 α MAP kinase and redox regulation of muscle regeneration', *eLife*, 7, p. e32991. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.32991>.
177. Li, A. *et al.* (2020) 'Mitochondrial Dynamics in Adult Cardiomyocytes and Heart Diseases', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.584800> (Accessed: 15 March 2022).
178. Li, J. *et al.* (1997) 'Nitric Oxide Reversibly Inhibits Seven Members of the Caspase Family via S-Nitrosylation', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240(2), pp. 419–424. Available at: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7672>.
179. Li, J. *et al.* (2019) 'UCP2 gene polymorphisms in obesity and diabetes, and the role of UCP2 in cancer', *FEBS Letters*, 593(18), pp. 2525–2534. Available at: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13546>.
180. Li, N., Karaca, M. and Maechler, P. (2017) 'Upregulation of UCP2 in beta-cells confers partial protection against both oxidative stress and glucotoxicity', *Redox Biology*, 13, pp. 541–549. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.012>.
181. Li, W. *et al.* (2018) 'CAB39L elicited an anti-Warburg effect via a LKB1-AMPK-PGC1 α axis to inhibit gastric tumorigenesis', *Oncogene*, 37(50), pp. 6383–6398. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0402-1>.
182. Lin, J., Handschin, C. and Spiegelman, B.M. (2005) 'Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators', *Cell Metabolism*, 1(6), pp. 361–370. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.004>.
183. Liu, J., Laksman, Z. and Backx, P.H. (2016) 'The electrophysiological development of cardiomyocytes', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 96, pp. 253–273. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.023>.
184. Liu, Y. and Min, W. (2002) 'Thioredoxin Promotes ASK1 Ubiquitination and Degradation to Inhibit ASK1-Mediated Apoptosis in a Redox Activity-Independent Manner', *Circulation Research*, 90(12), pp. 1259–1266. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000022160.64355.62>.

185. Lopaschuk, G.D. *et al.* (1994) 'Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1213(3), pp. 263–276. Available at: [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)00082-4](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)00082-4).
186. Lopaschuk, G.D. *et al.* (2010) 'Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease', *Physiological Reviews*, 90(1), pp. 207–258. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2009>.
187. Lopaschuk, G.D. (2017) 'Metabolic Modulators in Heart Disease: Past, Present, and Future', *The Canadian Journal of Cardiology*, 33(7), pp. 838–849. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.12.013>.
188. Lopaschuk, G.D. *et al.* (2020) 'Ketone metabolism in the failing heart', *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(12), p. 158813. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158813>.
189. Lopaschuk, G.D., Collins-Nakai, R.L. and Itoi, T. (1992) 'Developmental changes in energy substrate use by the heart', *Cardiovascular Research*, 26(12), pp. 1172–1180.
190. Lopaschuk, G.D. and Jaswal, J.S. (2010) 'Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation', *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 56(2), pp. 130–140. Available at: <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181e74a14>.
191. Lopaschuk, G.D., Spafford, M.A. and Marsh, D.R. (1991) 'Glycolysis is predominant source of myocardial ATP production immediately after birth', *The American Journal of Physiology*, 261(6 Pt 2), pp. H1698-1705. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.261.6.H1698>.
192. Lopaschuk, G.D. and Stanley, W.C. (1997) 'Glucose Metabolism in the Ischemic Heart', *Circulation*, 95(2), pp. 313–315. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.95.2.313>.
193. Lourenço Dos Santos, S., Petropoulos, I. and Friguet, B. (2018) 'The Oxidized Protein Repair Enzymes Methionine Sulfoxide Reductases and Their Roles in Protecting against Oxidative Stress, in Ageing and in Regulating Protein Function', *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(12), p. E191. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox7120191>.
194. Lu, M. *et al.* (2008) 'Role of the Malate-Aspartate Shuttle on the Metabolic Response to Myocardial Ischemia', *Journal of theoretical biology*, 254(2), pp. 466–475. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.05.033>.
195. Mackay, G.M. *et al.* (2015) 'Analysis of Cell Metabolism Using LC-MS and Isotope Tracers', *Methods in Enzymology*, 561, pp. 171–196. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.05.016>.
196. MacMillan-Crow, L.A. *et al.* (1996) 'Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21), pp. 11853–11858. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11853>.
197. Mahmood, D.F.D. *et al.* (2013) 'The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease', *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(11), pp. 1266–1303. Available at: <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4757>.

198. Mailloux, R.J. *et al.* (2011) 'Glutathionylation Acts as a Control Switch for Uncoupling Proteins UCP2 and UCP3', *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), pp. 21865–21875. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.240242>.
199. Makinde, A.-O., Gamble, J. and Lopaschuk, G.D. (1997) 'Upregulation of 5'-AMP-Activated Protein Kinase Is Responsible for the Increase in Myocardial Fatty Acid Oxidation Rates Following Birth in the Newborn Rabbit', *Circulation Research*, 80(4), pp. 482–489. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.RES.80.4.482>.
200. Martínez-Reyes, I. *et al.* (2016) 'TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions', *Molecular Cell*, 61(2), pp. 199–209. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.002>.
201. Martínez-Reyes, I. and Chandel, N.S. (2020) 'Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease', *Nature Communications*, 11(1), p. 102. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>.
202. Matsushima, S. and Sadoshima, J. (2015) 'The role of sirtuins in cardiac disease', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 309(9), pp. H1375–H1389. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00053.2015>.
203. Matsuyama, D. and Kawahara, K. (2011) 'Oxidative stress-induced formation of a positive-feedback loop for the sustained activation of p38 MAPK leading to the loss of cell division in cardiomyocytes soon after birth', *Basic Research in Cardiology*, 106(5), pp. 815–828. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00395-011-0178-8>.
204. Mattiasson, G. *et al.* (2003) 'Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma', *Nature Medicine*, 9(8), pp. 1062–1068. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm903>.
205. McDevitt, T.C. *et al.* (2002) 'In vitro generation of differentiated cardiac myofibers on micropatterned laminin surfaces', *Journal of Biomedical Materials Research*, 60(3), pp. 472–479. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbm.1292>.
206. McLeod, C.J. *et al.* (2005) 'Uncoupling Proteins 2 and 3 Function in Concert to Augment Tolerance to Cardiac Ischemia *', *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), pp. 33470–33476. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M505258200>.
207. Medvedev, A.V. *et al.* (2002) 'Regulation of the uncoupling protein-2 gene in INS-1 beta-cells by oleic acid', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(45), pp. 42639–42644. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M208645200>.
208. Menendez-Montes, I. *et al.* (2016) 'Myocardial VHL-HIF Signaling Controls an Embryonic Metabolic Switch Essential for Cardiac Maturation', *Developmental Cell*, 39(6), pp. 724–739. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.11.012>.
209. Meng, J. *et al.* (2021) 'Global profiling of distinct cysteine redox forms reveals wide-ranging redox regulation in *C. elegans*', *Nature Communications*, 12(1), p. 1415. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21686-3>.
210. Messerschmidt, D.M., Knowles, B.B. and Solter, D. (2014) 'DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos', *Genes & Development*, 28(8), pp. 812–828. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.234294.113>.

211. Meyer, J.N., Leuthner, T.C. and Luz, A.L. (2017) 'Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity', *Toxicology*, 391, pp. 42–53. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.07.019>.
212. Miller, A.-F. (2012) 'Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights', *FEBS letters*, 586(5), pp. 585–595. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.048>.
213. Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A.M. and Zujko, M.E. (2018) 'Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body', *Advances in Medical Sciences*, 63(1), pp. 68–78. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>.
214. Mollova, M. *et al.* (2013) 'Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(4), pp. 1446–1451. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1214608110>.
215. van Montfort, R.L.M. *et al.* (2003) 'Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B', *Nature*, 423(6941), pp. 773–777. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature01681>.
216. Moukdar, F. *et al.* (2009) 'Reduced antioxidant capacity and diet-induced atherosclerosis in uncoupling protein-2-deficient mice', *Journal of Lipid Research*, 50(1), pp. 59–70. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.M800273-JLR200>.
217. Murphy, M.P. (2009) 'How mitochondria produce reactive oxygen species', *Biochemical Journal*, 417(Pt 1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>.
218. Nakada, Y. *et al.* (2017) 'Hypoxia induces heart regeneration in adult mice', *Nature*, 541(7636), pp. 222–227. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature20173>.
219. Nassar, R., Reedy, M.C. and Anderson, P.A. (1987) 'Developmental changes in the ultrastructure and sarcomere shortening of the isolated rabbit ventricular myocyte.', *Circulation Research*, 61(3), pp. 465–483. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.RES.61.3.465>.
220. Navale, A.M. and Paranjape, A.N. (2016) 'Glucose transporters: physiological and pathological roles', *Biophysical Reviews*, 8(1), pp. 5–9. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12551-015-0186-2>.
221. Nedergaard, J. and Cannon, B. (2003) 'The “Novel” “Uncoupling” Proteins UCP2 and UCP3: What Do They Really do? Pros and Cons for Suggested Functions', *Experimental Physiology*, 88(1), pp. 65–84. Available at: <https://doi.org/10.1113/eph8802502>.
222. Nègre-Salvayre, A. *et al.* (1997) 'A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(10), pp. 809–815.
223. Niemann, B. and Rohrbach, S. (2016) 'Metabolically Relevant Cell Biology – Role of Intracellular Organelles for Cardiac Metabolism', in *The Scientist's Guide to Cardiac Metabolism*. Elsevier, pp. 19–38. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802394-5.00003-0>.
224. Nübel, T. *et al.* (2008) 'Modified glutamine catabolism in macrophages of Ucp2 knock-out mice', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(1), pp. 48–54. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.11.002>.

225. Oberkofler, H. *et al.* (2006) 'Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha in the transcriptional regulation of the human uncoupling protein 2 gene in INS-1E cells', *Endocrinology*, 147(2), pp. 966–976. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2005-0817>.
226. Olson, E.N. and Schneider, M.D. (2003) 'Sizing up the heart: development redux in disease', *Genes & Development*, 17(16), pp. 1937–1956. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1110103>.
227. Östman, A. *et al.* (2011) 'Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation', *The Journal of Biochemistry*, 150(4), pp. 345–356. Available at: <https://doi.org/10.1093/jb/mvr104>.
228. Otani, J. *et al.* (2013) 'Cell Cycle-Dependent Turnover of 5-Hydroxymethyl Cytosine in Mouse Embryonic Stem Cells', *PLOS ONE*, 8(12), p. e82961. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082961>.
229. Owen, O.E., Kalhan, S.C. and Hanson, R.W. (2002) 'The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function *', *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), pp. 30409–30412. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.R200006200>.
230. Palmieri, F. (2013) 'The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology', *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), pp. 465–484. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.005>.
231. Parra, V. *et al.* (2011) 'The complex interplay between mitochondrial dynamics and cardiac metabolism', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 43(1), pp. 47–51. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10863-011-9332-0>.
232. Patterson, A.J. and Zhang, L. (2010) 'Hypoxia and Fetal Heart Development', *Current molecular medicine*, 10(7), pp. 653–666.
233. Pecqueur, C. *et al.* (1999) 'Functional Organization of the Human Uncoupling Protein-2 Gene, and Juxtaposition to the Uncoupling Protein-3 Gene', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255(1), pp. 40–46. Available at: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.0146>.
234. Pecqueur, C. *et al.* (2001) 'Uncoupling Protein 2, *in Vivo* Distribution, Induction upon Oxidative Stress, and Evidence for Translational Regulation', *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), pp. 8705–8712. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M006938200>.
235. Pecqueur, C. *et al.* (2008) 'Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(1), pp. 9–18. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.07-8945com>.
236. Pecqueur, C. *et al.* (2009) 'UCP2, a metabolic sensor coupling glucose oxidation to mitochondrial metabolism?', *IUBMB Life*, 61(7), pp. 762–767. Available at: <https://doi.org/10.1002/iub.188>.
237. Peinkofer, G. *et al.* (2016) 'From Early Embryonic to Adult Stage: Comparative Study of Action Potentials of Native and Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes', *Stem Cells and Development*, 25(19), pp. 1397–1406. Available at: <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0073>.

238. Piccini, I. *et al.* (2015) 'Human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Genome-wide expression profiling of long-term in vitro maturation in comparison to human heart tissue', *Genomics Data*, 4, pp. 69–72. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.03.008>.
239. Pinto, A.R. *et al.* (2016) 'Revisiting Cardiac Cellular Composition', *Circulation research*, 118(3), pp. 400–409. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307778>.
240. Pollock, J.D. and Makaryus, A.N. (2021) *Physiology, Cardiac Cycle, StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459327/> (Accessed: 15 March 2022).
241. Pongratz, R.L. *et al.* (2007) 'Cytosolic and Mitochondrial Malic Enzyme Isoforms Differentially Control Insulin Secretion', *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), pp. 200–207. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M602954200>.
242. Porrello, E.R. *et al.* (2011) 'Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart', *Science*, 331(6020), pp. 1078–1080. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1200708>.
243. Portman, O., Behrman, R. and Soltys, P. (1969) 'Transfer of free fatty acids across the primate placenta', *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 216(1), pp. 143–147. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1969.216.1.143>.
244. Postic, C. *et al.* (1994) 'Development and regulation of glucose transporter and hexokinase expression in rat', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 266(4), pp. E548–E559. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1994.266.4.E548>.
245. Puente, B.N. *et al.* (2014) 'The Oxygen-Rich Postnatal Environment Induces Cardiomyocyte Cell-Cycle Arrest through DNA Damage Response', *Cell*, 157(3), pp. 565–579. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.032>.
246. Puigserver, P. *et al.* (1999) 'Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking', *Science (New York, N.Y.)*, 286(5443), pp. 1368–1371. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.286.5443.1368>.
247. Puigserver, P. *et al.* (2001) 'Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1', *Molecular Cell*, 8(5), pp. 971–982. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00390-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00390-2).
248. Qu, Q. *et al.* (2016) 'Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer', *Cell Death & Disease*, 7(5), pp. e2226–e2226. Available at: <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.132>.
249. Raho, S. *et al.* (2020) 'KRAS-regulated glutamine metabolism requires UCP2-mediated aspartate transport to support pancreatic cancer growth', *Nature Metabolism*, 2(12), pp. 1373–1381. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00315-1>.
250. Ricquier, D. (2017) 'UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective', *Biochimie*, 134, pp. 3–8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.10.018>.
251. Rindler, P.M. *et al.* (2016) 'Catalase-dependent H₂O₂ consumption by cardiac mitochondria and redox-mediated loss in insulin signaling', *American Journal of Physiology. Heart and*

- Circulatory Physiology*, 311(5), pp. H1091–H1096. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00066.2016>.
252. Ritterhoff, J. *et al.* (2020a) 'Metabolic Remodeling Promotes Cardiac Hypertrophy by Directing Glucose to Aspartate Biosynthesis', *Circulation research*, 126(2), pp. 182–196. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315483>.
253. Ritterhoff, J. *et al.* (2020b) 'Metabolic Remodeling Promotes Cardiac Hypertrophy by Directing Glucose to Aspartate Biosynthesis', *Circulation Research*, 126(2), pp. 182–196. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315483>.
254. Rodgers, J.T. *et al.* (2005) 'Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1', *Nature*, 434(7029), pp. 113–118. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature03354>.
255. Rosca, M.G. *et al.* (2012) 'Oxidation of Fatty Acids Is the Source of Increased Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Kidney Cortical Tubules in Early Diabetes', *Diabetes*, 61(8), pp. 2074–2083. Available at: <https://doi.org/10.2337/db11-1437>.
256. Rousset, S. *et al.* (2007) 'UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life', *FEBS letters*, 581(3), pp. 479–482. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.010>.
257. Rubattu, S. *et al.* (2017) 'Reduced brain UCP2 expression mediated by microRNA-503 contributes to increased stroke susceptibility in the high-salt fed stroke-prone spontaneously hypertensive rat', *Cell Death & Disease*, 8(6), p. e2891. Available at: <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.278>.
258. Rupprecht, A. *et al.* (2012) 'Quantification of Uncoupling Protein 2 Reveals Its Main Expression in Immune Cells and Selective Up-Regulation during T-Cell Proliferation', *PLOS ONE*, 7(8), p. e41406. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041406>.
259. Saitoh, M. *et al.* (1998) 'Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1', *The EMBO journal*, 17(9), pp. 2596–2606. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/17.9.2596>.
260. Sakamoto, T. *et al.* (2022) 'The nuclear receptor ERR cooperates with the cardiogenic factor GATA4 to orchestrate cardiomyocyte maturation', *Nature Communications*, 13(1), p. 1991. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29733-3>.
261. Sala, L. *et al.* (2018) 'MUSCLEMOTION: A Versatile Open Software Tool to Quantify Cardiomyocyte and Cardiac Muscle Contraction In Vitro and In Vivo', *Circulation Research*, 122(3), pp. e5–e16. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312067>.
262. Salameh, A. *et al.* (2010) 'Cyclic mechanical stretch induces cardiomyocyte orientation and polarization of the gap junction protein connexin43', *Circulation Research*, 106(10), pp. 1592–1602. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.214429>.
263. Samoylenko, A. *et al.* (2013) 'Nutritional Countermeasures Targeting Reactive Oxygen Species in Cancer: From Mechanisms to Biomarkers and Clinical Evidence', *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(17), pp. 2157–2196. Available at: <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4662>.

264. Sano, M. *et al.* (2007) 'Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha', *The Journal of Biological Chemistry*, 282(35), pp. 25970–25980. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M703634200>.
265. Santamans, A.M. *et al.* (2021) 'p38 γ and p38 δ regulate postnatal cardiac metabolism through glycogen synthase 1', *PLoS Biology*, 19(11), p. e3001447. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001447>.
266. Santos, J.H. (2021) 'Mitochondria signaling to the epigenome: A novel role for an old organelle', *Free Radical Biology and Medicine*, 170, pp. 59–69. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.016>.
267. Sarikhani, M. *et al.* (2020) 'Sustained Activation of AMPK Enhances Differentiation of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes via Sirtuin Activation', *Stem Cell Reports*, 15(2), pp. 498–514. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.06.012>.
268. Satin, J. *et al.* (2008) 'Calcium handling in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes', *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(8), pp. 1961–1972. Available at: <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0591>.
269. Seifert, E.L. *et al.* (2010) 'Electron Transport Chain-dependent and -independent Mechanisms of Mitochondrial H₂O₂ Emission during Long-chain Fatty Acid Oxidation', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(8), pp. 5748–5758. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.026203>.
270. Senyo, S.E. *et al.* (2013) 'Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes', *Nature*, 493(7432), pp. 433–436. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature11682>.
271. Shimazu, T. *et al.* (2013) 'Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor', *Science (New York, N.Y.)*, 339(6116), pp. 211–214. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1227166>.
272. Siedner, S. *et al.* (2003) 'Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart', *The Journal of Physiology*, 548(Pt 2), pp. 493–505. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.036509>.
273. Sies, H. and Jones, D.P. (2020) 'Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(7), pp. 363–383. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>.
274. Sim, C.B. *et al.* (2015) 'Dynamic changes in the cardiac methylome during postnatal development', *The FASEB Journal*, 29(4), pp. 1329–1343. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.14-264093>.
275. Smallwood, H.S. *et al.* (2007) 'Identification of a denitrase activity against calmodulin in activated macrophages using high-field liquid chromatography–FTICR mass spectrometry', *Biochemistry*, 46(37), pp. 10498–10505. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi7009713>.
276. Son, Y. *et al.* (2013) 'Chapter Two - Reactive Oxygen Species in the Activation of MAP Kinases', in E. Cadenas and L. Packer (eds) *Methods in Enzymology*. Academic Press (Hydrogen Peroxide and Cell Signaling, Part C), pp. 27–48. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405881-1.00002-1>.

277. Soonpaa, M.H. and Field, L.J. (1998) 'Survey of Studies Examining Mammalian Cardiomyocyte DNA Synthesis', *Circulation Research*, 83(1), pp. 15–26. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.RES.83.1.15>.
278. Sreedhar, A. *et al.* (2017) 'UCP2 overexpression enhanced glycolysis via activation of PFKFB2 during skin cell transformation', *Oncotarget*, 8(56), pp. 95504–95515. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20762>.
279. Sreedhar, A. *et al.* (2019) 'UCP2 Overexpression Redirects Glucose into Anabolic Metabolic Pathways', *Proteomics*, 19(4), p. e1800353. Available at: <https://doi.org/10.1002/pmic.201800353>.
280. Stieber, J. *et al.* (2003) 'The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), pp. 15235–15240. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2434235100>.
281. St-Pierre, J. *et al.* (2003) 'Bioenergetic Analysis of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Coactivators 1 α and 1 β (PGC-1 α and PGC-1 β) in Muscle Cells*', *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), pp. 26597–26603. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M301850200>.
282. Sturzu, A.C. *et al.* (2015) 'Fetal Mammalian Heart Generates a Robust Compensatory Response to Cell Loss', *Circulation*, 132(2), pp. 109–121. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011490>.
283. Sullivan, L.B. *et al.* (2015) 'Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells', *Cell*, 162(3), pp. 552–563. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.017>.
284. Sun, L.-L. *et al.* (2011) 'MicroRNA-15a positively regulates insulin synthesis by inhibiting uncoupling protein-2 expression', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 91(1), pp. 94–100. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2010.11.006>.
285. Szczepanowska, K. and Trifunovic, A. (2021) 'Mitochondrial matrix proteases: quality control and beyond', *The FEBS journal* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1111/febs.15964>.
286. Taegtmeyer, H., Sen, S. and Vela, D. (2010) 'Return to the fetal gene program', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1188(1), pp. 191–198. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05100.x>.
287. Tan, C.M.J. and Lewandowski, A.J. (2020) 'The Transitional Heart: From Early Embryonic and Fetal Development to Neonatal Life', *Fetal Diagnosis and Therapy*, 47(5), pp. 373–386. Available at: <https://doi.org/10.1159/000501906>.
288. Tang, J.X. *et al.* (2020) 'Mitochondrial OXPHOS Biogenesis: Co-Regulation of Protein Synthesis, Import, and Assembly Pathways', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), p. 3820. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21113820>.
289. Templeton, D.J. *et al.* (2010) 'Purification of reversibly oxidized proteins (PROP) reveals a redox switch controlling p38 MAP kinase activity', *PloS One*, 5(11), p. e15012. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015012>.

290. Tordjman, K. *et al.* (2002) 'PPARalpha suppresses insulin secretion and induces UCP2 in insulinoma cells', *Journal of Lipid Research*, 43(6), pp. 936–943.
291. Trausch-Azar, J.S. *et al.* (2015) 'Isoform-specific SCF(Fbw7) ubiquitination mediates differential regulation of PGC-1 α ', *Journal of Cellular Physiology*, 230(4), pp. 842–852. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.24812>.
292. Trempolec, N., Dave-Coll, N. and Nebreda, A.R. (2013) 'SnapShot: p38 MAPK substrates', *Cell*, 152(4), pp. 924-924.e1. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.047>.
293. Van Hall, G. (2000) 'Lactate as a fuel for mitochondrial respiration', *Acta Physiologica Scandinavica*, 168(4), pp. 643–656. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2000.00716.x>.
294. van der Velden, J. and Stienen, G.J.M. (2019) 'Cardiac Disorders and Pathophysiology of Sarcomeric Proteins', *Physiological Reviews*, 99(1), pp. 381–426. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2017>.
295. Vidal-Puig, A. *et al.* (1997) 'UCP3: An Uncoupling Protein Homologue Expressed Preferentially and Abundantly in Skeletal Muscle and Brown Adipose Tissue', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235(1), pp. 79–82. Available at: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6740>.
296. Vinhas, M. *et al.* (2013) 'Transthoracic echocardiography reference values in juvenile and adult 129/Sv mice', *Cardiovascular Ultrasound*, 11(1), p. 12. Available at: <https://doi.org/10.1186/1476-7120-11-12>.
297. Vliegen, H.W. *et al.* (1995) 'Polyploidy of myocyte nuclei in pressure overloaded human hearts: a flow cytometric study in left and right ventricular myocardium', *The American Journal of Cardiovascular Pathology*, 5(1), pp. 27–31.
298. Vozza, A. *et al.* (2014) 'UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3), pp. 960–965. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1317400111>.
299. Vreeker, A. *et al.* (2014) 'Assembly of the Cardiac Intercalated Disk during Pre- and Postnatal Development of the Human Heart', *PLoS ONE*, 9(4), p. e94722. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094722>.
300. Wai, T. *et al.* (2015) 'Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice', *Science (New York, N.Y.)*, 350(6265), p. aad0116. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aad0116>.
301. Wang, C. and Hu, S.M. (1991) 'Developmental regulation in the expression of rat heart glucose transporters', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 177(3), pp. 1095–1100. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)90651-m](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)90651-m).
302. Wang, Y. *et al.* (2018) 'Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling', *The Journal of Cell Biology*, 217(6), pp. 1915–1928. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>.

303. Watanabe, K. *et al.* (2021) 'Critical role of glutamine metabolism in cardiomyocytes under oxidative stress', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 534, pp. 687–693. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.018>.
304. Wei, W., Peng, J. and Shen, T. (2019) 'Rosuvastatin Alleviates Ischemia/Reperfusion Injury in Cardiomyocytes by Downregulating Hsa-miR-24-3p to Target Upregulated Uncoupling Protein 2', *Cellular Reprogramming*, 21(2), pp. 99–107. Available at: <https://doi.org/10.1089/cell.2018.0039>.
305. Werner, C., Doenst, T. and Schwarzer, M. (2016) 'Chapter 4 - Metabolic Pathways and Cycles', in M. Schwarzer and T. Doenst (eds) *The Scientist's Guide to Cardiac Metabolism*. Boston: Academic Press, pp. 39–55. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802394-5.00004-2>.
306. Williams, G.S.B., Boyman, L. and Lederer, W.J. (2015) 'Mitochondrial Calcium and the Regulation of Metabolism in the Heart', *Journal of molecular and cellular cardiology*, 78, pp. 35–45. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.10.019>.
307. Winterbourn, C.C. (2013) 'Chapter One - The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide', in E. Cadenas and L. Packer (eds) *Methods in Enzymology*. Academic Press (Hydrogen Peroxide and Cell Signaling, Part C), pp. 3–25. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405881-1.00001-X>.
308. Winterbourn, C.C. (2018) 'Biological Production, Detection, and Fate of Hydrogen Peroxide', *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(6), pp. 541–551. Available at: <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7425>.
309. Witteles, R.M. and Fowler, M.B. (2008) 'Insulin-Resistant Cardiomyopathy: Clinical Evidence, Mechanisms, and Treatment Options', *Journal of the American College of Cardiology*, 51(2), pp. 93–102. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.10.021>.
310. Wu, H., Ye, M., Liu, D., Yang, Jian, Ding, J.-W., *et al.* (2019) 'UCP2 protect the heart from myocardial ischemia/reperfusion injury via induction of mitochondrial autophagy', *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(9), pp. 15455–15466. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcb.28812>.
311. Wu, H., Ye, M., Liu, D., Yang, Jian, Ding, J., *et al.* (2019) 'UCP2 protect the heart from myocardial ischemia/reperfusion injury via induction of mitochondrial autophagy', *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(9), pp. 15455–15466. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcb.28812>.
312. Xia, J. and Wishart, D.S. (2011) 'Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst', *Nature Protocols*, 6(6), pp. 743–760. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.319>.
313. Xiao, M. *et al.* (2012) 'Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors', *Genes & Development*, 26(12), pp. 1326–1338. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.191056.112>.
314. Xin, M. *et al.* (2013) 'Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(34), pp. 13839–13844. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1313192110>.
315. Yang, C. *et al.* (2014) 'Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport', *Molecular cell*, 56(3), pp. 414–424. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.025>.

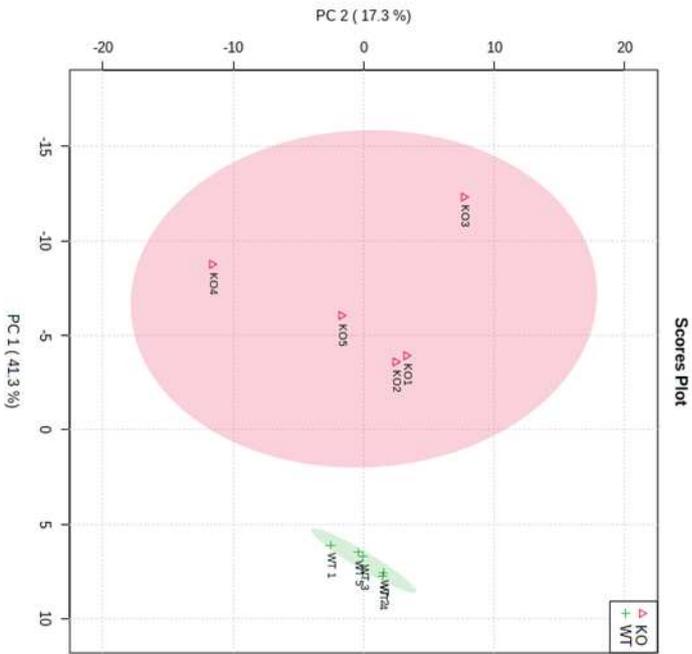
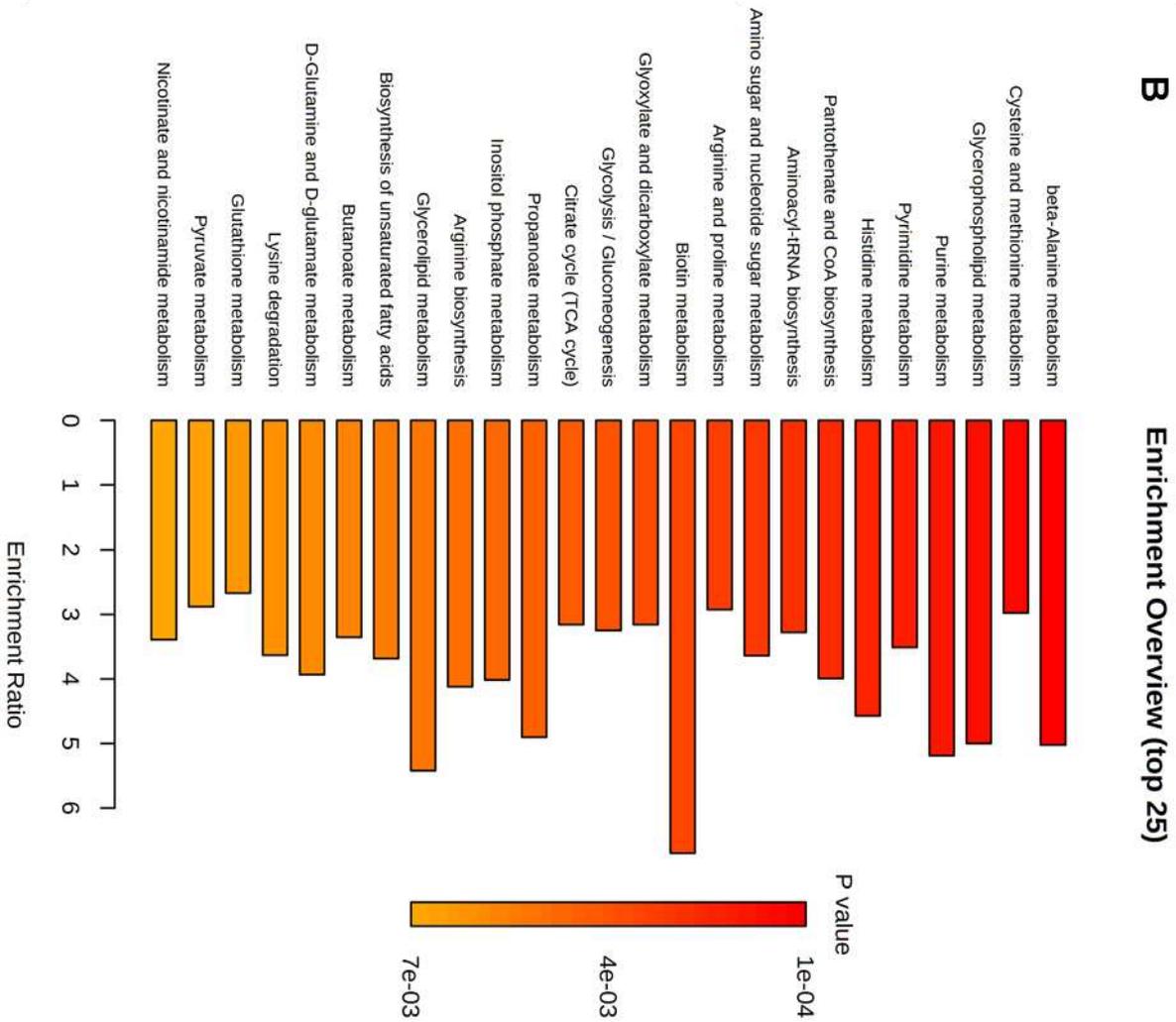
316. Yang, X. *et al.* (2019) 'Fatty Acids Enhance the Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells', *Stem Cell Reports*, 13(4), pp. 657–668. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.08.013>.
317. Yao, C.-H. *et al.* (2019) 'Mitochondrial fusion supports increased oxidative phosphorylation during cell proliferation', *eLife*, 8, p. e41351. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.41351>.
318. Yatscoff, M.A. *et al.* (2008) 'Myocardial hypertrophy and the maturation of fatty acid oxidation in the newborn human heart', *Pediatric Research*, 64(6), pp. 643–647. Available at: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318184d281>.
319. Ye, L. *et al.* (2021) 'Activation of AMPK Promotes Maturation of Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, p. 644667. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.644667>.
320. Yogeewari, P., Sriram, D. and Vaigundaragavendran, J. (2005) 'The GABA shunt: an attractive and potential therapeutic target in the treatment of epileptic disorders', *Current Drug Metabolism*, 6(2), pp. 127–139. Available at: <https://doi.org/10.2174/1389200053586073>.
321. Yokota, T. *et al.* (2020) 'p38 Mitogen-activated protein kinase regulates chamber-specific perinatal growth in heart', *Journal of Clinical Investigation*, 130(10), pp. 5287–5301. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI135859>.
322. Youle, R.J. and van der Blik, A.M. (2012) 'Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress', *Science (New York, N.Y.)*, 337(6098), pp. 1062–1065. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1219855>.
323. Young, M.J. and Copeland, W.C. (2016) 'Human mitochondrial DNA replication machinery and disease', *Current Opinion in Genetics & Development*, 38, pp. 52–62. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.03.005>.
324. Yuan, X. *et al.* (2017) 'Disruption of spatiotemporal hypoxic signaling causes congenital heart disease in mice', *The Journal of Clinical Investigation*, 127(6), pp. 2235–2248. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI88725>.
325. Zhang, C.-Y. *et al.* (2006) 'Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced β cell dysfunction in isolated pancreatic islets', *Cell Metabolism*, 3(6), pp. 417–427. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.04.010>.
326. Zhang, J. *et al.* (2011) 'UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells', *The EMBO Journal*, 30(24), pp. 4860–4873. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.401>.
327. Zhang, L. *et al.* (2019) 'Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation', *Redox Biology*, 26, p. 101284. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101284>.
328. Zhang, W. *et al.* (2018) 'Epigenetic Modifications in Cardiovascular Aging and Diseases', *Circulation Research*, 123(7), pp. 773–786. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312497>.
329. Zhang, Y. *et al.* (2010) 'Foxp1 coordinates cardiomyocyte proliferation through both cell-autonomous and nonautonomous mechanisms', *Genes & Development*, 24(16), pp. 1746–1757. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1929210>.

330. Zhihao, L. *et al.* (2020) 'SERCA2a: a key protein in the Ca²⁺ cycle of the heart failure', *Heart Failure Reviews*, 25(3), pp. 523–535. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10741-019-09873-3>.
331. Zhou, Y. *et al.* (2017) 'UCP2 attenuates apoptosis of tubular epithelial cells in renal ischemia-reperfusion injury', *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 313(4), pp. F926–F937. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00118.2017>.
332. Zhu, W. *et al.* (2018) 'Regenerative Potential of Neonatal Porcine Hearts', *Circulation*, 138(24), pp. 2809–2816. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034886>.
333. Zick, M., Rabl, R. and Reichert, A.S. (2009) 'Cristae formation—linking ultrastructure and function of mitochondria', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(1), pp. 5–19. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.06.013>.

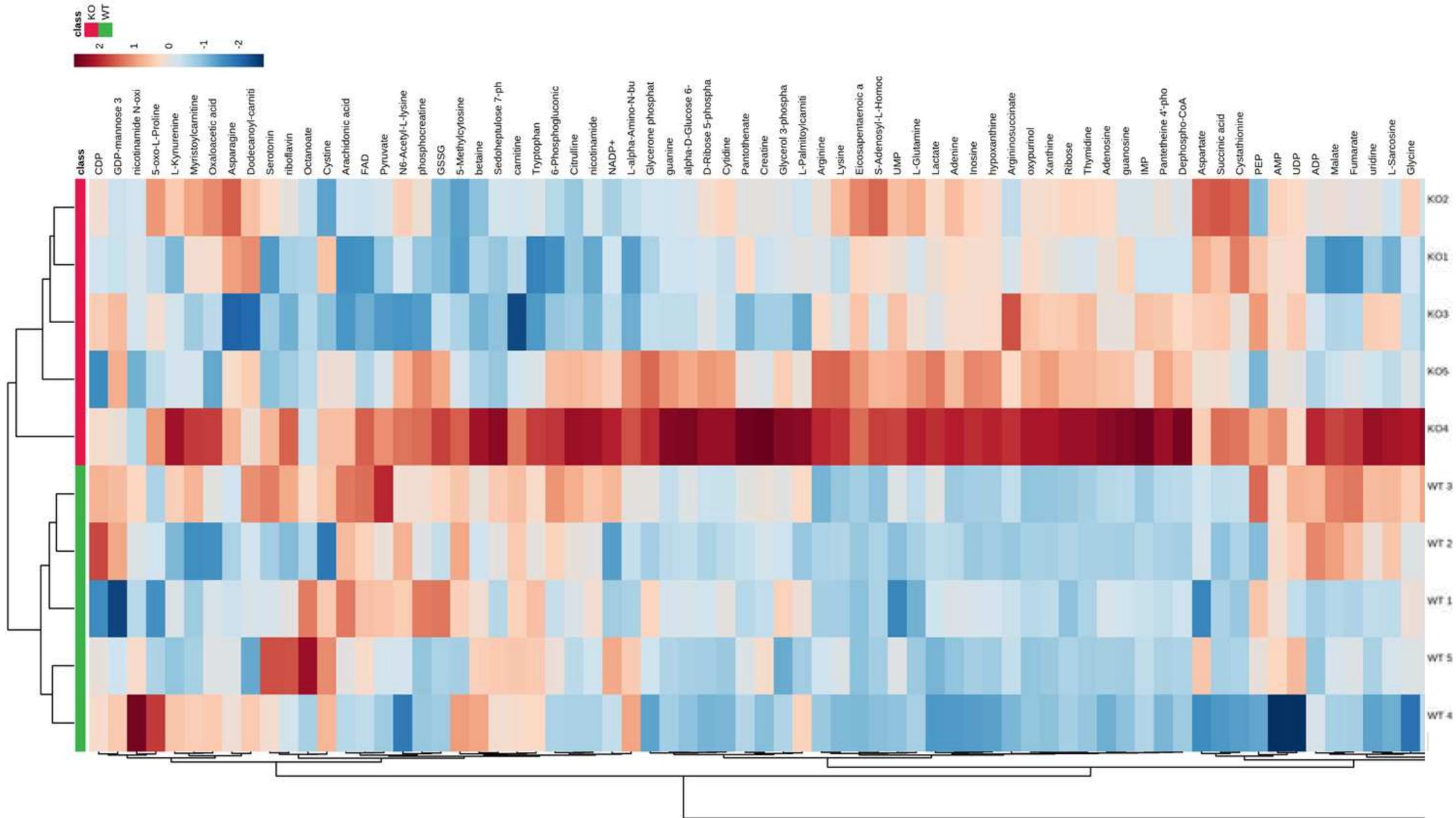
Annexes

Species	Reactivity	Lifetime	Diffusion distance	Preferred Target
Free-Radical:				
Nitric oxide (NO [•])	+	~1s	10 m	Metals
Superoxide radical anion (O ₂ ^{•-})	++	~50 ms	320 nm	Fe-S cluster, NO [•]
Hydroxyl radical (OH [•])	+++++	~10 ⁻⁹ s	4.5 nm	Any macromolecules
Carbonate radical anion (CO ₃ ^{•-})	++++	~10 ⁻⁶ s	152 nm	Tyr, Trp, thiols, guanine
Nitrogen dioxide (NO ₂ [•])	+++	NA	188 nm	Thiols, Tyr
Alkoxy radical (RO [•])	++++	NA	NA	Organic compounds
Peroxy radical (ROO [•])	+++	NA	NA	Organic compounds
Non-radicals:				
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	++	~1 ms	1.5 mm	Thiols, metals
Peroxynitrite (ONOO ⁻ /ONOOH)	++++	~15μs	50 μm	CO ₂ , Cys, Trp, Met, metals
Hypochlorous acid (HOCl)	++++	NA	NA	Amino, thiols
Singlet oxygen (¹ O ₂)	++	~45μs	60–268 nm	Guanine, unsaturated lipids, amino acids

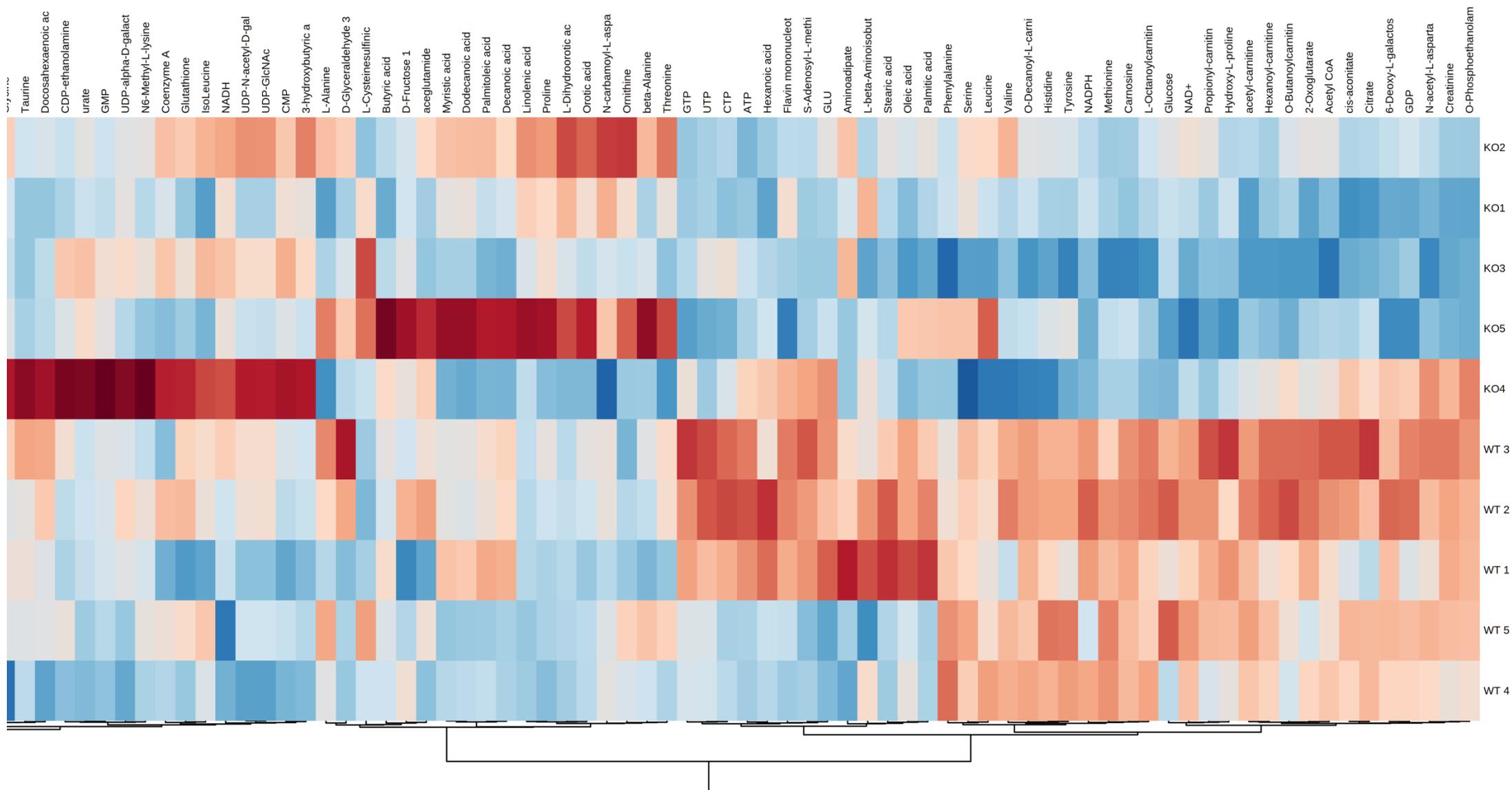
Annexe 1. Table des différents espèces réactives de l'oxygène et leurs caractéristiques chimiques. Le tableau décrit les caractéristiques chimiques des principaux ROS (réactivité, durée de vie, distance de diffusion, cibles). La réactivité des radicaux libres et des espèces non-radicalaires est définie en fonction du potentiel de réduction d'un électron (E₀) à pH=7, ou de la vitesse de réaction avec le glutathion (GSH), et son niveau relatif est indiqué « + » et « ++ » (faible), « +++ » (moyen), et ≥ « ++++ » (élevé). La durée de vie est égale au log2 divisé par la somme des produits de la constante de vitesse et des concentrations pour toutes les molécules avec lesquelles les différents ROS réagissent. La distance de diffusion est calculée à l'aide de la formule $x = (6Dt)^{1/2}$ (x, D, t représentent respectivement la distance de diffusion, les coefficients de diffusion et la durée de vie). Abréviations : Cys, cystéine ; Fe-S, sulfure de fer (II) ; Met, méthionine ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; Tyr, tyrosine ; Trp, tryptophane ; NA, inconnu. Les électrons non appariés sont indiqués par un point en exposant précédant le symbole de charge. *Tiré de Zhang 2019.*

A**B**

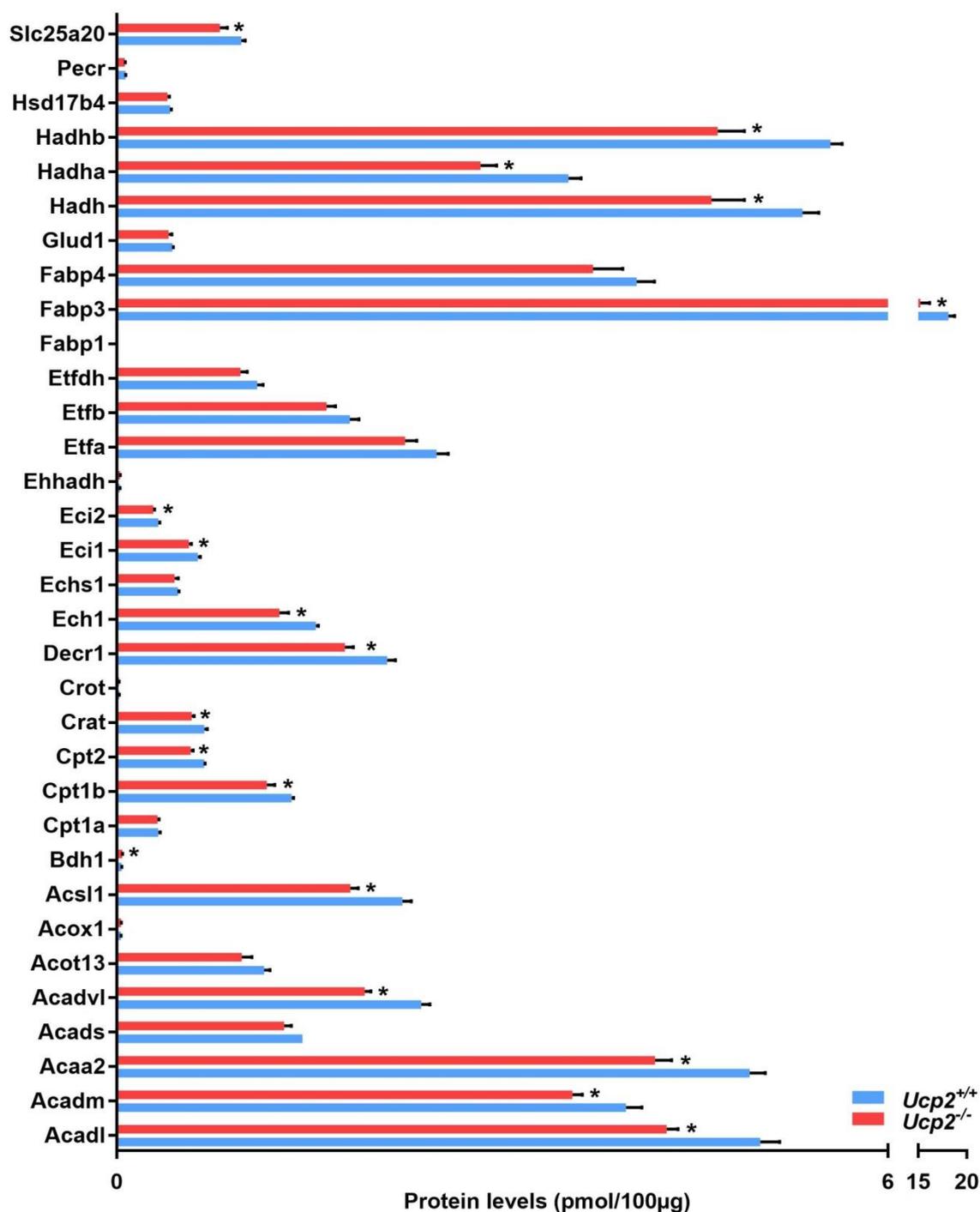
Annexe 2. Données supplémentaires de métabolomique. (A) Analyse en composante principale des différents réplicats biologiques utilisés. Les deux génotypes forment 2 clusters distincts. **(B)** Analyse des voies métaboliques dérégulées dans les ventricules cardiaques *Ucp2*^{-/-}.



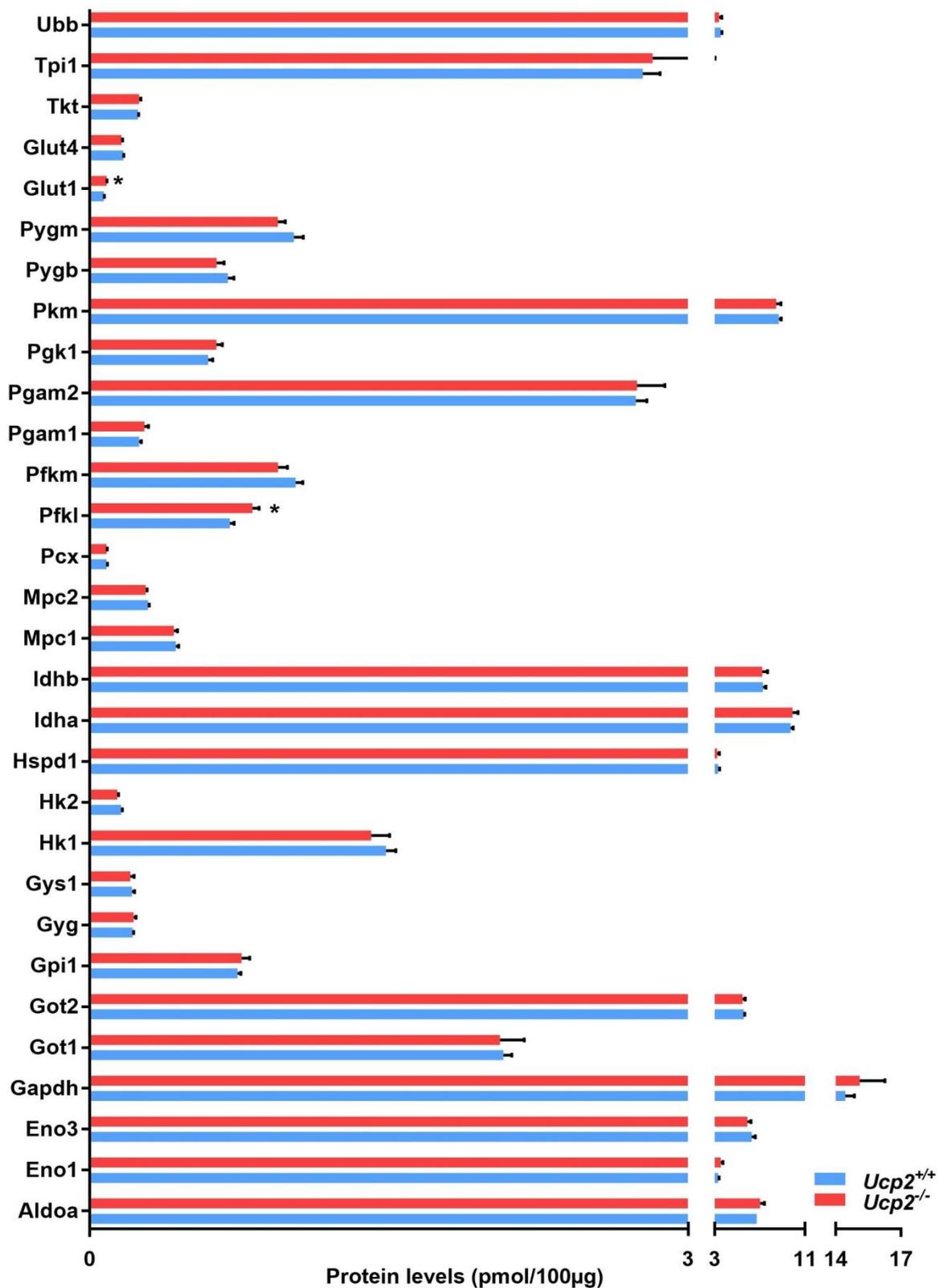
Annexe 3. Données supplémentaires de métabolomique (2). Heat map des 143 métabolites analysés dans les ventricules cardiaques P3 contrôles et mutants par LC-MS (partie 1).



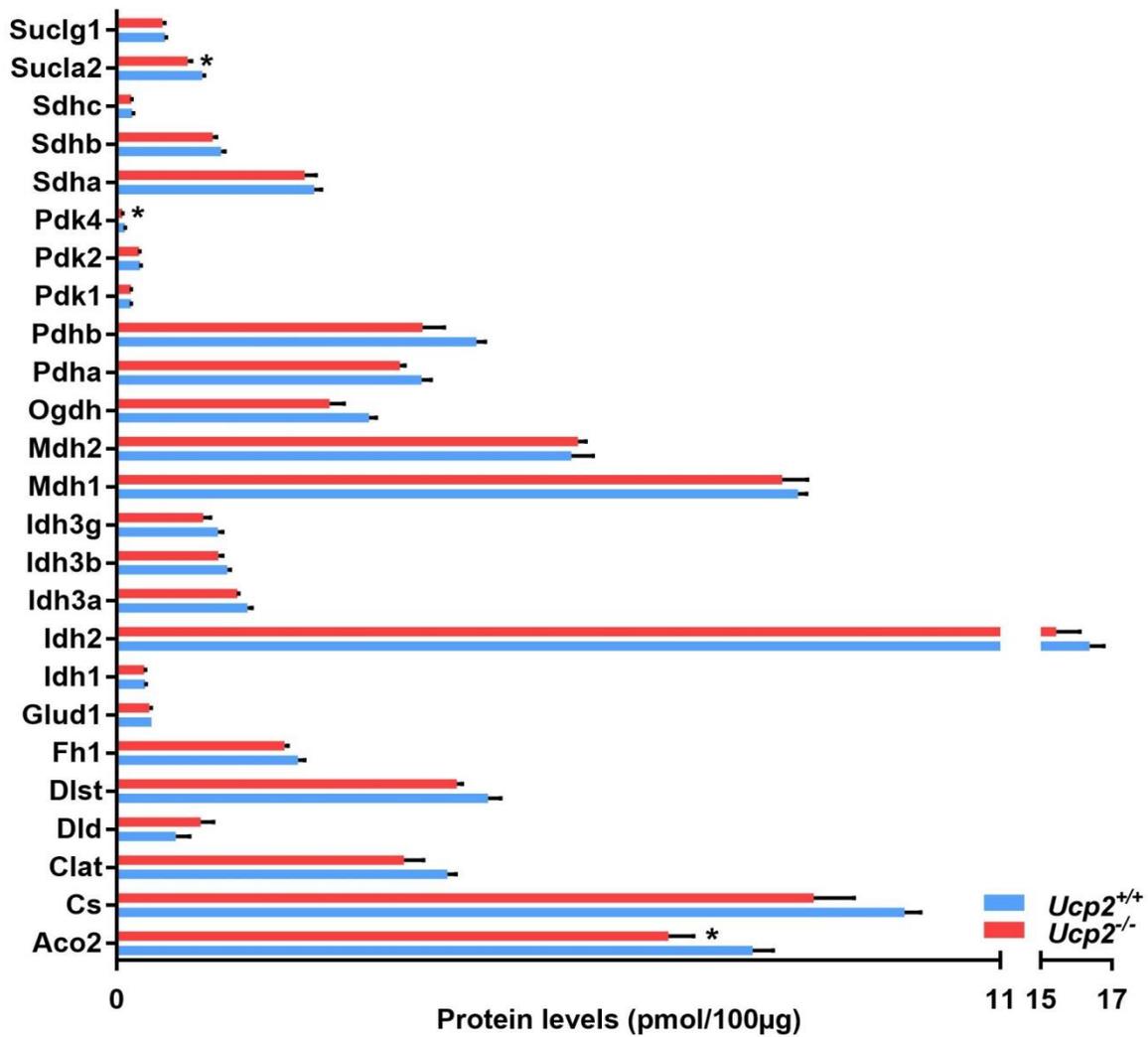
Annexe 4. Données supplémentaires de métabolomique (3). Heat map des 143 métabolites analysés dans les ventricules cardiaques P3 contrôles et mutants par LC-MS (partie 2).



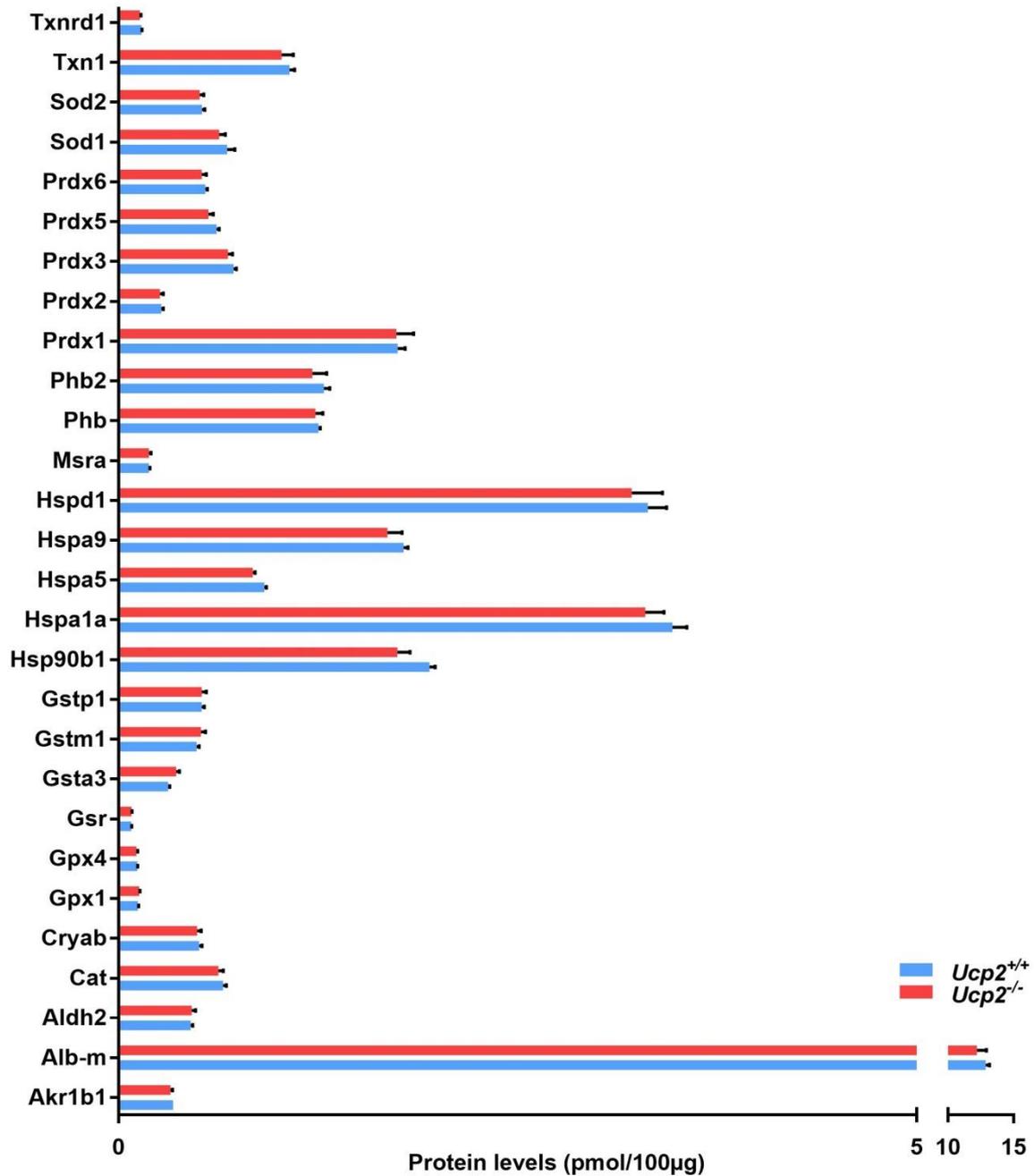
Annexe 5. Analyse quantitative par spectrométrie de masse des niveaux d'expression protéiques de différentes enzymes et transporteurs impliqués dans la prise en charge des acides gras et la β -oxydation dans des ventricules cardiaques contrôles et mutants à P3. Les données sont représentées en tant que moyenne +/- SEM. * = p-value < 0.05, Student t-test.



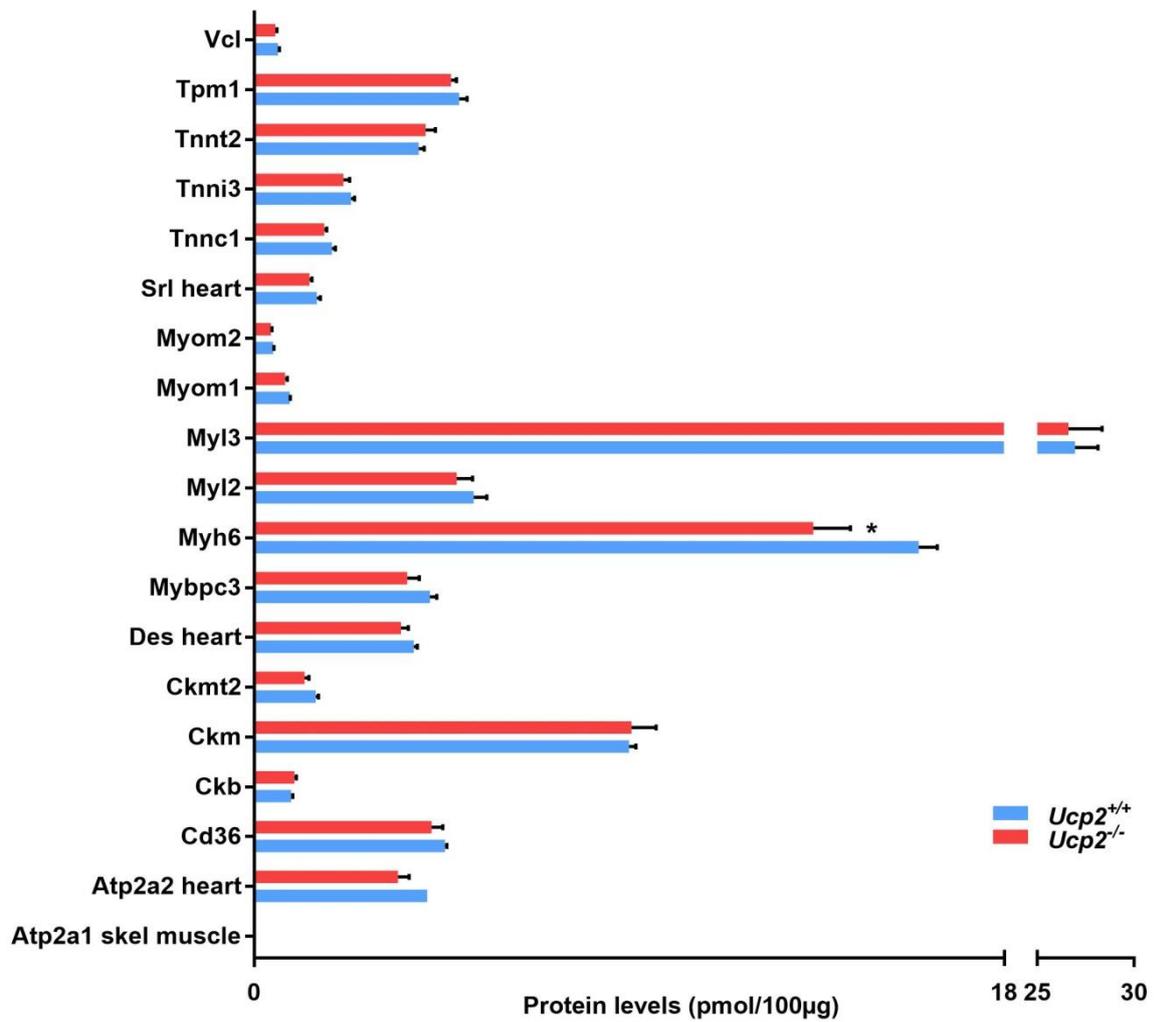
Annexe 6. Analyse quantitative par spectrométrie de masse des niveaux d'expression protéiques de différentes enzymes et transporteurs impliqués dans le transport du glucose, la néoglucogénèse et la glycolyse dans des ventricules cardiaques contrôles et mutants à P3. Les données sont représentées en tant que moyenne +/- SEM. * = p-value < 0.05, Student t-test.



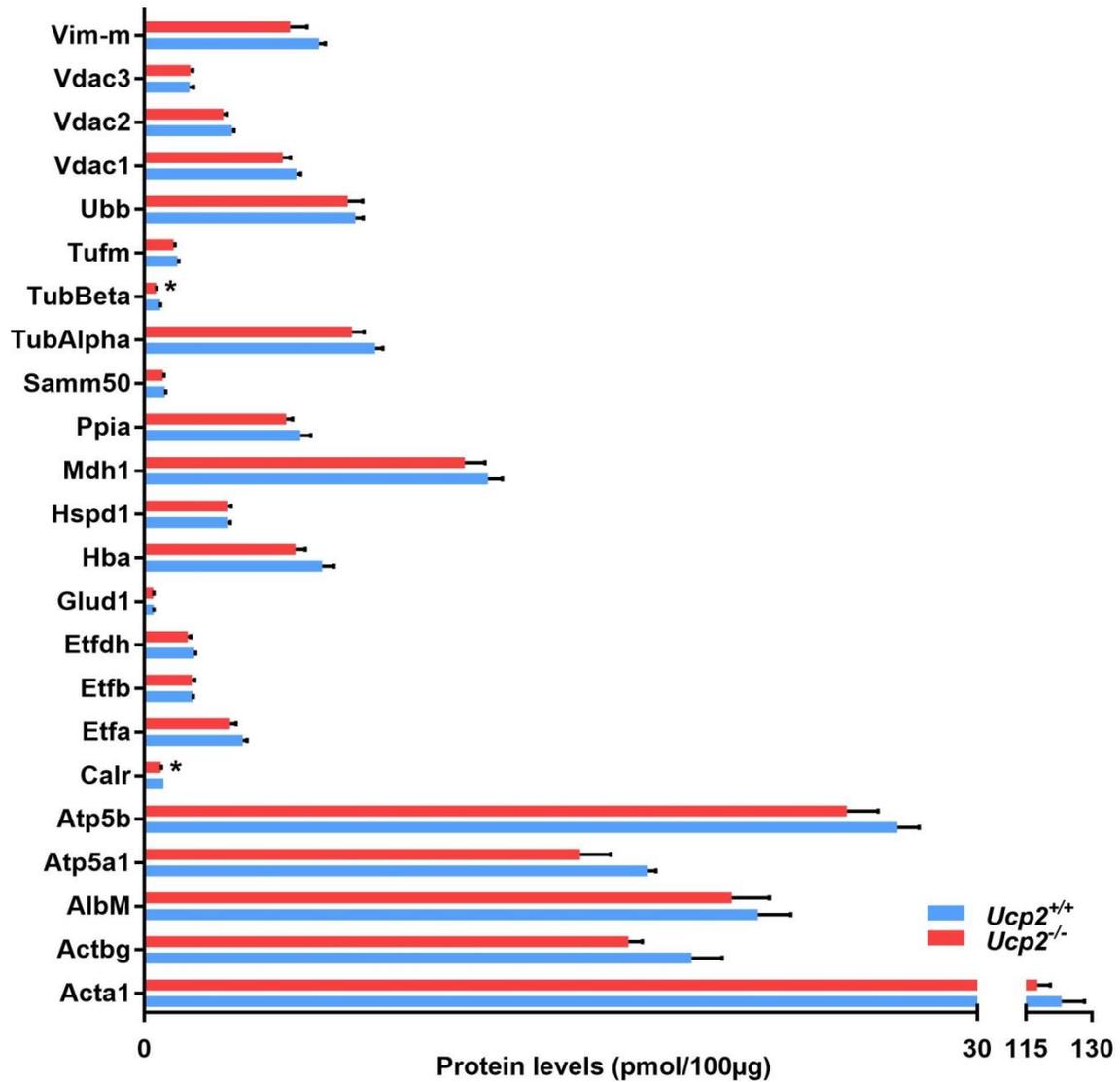
Annexe 7. Analyse quantitative par spectrométrie de masse des niveaux d'expression protéiques de différentes enzymes impliquées dans le cycle de Krebs. Les données sont représentées en tant que moyenne +/- SEM. * = p-value < 0.05, Student t-test.



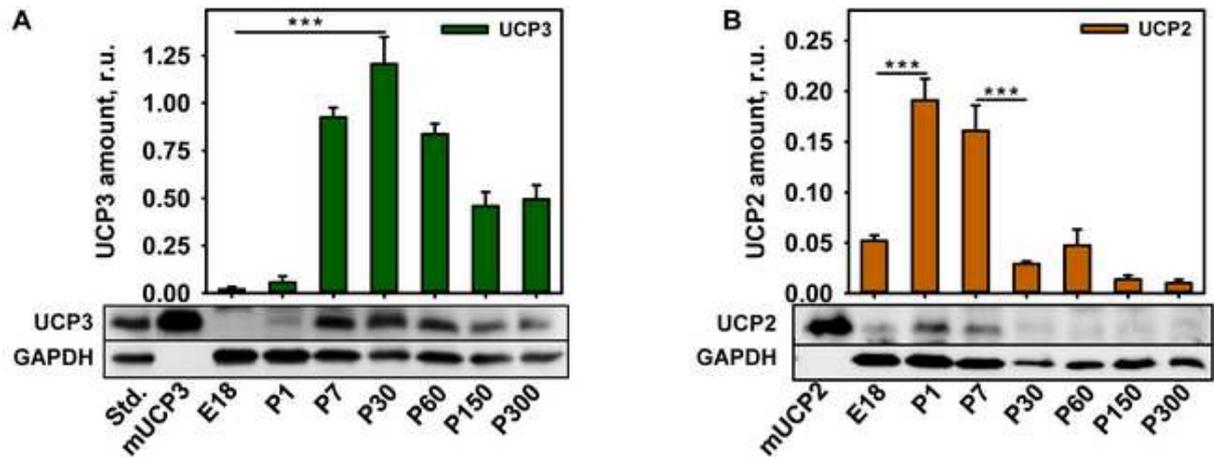
Annexe 8. Analyse quantitative par spectrométrie de masse des niveaux d'expression protéiques de différentes enzymes et protéines impliquées dans les systèmes anti-oxydants dans des ventricules cardiaques contrôles et mutants à P3. . Les données sont représentées en tant que moyenne +/- SEM. * = p-value < 0.05, Student t-test.



Annexe 9. Analyse quantitative par spectrométrie de masse des niveaux d'expression protéiques de différents marqueurs cardiaques dans des ventricules cardiaques contrôles et mutants à P3. Les données sont représentées en tant que moyenne +/- SEM. * = p-value < 0.05, Student t-test.



Annexe 10. Analyse quantitative par spectrométrie de masse des niveaux d'expression protéiques de différents marqueurs « de ménage » dans des ventricules cardiaques contrôles et mutants à P3. Les données sont représentées en tant que moyenne +/- SEM. * = p-value < 0.05, Student t-test.



Annexe 11. Profil d'expression protéique d'Ucp2 et Ucp3 dans des cœurs à différents stades. La spécificité des anticorps anti-Ucp2 et anti-Ucp3 ont été vérifiées dans (Rupprecht *et al.*, 2012) et (Hilse *et al.*, 2016) respectivement. Les données sont tirées de (Hilse *et al.*, 2018) et sont présentées en tant que moyennes +/- SEM. *** = p-value < 0.001

Publication – Egr1 loss-of-function promotes beige adipocytes differentiation and activation specifically in inguinal subcutaneous white adipose tissue

Parallèlement à mes travaux de thèse, j'ai pu participer à la finalisation d'un projet et figurer sur une publication au travers d'une collaboration avec le laboratoire de Delphine Duprez.

I. Introduction

Le tissu adipeux blanc (WAT) a pour fonction de stocker les substrats en excès dans de larges vacuoles lipidiques des adipocytes blanc et de sécréter des hormones spécifiques, comme la leptine (Lep). Le tissu adipeux brun (BAT) est quant à lui responsable de la thermogénèse, notamment grâce à l'expression élevée de la protéine découplante mitochondriale *Ucp1* qui est spécialisée dans la dissipation de l'énergie accumulée sous forme de gradient de protons. En cas d'exposition de longue durée au froid, les adipocytes blancs peuvent se transdifférencier en adipocytes beiges (brunissement), qui sont fonctionnellement et transcriptionnellement proches des adipocytes bruns. *Egr1* réprime la transcription de gènes comme *Ucp1* ou *Cebpb20*, impliqués dans le brunissement, en se fixant sur leurs promoteurs. Ainsi, la délétion d'*Egr1* entraîne le brunissement spontané des adipocytes blancs qui confère une protection contre l'obésité induite par un régime riche en graisse.

II. Résultats

A l'aide de souris *Egr1*^{-/-}, nous nous sommes intéressés aux caractéristiques physiologiques du tissu adipeux blanc sujet au brunissement spontané. Nous avons pu déterminer que, parmi les différents types de WAT, seul le WAT sous cutané inguinal (SC-WAT) montre une élévation de l'expression d'*Ucp1* en absence d'*Egr1*. Cette expression spécifique au SC-WAT

Egr1^{-/-} s'accompagne d'une répression de l'expression de *Lep* et résulte en une augmentation de la respiration mitochondriale et du nombre de copies d'ADN mitochondrial par cellule. Ces résultats démontrent que le brunissement spontané du SC-WAT en absence d'*Egr1* s'accompagne d'une signature transcriptionnelle et d'un métabolisme oxydatif similaire à celui du BAT.

Pour mieux saisir l'importance d'*Egr1* dans la régulation du destin cellulaire des adipocytes, nous avons soumis des cellules souches adipeuses (mASCs) provenant de SC-WAT *Egr1*^{-/-} et contrôles à des différenciations adipogéniques blanches ou beiges en culture. En absence d'*Egr1*, la différenciation adipogénique blanche des mASCs est altérée : à l'issue des 12 jours de différenciation, le nombre de cellules montrant la présence de large vacuoles lipidiques et l'expression de *Lep* caractéristique des adipocytes blancs sont significativement réduits. A l'inverse, la différenciation adipogénique beige induit un plus grand nombre de mASCs dans le destin d'adipocyte beige marquée notamment par l'expression élevée d'*Ucp1* en comparaison des contrôles. Ceci démontre que la répression du brunissement par *Egr1* est nécessaire à la différenciation normale des mASCs en adipocytes blancs.

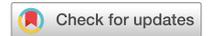
Pour confirmer ces résultats, nous avons effectué des manipulations de gain de fonction d'*Egr1* dans des cellules mésenchymateuses C3H10T1/2. La stimulation adipogénique blanche est plus efficace lorsqu'*Egr1* est surexprimé. En revanche, la stimulation adipogénique beige est altérée, et seule une faible proportion des cellules C3H10T1/2 surexprimant *Egr1* parviennent à se différencier en adipocyte beige et à exprimer les marqueurs associés, comme *Ucp1*. Dans leur ensemble, ces résultats démontrent qu'*Egr1*, en réprimant le brunissement, est suffisant pour promouvoir la différenciation en adipocyte blanc.

III. Discussion

Nous avons prouvé qu'*Egr1*, en réprimant le brunissement, est critique dans la différenciation et le maintien des adipocytes blanc. De plus, *in vivo*, son activité d'inhibition du brunissement et de maintien des adipocytes blancs est limitée au SC-WAT. Cette restriction de l'effet d'*Egr1* au SC-WAT pourrait s'expliquer par la présence dans ce tissu de co-régulateurs spécifiques. En effet, l'activité de répression ou d'activation transcriptionnelle

d'Egr1 dépend des partenaires avec lesquels il interagit. Il est possible que les co-régulateurs d'Egr1 soient spécifiquement exprimés dans le SC-WAT, lui permettant ainsi de réprimer le programme de brunissement dans ce tissu. Par ailleurs, sans détecter une surexpression d'*Ucp1* ou d'autres marqueurs du brunissement, nous avons observé une réduction de l'expression de *Lep* dans le tissu adipeux blanc mésentérique (MAT). Cela suggère l'existence de co-régulateurs d'Egr1 ayant des gènes cibles différents et des profils d'expression variés selon les différents types de WAT. L'identification de ces co-régulateurs à l'aide de la comparaison des différents partenaires d'Egr1 par co-immunoprécipitation dans le SC-WAT et le MAT permettrait d'éclaircir le mécanisme induisant cette spécificité, et de mieux comprendre la répression du brunissement spécifique au SC-WAT.

De plus, bien que les différents tissus adipeux des souris *Egr1*^{-/-} montrent la même masse, les animaux présentent une diminution de leur masse corporelle et une résistance à l'obésité induite par un régime riche en graisse. Nos données suggèrent que cette perte de masse corporelle est due à l'activité métabolique des adipocytes beiges, dont l'activité oxydative et la déperdition d'énergie associée à l'expression d'*Ucp1* explique la résistance à l'obésité. *Egr1* est d'ailleurs surexprimée chez les individus obèses, et, à la lumière de nos résultats, apparaît comme une cible thérapeutique intéressante dans la lutte contre l'obésité.



OPEN

Egr1 loss-of-function promotes beige adipocyte differentiation and activation specifically in inguinal subcutaneous white adipose tissue

Marianne Bléher^{1,5}, Berbang Meshko^{1,5}, Isabelle Cacciapuoti⁴, Rachel Gergondey^{1,3}, Yoann Kovacs^{1,3}, Delphine Duprez^{1,2}, Aurore L'Honoré^{1,3,6} & Emmanuelle Havis^{1,2,6}✉

In mice, exercise, cold exposure and fasting lead to the differentiation of inducible-brown adipocytes, called beige adipocytes, within white adipose tissue and have beneficial effects on fat burning and metabolism, through heat production. This browning process is associated with an increased expression of the key thermogenic mitochondrial uncoupling protein 1, *Ucp1*. *Egr1* transcription factor has been described as a regulator of white and beige differentiation programs, and *Egr1* depletion is associated with a spontaneous increase of subcutaneous white adipose tissue browning, in absence of external stimulation. Here, we demonstrate that *Egr1* mutant mice exhibit a restrained *Ucp1* expression specifically increased in subcutaneous fat, resulting in a metabolic shift to a more brown-like, oxidative metabolism, which was not observed in other fat depots. In addition, *Egr1* is necessary and sufficient to promote white and alter beige adipocyte differentiation of mouse stem cells. These results suggest that modulation of *Egr1* expression could represent a promising therapeutic strategy to increase energy expenditure and to restrain obesity-associated metabolic disorders.

White adipose tissue (WAT) plays a crucial role in energetic homeostasis regulation through the storage of excess energy in the large central vacuole of white adipocytes¹. WAT also performs metabolic functions and secretes several hormones such as Resistin (*Retn*)¹⁻³ and Leptin (*Lep*) which regulates body weight, lipid and glucose metabolism⁴⁻⁶. WAT is located in diverse sites throughout the body, such as the subcutaneous inguinal (SC-WAT), perigonadal (GAT), mesenteric (MAT) and perirenal (PAT) depots^{7,8}. While these depots are collectively named white adipose tissue, they have different developmental origins: SC-WAT, GAT and MAT derive from lateral plate mesoderm in female mice whereas PAT derive from the somitic mesoderm⁸. These different origins could contribute to differences in the physiology of fat depots.

In contrast, brown adipose tissue (BAT) has a critical thermogenic function thanks to its property to dissipate excess energy through heat production⁹. BAT depots are derived from the somitic mesoderm⁸ and are located in the inter-scapular region in mice and in both neck and supraclavicular regions in humans⁹. Brown adipocytes are smaller than white adipocytes. They exhibit multiple small lipid vacuoles and large number of mitochondria involved in heat production through the constitutive activation of the thermogenic uncoupling protein 1 (*Ucp1*)¹⁰⁻¹².

A third type of adipocyte, called beige adipocyte, has been described within WAT^{9,13}. Morphological and transcriptomic analyses show that brown and beige adipocytes are remarkably similar and express the same thermogenic markers, including *Ucp1*¹⁴. In mice, beige adipocytes differentiation occurs in response to long

¹Sorbonne Université, 75005 Paris, France. ²Institute of Biology Paris Seine-Developmental Biology Laboratory, Inserm U1156, French National Centre for Scientific Research (CNRS) UMR7622, 75005 Paris, France. ³Institute of Biology Paris Seine-Integrative Cellular Ageing and Inflammation, French National Centre for Scientific Research (CNRS) UMR8256, 75005 Paris, France. ⁴Inovation, Paris, France. ⁵These authors contributed equally: Marianne Bléher and Berbang Meshko. ⁶These authors jointly supervised this work: Aurore L'Honoré and Emmanuelle Havis. ✉email: emmanuelle.havis@sorbonne-universite.fr

term cold exposition, fasting or exercise through a process referred to as browning^{9,15}. White, beige and brown adipocytes have been shown to differentiate in vitro from adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells (ASC) isolated from lipoaspirates^{16–19}. In this context, we previously demonstrated that mice lacking *Egr1* expression exhibit spontaneous browning of the inguinal subcutaneous white adipose tissue without external stimulation²⁰. *Egr1* is a multi-faceted transcription factor involved in the development and homeostasis of several organs^{20–23}. Increased *Egr1* expression has been linked to obesity in both humans and murine models^{22,23}. In contrast, *Egr1* knock-out mice display an increased energy expenditure and are protected from high fat diet-induced obesity and obesity-associated pathologies^{23,24}. The browning of *Egr1*^{-/-} mice is associated with up-regulation of beige adipocyte gene expression such as *Ucp1*, *Cebpb*, *Cidea* and *Cox8b*, together with a decreased expression of the white adipocyte marker *Lep*. *Egr1* transcription factor can alternatively acts as a repressor or an activator depending of its interacting partners²¹. In this context, we previously showed that in SC-WAT, both *Ucp1* and *Cebpb* expressions are repressed by *Egr1* through direct binding to their promoters²⁰. Loss of *Egr1* can therefore spontaneously induce SC-WAT browning through the release of this repression and the consequent activation of beige differentiation by *Ucp1* and *Cebpb*²⁰. In this study, we get further to first analyze the consequences of *Egr1* knock-out on *Ucp1* expression in all adipose tissue depots. Then, we tested whether *Ucp1* up-regulation in WAT comes with a shift to a BAT-like oxidative metabolism. Interestingly, we observed that *Ucp1* up-regulation in mutant *Egr1*^{-/-} adipose tissue was restricted to subcutaneous inguinal SC-WAT and associated with an increased oxygen consumption rate in this fat pad. To further characterize the role of *Egr1* in SC-WAT browning, adipose stem cells (mASC) were isolated from control *Egr1*^{+/+} and mutant *Egr1*^{-/-} SC-WAT and compared for their ability to differentiate into white or beige adipocytes in vitro. We observed that *Egr1* was necessary to promote white adipocyte differentiation and repress beige differentiation of mASC. *Egr1* gain-of-function experiments performed in C3H10T1/2 mesenchymal stem cells confirmed the positive role of *Egr1* on white adipocyte differentiation and its negative role on beige differentiation. Collectively, our results indicate that *Egr1* favors white adipocyte differentiation and represses SC-WAT browning. *Egr1* may thus become a promising target to combat obesity.

Results and discussion

***Egr1*^{-/-} mice display spontaneous increase of *Ucp1* expression specifically in SC-WAT.** *Egr1* loss-of-function in postnatal and 4-month-old mice leads to a reduced body weight despite similar weight of SC-WAT fat pads in control *Egr1*^{+/+} and mutant *Egr1*^{-/-} mice²⁰. Significant body weight reduction was confirmed in 8-month-old *Egr1*^{-/-} mice (Fig. 1A). In addition, all isolated white subcutaneous (SC-WAT), gonadic (GAT), mesenteric (MAT) and perirenal (PAT) and brown (BAT) fat pads display similar percentage of body weight in control *Egr1*^{+/+} and mutant *Egr1*^{-/-} mice (Fig. 1B, C). These observations indicate that lower body weight observed in mutant *Egr1*^{-/-} mice is not due to a reduced adipose tissue mass, and suggest that *Egr1* loss-of-function reduces body weight through unknown global metabolic processes. *Egr1* loss-of-function has been shown to induce spontaneous browning of SC-WAT, associated with increased *Ucp1* expression, without external stimulation²⁰. Here, we quantified the expression of *Egr1*, *Cebpb*, *Pparg*, *Ucp1*, *Lep* and *Dcun1d3* in five different adipose tissue depots from control *Egr1*^{+/+} and *Egr1*^{-/-} mice. As expected, *Egr1* was nearly undetectable in mutant *Egr1*^{-/-} fat pads (Fig. 2A, Supplementary Figs. 1 and 2A–C). A significant increase of *Cebpb* and *Ucp1* expression was observed in mutant *Egr1*^{-/-} SC-WAT compared to control, associated with a decrease of *Lep* expression (Fig. 2A). In contrast, *Cebpb*, *Ucp1* and *Lep* expression were not altered in the other 4 fat pads in mutant versus control (Supplementary Fig. 1 and 2A–C) except in MAT in which *Lep* expression was lower in mutants. These observations are consistent with previous results showing the absence of spontaneous browning in BAT and GAT from *Egr1*-deleted mice²³. Our results indicate that *Egr1* deficiency induces a browning phenotype restricted to SC-WAT, and suggest that *Egr1* is required to repress SC-WAT browning in standard housing conditions. SC-WAT browning in mutant *Egr1*^{-/-} mice is characterized by an increased number of beige adipocytes at the expense of white adipocytes²⁰. Taken together, our results suggest that *Egr1* represses *Cebpb*, *Ucp1* and activates *Lep* expression in SC-WAT, which is in accordance with previous results showing recruitment of *Egr1* to their promoters^{20,25}. Decreased *Lep* expression in MAT depot in *Egr1*-null mice (MAT, Supplementary Fig. 2B) suggests that *Egr1* can activate *Lep* independently of the browning phenotype. At last, as previously observed, *Pparg* expression was not affected by *Egr1* loss-of-function in SC-WAT²⁰ neither in the 4 other fat pads (Fig. 2A, Supplementary Figs. 1 and 2A–C).

Dcun1d3 has been shown upregulated in mutant *Egr1*^{-/-} SC-WAT²⁰. *Dcun1d3* is expressed in adipocytes within adipose tissue (Fig. 2B), however its role has not been elucidated yet. While *Dcun1d3* was present in all adipose depots in controls (Fig. 2A, Supplementary Fig. 1 and 2A–C), its expression was specifically upregulated in *Egr1*-deficient SC-WAT (Fig. 2A, Fig. 2A, Supplementary Figs. 1 and 2A–C). This suggests that *Dcun1d3* may be related to SC-WAT browning in mutant *Egr1*^{-/-} mice.

Taken together, these results indicate that *Egr1* loss-of-function increases *Cebpb*, *Ucp1* and *Dcun1d3* expression and decreases *Lep* expression in SC-WAT, resulting in spontaneous browning in this specific adipose tissue depot. One hypothesis could be that *Egr1* interacts with specific co-regulators in fat pads, leading to the regulation of different genetic programs in each depot. The co-factors allowing *Egr1* to regulate the browning program might be specifically expressed in SC-WAT.

***Egr1* loss-of-function induces a metabolic shift in white adipose tissue, leading to a BAT-like oxidative metabolism.** We then investigated whether the brown transcriptomic signature observed in mutant *Egr1*^{-/-} SC-WAT was correlated with metabolic modifications. While control *Egr1*^{+/+} SC-WAT is characterized by a low mitochondrial mass, marked by a low mitochondrial/nuclear DNA ratio, we observed an increased mitochondrial mass in mutant SC-WAT (Fig. 3A), with a ratio being much similar to that of BAT. Such increase is specific to this tissue and was not observed in any other tested fat tissues (Supplementary Fig. 3).

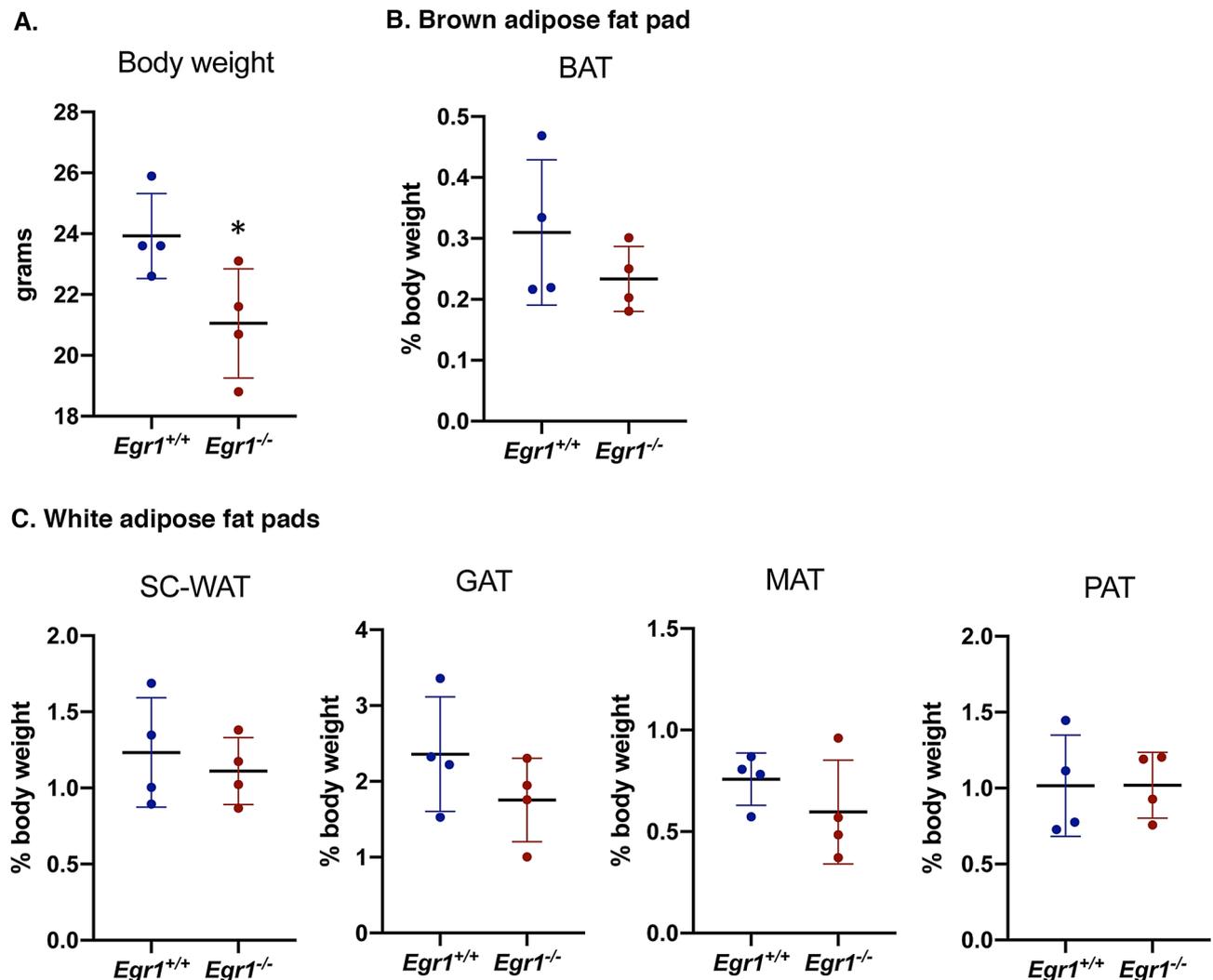


Figure 1. *Egr1* loss-of-function does not affect fat pad percentage of body weight. (A) Whole body, (B) Brown adipose tissue (BAT), (C) Inguinal sub-cutaneous adipose tissue (SC-WAT), gonadal adipose tissue (GAT), mesenteric adipose tissue (MAT) and perirenal adipose tissue (PAT) of 8-month-old *Egr1*^{+/+} and *Egr1*^{-/-} female mice were weighted. Fat pad weights were represented as a percentage of body weight. Experiments were performed with $n = 4$ for each genotype. Error bars represent the mean \pm standard deviations. The p values were obtained using the Student t test, with $*p < 0.05$.

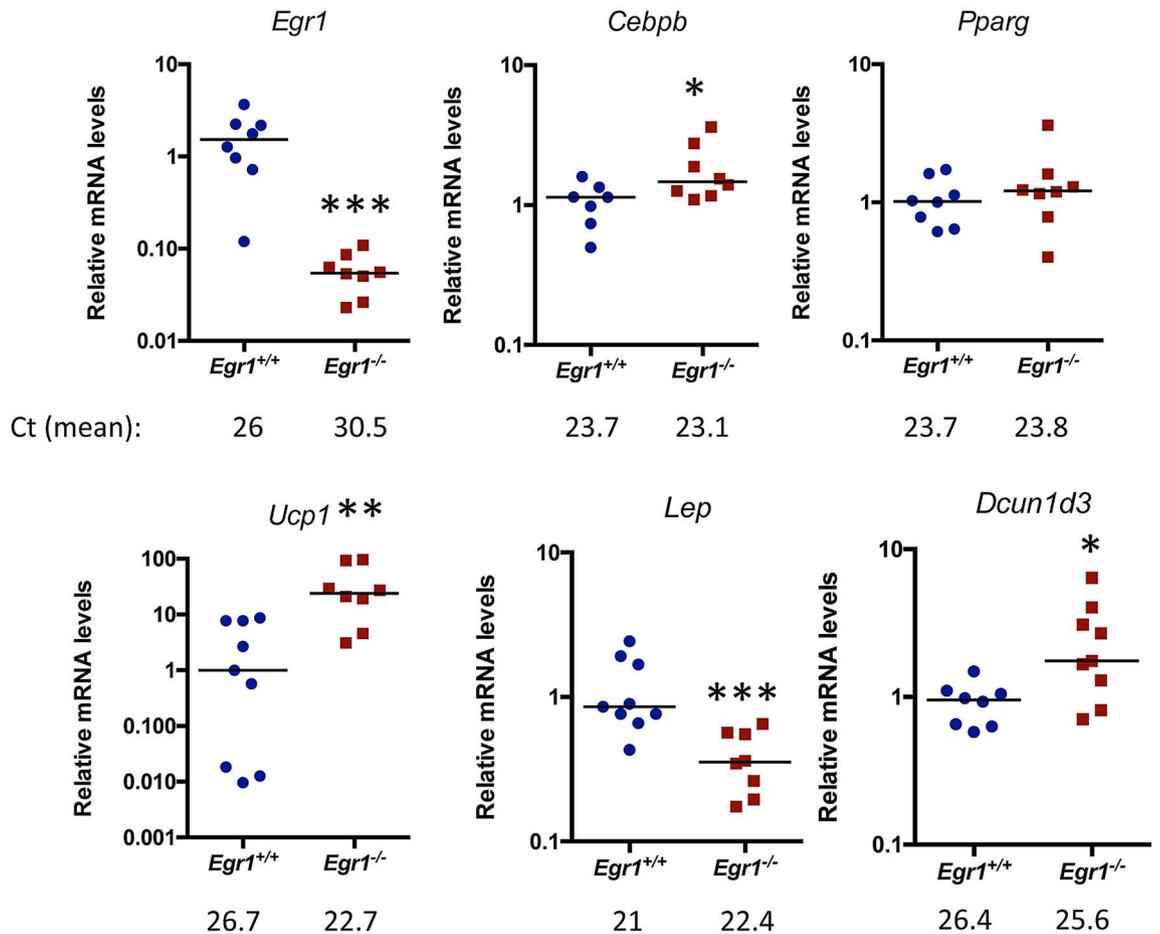
To examine whether this increased mitochondrial mass has functional metabolic consequences, we assessed oxygen consumption rate (OCR) of BAT, SC-WAT and GAT freshly dissected from control and mutant mice. Using Seahorse XFe24 analyzer, we showed that while *Egr1* loss-of-function does not affect GAT (Supplementary Fig. 3B, C) or BAT OCR (Fig. 3B, C, D), it leads to an increase of all markers of oxidative capacity, including basal and maximal OCR, ATP-linked OCR and non-mitochondrial OCR. Importantly, all rates quantified in mutant *Egr1*^{-/-} SC-WAT were close to that obtained with BAT, demonstrating a metabolic shift of *Egr1*^{-/-} SC-WAT towards a BAT-like oxidative metabolism. As expected, this increase of oxidative capacity does not lead to altered ROS production, as indicated by similar carbonylation protein levels (Supplementary Fig. 3D), thus demonstrating that the browning process observed in *Egr1* mutant occurs in physiological conditions.

Our previous study has revealed a spontaneous browning of the SC-WAT in *Egr1* mutant, with *Ucp1* expression being up-regulated in absence of external stimulation²⁰. We now show that this browning also exerts at physiological level with consequences on metabolic and bio-energetic activity of SC-WAT. Our results reveal a shift of *Egr1*^{-/-} SC-WAT towards a BAT-like oxidative metabolism and are correlated with previous studies establishing a link between increased *Egr1* expression and obesity^{22,23}. They suggest a central role of *Egr1* in regulation of SC-WAT homeostasis in the adult.

***Egr1* is necessary to promote white and to repress beige adipocyte differentiation of mouse adipose stem cells.**

To further analyze the role of *Egr1* in spontaneous browning of SC-WAT in mutants, we tested whether *Egr1* loss-of-function can alter the differentiation of SC-WAT-derived mouse adipose stem

A.



B.

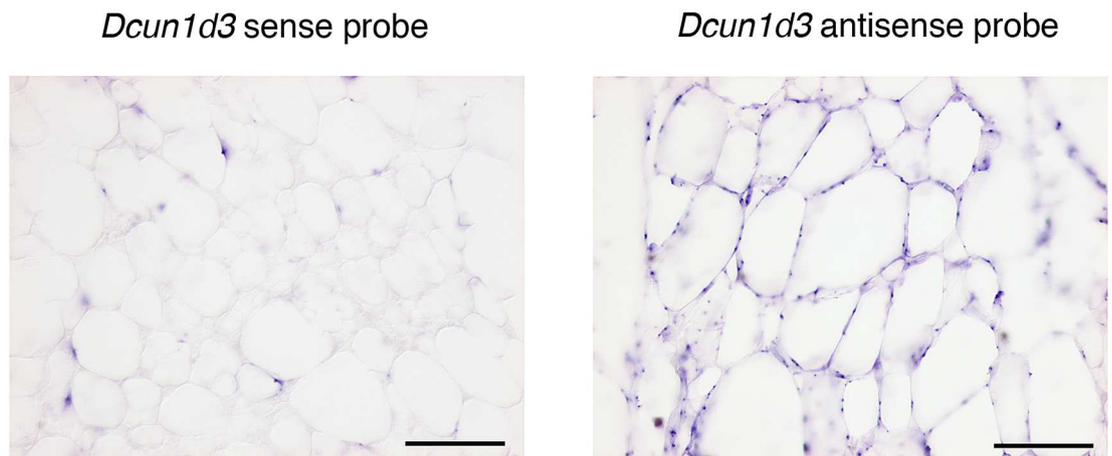


Figure 2. *Egr1* loss-of-function increases *Ucp1* expression in SC-WAT. (A) SC-WAT of 8-month-old *Egr1*^{+/+} and *Egr1*^{-/-} mice were used for RNA purification. RNA samples were analysed by RT-qPCR for *Egr1*, *Cebpb*, *Pparg*, *Ucp1*, *Lep* and *Dcun1d3* expression. Experiments were performed with $n = 8$ animals for each genotype. Transcripts are shown relative to the level of *Rp18S* transcripts, with control *Egr1*^{+/+} being normalized to 1. The relative mRNA levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The p values were obtained using the Mann-Whitney test, with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (B) SC-WAT from wild-type mice was longitudinally cryosectioned. 8 μm sections were hybridized with the DIG-labeled sense and antisense probes for *Dcun1d3*. Scale bars: 100 μm .

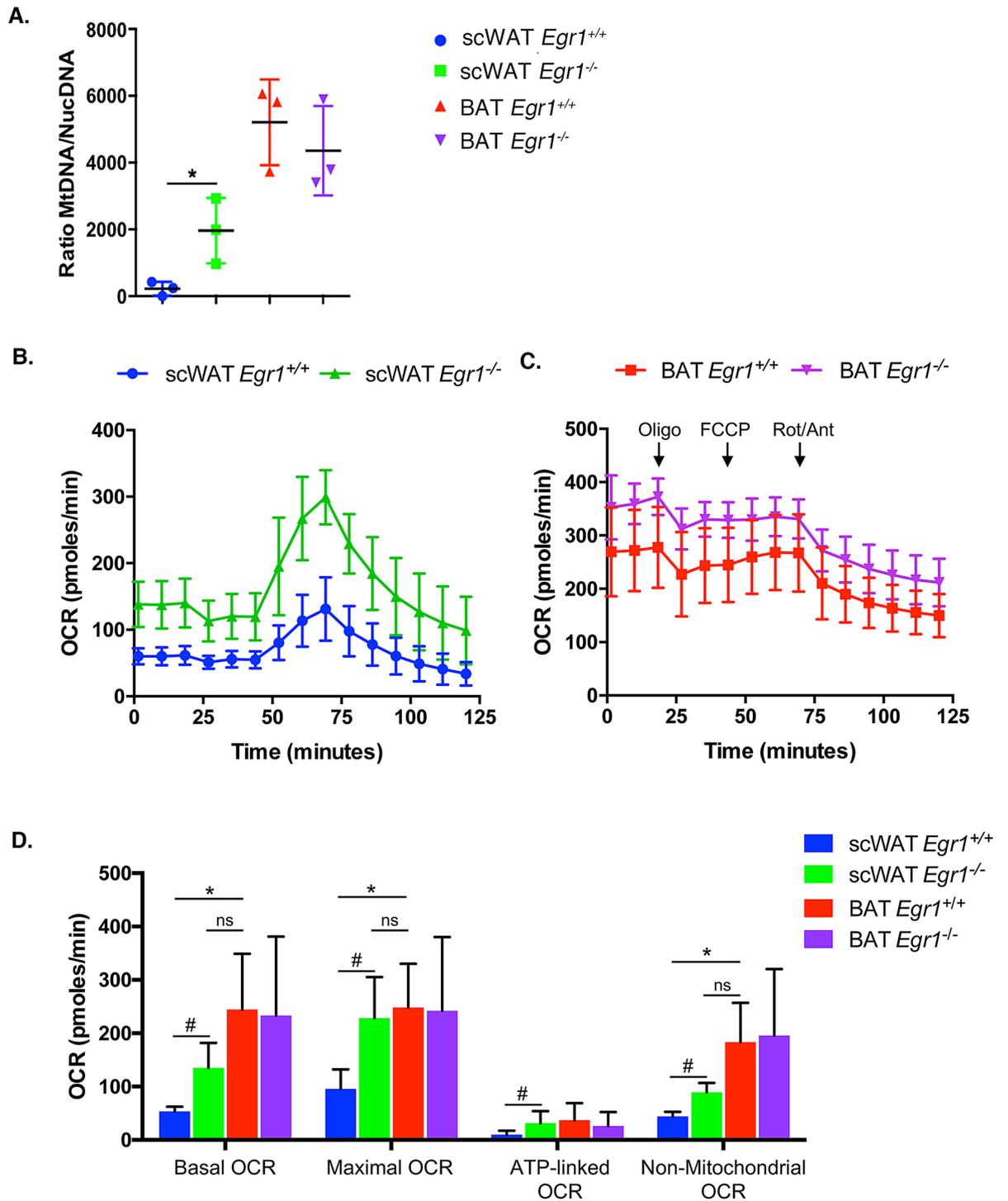
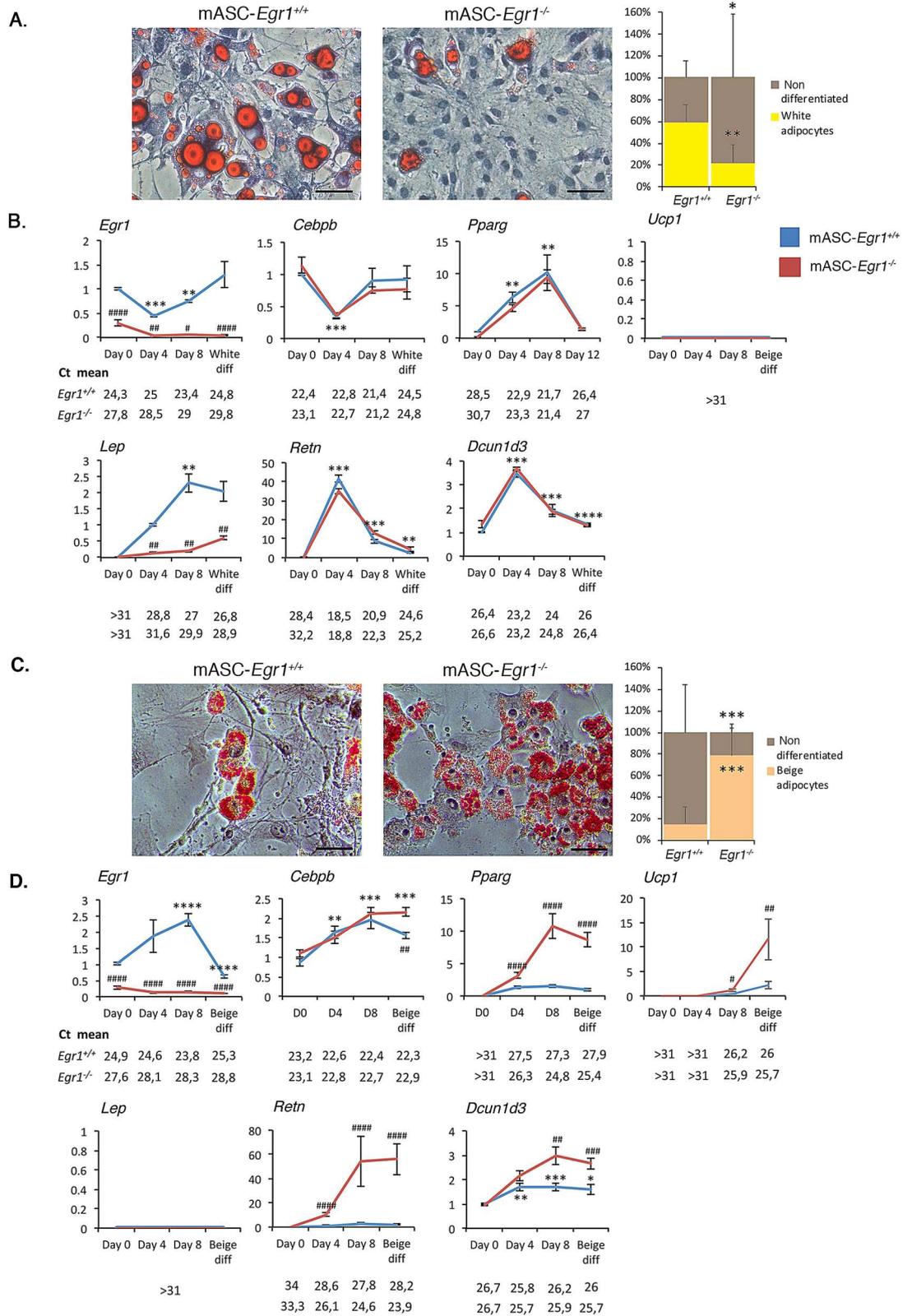


Figure 3. *Egr1* loss-of-function induces a metabolic shift in white adipose tissue, leading to a BAT-like oxidative metabolism. (A) WAT and BAT of 8-month-old control *Egr1*^{+/+} and mutant *Egr1*^{-/-} female mice were dissected and used for DNA purification. Mitochondrial (*Cyt B*) and nuclear (*Ndufv1*) genes were quantified by qPCR and histogram represents their ratio. Error bars represent the means + standard deviations with $n = 3$ animals for each genotype, $*p < 0.05$. (B, C) Mitochondrial respiration measured by oxygen consumption rate (OCR) in basal conditions and after sequential addition of Oligomycin, FCCP, and a mix of Rotenone/Antimycin were simultaneously recorded on SC-WAT (B) and BAT (C) tissues, freshly dissected from 8-month-old control *Egr1*^{+/+} and mutant *Egr1*^{-/-} female mice. (D) Histogram represents the basal OCR (determined as the difference between OCR before oligomycin and OCR after rotenone/antimycin A), maximal OCR (difference between OCR after FCCP and OCR after rotenone/antimycin A), ATP-linked OCR (difference between OCR before and after oligomycin), and the non-mitochondrial OCR (OCR after rotenone and antimycin A treatment) calculated from data obtained in A. Error bars represent the means + standard deviations with $n = 3$ animals for each genotype, $*p < 0.05$.



◀Figure 4. *Egr1* is necessary to promote white adipocyte differentiation and prevent beige differentiation of mouse adipose stem/stromal cells. (A–F) Control mASC-*Egr1*^{+/+} and mutant mASC-*Egr1*^{-/-} were subjected to white (A,C,D) or beige (B,E,F) differentiation for 12 or 10 days, respectively. (A, C) Non-differentiated and white (A, right panel) or beige (C, left panel) adipocytes were stained with Oil Red O and Hematoxylin after white (A, left panel) or beige (C, left panel) differentiation and counted (A and C, right panels). For each genotype, results are expressed as a percentage of cells differentiated or not, counted from 7 pictures at Days 0 and 8 after full differentiation. Scale bars, 50 μ m. Error bars show means + standard deviations, with * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The p values were obtained using the Mann–Whitney test. (B, D) After 0, 4, 8 and 12 days of culture in white (B) or beige (D) differentiation medium, cells were used for RNA purification. RNA samples were analysed by RT-qPCR analysis for *Egr1*, *Dcun1d3*, *Ucp1*, *Lep* and *Retn* expression in control mASC-*Egr1*^{+/+} and mutant mASC-*Egr1*^{-/-} cells. Transcripts are shown relative to the level of *Rplp0* and *18S* transcripts. The relative mRNA levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, with control being normalized to 1. For cells subjected to white differentiation, experiments were performed with $n \geq 5$ independent cultures for each genotype ($n = 12$ at Day0, $n = 6$ at Day4, $n = 5$ at Day8 and $n = 10$ at Day12 for control mASC-*Egr1*^{+/+} cells; $n = 11$ at Day0, $n = 6$ at Day4, $n = 6$ at Day8 and $n = 12$ at Day12 for mutant mASC-*Egr1*^{-/-} cells). For cells subjected to beige differentiation, experiments were performed with $n = 16$ independent cultures for each timepoint and genotype. Error bars represent the mean + standard deviations. The p values were obtained using the Mann–Whitney test. Asterisks * indicate the p values of gene expression levels in mASC-*Egr1*^{+/+} and mASC-*Egr1*^{-/-} compared to the first day of gene detection * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; # indicate the p values of gene expression levels in mASC-*Egr1*^{+/+} versus mASC-*Egr1*^{-/-}, for each time point, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$.

cells (mASC) into white and beige adipocytes. mASC were isolated from inguinal SC-WAT of control *Egr1*^{+/+} and mutant *Egr1*^{-/-} mice and subjected to white (Fig. 4A, B) or beige (Fig. 4C, D) adipogenic differentiation.

At the end of white adipogenic stimulation, 60% of control *Egr1*^{+/+} cells have acquired a white adipocyte phenotype, marked by the presence of large lipid droplets in the cytoplasm (Fig. 4A). In contrast, only 20% of mutant mASC-*Egr1*^{-/-} cells exhibited lipid droplets (Fig. 4A) suggesting that *Egr1* is necessary for white adipocyte differentiation. To confirm this hypothesis, we quantified the expression of adipocyte markers in control and mutant cells at different days after differentiation. As expected, *Egr1* is highly expressed during the entire white adipocyte differentiation of control mASC-*Egr1*^{+/+} cells, while not detected in mutant mASC-*Egr1*^{-/-} cells (Fig. 4B). *Cebpb* and *Pparg* encode transcription factors belonging to the core genetic program that trigger adipogenesis²⁶. In both control mASC-*Egr1*^{+/+} and mutant mASC-*Egr1*^{-/-}, *Cebpb* expression first decreases after 4 days of white differentiation and returns to basal level at the end of the process. *Pparg* expression continuously increases until day 8, and returns to basal level at the end of white differentiation. These results indicate that *Egr1* is not necessary to activate *Cebpb* and *Pparg* expression during white adipocyte differentiation. Since *Egr1* has been described as a direct regulator of *Cebpb* expression by chromatin immunoprecipitation assays²⁰, our observations suggest that absence of *Egr1* could be compensated in mASC-*Egr1*^{-/-} cells to activate *Cebpb* expression, or that *Egr1* is recruited to *Cebpb* promoter only as a transcriptional repressor of beige adipocyte differentiation²⁰. The beige adipocyte marker *Ucp1* was not expressed either in control or mutant cells. During white adipocyte differentiation, *Lep*, a late marker of white adipocyte differentiation^{27,28}, was significantly down-regulated in mutant mASC-*Egr1*^{-/-} cells compared to controls, which is consistent with the reduced white adipocyte differentiation observed in *Egr1*^{-/-} cells (Fig. 4A). Resistin (*Retn*) is an adipocyte-specific hormone secreted by WAT³. In control and mutant cells, *Retn* expression was absent at day 0, increased during white differentiation reaching a peak at day 4, and subsequently decreased during late differentiation (Fig. 4B). A similar *Retn* expression profile has been previously described during white adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes²⁹. This result indicates that *Egr1* may not regulate *Retn* expression or that the absence of *Egr1* was compensated. *Dcun1d3* displays a similar expression profile to *Retn* during white differentiation of control mASC-*Egr1*^{+/+} cells. In contrast to what we previously observed in vivo with the *Egr1*^{-/-} mutant (Fig. 2A), *Egr1* loss-of-function did not affect *Dcun1d3* expression during mASC white adipocyte differentiation (Fig. 4B). This result can be explained by the difference between in vivo analysis of a mixed tissue, and study of an in vitro homogenous cell population strictly directed towards white differentiation.

These observations demonstrate that while mutant mASC-*Egr1*^{-/-} cells express some markers at a similar level than in control cells (*Cebpb*, *Pparg*, *Retn* and *Dcun1d3*, Fig. 4B), they present significant morphological (Fig. 4A) and transcriptomic (Fig. 4B, *Lep*) alterations in late markers of normal white adipocyte differentiation. This suggests that *Egr1* has a positive role on white adipocyte differentiation.

Following beige adipogenic stimulation, control mASC-*Egr1*^{+/+} cells displayed a low level (17%) of differentiation into beige adipocytes marked by the appearance of numerous small lipid droplets in their cytoplasm (Fig. 4C). In contrast, *Egr1* deletion led to a robust differentiation of 78% of mutant mASC-*Egr1*^{-/-} cells into beige adipocytes (Fig. 4C). This result shows that beige adipocyte differentiation in wild type mASC is a less efficient process compared to white differentiation (Fig. 4A, C). More importantly, this observation reveals that *Egr1* acts as a critical repressor of beige adipocyte differentiation. In wild type mASC, *Egr1* expression increases during the first time-points of beige adipocyte differentiation and decreases at the end of the process (Fig. 4C). In contrast to white adipocyte differentiation, *Cebpb* expression increases during wild type mASC beige adipocyte differentiation whereas *Pparg* expression remains constant from day 4 (Fig. 4D). Interestingly, *Egr1* loss-of-function significantly increases *Cebpb* and *Pparg* expression, suggesting that *Egr1* is necessary to repress *Cebpb* and *Pparg* expression during beige adipocyte differentiation. As expected, *Ucp1* expression is significantly upregulated in mutant mASC-*Egr1*^{-/-} compared to control cells (Fig. 4D), consistently with the browning phenotype of *Egr1*^{-/-} mice (Figs. 2 and 3)²⁰. *Lep* is not expressed during beige adipocyte differentiation of both control and

mutant mASC (Fig. 4D). Expression of *Retn* is detected during beige adipocyte differentiation (Fig. 4D), while at lower levels compared to white differentiation, which further suggests that *Retn* may be a generic marker of both white and beige adipocyte differentiation¹³. Similarly, mutant mASC-*Egr1*^{-/-} cells which exhibit a robust differentiation rate, visualized by accumulation of lipid droplets in the cytoplasm (78%, Fig. 4C), are characterized by higher *Retn* expression levels compared to wild type cells (Fig. 4D). This further confirms that *Retn* expression can be associated with beige adipocyte differentiation. *Dcn1d3* expression is increased during beige adipocyte differentiation (Fig. 4D). In addition, *Egr1* loss-of-function leads to a significant upregulation in *Dcn1d3* expression (Fig. 4D), suggesting that *Egr1* represses *Dcn1d3* expression. This is similar to our in vivo results (Fig. 2B).

Altogether, our results indicate that *Egr1* is necessary to promote white adipocyte differentiation and to repress beige adipocyte differentiation of mASC. Consistent with the cell differentiation phenotypes, *Egr1* is necessary to activate *Lep* during white differentiation and to repress *Ucp1* during beige adipocyte differentiation. *Retn* and *Dcn1d3* are expressed during both white and beige adipocyte differentiation of mASC, suggesting a generic role of these factors during adipocyte differentiation (Fig. 7). Interestingly, *Egr1* loss-of-function specifically affects the expression of the generic adipocyte differentiation markers *Cebpb*, *Pparg*, *Retn* and *Dcn1d3* during beige adipocyte differentiation, which confirms the negative role of *Egr1* on beige differentiation suggested by in vivo data (Figs. 2 and 3). The positive role of *Egr1* on in vitro white adipocyte differentiation is consistent with our in vivo results (Figs. 2 and 3) and with studies correlating *Egr1* overexpression with obesity^{22,23}.

***Egr1* is sufficient to promote white and to repress beige adipocyte differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells.**

To further characterize the role of *Egr1* during adipocyte differentiation and confirm the results obtained with mASC, we used a second in vitro approach, taking advantage of the Tol2 genomic system to perform *Egr1* gain-of-function experiments in C3H10T1/2 mesenchymal cells. The Tol2 system was used in combination with the viral T2A system, which allowed stable and bi-cistronic expression of two proteins³⁰ (Supplementary Fig. 4). Control C3H-*Tom-Gfp* cells co-expressed cytoplasmic Tomato and nuclear H2B-GFP fluorescent reporter proteins, whereas in C3H-*Tom-Egr1* cells, the H2B-GFP coding sequence was replaced with *Egr1* coding sequence (Supplementary Fig. 4). C3H-*Tom-Gfp* and C3H-*Tom-Egr1* cells exhibited cytoplasmic Tomato expression and nuclear H2B-Gfp or *Egr1* expression, respectively (Figs. 5A and 6A).

At the end of white adipogenic stimulation, 90% of C3H-*Tom-Gfp* and 95% of C3H-*Tom-Egr1* cells differentiated into white adipocytes, marked by the appearance of large lipid droplets in the cytoplasm (Fig. 5B, C, white arrowheads). These observations indicate that *Egr1* gain-of-function promotes C3H10T1/2 cell differentiation into white adipocytes and support previous findings showing increased *Egr1* expression in WAT of obese mice and humans compared to lean individuals^{22,23}. In contrast, while 97% of C3H-*Tom-Gfp* differentiated into beige adipocytes, indicated by the presence of small lipid droplets (Fig. 6B, C, white arrowheads), only 50% of C3H-*Tom-Egr1* cells achieved beige differentiation. These results confirm that *Egr1* gain-of-function in C3H10T1/2 mesenchymal stem cells reduces beige adipocyte differentiation²⁰.

To further characterize the consequences of *Egr1* gain of function during white and beige differentiation, we quantified the expression of *Egr1* and several generic (*Cebpb*, *Pparg*, *Retn*, *Dcn1d3*) and beige (*Ucp1*, *Cidea*, *Cox8b*) adipocyte markers in C3H-*Tom-Gfp* and C3H-*Tom-Egr1* cells. As expected, C3H-*Tom-Egr1* cells display stable overexpression of *Egr1* during white (Fig. 5D) and beige (Fig. 6D) adipocyte differentiation, compared to control C3H-*Tom-Gfp* cells. The generic adipogenic factors *Cebpb* and *Pparg* were up regulated during white (Fig. 5D) and beige (Fig. 6D) adipocyte differentiation in both control C3H-*Tom-Gfp* and C3H-*Tom-Egr1* cells. *Egr1* gain-of-function did not affect *Cebpb* and *Pparg* expression. These results indicate that while *Egr1* is required to repress *Cebpb*²⁰ (Fig. 4D) and *Pparg* expression (Fig. 4D) during mASC differentiation, it is not sufficient to affect their expression during adipocyte differentiation of C3H10T1/2 cells (Figs. 5D and 6D).

Ucp1 was not detected at the end of white differentiation (Fig. 5D). As expected, the expression of the beige markers *Ucp1*, *Cidea* and *Cox8b* was upregulated in control C3H-*Tom-Gfp* cells upon differentiation into beige adipocytes (Fig. 6D). A moderate decrease in *Ucp1* expression was also observed in C3H-*Tom-Egr1* cells when compared to control cells (Fig. 6D), in accordance with their impaired beige differentiation. Surprisingly, an increase of both *Cidea* and *Cox8b* expression was also observed during white adipocyte differentiation (Fig. 5D). In addition, *Egr1* gain of-function increases both *Cidea* and *Cox8b* expression during white (Fig. 5D) or beige (Fig. 6D) adipocyte differentiation. *Egr1* therefore acts as an activator of *Cidea* and *Cox8b* expression during white and beige adipocyte differentiation of C3H10T1/2 and is able to repress *Ucp1* expression only. One hypothesis could be that, in contrast to the in vivo context (Fig. 2) the co-factors allowing *Egr1* to repress *Cox8b* and *Cidea* might not be expressed by C3H10T1/2 cells.

Both *Retn* and *Dcn1d3* expression were upregulated in C3H-*Tom-Gfp* cells after white and beige differentiation (Figs. 5D and 6D), which strengthens the hypothesis of a generic role of these two genes during adipocyte differentiation. In addition, *Dcn1d3* expression was not altered in C3H-*Tom-Egr1* cells compared to controls (Figs. 5D and 6D), showing that *Egr1* is not required to regulate *Dcn1d3* expression during adipocyte differentiation. We could not detect any expression of the white adipocyte marker *Lep* either in C3H-*Tom-Gfp* or in C3H-*Tom-Egr1* cells during white adipocyte differentiation. These results highlights the limitations of in vitro cell lines in the analysis of white adipocyte differentiation and confirms that primary mASC are the only in vitro system that allows *Lep* detection³¹.

Collectively, these results indicate that *Egr1* is sufficient to promote white adipocyte differentiation of C3H10T1/2 cells and to impair beige differentiation, presumably by down-regulation of *Ucp1* expression.

In summary, *Egr1* deletion induces spontaneous WAT browning specifically in the inguinal subcutaneous depot. This process acts through *Ucp1* upregulation and results in OCR increase at a level close to the BAT (Fig. 7). In vitro differentiation of mASC isolated from *Egr1* mutant SC-WAT confirmed that *Egr1* loss-of-function promotes beige adipocyte differentiation through *Ucp1* upregulation, and repress white adipocyte

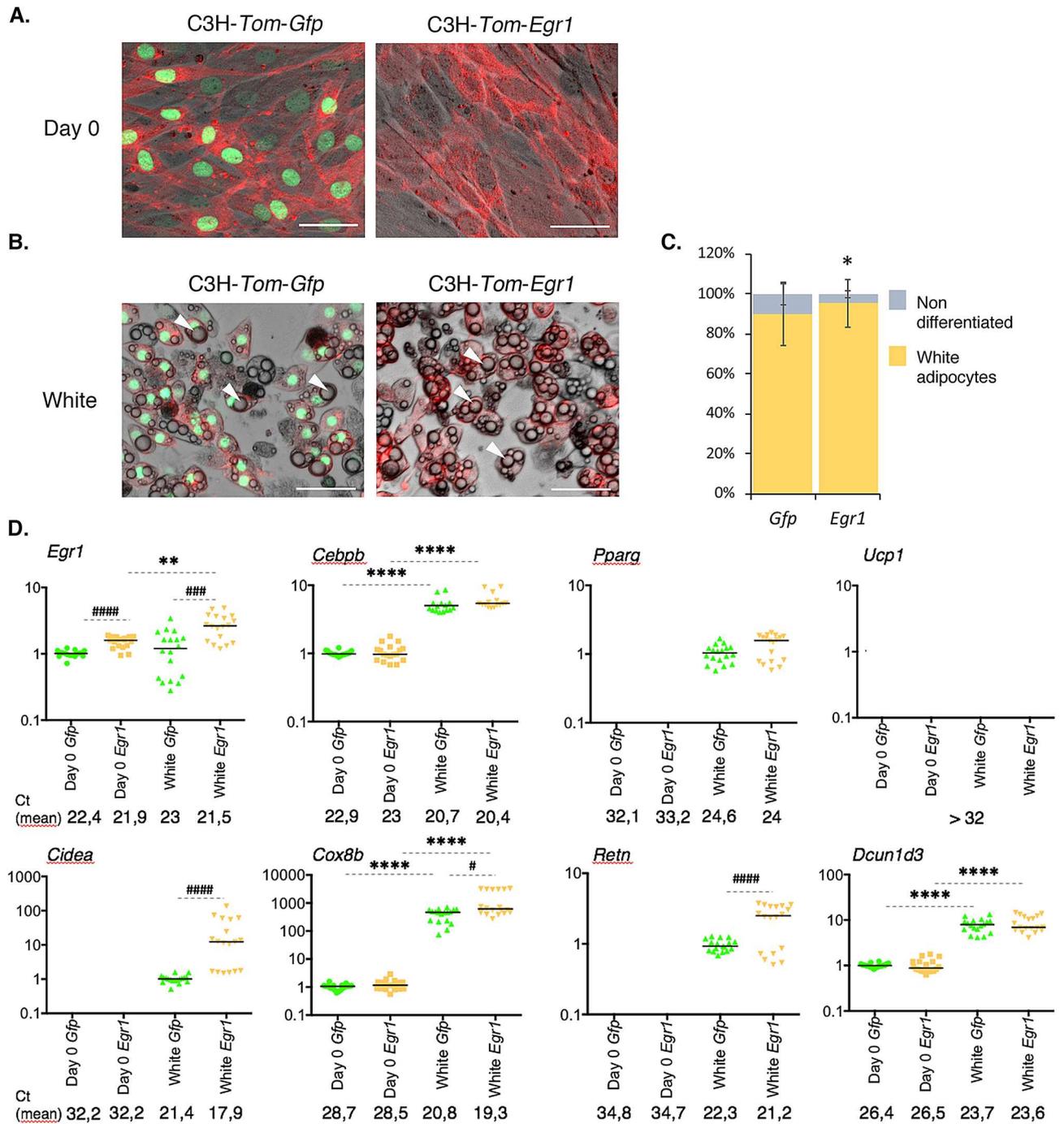


Figure 5. *Egr1* is sufficient to promote white adipocyte differentiation in a multipotent cell line. (A–D) Control C3H-*Tom-Gfp* and *Egr1*-overexpressing C3H-*Tom-Egr1* cells were subjected to white differentiation. At day 0 (A) and at the end of the differentiation process (B), apotome images were obtained using brightfield, green (Gfp) and red (Tom) channels, merged, and a representative image is shown for each condition. White arrowheads indicate lipid droplets. Scale bars, 50 μ m. (C) C3H-*Tom-Gfp* and C3H-*Tom-Egr1* cells submitted to white adipogenic medium were counted from n = 7 pictures and expressed as a percentage of total cells differentiated or not for each condition or as total number of cells per arbitrary unit area. Error bars represent the means \pm standard deviations, and *p* values were obtained using the Mann–Whitney test comparing differentiated and non-differentiated C3H-*Tom-Gfp* and C3H-*Tom-Egr1* cells, **P* < 0.05. (D) At Day 0 or at the end of white differentiation, cells were used for RNA purification. RNA samples were analysed by RT-qPCR analysis for *Egr1*, *Cebpb*, *Pparg*, *Ucp1*, *Cidea*, *Cox8b*, *Retn* and *Dcn1d3* expression in control C3H-*Tom-Gfp* and *Egr1*-overexpressing C3H-*Tom-Egr1* cells. Transcripts are shown relative to the level of 18S transcripts. The relative mRNA levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, with control being normalized to 1. Experiments were performed with n = 18 independent cultures for C3H-*Tom-Gfp* and C3H-*Tom-Egr1* cells. * indicate the *p* values of gene expression levels in C3H-*Tom-Gfp* or C3H-*Tom-Egr1* at the first day of gene detection versus differentiation, with ***P* < 0.01, *****P* < 0.0001; # indicate the *p* values of gene expression levels in C3H-*Tom-Gfp* versus C3H-*Tom-Egr1* for each time point, with #*P* < 0.05, ###*P* < 0.001, *****P* < 0.0001.

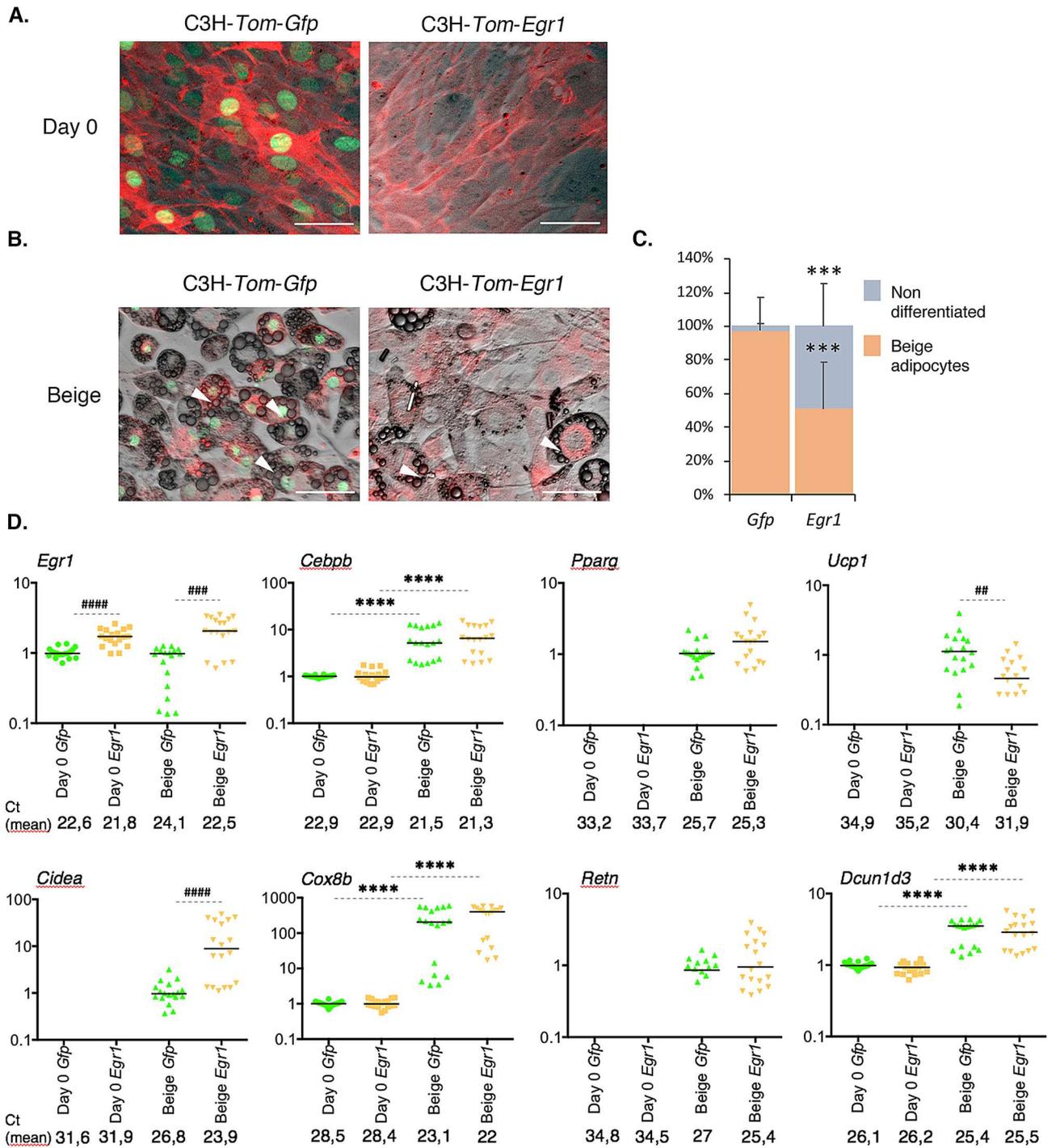


Figure 6. *Egr1* is sufficient to reduce beige adipocyte differentiation in a multipotent cell line. (A–D) Control C3H-*Tom-Gfp* and *Egr1*-overexpressing C3H-*Tom-Egr1* cells were subjected to beige differentiation. At day 0 (A) and at the end of the differentiation process (B), apotome images were obtained using brightfield, green (Gfp) and red (Tom) channels, merged, and a representative image is shown for each condition. White arrowheads indicate lipid droplets. Scale bars, 50 μ m. (C) C3H-*Tom-Gfp* and C3H-*Tom-Egr1* cells submitted to beige adipogenic medium were counted from $n = 6$ pictures and expressed as a percentage of total cells differentiated or not for each condition or as total number of cells per arbitrary unit area. Error bars represent the means + standard deviations, and p values were obtained using the Mann–Whitney test comparing differentiated and non-differentiated C3H-*Tom-Gfp* and C3H-*Tom-Egr1* cells, $***P < 0.001$. (D) At Day 0 or at the end of beige differentiation, cells were used for RNA purification. RNA samples were analysed by RT-qPCR analysis for *Egr1*, *Cebpb*, *Pparg*, *Ucp1*, *Cidea*, *Cox8b*, *Retn* and *Dcn1d3* expression in control C3H-*Tom-Gfp* and *Egr1*-overexpressing C3H-*Tom-Egr1* cells. Transcripts are shown relative to the level of 18S transcripts. The relative mRNA levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, with control being normalized to 1. Experiments were performed with $n = 18$ independent cultures for C3H-*Tom-Gfp* and C3H-*Tom-Egr1* cells. * indicate the p values of gene expression levels in C3H-*Tom-Gfp* or C3H-*Tom-Egr1* at the first day of gene detection versus differentiation, with $****P < 0.0001$; # indicate the p values of gene expression levels in C3H-*Tom-Gfp* versus C3H-*Tom-Egr1* for each time point, with $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$.

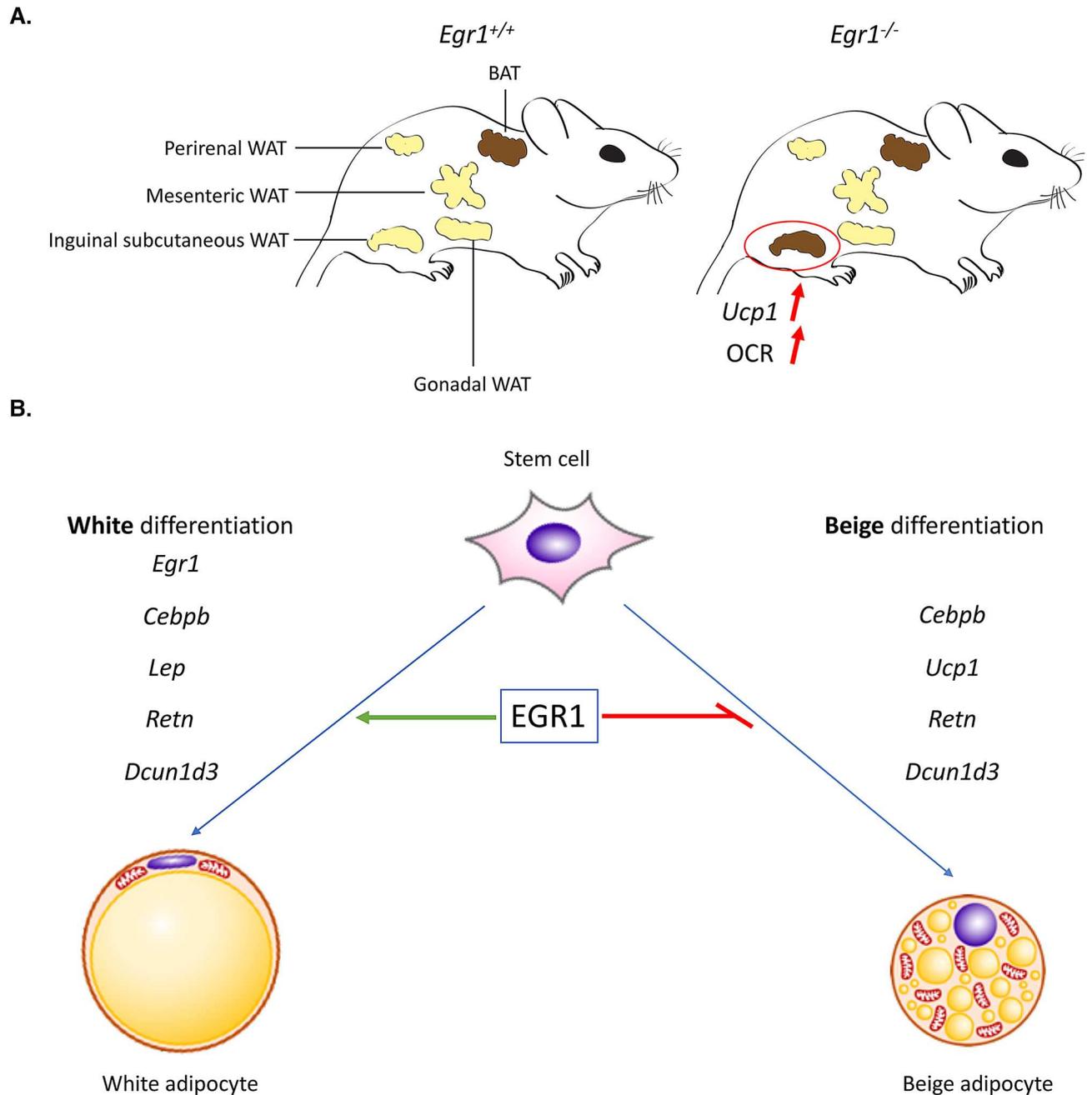


Figure 7. Schematic representation of the consequences of *Egr1* loss or gain-of-function on adipose tissue metabolism and adipocyte differentiation. (A) *Egr1* depletion leads to spontaneous and specific browning of inguinal subcutaneous white adipose tissue (WAT), visualized by increased *Ucp1* expression and oxygen consumption rate (OCR). (B) *Egr1* is necessary and sufficient to promote white adipocyte differentiation and reduce beige differentiation through the regulation of *Egr1*, *Cebpb*, *Ucp1*, *Lep*, *Retn* and *Dcun1d3* expression.

differentiation. We confirmed these results using *Egr1* gain-of-function experiments in C3H10T1/2 mesenchymal stem cells. Altogether, our study reveals that *Egr1* is necessary and sufficient to promote full white adipocyte differentiation and sufficient to prevent beige adipocyte differentiation. These results are in accordance with the increased expression of *Egr1* observed in obese mice and humans^{22,23} and establishes *Egr1* as a putative promising target to counteract obesity.

Methods

Mouse line. All experimental procedures using mice were conducted in accordance with the European guidelines (2010/63/UE) and were approved by the French National Ethic Committee for animal experimentation No. 05 and are registered under the number 01789.02.

Egr1 gene was inactivated in C57BL/6 J mice by insertion of the *LacZ* coding sequence within the *Egr1* 5' untranslated region, in addition to a frameshift mutation upstream of the DNA-binding domain of *Egr1*³². The

line was maintained on a C57BL/6J genetic background (JANVIER, France). Animals were bred under controlled photo-period (lights on 08:00–20:00 h), chow diet and tap water ad libitum.

RNA extraction from fat pads. Fresh inguinal subcutaneous (WAT), brown (BAT), gonadic (GAT), mesenteric (MAT) and perirenal (PAT) fat pads were removed from 8-month-old euthanized *Egr1*^{+/+} and *Egr1*^{-/-} female mice and homogenized using a mechanical disruption device (Lysing Matrix A, Fast Prep MP1, 4 × 30 s, 6 m s⁻¹). Total RNA was isolated using the RNeasy mini kit (QIAGEN), with 15 min of DNase I (QIAGEN) treatment as previously described²⁰.

In situ hybridization to adipose tissue sections. The mouse *Dcun1d3* fragment was amplified by PCR (reverse 5'ggctcatcactagccatcctaac; forward 5'cagtattcaggaggactttg) from SC-WAT cDNA and cloned in the PGEM-T easy plasmid (PROMEGA). The antisense probe was synthesized using T7 polymerase after Sall digestion. The sense probe was obtained using Sp6 polymerase after SacII digestion. Inguinal subcutaneous fat pads were isolated from 1-month-old female mice, fixed in 4% paraformaldehyde overnight and cryo-sectioned. 8 μm wax tissue sections were used for in situ hybridization as previously described³³.

Quantification of mitochondrial DNA. WAT and BAT were dissected from 8-months-old control *Egr1*^{+/+} and mutant *Egr1*^{-/-} female mice and immediately frozen at -80 °C. DNA purification was performed using the QIAmp DNA Minikit (QIAGEN). DNA concentration and purity were measured using a Nanodrop. Quantitative real time PCR was performed on a StepOnePlus PCR machine (APPLIED BIOSYSTEMS) using the FastStart Universal SYBR Green Master (ROCHE) with primers that amplify the mitochondrial *CytB* gene and the nuclear encoded *NDUFV1* gene as endogenous reference, as described in³⁴.

Metabolic and bio-energetic analysis. Tissue bioenergetics were analyzed on a Seahorse extracellular flux analyzer (XF²⁴) according to the manufacturer's instructions. 2 mg explants of WAT and BAT freshly dissected from 8-months-old control *Egr1*^{+/+} and mutant *Egr1*^{-/-} female mice were immediately placed in a Seahorse XF²⁴ islet plate in 500 μL of pre-heated minimal assay medium (SEAHORSE BIOSCIENCES, 37 °C, pH 7.40) supplemented with glucose (2.25 g/L), sodium pyruvate (1 mM) and L-glutamine (2 mM). The tissue weight was based on initial assays that optimized the oxygen consumption rate (OCR). After one hour of equilibration at 37 °C in a non-CO₂ incubator, OCR was measured successively in control condition (basal rates) and after successive injections of oligomycin (1 μM) that inhibits ATP synthase (ATP-linked OCR), FCCP (10 μM) that uncouples mitochondrial OXPHOS (maximal OCR) and mixed rotenone/antimycin (10 μM) that inhibit complexes I and III (non-mitochondrial OCR).

Detection and quantification of carbonylated proteins. WAT and BAT were dissected from 8-months-old control *Egr1*^{+/+} and mutant *Egr1*^{-/-} female mice and immediately frozen at -80 °C. The day of extraction, tissues were homogenized in lysis buffer (8 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS and 10 mM DTT). After 30 min on ice, lysates were clarified by centrifugation at 20,000 g for 15 min at 4 °C. Protein concentrations of the supernatants were determined by the Bradford method. Labeling of protein carbonyl groups was obtained by overnight incubation of 20 μg protein extracts with CF555DI hydrazide (BIOTIUM, Fremont, CA, USA) at 4 °C under medium agitation. Labeled samples were then resolved by SDS-PAGE in an anykD pre-cast gel (BIORAD). After three washes using a solution 7% acetic acid and 10% ethanol, CF555DI hydrazide labeling was detected using a ChemiDoc MP Imager System (BIORAD). Total protein staining was performed using Instant-Blue Protein Stain (EXPEDEON). Raw data were analyzed using the Fiji/ImageJ software. In both CF555DI and Coomassie's analysis, the protein profiles were quantified by measuring the intensity of the lane for each sample. Data were normalized using the CF555DI/Coomassie ratio.

Isolation of murine adipose stem/stromal cells (mASC). mASC were isolated as previously described³⁵. Briefly, subcutaneous inguinal fat pads were excised from wild type or *Egr1*^{-/-} female mice, minced in prewarmed Krebs–ringer bicarbonate KRB (118 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 2 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 5 mM glucose, pH = 7.4) and digested in collagenase solution (0.1%). After centrifugation, the stromal vascular fraction (SVF) was rinsed in PBS, resuspended in prewarmed Stromal medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO) supplemented with 10% FBS, 1% penicillin–streptomycin) and seeded on plastic flasks to allow mASC adhesion. Cells were cultured at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO₂.

Plasmid cloning. The *Egr1* coding sequence was obtained by PCR amplification of the plasmid *pCAβ-Egr1*³⁶ using the following primers: *mEgr1*-Bstbl-Forward-CTAATGTTTCGAAATGGCAGCGGCCAAGGC, *mEgr1*-PmlI-Reverse-ATCGTCACGTGTATTAGCAAATTTCAAT, and cloned in the transposable *pT2AL-CMV-Tom-T2A-Gfp* plasmid³⁰. The *H2B-Gfp* coding sequence was removed from *pT2AL-CMV-Tom-T2A-Gfp* by BstI and PmlI digestion and replaced with *Egr1* coding sequence.

Transfection of C3H10T1/2 cells and isolation of C3H-Tom-Gfp and C3H-Tom-Egr1 cells. Mouse mesenchymal stem cells C3H10T1/2³⁷ were seeded to 6-well plates at a density 20,000 cells/cm² in stromal medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO) supplemented with 10% FBS, 1% penicillin–streptomycin). Cells were transfected at 80% confluence by lipofectamine P3000 (Invitrogen) with 1 μg of plasmid encoding the transposase (pT2TP) and 2 μg of *pT2AL-CMV-Tom-T2A-Gfp*, or *pT2AL-CMV-Tom-T2A-*

Egr1, in order to obtain stable C3H-*Tom-Gfp* and C3H-*Tom-Egr1* cells that overexpress *GFP* and *Egr1*, respectively. Two days after transfection, C3H-*Tom-Gfp* and C3H-*Tom-Egr1* cells were resuspended into Fluorescence Analysis Cell sorting (FACS) suspension medium (Sterile PBS 1X, 10% FBS, 1% P/S, 2 mM EDTA and DAPI) and purified on a FACS Aria 3 (BECTON DICKINSON, CA). Live cells were gated based on the morphology, doublets were excluded and cells were sorted based on their Tomato expression.

Cell cultures. Mouse adipose stem/stromal cells mASC-*Egr1*^{+/+} and mASC-*Egr1*^{-/-}, or mouse mesenchymal stem cells C3H-*Tom-Gfp* and C3H-*Tom-Egr1* were plated on 6-well plates at a density of 7.500 cells/cm² in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, INVITROGEN) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS, Sigma), 1% penicillin-streptomycin (SIGMA), 1% Glutamine (SIGMA), 800 µg/ml G418 Geneticin (SIGMA) and incubated at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO₂ as described in²⁰. Cells were cultured in white adipocyte differentiation medium (STEMPRO, THERMOFISHER) until differentiation which takes 7 to 12 days. The medium was changed every 3–4 days. Day 0 corresponds to the addition of white differentiation medium, at 100% confluence. mASC-*Egr1*^{+/+} and mASC-*Egr1*^{-/-} subjected to white adipocyte differentiation medium were stopped at Day 0, Day 4, Day 8 and Day 10 or 12 for gene expression analysis and stopped at Day 10 for Oil Red O staining (as described in previous study²⁰). C3H-*Tom-Gfp* and C3H-*Tom-Egr1* cells subjected to white adipocyte differentiation medium were stopped at Day 0 and at the end of differentiation for gene expression analysis.

Confluent cells were cultured in beige differentiation induction medium for 2 days and in beige maturation medium for 7 to 10 days according to published protocols^{20,38}. Day 0 corresponds to the addition of beige differentiation induction medium at confluence. The maturation medium was changed every 3–4 days. mASC-*Egr1*^{+/+} and mASC-*Egr1*^{-/-} subjected to beige adipocyte differentiation medium were fixed for Oil Red O staining at Day 10 or lysed for gene expression analysis at Day 0, Day 4, Day 8 and Day 10.

C3H-*Tom-Gfp* and C3H-*Tom-Egr1* cells subjected to beige adipocyte differentiation medium were stopped at Day 0 and at the end of differentiation for gene expression analysis.

Cell number measurements were performed using the free software Fiji³⁹.

Reverse-transcription and quantitative real time PCR. Total RNAs extracted from mouse fat pads, mASC-*Egr1*^{+/+} and mASC-*Egr1*^{-/-}, or C3H-*Tom-Gfp* and C3H-*Tom-Egr1* cells were Reverse Transcribed using the High Capacity Retro-transcription kit (Applied Biosystems). Quantitative PCR analyses were performed using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and primers listed in Supplementary Table 1. The relative mRNA levels were calculated using the 2^{-ΔΔCt} method⁴⁰. The Ct values were obtained from Ct normalized to *Rn18S* levels in each sample. For mRNA level analysis in fat pads, 7 to 9 independent RNA samples of 8-month-old *Egr1*^{+/+} and *Egr1*^{-/-} female mice were analysed in duplicate. For mRNA level analysis of mASC-*Egr1*^{+/+} and mASC-*Egr1*^{-/-} cultures, 5 to 12 independent RNA samples were analysed in duplicate for each time point. For mRNA level analysis of C3H10T1/2-*Tom-Gfp* and C3H10T1/2-*Tom-Egr1* cell cultures, 12 independent RNA samples were analysed in duplicate for each time point.

Statistical analyses. Data was analysed using the non-parametric Mann-Whitney test with Graphpad PRISM V6 or Student t test. Results are shown as means ± standard deviations. The *p* values are indicated either with the value or with * or #, as in²⁰.

Received: 4 June 2020; Accepted: 24 August 2020

Published online: 28 September 2020

References

- Kershaw, E. E. & Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2548–2556 (2004).
- Coelho, M., Oliveira, T. & Fernandes, R. State of the art paper Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. (2013) doi:10.5114/aoms.2013.33181.
- Steppan, C. M. *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307–312 (2001).
- Kamohara, S., Burcelin, R., Halaas, J. L., Friedman, J. M. & Charron, M. J. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* **389**, 374–377 (1997).
- Tartaglia, L. *et al.* Identification and expression cloning of a leptin receptor OB-R. *Cell* **83**, 1263–1271 (1995).
- Trayhurn, P. Leptin—a critical body weight signal and a ‘master’ hormone? *Sci. STKE* **2003**, pe7 (2003).
- Berry, D. C., Stenesen, D., Zeve, D. & Graff, J. M. The developmental origins of adipose tissue. *Development* **140**, 3939–3949 (2013).
- Sebo, Z. L., Jeffery, E., Holtrup, B. & Rodeheffer, M. S. A mesodermal fate map for adipose tissue. *Development* **145**, dev166801 (2018).
- Bartelt, A. & Heeren, J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 24–36 (2014).
- Klaus, S., Casteilla, L., Bouillaud, F. & Ricquier, D. The uncoupling protein UCP: a membranous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *Int. J. Biochem.* **23**, 1773883 (1991).
- Seale, P. *et al.* Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. **121**, 53–56 (2011).
- De Jesus, L. A. *et al.* The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **108**, 1379–1385 (2001).
- Lizcano, F. The beige adipocyte as a therapy for metabolic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
- Rosenwald, M., Perdikari, A., Rüllicke, T. & Wolfrum, C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* **15**, 659–667 (2013).
- Garcia, R. A., Roemmich, J. N. & Claycombe, K. J. Evaluation of markers of beige adipocytes in white adipose tissue of the mouse. *Nutr. Metab. (Lond)* **13**, 24 (2016).
- Elabd, C. *et al.* Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells* **27**, 2753–2760 (2009).

17. Horwitz, E. M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* **7**, 393–395 (2005).
18. Zuk, P. Adipose-derived stem cells in tissue regeneration: a review. *Int. Sch. Res. Not.* **2013**, e713959 (2013).
19. Zuk, P. A. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279–4295 (2002).
20. Millet, C. *et al.* Egr1 deficiency induces browning of inguinal subcutaneous white adipose tissue in mice. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
21. Havis, E. & Duprez, D. EGR1 transcription factor is a multifaceted regulator of matrix production in tendons and other connective tissues. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–25 (2020).
22. Yu, X. *et al.* Egr-1 decreases adipocyte insulin sensitivity by tilting PI3K/Akt and MAPK signal balance in mice. *EMBO J.* **30**, 3754–3765 (2011).
23. Zhang, J. *et al.* Dietary obesity-induced Egr-1 in adipocytes facilitates energy storage via suppression of FOXC2. *Sci. Rep.* **3**, 1476 (2013).
24. Shen, N. *et al.* An early response transcription factor, Egr-1, enhances insulin resistance in type 2 diabetes with chronic hyperinsulinism. *J. Biol. Chem.* **286**, 14508–14515 (2011).
25. Mohtar, O. *et al.* Egr1 mediates the effect of insulin on leptin transcription in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **294**, 5784–5789 (2019).
26. Peirce, V., Carobbio, S. & Vidal-Puig, A. The different shades of fat. *Nature* **510**, 76–83 (2014).
27. Macdougald, O. A., Hwang, C. S., Fan, H. & Lane, M. D. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 9034–9037 (1995).
28. Palhinha, L. *et al.* Leptin induces proadipogenic and proinflammatory signaling in adipocytes. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **10**, (2019).
29. Ikeda, Y., Tsuchiya, H., Hama, S., Kajimoto, K. & Kogure, K. Resistin affects lipid metabolism during adipocyte maturation of 3T3-L1 cells. *FEBS J.* **280**, 5884–5895 (2013).
30. Bourgeois, A. *et al.* Stable and bicistronic expression of two genes in somite- and lateral plate-derived tissues to study chick limb development. *BMC Dev. Biol.* **15**, 1–12 (2015).
31. Wrann, C. D. & Rosen, E. D. New insights into adipocyte-specific leptin gene expression. *Adipocyte* **1**, 168–172 (2012).
32. Topilko, P. *et al.* Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice. *Mol. Endocrinol.* **12**, 107–122 (1998).
33. Bonnin, M. A. *et al.* Six1 is not involved in limb tendon development, but is expressed in limb connective tissue under Shh regulation. *Mech. Dev.* **122**, 573–585 (2005).
34. L'Honoré, A. *et al.* The role of Pitx2 and Pitx3 in muscle 1 stem cells gives new insights into P38 α MAP kinase and redox regulation of muscle regeneration. *Elife* <https://doi.org/10.7554/eLife.32991> (2018).
35. Yu, G. *et al.* Isolation of murine adipose-derived stem cells. In *Adipose-Derived Stem Cells: Methods and Protocols* (eds Gimble, J. M. & Bunnell, B. A.) 29–36 (Humana Press, 2011). 10.1007/978-1-61737-960-4_3.
36. Lejard, V. *et al.* EGR1 and EGR2 involvement in vertebrate tendon differentiation. *J. Biol. Chem.* **286**, (2011).
37. Reznikoff, C. a, Brankow, D. W. & Heidelberger, C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of. 3231–3238 (1973).
38. Lone, J., Choi, J. H., Kim, S. W. & Yun, J. W. ScienceDirect Curcumin induces brown fat-like phenotype in 3T3-L1 and primary white adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 1–10 (2015) 10.1016/j.jnutbio.2015.09.006.
39. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
40. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).

Acknowledgements

We thank Marthe Moldes from Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris, France and Jacqueline Bliley, from Carnegie Mellon University, Pittsburgh, USA for comments on the manuscript. We thank Hélène Fohrer-Ting, Centre d'Histologie, d'Imagerie et de Cytom  trie, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, F-75006 Paris, France, for cell sorting. We thank Alwyn Dady from Medical Sciences Institute, University of Dundee, Scotland and Sophie Gournet from IBPS, Paris, France for illustrations.

Author contributions

M.B., B.M., I.C., R.G. and Y.K. contributed to acquisition, analysis and interpretation of data. D.D. contributed to analysis and interpretation of histology data. A.L. and E.H. contributed to conception, design, analysis and interpretation of data, drafting the article, funding.

Funding

This work was supported by the Institut national de la santé et de la recherche Médicale (Inserm), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Sorbonne Université (UPMC), Sorbonne Universités Emergence (SU-16-R-EMR-33), Institut de Biologie Paris Seine-Action Initiative program 2017.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72698-w>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to E.H.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Publications, Congrès & Communication

Publications

Publication 1

Egr1 loss-of-function promotes beige adipocyte differentiation and activation specifically in inguinal subcutaneous white adipose tissue

Bléher M, Meshko B, Cacciapuoti I, Gergondey R, **Kovacs Y**, Duprez D, L'Honoré A, Havis E. Scientific Reports (2020) DOI: 10.1038/s41598-020-72698-w.

Publication 2

Ucp2-mediated metabolic regulation is required for cardiomyocyte maturation

Kovacs Y*, Bassand K*, Gergondey R, Szweda L, Nemazanyy I, Ouimette JF, Frejacques F, Friguet B, L'honore A. *Contribution équivalente

Soumission prochaine à la revue Cell Metabolism

Communications

Printemps de la Cardiologie de la Société Française de Cardiologie (Tours, juin 2022)

Communication Orale

Ucp2 regulates neonatal heart maturation through modulation of mitochondrial metabolism

Kovacs Y*, Bassand K*, Gergondey R, Nemazanyy I, Friguet B, L'honore A.

*Contribution équivalente

Prix Jeune Chercheur de la session Signalisation et Métabolisme

Journée Boris Ephrussi (Campus Jussieu, Sorbonne Université, Mai 2022)

Communication Orale

Ucp2 regulates neonatal cardiomyocyte proliferation through modulation of mitochondrial metabolism

Kovacs Y*, Bassand K*, Gergondey R, Nemazanyy I, Friguet B, L'honore A.

*Contribution équivalente

Printemps de la Cardiologie 2021 (visioconférence, Mai 2021)

ePoster

Kovacs Y, Bassand K, Friguet B, L'honore A.

Redox regulation of cardiomyocyte proliferation: The Ucp2 Avenue.

Réunion du consortium Leducq Redox (visioconférence, Avril 2020)

Communication orale

Ucp2 inhibition by genipin triggers ROS-dependent loss of proliferation in neonatal cardiomyocytes

Kovacs Y, Friguet B, L'honore A.

Congrès de l'American Heart Association (Philadelphie, Novembre 2019)

Congrès Myology 2019 de l'AFM-Téléthon (Bordeaux, Mars 2019)



Inserm
La science pour la santé
From science to health

université
PARIS-SACLAY
FACULTÉ DE
PHARMACIE

Orsay, jeudi 15 septembre 2022

A l'attention de : Ecole doctorale « Complexité du vivant », Sorbonne Université

Objet : Rapport sur le manuscrit de thèse de Monsieur Yoann Kovacs par Mathias Mericskay

La thèse de Yoann Kovacs intitulée « Rôle de la protéine découplante mitochondriale Ucp2 dans la régulation du métabolisme et de la maturation des cardiomyocytes néonataux » a été réalisée sous la direction du Professeur Bertrand Friguet et co-encadrée par le Dr Aurore L'honoré au sein du laboratoire UMR8256 CNRS – Sorbonne Université « Inflammation et vieillissement cellulaire ».

M. Kovacs a rédigé un manuscrit en quatre parties principales : une introduction, une partie résultats incluant des sections matériel et méthodes, conclusions générales, et enfin une partie discussion et perspectives. Le manuscrit contient en outre un chapitre citant 323 références bibliographiques.

L'introduction est bien structurée et bien écrite avec une iconographie soignée et didactique. M Kovacs y expose le contexte de sa recherche en faisant un bilan assez large des connaissances sur le métabolisme mitochondrial et son impact sur les propriétés de prolifération et différenciation des cardiomyocytes au cours de la période fœtale et périnatale dans des conditions pathologiques chez l'adulte. Il aborde ensuite l'état des connaissances sur la protéine UCP2 de la famille des protéines découplantes de la membrane interne de la mitochondrie qui fait l'objet principal des travaux de thèse. Les principaux concepts sont pour la grande majorité bien expliqués et permettent de bien préparer la compréhension des résultats obtenus au cours de la thèse même si quelques points de détails mériteront d'être clarifiés au cours de la soutenance.

La partie résultat est divisée en 3 sous-chapitres. Les deux premiers concernent l'étude de l'impact de l'inactivation du gène Ucp2 chez la souris ou de l'inhibition de l'activité de la protéine par la génipine sur la maturation et le métabolisme oxydatif des cardiomyocytes. Ils

sont présentés sous formes de résultats détaillés accompagnés de sous-parties décrivant le matériel et les méthodes employées. Il est expliqué en préambule par M Kovacs que ces résultats seront à la base d'un article original en anglais restant à rédiger dans lequel il sera premier co-premier auteur.

Les travaux de thèse initiés par M. Kovacs se basent sur l'observation intéressante que le gène UCP2 présente un pic d'expression dans le cœur au cours de la période périnatale, unique parmi les autres membres de la famille UCP. On peut noter au passage qu'au vu de l'importance des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm UCP2 évoqués par M Kovacs dans son introduction, il aurait été souhaitable de présenter également les niveaux de la protéine.

M. Kovacs et ses collaborateurs ont utilisé une panoplie de méthodes remarquable par sa diversité (transcriptomique, métabolomique, modélisation cellulaire, oxygraphie) pour montrer que dans les cardiomyocytes du mutant UCP2^{-/-}, il y a dans les 3 premiers jours postnataux un défaut de biogénèse mitochondriale et de capacités oxydatives, notamment des acides gras, associé à une baisse du stress oxydant. De manière inattendue, ce défaut de capacité oxydative mitochondriale dans les cardiomyocytes n'est pas compensée par une augmentation ou au moins un maintien des capacités glycolytiques caractéristiques du cardiomyocyte fœtal mais au contraire, par une baisse de la capacité glycolytique qui est observée dans le modèle de cardiomyocytes déficients en UCP2 cultivés in vitro. Ce défaut semble être associée à des changements dans l'état redox du coenzyme NAD(H) mais la cause et le mécanisme exact restent à déterminer. M Kovacs montre ensuite que ces défauts métaboliques sont associés à un déficit de maturation de l'appareil contractile et de prolifération des cardiomyocytes.

M Kovacs explore dans sa thèse la piste originale et particulièrement pertinente du lien entre métabolisme énergétique et régulation épigénétique de l'expression des gènes de différenciation du cardiomyocyte. Il montre qu'un changement du métabolisme mitochondrial vers une dépendance à la glutamine est associé à une baisse d'un intermédiaire du cycle de Krebs, l'alpha-cétoglutarate ainsi que de l'acétyl-coA, deux métabolites qualifiés « d'épimétabolites » car ils sont utilisés respectivement par des enzymes déméthylases ou des acétyl-transférases modifiant l'état de la chromatine et l'expression des gènes. C'est un concept majeur qui a émergé déjà il y a quelques années dans le domaine du cancer mais pour lequel il reste beaucoup à faire dans le domaine de la cardiologie moléculaire. En ce sens les travaux de M. Kovacs et de ses collaborateurs apportent un éclairage nouveau sur ces mécanismes dans les cardiomyocytes et il s'agit d'un sujet tout à fait excitant pour la recherche dans ce domaine. La deuxième partie des résultats décrit l'obtention de résultats utilisant une approche

pharmacologique d'inhibition des UCP par la génipine en partant du principe qu'à la période périnatale, UCP2 est le gène UCP majoritaire. Des résultats similaires à l'étude sur le mutant UCP2-/- sont obtenus avec la génipine, comme la baisse de la capacité oxydative mitochondriale et de la prolifération des cardiomyocytes néonataux, mais aussi parfois différents, comme l'augmentation de marqueurs du stress oxydant alors qu'ils diminuaient chez le mutant. M Kovacs discute de ces différences qui pourraient s'expliquer entre autres par l'action sélective de l'inhibiteur sur la fonction de transfert de protons d'UCP2 mais l'absence d'effet sur la fonction d'UCP2 d'exporteur de métabolites du cycle de Krebs vers le cytosol, ou encore d'autres actions de la génipine non spécifiques de la cible UCP2.

La troisième partie synthétise brièvement en français les résultats d'un article original publié en anglais dans le journal Scientific Reports qui est inclus dans le manuscrit de thèse et où M Kovacs est 5^{ème} auteur. Cette étude est issue d'une collaboration avec l'équipe des Dr Havis et Duprès sur un sujet concernant le rôle de EGR1 dans la différenciation adipocytaire, sujet très intéressant mais qui ne relève pas directement de son travail de thèse et que je ne commenterai pas ici.

Les parties conclusions générales et discussion et perspectives sont particulièrement riches et instructives et montrent que M Kovacs maîtrise son sujet et l'implication de ses résultats pour le domaine. Il restera en effet à mieux comprendre à l'avenir le rôle de UCP2 qui réapparaît dans le myocarde suite à des lésions d'ischémie-reperfusion qui jouent un rôle majeur dans la pathologie de l'infarctus du myocarde, première cause unique de mortalité dans le monde pour laquelle la recherche de thérapeutique efficace reste un sujet majeur de santé publique. Les travaux de thèse de M Kovacs sont pour cela tout à fait importants pour le domaine dans l'ouverture de pistes de recherches majeures qui devront être explorées à l'avenir.

Pour toutes ces raisons, je soutiens sans réserve la demande de M. Yoann Kovacs de soutenir sa thèse devant jury.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M Mericskay', with a stylized flourish underneath.

Dr Mathias Mericskay, Directeur de recherche INSERM

**Maladies Rares,
Génétique et
Métabolisme
INSERM U1211**

Objet : Rapport de thèse
de M. Yoann KOVACS

Bordeaux, 26 septembre 2022,

Contact :

Dr. Rodrigue
ROSSIGNOL
DR2 INSERM
INSERM U1211
rodrigue.rossignol@u-bordeaux.fr

Rapport de la thèse : Rôle de la protéine découplante mitochondriale Ucp2 dans la régulation du métabolisme et de la maturation des cardiomyocytes néonataux.

Le travail de thèse de **M. Yoann KOVACS** porte sur le métabolisme cardiaque et la maturation des cardiomyocytes. La thèse se focalise sur l'étude de la **protéine mitochondriale UCP2** et de son rôle sur le contrôle épigénétique. Cette thèse s'inscrit aussi dans la recherche biomédicale à travers l'identification du rôle causal ou modulateur d'UCP2 dans la sévérité des maladies cardiaques, via son activité régulatrice des flux de substrats issus du cycle de Krebs. L'oxydation des acides gras et le rôle de l'oxoglutarate sont alors plus particulièrement étudiées pour comprendre la modulation observée de la maturation des cardiomyocytes murins. **Cette recherche à la fois fondamentale, et appliquée aux maladies cardio-métaboliques, en relation avec le métabolisme des acides gras**, accroît nos connaissances sur la maturation des cardiomyocytes. Le travail de M. Yoann KOVACS est sanctionné par deux articles en préparation et un article de collaboration publié dans Scientific Reports.

EVALUATION DU MANUSCRIT DE THESE:

Le document d'environ 260 pages est rédigé en langue française (à l'exception de la partie N°3 des résultats, en langue anglaise). Il se distingue tout d'abord par une organisation claire et logique, ainsi que par une rédaction de grande qualité qui rend sa lecture très agréable. Tous les points requis pour la compréhension du travail de thèse sont abordés dans cette introduction: la physiologie et la bioénergétique cardiaques, le développement des cardiomyocytes et les protéines UCP1 et 2. J'ai apprécié la clarté et l'utilité des nombreuses figures, notamment les figures 34 (export des métabolites par UCP2) et 46 (fonction épigénétique d'UCP2). Cette introduction démontre ainsi une **bonne connaissance de la physiologie cardiaque et du métabolisme énergétique et lipidique en lien avec l'épigénétique.**

Les questions biologiques sont alors posées de façon claire dans la partie 'Objectifs des Travaux' qui se focalise sur la régulation du métabolisme du cœur néonatal par la protéine UCP2.

Résultats. Partie 1 - La régulation du métabolisme par Ucp2 est requise pour assurer la maturation des cardiomyocytes néonataux (co-premier auteur en préparation). Ce travail s'appuie sur l'analyse multi-omique du modèle murin *ucp2* -/- et la caractérisation métabolique et développementale du cœur néonatal. Des voies de signalisation sont identifiées avec notamment une voie impliquée dans l'adressage des protéines mitochondriales. Une inhibition de régulateurs de la biogenèse mitochondriale est aussi observée, associée à une inhibition de la respiration. La glycolyse est aussi inhibée de même que la machinerie de bêta-oxydation des acides gras. Enfin, une diminution de l'activité AMPK est observée suggérant une régulation de cette voie par UCP2. Le mécanisme reliant UCP2 et la voie LKB1/AMPK reste à préciser. Les conséquences de l'altération bioénergétique sur la signalisation REDOX, la fonctionnalité des cardiomyocytes et leur programme de maturation sont alors détaillées. Ce travail original met donc en évidence l'impact d'un KO d'*ucp2* dans le cœur néonatal murin à plusieurs niveaux biochimiques et génétiques. La coordination entre les différents effets observés pourrait faire appel à plusieurs mécanismes.

Résultats. Partie 2 - L'inhibition d'Ucp2 par la génipine entraîne l'activation rédox-dépendante de la voie p38MAPK et l'inhibition de la prolifération des cardiomyocytes néonataux. Ici, le rôle 'antioxydant' d'UCP2 est étudié dans le cœur néonatal de souris à l'aide d'un inhibiteur, la génipine. Un effet sur les ROS et la signalisation p38MAPK est identifié, ainsi que les conséquences pour la prolifération des cardiomyocytes. Ce travail original propose un mécanisme qui relie UCP2 et le contrôle de la prolifération des cardiomyocytes. La contribution des effets bioénergétiques, REDOX et épigénétiques de l'UCP2 au contrôle de la prolifération pourront être discutés.

Résultats. Partie 3 Egr1 loss-of-function promotes beige adipocytes differentiation and activation specifically in inguinal subcutaneous white adipose tissue (article de collaboration publié dans Scientific Reports). Le rôle d'Egr1 dans le contrôle d'UCP1 et de la reprogrammation métabolique en faveur de la consommation énergétique est mis en évidence dans le tissu adipeux de souris avec des différences selon le type brun ou blanc. La question de la spécificité tissulaire observée est centrale dans ce travail.

Une conclusion générale avec de nombreuses perspectives, notamment cliniques, est proposée à la fin de la thèse, permettant de synthétiser l'apport du travail de M. Kovacs au niveau de la reprogrammation métabolique des cardiomyocytes et des adipocytes. La régulation de la dynamique mitochondriale dans les cardiomyocytes est alors évoquée de même que le mode de fonctionnement d'UCP2 pendant la maturation cardiaque néonatale.

Conclusion : Mon appréciation sur le travail de M. Yoann KOVACS est très favorable. Les résultats obtenus sont originaux et d'un très bon niveau scientifique comme attesté par la lecture de deux publications en préparation. Le candidat à la thèse a clairement mis en œuvre de nombreuses méthodes de biologie moléculaire et de biologie cellulaire mais aussi de physiologie mitochondriale et de bioénergétique difficiles à maîtriser, pour découvrir la fonction de la protéine UCP2 dans le cœur néonatal. Je donne donc mon accord pour la soutenance orale de la thèse au cours de laquelle je poserai plusieurs questions sur le travail réalisé. Aucune modification du document écrit n'est requise.



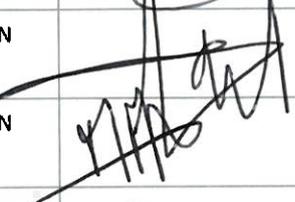
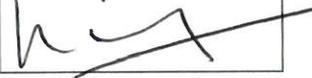
RAPPORT DE SOUTENANCE
Doctorant : Yoann KOVACS
Titre de la thèse : Rôle de la protéine découplante mitochondriale Ucp2 dans la régulation du métabolisme et de la maturation des cardiomyocytes néonataux

École doctorale : Complexité du vivant

Date et heure de la soutenance : 7 octobre 2022 à 14h00

Président du jury (indiquer le nom et prénom) :

Membres du jury :

Civilité, NOM, Prénom	Fonction	Titre	Visio conférence	Signature
M. Bertrand FRIGUET	Directeur de thèse	Professeur des universités	NON	
M. Rodrigue ROSSIGNOL	Rapporteur	Directeur de recherche	NON	
M. Mathias MERICKSKAY	Rapporteur	Directeur de recherche	NON	
M. Giovanni BÉNARD	Examineur	Directeur de recherche	NON	
Mme Francesca ROCHAIS	Examinatrice	Chargée de recherche	NON	
Mme Aurore L'HONORÉ	Co-encadrante de thèse	Maître de conférences	NON	
Mme Patricia SERRADAS PACHECO	Examinatrice	Professeure des universités	NON	

Les membres du jury attestent avoir pris connaissance de l'intégralité du rapport ci-dessous. La Direction de la thèse atteste ne pas avoir pris part à la décision.

Utiliser l'espace ci-dessous et le verso de ce document pour rédiger le rapport de soutenance.

Si exceptionnellement le rapport de soutenance est rédigé dans une autre langue que le français, la traduction en français de ce document devra être signée par le président du jury. Si le rapport comporte plusieurs pages ou s'il est rédigé sur un document distinct, il devra être paraphé sur chaque page et signé par le Président du jury.

RAPPORT :

au verso

Rapport de soutenance de doctorat

Monsieur Yoann Kovacs a présenté puis discuté devant le jury les résultats de ses recherches portant sur le rôle de la protéine découplante mitochondriale Ucp2 dans la régulation du métabolisme et de la maturation des cardiomyocytes néonataux.

Pendant son exposé des travaux, dont la qualité a été soulignée par le jury, Monsieur Kovacs a mis en exergue le rôle essentiel d'Ucp2 dans la régulation métabolique du cœur néonatal, et l'existence d'un nouveau type de signalisation mitochondriale initiant la maturation cardiaque post-natale. La discussion qui a suivi la présentation orale a été très riche et approfondie. En répondant avec clarté et pertinence aux questions, Monsieur Yoann Kovacs a mis en évidence l'esprit critique dont il fait preuve ainsi que la maîtrise des concepts. Sa connaissance bibliographique ainsi que sa démarche de réflexion sur le travail effectué et les perspectives qu'ils ouvrent, ont été particulièrement appréciées.

Après délibération, le jury à l'unanimité, a déclaré Monsieur Yoann Kovacs admis au diplôme de Docteur de Sorbonne Université (aucune mention n'est délivrée, conformément à la réglementation en vigueur) et l'a félicité pour la qualité du travail réalisé.

La présidente du jury
Pr. Patricia Serradas

