



**HAL**  
open science

**Rôle de PGC-1 $\alpha$  dans le système cardiovasculaire :  
recherche d'activateurs cœur-spécifiques et étude de ses  
mécanismes de régulation dans le muscle lisse aortique**

Matthieu Ruiz

► **To cite this version:**

Matthieu Ruiz. Rôle de PGC-1 $\alpha$  dans le système cardiovasculaire : recherche d'activateurs cœur-spécifiques et étude de ses mécanismes de régulation dans le muscle lisse aortique. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114830 . tel-00834420

**HAL Id: tel-00834420**

**<https://theses.hal.science/tel-00834420>**

Submitted on 15 Jun 2013

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

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

# UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

FACULTE DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY

**ECOLE DOCTORALE :**

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

*PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE*

ANNÉE 2011 – 201

SÉRIE DOCTORAT N° 1175

**THÈSE DE DOCTORAT**

soutenue le 14/09/2012

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

par

**Mr Matthieu RUIZ**

**Rôle de PGC-1 $\alpha$  dans le système cardiovasculaire :**

Recherche d'activateurs cœur-spécifiques

et

Etude de ses mécanismes de régulation dans le muscle lisse aortique.

**Directeur de thèse :** Dr Anne GARNIER

**JURY :**

*Président :* Pr Marc PALLARDY

*Rapporteurs :* Pr Christine des ROSIERS  
Dr Rodrigue ROSSIGNOL

*Examineurs :* Dr Jane-Lise SAMUEL  
Dr Hervé SANCHEZ

## REMERCIEMENTS

---

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance à Christine des Rosiers et Rodrigue Rossignol pour avoir bien voulu expertiser ce travail et me faire l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi tout naturellement à Jane-Lise Samuel et Hervé Sanchez d'avoir accepté leur rôle d'examineurs dans l'évaluation de ce travail.

Je n'oublie évidemment pas Marc Pallardy qui outre son rôle d'examineur a accepté la présidence de ce jury et auprès de qui j'ai pu découvrir durant ces 4 années « *les dessous* » de la recherche et de l'ED 425 via la commission recherche et l'ADIT. Ces expériences transversales ont été enrichissantes à tout point de vue.

Un grand merci à Rodolphe Fischmeister, directeur de l'U769 sans qui le labo ne serait pas ce qu'il est. Merci pour ton accueil, ta capacité à rendre ce lieu de travail aussi convivial que plaisant. Par ta culture tant générale que scientifique, tu apportes un savoir de qualité qui ne passe sans doute pas inaperçu dans le monde de la recherche. Ce fut un réel plaisir de travailler dans ton unité et d'avoir eu accès à ton savoir dans tant de domaines. Je te souhaite sincèrement une poursuite à la hauteur de tes espérances.

A toi Anne Garnier, je tiens à t'adresser mes remerciements les plus sincères. Je n'aurai décidément pas pu rêver mieux comme encadrante de thèse. Travailler en ta compagnie a été un réel plaisir et un bonheur sans fin. Par ta rigueur, ton intelligence et ta grande confiance en moi, ce travail n'en est devenu que plus agréable malgré les grandes difficultés rencontrées et notre point commun essentiel : le mauvais œil ! Plus sérieusement, je te souhaite le meilleur à venir tant tu mérites de pouvoir être heureuse tout simplement ! Un grand merci pour tout « *nanas* » !

Que serait l'équipe sans toi Renée ? On a tant à apprendre de toi. Tu as tout d'une grande dame généreuse, brillante et rayonnante. Tu apportes un climat de confiance de manière si naturelle que venir chaque jour au labo se fait sans peine. Merci aussi pour ton aide et ta disponibilité. Je te dois aussi grandement la réussite de cette thèse. Que l'avenir te réserve d'agréables surprises... ton départ à la retraite sera cependant une grande perte pour le monde de la recherche.

Dom, tant de choses à dire... Mille mercis... Merci pour ton soutien, ta disponibilité, ton aide au quotidien. Tu crois souvent le contraire, mais ton grand cœur fait de toi une personne exceptionnelle. Travailler à tes côtés fut un atout inestimable. Je te dois beaucoup dans l'avancée de ma thèse et tu vas vraiment beaucoup me manquer, tant au niveau professionnel que privé. Nos petites sorties à la brasserie de Châtenay avec Steph, nos discussions le matin aux aurores, ta franchise et ta capacité à apporter le rire m'ont apporté une bouffée d'oxygène permanente. Encore merci pour tout, ne changes pas et je te souhaite le meilleur à venir...

Je ne peux évidemment pas oublier Flo, Françoise, Sophie et Patrick. Flo ces journées de dissoc en ta compagnie dans une ambiance musicale et amicale, nos discussions sur les marches de la tour D4, me manqueront inévitablement.

Françoise, ou devrai-je dire notre maman du labo. Tes qualités sont si nombreuses que les énumérer me prendrait une éternité. Ta gentillesse, ton attention aux autres et ton travail acharné à faire tourner la boutique contribuent à 300% à faire que le labo soit et reste un endroit chaleureux et où travailler se fait sans peine.

Ma petite sophie verte, toi qui court à travers les étages, pointes de cônes et autoclave sont tes alliés mais ta gentillesse ton meilleur atout. Merci pour toutes tes petites attentions qui font chaud au cœur.

Patrick, je crois que nos cafés partagés le matin quand tout le monde commence doucement à se réveiller me manqueront énormément ! Calme, sang froid et sérénité resteront gravés dans ma mémoire ! Merci pour ta disponibilité au moindre petit souci technique informatique and co. A ce jour ton horoscope t'annonce un avenir radieux ;)

Encore merci à vous, sans qui le labo serait bien monotone et morne.

Chers compatriotes « *ciblotiens* » ! Jean-Paul, travailler à tes côtés a été un réel plaisir. Merci pour tes conseils toujours avisés et justes, ta disponibilité tant pour les réflexions scientifiques que plus générales. Je crois pouvoir affirmer que ma formation actuelle ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui sans toi. A toutes mes questions métaphysiques, tu n'as jamais renoncé et m'a toujours écouté ! Je te souhaite sincèrement le meilleur à venir !

Delphine, je n'aurai jamais assez de ces quelques lignes pour te faire part de toute ma reconnaissance. Tu es une personne extraordinaire aussi bien humainement que professionnellement. J'ai beaucoup appris avec toi, à la paillasse évidemment, mais également à ne jamais lâcher prise et toujours positiver et aller de l'avant. Tu m'as continuellement apporté ton soutien et ton aide sur ces étapes « *ciblotiennes* ». Alors je t'adresse un grand MERCI pour tout ça et j'espère que tous tes projets se réaliseront à la hauteur de tes qualités inestimables.

Jean-Christophe, merci pour ton implication à la partie robotique. Il est vrai que nous n'avons malheureusement exploité qu'un petit 10<sup>ème</sup> de toutes les programmations, mais tu n'as jamais hésité à adapter les protocoles à ma demande et toujours avec cette humeur joviale qui est la tienne ! Merci aussi pour ces moments de détente (avec JP et Delphine aussi) autour d'un café qui ont aussi eu leur importance au maintien du moral des troupes ! Merci à toi et bon courage pour la suite.

A mes collègues et amis thésards... Bien plus qu'une relation de travail, les amitiés développées ont été multiples et bienheureuses :

- Steph, tu es partie bien trop vite à mon goût mais malgré tout ce début de thèse passé à tes côtés a été fantastique. C'est en toute sincérité que je te dis merci pour ton soutien, ton amitié et ta joie de vivre constante. Tu as été un vrai petit rayon de soleil, et j'espère que l'on aura encore beaucoup à partager. Je te souhaite de trouver ta voie ou en tout cas celle que tu mérites.

- Delphine, ce mariage fut bref mais intense ! Merci pour tous ces bons moments partagés.

- Jéjé, à quand tu veux pour une soirée gitane dans le sud de la France, ce fut mémorable et vraiment très chouette.

- Les amis du 5, Fabio, hindouda et zeinouba, merci pour ces moments de franche rigolade autour du bar, la manette en main ou simplement à la croisée d'un ascenseur. En tout cas qu'une chose à dire les « cowboys » n'ont qu'à bien se tenir !

- toulousain(e)s pour de faux, mag, Ane-Co et Alex, qu'est ce que j'ai pu vous envier, même si faut avouer que votre départ était bien trop précoce ! Mais à bon entendeur rendez-vous à « la maison » !

- Cacafofic, mon yang (je trouvais que c'était mieux que mon « côté masculin !), l'absence de tes bruitages va me laisser un vide... Mais bien plus que ça, ta sincère amitié me manquera beaucoup et même nos « road trips » en congrès...

- Claire et Cécile, peu de temps, mais beaucoup de partages agréables. Claire, j'espère réellement que nos chemins se recroiseront, qui sait en Belgique ou du côté de Carcassonne ! Cécile, je me ravis de pouvoir très prochainement te rejoindre et partager quelques canons et autres délices de la vie canadienne !

- Giada, ce fut un réel plaisir de participer à ta formation. Tu es vraiment une fille brillante et je suis persuadé que tu iras très loin. Merci aussi pour cette initiation à la culture italienne et pour ton amitié que j'espère continuera longtemps !

- Marianne, Ana (et oliver !), Alejandro et gaëlle, à chacune (et chacun, oliver je ne t'oublie pas !) merci de m'avoir permis de ne pas rester trop longtemps dans ma tour d'ivoire ! J'ai apprécié chaque moment passé avec vous. Les chemins se croisent et le temps passe hélas trop vite mais c'est le moment présent et chaque instant vécu qui compte.

Eric et isabelle, un grand merci pour la confiance que vous m'avez apporté pour les enseignements, et votre appui pour l'obtention du poste d'ATER. Ces années d'abord en tant que moniteur puis en tant qu'ATER m'ont beaucoup appris sur le métier d'enseignant, et non Eric je ne renoncerai pas ! Isa, je te souhaite sincèrement le meilleur à venir, tu le mérites réellement. Merci pour ton aide, ta gentillesse et ton investissement hors pair dans l'organisation des TP. Eric, merci pour ton soutien continu et le fait de croire en moi (un peu trop peut-être !). Et je crois même que ton organisation disons particulière arrivera à me manquer ! Mais Audrey sera là pour te cadrer ! Merci à toi aussi Audrey pour ta gentillesse. Bonne chance pour la suite à tous les 2.

J'en profite également pour remercier Jérôme Leroy tant pour les cafés/clopes du matin dans la bonne humeur, que pour ton aide précieuse pour les enseignements en physiologie.

Je remercie aussi chaque membre du labo, pour ce que chacun permet de construire au jour le jour. Merci à Véro, Ana-maria, Maryline, Greg, Philippe, Jean-Pierre, Vincent Boris, Pierre, Christophe et Alex. Merci aussi à Vovo et Fred, Vovo et sa guitare, Fred et son militantisme, merci à tous les deux pour votre confiance durant ces 10 mois de discussion et de co-encadrement avec Giada !

Je tiens maintenant à remercier chaleureusement mes amis decazevillois et issus d'autres villages du sud, avec qui j'ai démarré mon imprégnation dans la science, qui m'ont soutenu tout au long de cette thèse, qui ont toujours été présents dans les moments de doute et de panique et qui ont su m'offrir un espace de réconfort et une échappatoire. Merci à Romain et Audrey, Niny et Nathan, Bastou et Lucie, Claire et tous les autres.

Je ne peux oublier non plus mes amis « papiens » et poitevins d'un jour, qui malgré l'éloignement m'ont aidé à garder le cap et sont restés fidèles à notre grande amitié. Merci à Charlotte, Coco et Doudou, Cokine et Arnaud, Titou, Coquette, Sophie et Do.

Restons un petit peu dans le poitou...merci à Clarisse et Jocelyn pour ces stages de M1 et M2 bien agréables. Merci aussi pour l'opportunité que j'ai pu saisir ici à Châtenay. C'est un peu aussi grâce à vous.

Annie U, Florent C, Stéphanie B, merci pour tous les moments de réconfort et de soutien, je vous dois beaucoup... Merci également à toute la compagnie, Malou et Florent, Laure, Vincent et Aline, Emilie, merci pour tous ces partages qui font du bien, et votre amitié qui porte et aide à avancer. J'en profite pour une petite pensée pour Mag S, ça fait du bien de

pouvoir se comprendre sur les mêmes problèmes de fond ! Bon courage à toi, chacun son tour !!

Quand on est loin de chez soi, c'est toujours un bonheur de recréer son petit cocon. Merci à Minipouce et Manuréva pour ce « come-back » des colocataires ! Et malgré le temps, kéké et Rérette vous en faites toujours un peu partie ! Merci à chacun et chacune pour toutes ces années de colocation qui bien plus qu'une cohabitation, nous a permis de tisser des liens indémêlables.

Et puis parce que pouvoir conserver son jardin secret, ce petit brin d'évasion qui nous détache de tout ce qui nous entoure, permet de se ressourcer juste ce qu'il faut, un grand merci à qui de droit ;)

Evidemment, je dois beaucoup pour ce que je suis devenu aujourd'hui à mes parents qui m'ont toujours soutenu, aiguillé, écouté et conforté. Merci Maman et François, Papa pour votre soutien invétéré ainsi que vos encouragements. Je ne peux oublier non plus Vanessa, Yohan, Léna, Amélia, Priscilla, qui chacun à leur façon m'a apporté ce petit quelque chose qui fait chaud au cœur.

Enfin je dédie tout naturellement cette thèse à ma marraine et mes grands-parents...

## TABLE DES MATIERES

---

RESUME .....	10
ABSTRACT .....	11
LISTE DES ABBREVIATIONS .....	12
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	16
AVANT-PROPOS .....	20
INTRODUCTION .....	22
<b>Chapitre I. Le cœur, organe contractile et principal consommateur d'énergie.....</b>	<b>22</b>
<b>I) Fonction contractile cardiaque .....</b>	<b>23</b>
1) Organisation du cardiomyocyte .....	25
a. Les myofilaments .....	25
b. Le réticulum sarcoplasmique (RS) .....	27
c. Les tubules transverses (tubules T) .....	28
d. La mitochondrie .....	29
2) Couplage excitation-contraction .....	32
a. Bases fonctionnelles .....	32
b. Bases anatomiques .....	33
<b>II) Métabolisme énergétique cardiaque.....</b>	<b>35</b>
1) La mitochondrie, carrefour métabolique .....	36
a. Catabolisme du glucose .....	37
b. Catabolisme des acides gras .....	41
c. Cycle de Krebs .....	48
d. Phosphorylation oxydative .....	49
2) Transferts énergétiques .....	52
a. Canalisation directe .....	52
b. Système créatine kinase .....	53
c. Système adénylate kinase .....	55
<b>Chapitre II : Contrôle de la biogenèse mitochondriale .....</b>	<b>58</b>
<b>I) Contrôle coordonné de la biogenèse mitochondriale .....</b>	<b>60</b>
1) Expression des protéines mitochondriales .....	60
a) Coordination entre les génomes nucléaires et mitochondrial .....	60
b) Expression et transport des protéines mitochondriales .....	61
c) Contrôle transcriptionnel .....	64
2) Le co-activateur transcriptionnel PGC-1 $\alpha$ et la biogenèse mitochondriale .....	71
a) Découverte de PGC-1 $\alpha$ .....	71
b) Rôle de PGC-1 $\alpha$ dans la biogenèse mitochondriale .....	71
c) Activité transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$ .....	72
<b>II) PGC-1<math>\alpha</math>, chef d'orchestre de la fonction mitochondriale .....</b>	<b>75</b>
1) Exemple de l'exercice physique.....	76
a) Adaptations métaboliques du muscle squelettique .....	75
b) Adaptation à l'exercice et tissu spécificité .....	82
c) Régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles de PGC-1 $\alpha$ .....	83
2) Place de PGC-1 $\alpha$ dans le cœur ? .....	100
a) La restriction calorique .....	101
b) Modèles de surexpression de PGC-1 $\alpha$ .....	101

c) <i>Modèles d'inactivation de PGC-1<math>\alpha</math></i> .....	103
3) PGC-1 $\beta$ et PRC, homologues de PGC-1 $\alpha$ .....	105
a) <i>Homologie de séquence</i> .....	105
b) <i>PGC-1<math>\beta</math></i> .....	106
c) <i>PRC</i> .....	107
4) Conclusion chapitre II.....	108
<b>Chapitre III : le cœur défaillant, « moteur en panne d'essence » : cas de l'insuffisance cardiaque.....</b>	<b>110</b>
<b>I) Altérations du métabolisme énergétique dans l'insuffisance cardiaque.....</b>	<b>111</b>
1) Utilisation des substrats.....	111
a) <i>Métabolisme des acides gras</i> .....	111
b) <i>Métabolisme des hydrates de carbone</i> .....	113
c) <i>Schéma bilan</i> .....	115
2) Altérations structurales et fonctionnelles de la mitochondrie.....	116
a) <i>Dysfonction de la chaîne respiratoire</i> .....	117
b) <i>Stress oxydant</i> .....	117
3) Altération des transferts énergétiques.....	118
<b>II) Biogenèse mitochondriale et insuffisance cardiaque.....</b>	<b>119</b>
1) Modèles expérimentaux animaux.....	120
2) Cardiomyopathies humaines.....	122
<b>III) Vers un concept de thérapie métabolique de l'insuffisance cardiaque.....</b>	<b>126</b>
1) Diagnostic et pronostic vital de l'IC.....	126
2) Traitements usuels de l'IC.....	126
3) Thérapies métaboliques.....	128
a) <i>Modulateurs indirects</i> .....	129
b) <i>Modulateurs directs</i> .....	129
4) PGC-1 $\alpha$ , une nouvelle cible thérapeutique de l'insuffisance cardiaque ?.....	131
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>138</b>
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>138</b>
<b>I) Modèles expérimentaux.....</b>	<b>138</b>
1) Modèle animal : les rats Dahl sensibles au sel.....	138
a) <i>Description de la souche</i> .....	138
b) <i>Conditionnement et traitement des rats (Figure 57)</i> .....	139
2) Modèles cellulaires.....	140
a) <i>Lignée cellulaire cardiomyoblastique H9c2</i> .....	140
b) <i>Culture primaire de cardiomyocytes de rats adultes</i> .....	141
c) <i>Culture primaire de cellules musculaires lisses (CML) d'aortes de rats</i> .....	143
<b>II) Réactivité vasculaire.....</b>	<b>146</b>
1) Préparation et montage des anneaux d'aorte.....	146
2) Evaluation de la capacité contractile.....	147
3) Evaluation de la fonction endothéliale.....	148
4) Evaluation de la fonction musculaire.....	149
<b>III) Mise en place d'un test cellulaire de criblage ou test cellulaire robotisé pour la recherche de nouveaux activateurs de PGC-1<math>\alpha</math>.....</b>	<b>150</b>
1) Etablissement du test cellulaire.....	150
a) <i>Etablissement de la construction PGC-1<math>\alpha</math>/GLuc</i> .....	150



b)	<i>Etablissement de la lignée stable H9c2</i> .....	163
c)	<i>Mesures de la luminescence et validation de la lignée stable</i> .....	164
2)	Extraction d'ARNm et transcription inverse (RT) sur plaque .....	170
a)	<i>Purification des ARNm</i> .....	170
b)	<i>Synthèse des ADNc ou transcription inverse</i> .....	171
3)	Mesure de la viabilité cellulaire .....	171
a)	<i>Test du bleu alamar</i> .....	171
b)	<i>Mesure du contenu cellulaire en ADN</i> .....	173
4)	Protocole général du test cellulaire robotisé (TCR).....	173
<b>IV)</b>	<b>Etude de l'expression des gènes par PCR quantitative en temps réel.....</b>	<b>180</b>
1)	Stimulation des cellules.....	180
a)	<i>Cardiomyocytes de rats adultes</i> .....	180
b)	<i>Cellules musculaires lisses de rat adulte</i> .....	180
2)	Extraction des ARN totaux : méthode au Trizol/chloroforme .....	180
a)	<i>Lyse des cellules</i> .....	180
b)	<i>Séparation ARN/ADN/protéines</i> .....	181
c)	<i>Précipitation des ARNs</i> .....	181
3)	Analyse qualitative et quantitative des ARNs.....	182
4)	Transcription inverse.....	182
a)	<i>Kit Superscript 2 (Invitrogen)</i> .....	183
b)	<i>Kit IScript (BioRad)</i> .....	183
5)	PCR quantitative selon la technologie « SYBR Green » .....	183
a)	<i>Principe</i> .....	183
b)	<i>Couples d'amorces utilisés</i> .....	184
c)	<i>Protocoles</i> .....	185
d)	<i>Analyse des résultats</i> .....	187
<b>V)</b>	<b>Etude de la viabilité des cardiomyocytes.....</b>	<b>189</b>
1)	Principe du dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) totale .....	189
2)	Interprétation des mesures de spectrophotométrie .....	190
<b>VI)</b>	<b>Etude de l'expression des protéines.....</b>	<b>191</b>
1)	Extraction des protéines .....	191
2)	Dosage des protéines par la méthode BCA (bicinchoninic acid).....	192
3)	Semi-quantification de l'expression de protéines spécifiques par western blot.....	193
a)	<i>Séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE</i> .....	193
b)	<i>Electrotransfert</i> .....	194
c)	<i>Immunorévélation</i> .....	195
4)	Anticorps utilisés.....	196
5)	Analyse des résultats .....	197
<b>VII)</b>	<b>Etude de la fonction mitochondriale.....</b>	<b>197</b>
1)	Principe.....	198
2)	Enregistrement et analyse des données .....	199

**RESULTATS..... 200**

<b>Chapitre I. Recherche d'activateurs du co-activateur transcriptionnel PGC-1<math>\alpha</math> dans un contexte cardiaque spécifique .....</b>	<b>200</b>
<b>I) Présentation .....</b>	<b>200</b>
<b>II) Résultats et discussion.....</b>	<b>202</b>
<b>III) Conclusion.....</b>	<b>203</b>

<b>Chapitre II. Etude de la régulation de la biogenèse mitochondriale dans le muscle lisse en situation de stress oxydant et influence du Resvératrol.....</b>	<b>204</b>
<b>I) Contexte de l'étude.....</b>	<b>204</b>
<b>II) Présentation .....</b>	<b>206</b>
<b>III) Résultats et discussion.....</b>	<b>207</b>
<b>IV) Conclusion.....</b>	<b>208</b>
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>209</b>
<b>Chapitre I. Identification de nouveaux activateurs de PGC-1<math>\alpha</math> dans le cœur .....</b>	<b>209</b>
<b>I) Choix du test cellulaire développé .....</b>	<b>210</b>
1) Choix du type cellulaire .....	210
2) Avantages du TCR développé.....	211
3) Inconvénients du TCR développé .....	212
<b>II) Discussion autour des activateurs sélectionnés.....</b>	<b>213</b>
1) Les hormones stéroïdiennes : $\beta$ -oestradiol et progestérone .....	214
2) Les Vitamines B.....	222
3) Les acides gras .....	229
<b>Chapitre II. Biogenèse mitochondriale dans l'hypertension artérielle et rôle du resvératrol.....</b>	<b>238</b>
<b>I) Le resvératrol, molécule aux multiples facettes.....</b>	<b>238</b>
<b>II) Effets bénéfiques du resvératrol sur la fonction cardiovasculaire .....</b>	<b>238</b>
<b>III) Contrôle de la biogenèse mitochondriale dans l'hypertension artérielle et influence du resvératrol.....</b>	<b>240</b>
1) Comportement de la biogenèse mitochondriale des cellules musculaires lisses pathologiques .....	240
2) Paradoxe du resvératrol sur le contrôle de la biogenèse mitochondriale vasculaire.....	241
3) Stress oxydant et biogenèse mitochondriale .....	242
4) La CaMKII, senseur moléculaire du stress oxydant .....	244
5) Conclusion.....	246
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>250</b>

## RESUME

---

L'insuffisance cardiaque (IC) reste la cause majeure de morbidité dans les pays industrialisés justifiant ainsi la recherche de traitements plus ciblés. Caractérisée par des désordres métaboliques importants qui impliquent notamment une dysfonction mitochondriale, le métabolisme énergétique apparaît comme une composante majeure du développement de l'IC. Ces dernières années, le co-activateur transcriptionnel PGC-1 $\alpha$  a été proposé comme un acteur central du contrôle de la fonction mitochondriale et constitue ainsi une cible thérapeutique d'intérêt.

Ainsi, l'objectif principal de ce travail est de développer un test cellulaire robotisé permettant la recherche d'activateurs de PGC-1 $\alpha$  dans un contexte cardiaque.

La mise en place de ce test cellulaire de criblage dans des cellules H9c2 différenciées en cellules pseudo-cardiaques a permis l'identification de trois familles majeures : les hormones stéroïdiennes, les vitamines B et les acides gras, capables d'activer l'expression de PGC-1 $\alpha$  et par ce biais d'induire une biogenèse mitochondriale ainsi qu'une augmentation de la respiration mitochondriale. La validation de ces effets dans des cardiomyocytes de rat adulte a permis d'une part de valider la pertinence du test et du choix du modèle cellulaire et d'autre part de vérifier qu'une induction de l'expression de PGC-1 $\alpha$  se répercute bien sur la cascade transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale. Ce test constitue donc un atout majeur dans la recherche de nouveaux activateurs de PGC-1 $\alpha$  pour mieux comprendre ses mécanismes de régulation dans le cœur, mais offre aussi des perspectives intéressantes pour la recherche de composés pharmacologiques à visée thérapeutique.

Par ailleurs, peu de connaissances sont disponibles dans la littérature concernant le contrôle de la biogenèse mitochondriale dans le muscle lisse vasculaire et plus particulièrement dans l'hypertension artérielle. Ainsi, la deuxième partie de ce travail a été de caractériser la biogenèse mitochondriale dans un contexte d'hypertension. A travers l'utilisation d'un modèle expérimental d'hypertension et après confirmation dans des cellules musculaires lisses en culture, nous avons montré une induction importante de la biogenèse mitochondriale dans l'hypertension par un mécanisme stress oxydant-dépendant. De plus, cette induction est corrélée à une forte activation de la CaMKII, totalement bloquée par la présence d'un anti-oxydant : le resvératrol. Ces résultats suggèrent donc un contrôle de la biogenèse mitochondriale dépendante de la balance pro/anti-oxydante via l'activation de la CaMKII dans le muscle lisse vasculaire.

## ABSTRACT

---

Heart failure (HF) is still the major cause of morbimortality in industrialized countries that justify the research of new treatments. Characterized in part by metabolic disorders including mitochondrial dysfunction, energetic metabolism appears as an essential component in HF development. These last years, PGC-1 $\alpha$  has been proposed as a central actor of mitochondrial function control and thus as a therapeutic target of interest.

The development of a cellular robotized assay in cardiac-like differentiated H9c2 cells allowed identification of three families: steroid hormones, B vitamins and fatty acids, able to induce the expression of PGC-1 $\alpha$  and thus up-regulate mitochondrial biogenesis and mitochondrial respiration. The validation of these effects in adult rat cardiomyocytes lets in the one hand to validate the suitability of the assay and in the other hand to confirm that PGC-1 $\alpha$  induction leads to mitochondrial biogenesis activation. Consequently, this assay constitutes a major asset to find new activators of PGC-1 $\alpha$  to better understand its regulation in heart and provides interesting perspectives for the research of therapeutic pharmacologic compounds.

Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis in response to hypertension in vascular smooth muscle remain unclear. In this context, the second part of this work was to identify how mitochondrial biogenesis is modulated in arterial hypertension. Using an experimental model of hypertension and after validation in cultivated smooth muscle cells, we show a mitochondrial biogenesis induction in response to hypertension in relation with an increase in oxidative stress. Moreover, this induction is associated with a significant increase in CaMKII activity which was totally blocked by an antioxidant: resveratrol. These results suggest a regulation of mitochondrial biogenesis by oxidative stress via a CaMKII mechanism in vascular smooth muscle.

## LISTE DES ABBREVIATIONS

---

ACC	<i>acetyl-CoA carboxylase</i>
ACS	<i>acetyl-CoA- synthase</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNmt	ADN mitochondrial
ADP	adénine diphosphate
AG	acide gras
AK	adénylate kinase
AMP	adénosine monophosphate
AMPc	AMP cyclique
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ANDn	ADN nucléaire
ANF	<i>atrial natriuretic factor</i>
ANP	<i>atrial natriuretic peptide</i>
ANT	adénine nucleotide transférase
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
ATF2	<i>activating transcription factor 2</i>
ATP	adénosine triphosphate
BET	bromure d'éthidium
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
Ca <sup>2+</sup>	<i>calcium</i>
CACT	<i>carnitine-acylcarnitine translocase</i>
CaMK	<i>calcium-calmoduline kinase</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CD36	<i>cluster of differentiation 36</i>
ChiP	<i>chromatin immunoprecipitation</i>
cHSP70	<i>cytosolic heat shock protein</i>
CK	créatine kinase
CnA	calcineurine A
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
COX	cytochrome c oxydase
CPSI	carbamyl-phosphatase synthétase I
CPT1	carnitine palmitoyl transférase 1
CRE	<i>cyclic AMP response element</i>
CS	citrate synthétase
Ct	<i>cycle threshold</i>
DA	domaine d'activation
dNTP	déoxyribonucléotide
DOX	doxycycline
DR	domaine de répression
DRIP	<i>vitamin D interacting protein</i>
DTT	<i>dithiothreitol</i>
E2	œstradiol

ECG	électrocardiogramme
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	<i>estrogen receptor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EROS	espèces réactives de l'oxygène
ERR	<i>estrogen related receptor</i>
FABPc	<i>cytosolic fatty acid binding protein</i>
FABPpm	<i>fatty acid binding protein of the plasma membrane</i>
FADH <sub>2</sub>	flavine adenine dinucléotide réduite
FAT	<i>fatty acid translocase</i>
FATP	<i>fatty acid transport protein</i>
FE	fraction d'éjection
G3P	glycéraldéhyde 3 phosphate
GC	guanylate cyclase
GCN5	<i>general control non repressed 5</i>
Glc-6-P	glucose-6-phosphate
GLuc	gaussia luciférase
GLUT	<i>glucose transporter</i>
GPx	<i>glutathion peroxydase</i>
H <sub>2</sub> O	eau
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	péroxyde d'hydrogène
HHCY	homocystéine
HIF-1 $\alpha$	<i>hipoxia inducible factor-1<math>\alpha</math></i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP	<i>heavy strand promoter</i>
IC	insuffisance cardiaque
IEC	inhibiteurs de l'enzyme de conversion
IGF	<i>insuline growth factor</i>
IL-1	interleukine-1
KDa	kilodalton
KO	<i>knockdown</i>
LB	<i>luria broth</i>
LCAD	<i>long chain acyl-Coa dehydrogenase</i>
LCFA	<i>long chain fatty acid</i>
LDH	lactate déshydrogénase
LSP	<i>light strand promoter</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCAD	<i>medium chain acyl-CoA dehydrogenase</i>
MCS	<i>multi cloning site</i>
MEF2	<i>myocyte enhancer factor 2</i>
Mge1	<i>mitochondrial GrpE1</i>
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
MLC	<i>myosin light chain</i>
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
MLCP	<i>myosin light chain phosphatase</i>
MMA	méthylmalonyl-CoA mutase
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MPP	<i>mitochondrial processing peptidase</i>

MSF	<i>mitochondrial import stimulation factor</i>
NAC	N-acétyl cystéine
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
NAM	nicotinamide
NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransférase
NRF	<i>nuclear respiratory factor</i>
NRRE	<i>nuclear receptor response element</i>
NYHA	<i>new york heart association</i>
O <sub>2</sub>	oxygène
OXPHOS	phosphorylation oxydative
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCr	phosphocréatine
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDH	pyruvate déshydrogénase
PDK	kinase pyruvate déshydrogénase
PEP	phospho-enolpyruvate
PFK	phosphofructokinase
Pfu	<i>pyrococcus furiosus</i>
PGC-1 $\alpha$	<i>peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1<math>\alpha</math></i>
PGC-1 $\beta$	<i>peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1<math>\beta</math></i>
Pi	phosphate inorganique
PI3 kinase	<i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PKB	protéine kinase B
POLMRT	ARN polymérase mitochondriale
PPAR	<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
PRC	<i>PGC-1 related co-activator</i>
QSP	quantité suffisante pour
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
RS	réticulum sarcoplasmique
RT	reverse transcription
RtTA	<i>reverse tetracycline transactivator</i>
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
RyR	récepteur à la ryanodine
SAMI	<i>SAGIAN automated method interface</i>
SDS	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrilamide gel electrophoresis</i>
SERCA	<i>sarcoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SGLT	<i>sodium/glucose transporter</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SIRT1	sirtuine 1
SNAP	S-nitrosothiol-N-acétyl-pénicillamine
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein</i>
SOD	superoxyde dismutase
SRC-1	<i>steroid receptor co-activator 1</i>
SURF-1	surfeit-1
TAC	<i>transverse aortic constriction</i>
Taq	<i>thermus aquaticus</i>
TCR	test cellulaire robotisé
TEP	tomographie par émission de positrons
Tfam	facteur de transcription mitochondrial A

TFBM	<i>transcriptional factor B mitochondrial</i>
TIM	<i>translocase inner membrane</i>
TnC	troponine C
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
TnI	troponine I
TnT	troponine T
TOM	<i>translocase outer membrane</i>
TRAP	<i>thyroid receptor-associated protein</i>
TRE	<i>tetracycline response element</i>
UCP	<i>uncoupling protein</i>
UV	ultraviolet
VEGF	<i>vascular epidermal growth factor</i>



## TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

### FIGURES

Figure 1. Cycle cardiaque.....	23
Figure 2. Organisation d'un sarcomère .....	24
Figure 3. Ultrastructure des myofilaments .....	27
Figure 4. Organisation macroscopique du réticulum sarcoplasmique (RS).....	28
Figure 5. Structure 3D (tomographie) mitochondriale.....	30
Figure 6. Couplage excitation-contraction cardiaque .....	33
Figure 7. Bases moléculaires de la contraction .....	34
Figure 8. Raccourcissement des sarcomères lors de la contraction .....	34
Figure 9. A. Ultrastructure du cardiomyocyte. B. concept de travail à flux tendu .....	35
Figure 10. Voies métaboliques impliquées dans le métabolisme énergétique cardiaque .....	36
Figure 11. Mécanismes d'activation de la translocation de GLUT 4.....	37
Figure 12. Voie de la glycolyse.....	39
Figure 13. Navette malate-aspartate.....	40
Figure 14. Transport des acides gras à longue chaîne mettant en jeu des transporteurs spécifiques.....	43
Figure 15. Transport des acides gras dans la matrice mitochondriale avant $\beta$ -oxydation .....	44
Figure 16. Dégradation des acides gras par $\beta$ -oxydation .....	46
Figure 17. Cycle de Krebs.....	49
Figure 18. Phosphorylation oxydative .....	50
Figure 19. Transfert et couplage énergétique.....	52
Figure 20. Organisation ultrastructurale du cardiomyocyte.....	53
Figure 21. Système de transfert énergétique lié à la créatine kinase (CK) .....	55
Figure 22. Système adénylate kinase .....	56
Figure 23. Biogenèse mitochondriale à l'échelle moléculaire .....	59
Figure 24. Représentation schématique du génome mitochondrial humain .....	60
Figure 25. Sous-unités protéiques de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	61
Figure 26. Transport des protéines mitochondriales .....	63
Figure 27. Contrôle nucléaire de la biogenèse mitochondriale.....	66
Figure 28. Modélisation du complexe d'initiation de la transcription de l'ADNmt .....	69

Figure 29. Structure et fonction de PGC-1 $\alpha$ .....	73
Figure 30. Activation de la transcription : rôle central de PGC-1 $\alpha$ .....	75
Figure 31. Induction de la biogenèse mitochondriale par l'exercice physique.....	78
Figure 32. Contrôle du métabolisme des hydrates de carbone en réponse à l'exercice physique .....	80
Figure 33. Contrôle de l'utilisation des acides gras en réponse à l'exercice physique .....	81
Figure 34. Contrôle de l'angiogenèse via l'axe PGC-1 $\alpha$ /ERR $\alpha$ .....	83
Figure 35. Contrôle de l'expression transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$ via la signalisation calcique .....	86
Figure 36. Contrôle de l'expression de PGC-1 $\alpha$ via la signalisation MAPK.....	88
Figure 37. L'AMPK, senseur énergétique de la cellule .....	89
Figure 38. Contrôle de l'expression de PGC-1 $\alpha$ par l'AMPK .....	91
Figure 39. SIRT1, 2 <sup>ème</sup> senseur énergétique au sein de la cellule .....	92
Figure 40. Régulation de PGC-1 $\alpha$ par acétylation/désacétylation .....	93
Figure 41. Relation entre les voies de signalisation AMPK et SIRT1 .....	94
Figure 42. Production d'espèces réactives de l'O <sub>2</sub> par la chaîne respiratoire mitochondriale. 96	
Figure 43. Signalisation ROS-dépendante sur la régulation transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$ ....	99
Figure 44. Structure comparative des co-activateurs de la famille PGC-1 .....	106
Figure 45. PGC-1 $\alpha$ , chef d'orchestre de la fonction mitochondriale. ....	109
Figure 46. Courbes de survie chez des patients présentant une cardiomyopathie dilatée.....	110
Figure 47. Utilisation et oxydation des acides gras.....	113
Figure 48. Utilisation et oxydation du glucose .....	114
Figure 49. Utilisation des substrats dans le cœur sain et le cœur insuffisant.....	115
Figure 50. Photographies de microscopie électronique de cardiomyocytes de rats contrôles .....	116
Figure 51. Biogenèse et fonction mitochondriale dans l'IC chez le rat .....	120
Figure 52. Système de la CK dans l'IC chez le rat .....	121
Figure 53. Altération de l'axe PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$ dans l'IC expérimentale.....	122
Figure 54. Altération des acteurs contrôlant la biogenèse mitochondriale et l'utilisation des AG dans l'IC humaine.....	123
Figure 55. Positionnement central de PGC-1 $\alpha$ dans le contrôle de la fonction mitochondriale .....	125
Figure 56. Déséquilibre énergétique et stratégie thérapeutique .....	128
Figure 57. Schéma du conditionnement et traitement des rats Dahl sensibles au sel .....	139

Figure 58. Schéma général de mise en culture des cellules musculaires lisses (CML) d'aorte de rat.....	146
Figure 59. Schéma général du mécanisme de contraction/relaxation du muscle lisse vasculaire .....	149
Figure 60. Schéma du fonctionnement des amorces d'amplification .....	151
Figure 61. Amplification du promoteur humain de PGC-1 $\alpha$ de 2665 pb.....	152
Figure 62. Vérification de la purification du promoteur humain de PGC-1 $\alpha$ .....	153
Figure 63. Caractéristiques du plasmide TOPO XL .....	154
Figure 64. Sélection des bactéries TOPO/PGC-1 $\alpha$ : PCR sur colonie.....	156
Figure 65. Caractéristiques du vecteur pGluc-basic.....	158
Figure 66. Sous clonage dans le plasmide GLuc .....	159
Figure 67. Sélection des clones TOPO anti-sens .....	160
Figure 68. Sélection des clones GLuc/PGC-1 $\alpha$ .....	161
Figure 69. Vérification du plasmide amplifié PGC-1 $\alpha$ /GLuc .....	163
Figure 70. Vérification de la stabilité de la Gaussia Luciférase.....	166
Figure 71. Test de fonctionnalité de la lignée stable H9c2 .....	167
Figure 72. Stabilisation de la mesure de luminescence.....	169
Figure 73. Etude de la viabilité cellulaire par le bleu alamar.....	172
Figure 74. Système de distribution cellulaire : le microfill.....	174
Figure 75. Préparation des plaques de composés .....	176
Figure 76. Automatisation des transferts de liquide.....	177
Figure 77. Définition d'un hit, exemple du SVF.....	178
Figure 78. Etapes clés du test cellulaire robotisé (TCR).....	179
Figure 79. Quantification du gène de référence YWHAZ en utilisant une gamme étalon ....	188
Figure 80. Schéma du montage pour le transfert des protéines .....	195
Figure 81. Etude génomique comparative mâle/femelle dans un modèle d'hypertrophie du myocarde induite par surcharge de pression .....	221
Figure 82. Schéma simplifié du métabolisme monocarboné et implication des vitamines B	223
Figure 83. Rôle de l'axe PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$ dans le contrôle de l'utilisation des acides gras et de la biogenèse mitochondriale.....	233
Figure 84. Induction de PGC-1 $\alpha$ via le dimère RXR/PPAR $\alpha$ .....	235
Figure 85. Contrôle de la biogenèse mitochondriale par le stress oxydant dans l'hypertension artérielle.....	244

## TABLEAUX

Tableau 1. Composition des solutions utilisées pour la dissociation des cardiomyocytes de rat adulte .....	143
Tableau 2. Conditions d'amplification par PCR du promoteur humain de PGC-1 $\alpha$ .....	152
Tableau 3. Conditions d'amplification par PCR sur colonie .....	156
Tableau 4. Caractéristiques des amorces utilisées et conditions de PCR en temps réel .....	184
Tableau 5. Protocole de PCRq avec le Light Cycler .....	186
Tableau 6. Protocole de PCRq pour le CFX96 .....	187
Tableau 7. Préparation des réactifs pour le dosage de la LDH .....	190
Tableau 8. Préparation du tampon d'extraction des protéines pour western blot .....	192
Tableau 9. Préparation des gels d'électrophorèse SDS-PAGE .....	194
Tableau 10. Conditions d'utilisation des Anticorps .....	196
Tableau 11. Composition de la solution de respiration .....	198

## AVANT-PROPOS

---

*« Symboliquement, le cœur est depuis l'antiquité utilisé dans notre vocabulaire comme représentant le centre (au cœur) de l'activité émotionnelle, spirituelle, morale ou intellectuelle. Le cœur évoque bien sûr l'organe, et tout autant le centre, l'essence ou l'importance des choses. Le cœur est effectivement le centre de l'être humain car physiologiquement il assure la circulation du sang au sein de l'organisme ».*

D'un regard plus contemporain, il est aussi au centre de nos préoccupations puisque les maladies cardiovasculaires apparaissent comme la première cause de mortalité dans les pays industrialisés parmi lesquelles l'insuffisance cardiaque (IC) représente environ 40% des décès. Selon l'OMS, l'IC est un syndrome clinique complexe résultant de l'incapacité du cœur à fournir un débit suffisant, au repos et à l'effort, pour répondre aux besoins métaboliques de l'organisme. Malgré des avancées thérapeutiques majeures, le taux de mortalité après diagnostic de l'IC reste élevé. Il est donc capital de mieux connaître les dysfonctions participant au développement de l'IC afin de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Une des stratégies actuellement en cours de développement est axée sur l'amélioration du métabolisme énergétique cardiaque, sa détérioration étant déterminante dans la progression et la sévérité de l'IC. Dans ce contexte, le co-activateur transcriptionnel PGC-1 $\alpha$ , un acteur central du contrôle du métabolisme énergétique et de la fonction mitochondriale a été proposé comme une cible thérapeutique d'intérêt majeur. Afin d'illustrer dans l'introduction l'intérêt d'utiliser PGC-1 $\alpha$  comme cible thérapeutique dans l'IC, l'accent sera tout d'abord porté sur la place du métabolisme énergétique et de la mitochondrie dans le cœur sain. Dans un deuxième temps, le contrôle de la fonction mitochondriale sera abordé et plus particulièrement la place de PGC-1 $\alpha$  comme chef d'orchestre du « métabolisme mitochondrial ». Enfin, parce que l'IC est associée à une dysfonction mitochondriale majeure dont l'origine peut vraisemblablement être corrélée à une baisse d'expression de PGC-1 $\alpha$ , la troisième partie de l'introduction sera focalisée sur les données bibliographiques permettant de justifier cette hypothèse.

L'objet principal de ce travail a donc porté sur la mise en place d'un test cellulaire de criblage dans des cellules H9c2 permettant la recherche de nouveaux activateurs de PGC-1 $\alpha$ . La phase de développement du test ayant constitué la majeure partie de mon travail de thèse, une attention particulière y sera portée d'un point de vue méthodologique dans la partie « matériel et méthodes ». Cette étude sera par ailleurs couplée, pour les molécules issues du

test de criblage, à une validation par des études fonctionnelles et sur un deuxième modèle cellulaire : les cardiomyocytes de rat adulte. A court terme, ce travail permettra d'identifier de nouveaux modulateurs de PGC-1 $\alpha$  dans le cœur et ainsi de mieux décrypter ses mécanismes de régulation dans un contexte cardiaque, ces derniers étant peu connus à ce jour. A plus long terme, la validation du test permettra de l'appliquer à la recherche d'activateurs pharmacologiques de PGC-1 $\alpha$  à visée thérapeutique.

En parallèle, notre équipe a publié une étude montrant notamment les effets bénéfiques du resvératrol sur la fonction cardiaque en améliorant la fonction mitochondriale validant ainsi la pertinence du ciblage de la fonction mitochondriale pour améliorer la fonction cardiaque. D'autre part, dans cette étude, le resvératrol a également exercé des effets bénéfiques sur la fonction vasculaire, mais peu d'informations étaient accessibles dans la littérature sur la biogenèse mitochondriale vasculaire. Ainsi, en raison de mes compétences acquises au cours de mon master 2 dans l'étude de la réactivité vasculaire, j'ai participé à cette étude puis développé un axe de recherche visant à étudier les mécanismes contrôlant la biogenèse mitochondriale dans la cellule musculaire lisse au cours de l'hypertension et notamment en condition de stress oxydant.

L'ensemble de ces travaux ouvrant sur de nombreuses perspectives, nos résultats seront confrontés aux données de la littérature dans le cadre d'une discussion centrée sur l'identification des composés activateurs de PGC-1 $\alpha$  dans un premier temps, et dans un second temps focalisée sur la fonction mitochondriale vasculaire et les mécanismes contrôlant la biogenèse mitochondriale en situation de stress oxydant.

### **Chapitre I. Le cœur, organe contractile et principal consommateur d'énergie**

Le cœur est un organe creux, logé à l'intérieur du médiastin autrement dit la cavité centrale du thorax, qui joue un rôle de « pompe » propulsant le sang dans le réseau vasculaire au sein de l'organisme. C'est un organe dont la paroi est formée de trois tuniques distinctes localisées de l'extérieur vers l'intérieur comme suit : le péricarde (fibreuse et séreuse), le myocarde et l'endocarde.

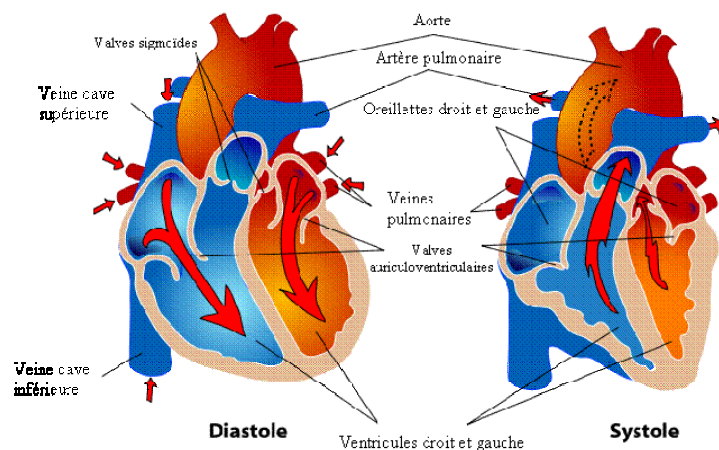
Le cœur est constitué de deux entités distinctes : le cœur droit et le cœur gauche. Le cœur droit est assimilé à « *la pompe de la circulation pulmonaire* » qui va éjecter le sang pauvre en oxygène vers la circulation pulmonaire. A l'opposé, le cœur gauche est considéré comme « *la pompe de la circulation systémique* » et permet de propulser le sang riche en oxygène vers la circulation systémique.

Chacune de ces entités est constituée d'un ventricule et d'une oreillette, deux éléments distincts séparés l'un de l'autre par les valves auriculo-ventriculaires, la valve tricuspide pour le cœur droit et la valve mitrale (ou bicuspidée) pour le cœur gauche. Leur fonction principale est d'empêcher le sang de refluer des ventricules vers les oreillettes lorsque les ventricules se contractent. Sur le même modèle, il existe les valves sigmoïdes comprenant les valves de l'aorte et du tronc pulmonaire, qui empêchent le sang de refluer des vaisseaux vers les ventricules.

Grâce au fonctionnement de ces valves, le sang circule à sens unique dans le cœur, et passe des oreillettes aux ventricules, puis s'engage dans les grosses artères émergeant de la partie supérieure du cœur. Le passage du sang d'une cavité à l'autre dépend de l'ouverture et de la fermeture des valves précédemment décrites en réponse aux variations de la pression sanguine exercées à leur surface.

La fonction cardiaque consiste donc à assurer un approvisionnement constant en sang oxygéné (et en nutriments) à l'ensemble de l'organisme et à l'élimination du CO<sub>2</sub> (et des déchets) après utilisation au niveau systémique. Ce processus cyclique adapté aux besoins de l'organisme est assuré par des phénomènes mécaniques ou révolution cardiaque qui correspond à des variations de pression et du volume sanguin à l'intérieur du cœur.

La révolution cardiaque démarre par une phase de remplissage ventriculaire au cours de la diastole, se poursuit par l'éjection du sang dans la circulation au cours de la phase de systole et se termine par une phase de protodiastole (en début de diastole). De manière mécanique, pendant la diastole, les valves auriculo-ventriculaires s'ouvrent tandis que les valves sigmoïdes se ferment. Le sang qui provient de la circulation systémique pour l'oreillette droite et en provenance de la circulation pulmonaire pour l'oreillette gauche, s'écoule passivement dans les ventricules du fait d'une pression basse à l'intérieur des cavités. Au moment où les oreillettes se relâchent, les ventricules se contractent ce qui entraîne une élévation abrupte de la pression sanguine à l'intérieur des ventricules et la fermeture des valves auriculo-ventriculaires. Puis, lorsque la pression intra-ventriculaire devient supérieure à celle régnant dans les grosses artères émergeant des ventricules, le sang est éjecté vers l'appareil circulatoire (Figure1).



**Figure 1. Cycle cardiaque**

Diastole à gauche : relaxation et remplissage des ventricules, systole à droite : contraction et éjection du sang dans la circulation.

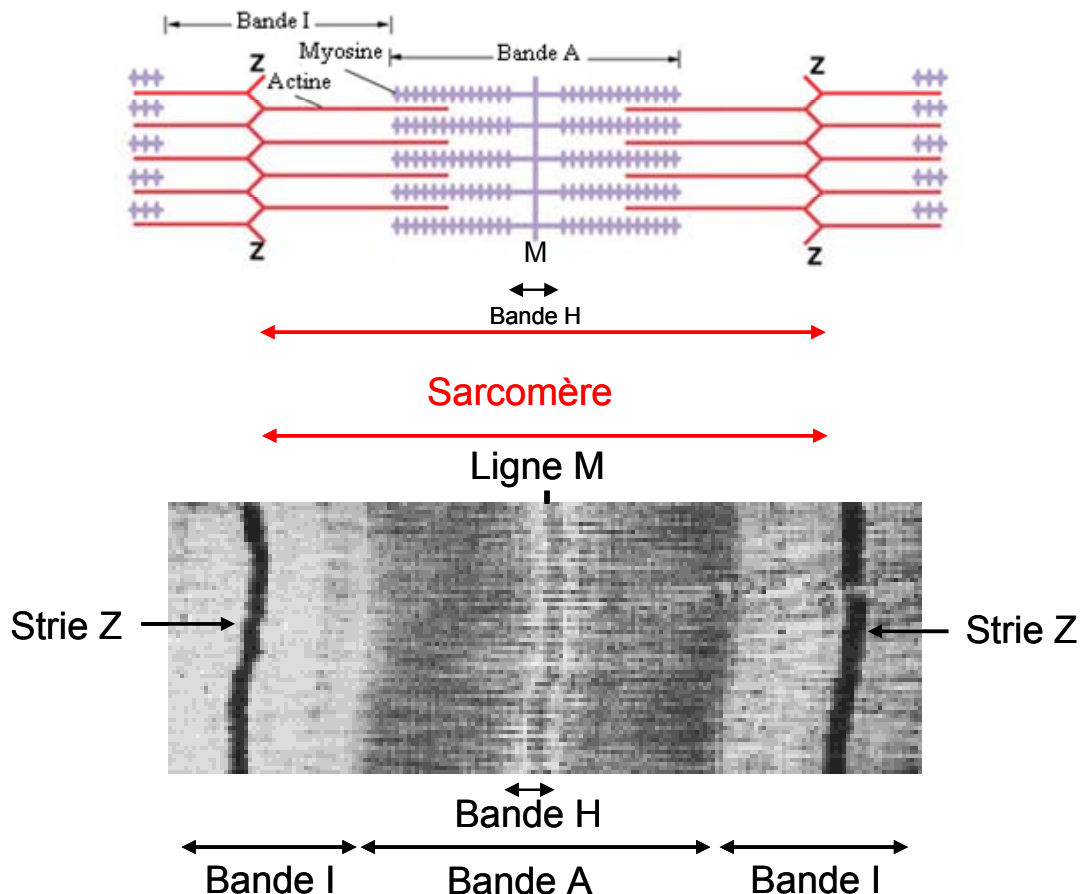
*Modifiée d'après <http://www.biologyguide.net>*

## **I) Fonction contractile cardiaque**

La contraction du myocarde est permise du fait d'une activité mécanique coordonnée des cardiomyocytes. L'observation en microscopie électronique d'un cardiomyocyte ou d'une cellule musculaire striée en général, laisse apparaître de manière évidente une striation transversale caractérisée par une alternance de bandes sombres ou A pour anisotropiques et de



bandes claires ou I pour isotropiques. Chaque bande A possède en son centre une zone plus claire appelée bande H (heller = plus pâle), elle-même divisée en deux par une ligne verticale sombre : la ligne M (mittel = centre). Par convention, la zone définie entre deux lignes Z (zwischen = entre) est appelée sarcomère et est considérée comme l'unité fonctionnelle d'une cellule musculaire (Figure 2).



**Figure 2. Organisation d'un sarcomère**

(Bande A : anisotrope, bande I : isotrope, Bande H : heller, Ligne M : mittel, strie Z : zwischen = entre). La zone située entre les deux stries Z constitue le sarcomère.

*Issue de <http://fr.wikipedia.org/wiki/Sarcomère>*

Le cardiomyocyte apparaît donc comme une cellule hautement structurée et spécialisée et les structures présentes sont dédiées à la fonction contractile, à l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  et à la fonction énergétique du cardiomyocyte. Les acteurs de la contraction ou myofibrilles occupent environ 60 % du volume cellulaire, tandis que les mitochondries occupent près de 30 % du volume cellulaire. Les 10 % restants correspondent au réticulum

sarcoplasmique (RS) à hauteur de 2 % du volume cellulaire, aux noyaux, ainsi qu'au sarcoplasme (cytoplasme d'une cellule musculaire striée).

## **1) Organisation du cardiomyocyte**

### ***a. Les myofilaments***

Au niveau moléculaire, l'organisation striée des myofibrilles est permise par l'agencement ordonné de myofilaments à l'intérieur du sarcomère. Ces myofilaments sont de deux types : les filaments épais de myosine et les filaments fins d'actine. C'est le glissement de ces 2 types de filaments l'un par rapport à l'autre qui génère la force à l'origine de la contraction.

#### ***i. Les filaments de myosine***

Ces filaments, appelés filaments épais, ont un diamètre d'environ 16 nm et sont composés d'une espèce moléculaire : la myosine. Cette molécule, composée de deux chaînes polypeptidiques lourdes ou « myosin heavy chain » (MHC) de 200 KDa et de quatre chaînes légères ou « myosin light chain » (MLC) de 20 KDa, est à la fois une protéine de structure et une protéine fonctionnelle à activité enzymatique. Chaque chaîne lourde est composée d'une tête globulaire qui porte l'activité ATPasique et d'une partie allongée et fibrillaire en hélice alpha, les deux étant reliées par un domaine déformable. Les queues allongées des deux chaînes lourdes s'enroulent l'une autour de l'autre pour former une superhélice et les 2 têtes globulaires se retrouvent côte à côte (Figure 3b et c). C'est l'association d'une centaine de molécules de myosine qui forme le filament épais et les têtes globulaires dépassent en périphérie de façon à être facilement en contact avec l'actine. Enfin, chaque tête globulaire comprend un site de fixation à l'actine et un site de fixation à l'ATP.

Au niveau cardiaque, il existe deux isoformes pour la chaîne lourde qui sont codées par 2 gènes indépendants : l' $\alpha$ -MHC et la  $\beta$ -MHC. L'expression de ces deux isoformes diffère au cours du développement, selon l'espèce considérée mais aussi en fonction de la cavité du cœur étudiée, à savoir l'oreillette ou le ventricule, gauche ou droit. Chez le rongeur, l'isoforme  $\alpha$ -MHC est l'isoforme majoritaire chez l'adulte tandis que l'isoforme  $\beta$ -MHC est majoritairement exprimée au cours du développement prénatal, ou lors d'une

reprogrammation génique dans certaines pathologies dans le ventricule (Izumo et al., 1987). Chez l'homme, l'isoforme  $\alpha$ -MHC est quasi inexistante dans le ventricule chez l'adulte, l'isoforme  $\beta$ -MHC étant exprimée à plus de 90 % (Reiser et al., 2001)

## *ii. Les filaments d'actine*

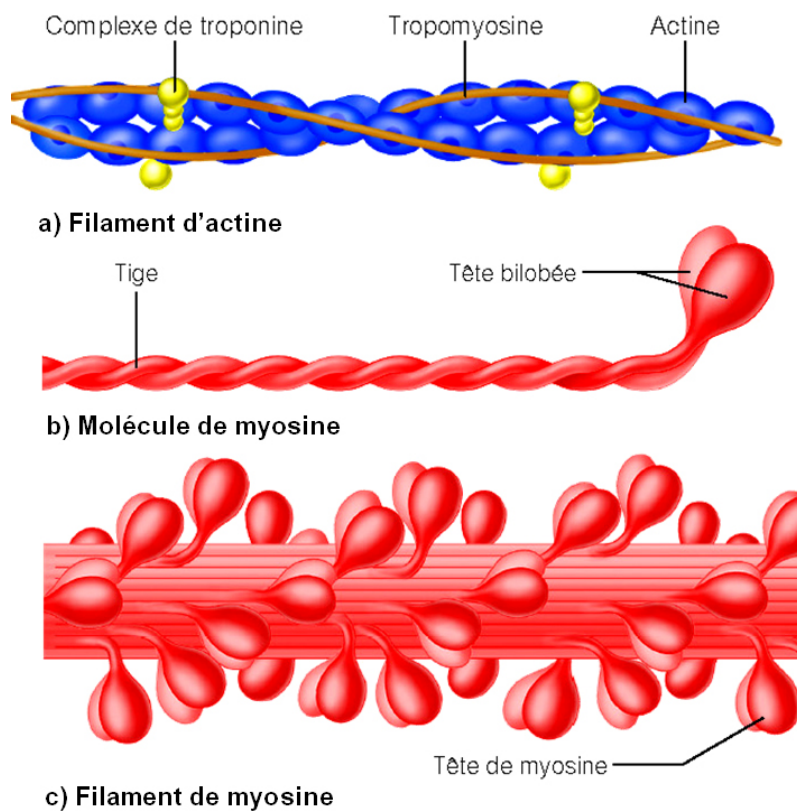
Ce sont de fins filaments situés de part et d'autre des filaments épais de myosine, d'un diamètre de 7 à 8 nm, chaque filament étant composé de deux brins de sous-unités d'actine enroulés sur eux même en spirale. Ces filaments résultent de la polymérisation de multiples molécules d'actine G (pour globulaire) formant de longues chaînes ou actine F (pour filamenteuse). Ces sous-unités portent les sites de liaison sur lesquels se fixent les têtes de myosine lors de la contraction. Ces filaments comprennent aussi 2 protéines de régulation : la tropomyosine et la troponine (Figure 3a).

La tropomyosine est une protéine fibreuse, allongée, homodimérique ou hétérodimérique qui se loge au creux des sillons de la double hélice formée par l'actine ce qui permet sa rigidification et sa stabilisation. Dans une fibre musculaire au repos, elle bloque les sites actifs de l'actine et y empêche la fixation des têtes de myosine.

La troponine, protéine globulaire, s'intercale à chaque extrémité d'une molécule de tropomyosine ce qui correspond à un intervalle de sept molécules d'actine. C'est un complexe tripeptidique formé de trois polypeptides aux fonctions bien déterminées :

- la troponine I (TnI) : protéine qui lie directement l'actine et qui a une activité inhibitrice sur l'activité ATPasique de la myosine,
- La troponine T (TnT) : située au point d'ancrage entre la tropomyosine et l'actine,
- La troponine C (TnC) : capable de fixer le calcium et à l'origine de la levée de l'inhibition par la troponine I.

Le complexe tropomyosine/troponine apparait comme un élément clé dans la régulation des interactions actine/myosine au cours de la contraction.



**Figure 3. Ultrastructure des myofilaments**

a. Ultrastructure des myofilaments fins, b. et c. Ultrastructure des myofilaments épais.

Issue de <http://physioweb.uvm.edu/muscle/physio>

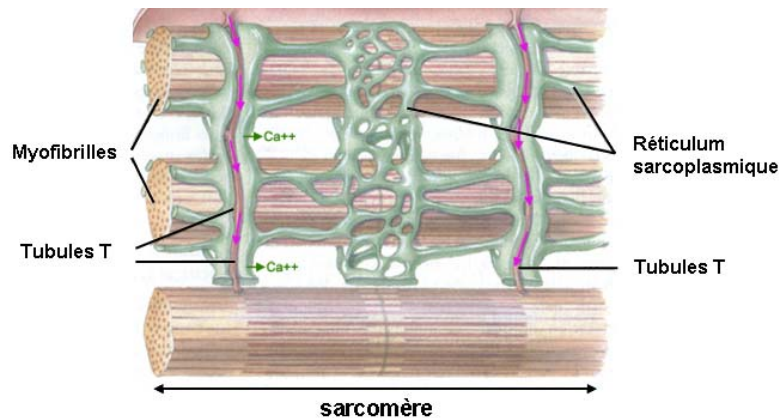
*b. Le réticulum sarcoplasmique (RS)*

C'est un organe hautement spécialisé dérivé du réticulum endoplasmique qui s'enroule autour de chaque myofibrille tel « un lacet ». Il constitue une réserve interne en calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ce dernier étant déversé dans le sarcoplasme en réponse à une dépolarisation du sarcolemme (structure histologique formée de la membrane plasmique et de la lame basale d'une fibre musculaire). Son organisation macroscopique forme un réseau tubulaire qui parcourt la myofibrille longitudinalement et les tubules se rejoignent entre eux au niveau de la bande H.

Sa structure particulière lui confère deux parties distinctes au niveau fonctionnel : les citernes terminales, renflement de part et d'autre des tubules T (décrits dans la section suivante), plus spécialisées dans la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  et le réticulum sarcoplasmique

longitudinal, fin réseau reliant les citernes terminales, majoritairement impliqué dans le repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 4).

Ces structures comportent des protéines clés qui sont impliquées dans les mouvements des ions calciques et ayant un rôle majeur dans le couplage excitation-contraction. La première, située au niveau des citernes terminales, est le récepteur à la ryanodine ou RyR, protéine canal qui permet la sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique vers le sarcoplasme. La deuxième protéine essentielle permet de maintenir un équilibre des concentrations calciques en faveur d'une recapture du calcium du sarcoplasme vers le RS. C'est une  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase ou SERCA (sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase) qui permet l'internalisation du  $\text{Ca}^{2+}$  au sein de la lumière du réticulum sarcoplasmique, grâce à une hydrolyse de l'ATP.



**Figure 4. Organisation macroscopique du réticulum sarcoplasmique (RS)**

Les tubules du RS enveloppent chaque myofibrille et fusionnent latéralement pour former un réseau communicant (exemple ici du muscle squelettique).

### *c. Les tubules transverses (tubules T)*

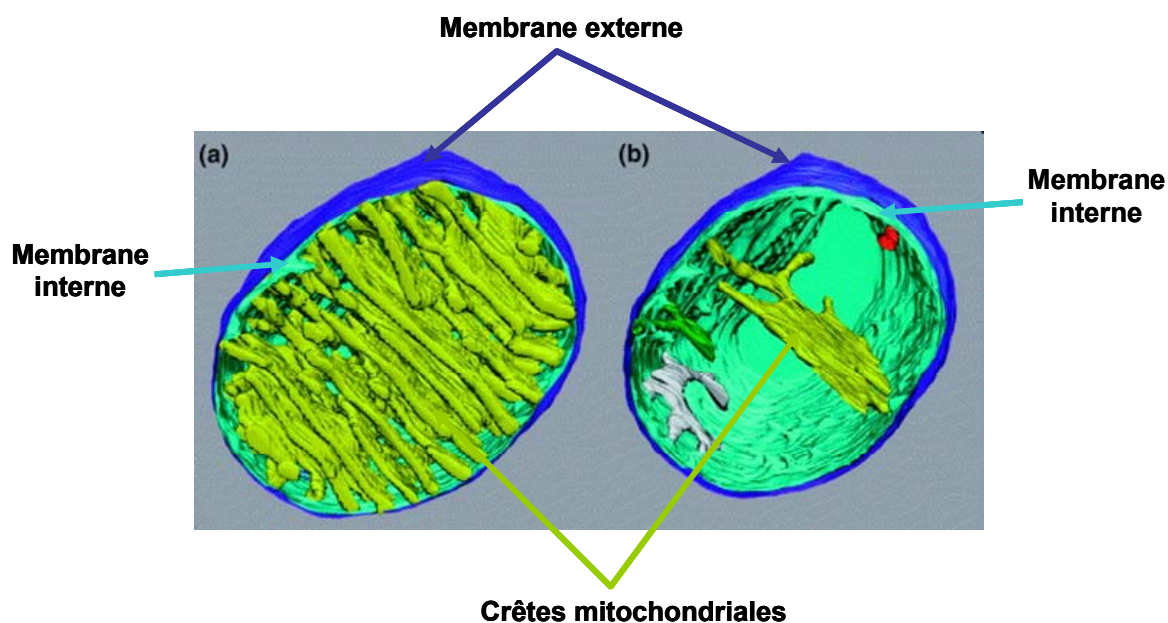
Ce sont des invaginations du sarcolemme à l'intérieur de la cellule, étroitement associées aux citernes terminales du RS et communiquant avec le liquide interstitiel de l'espace extracellulaire. Ces invaginations sont strictement localisées à la jonction des bandes A et des bandes I pour les muscles striés squelettiques et forment ce que l'on appelle une triade avec deux citernes terminales du RS. Au niveau du muscle cardiaque, ces invaginations sont situées au niveau des lignes Z et forment des diades avec une citerne terminale du RS. Globalement, chaque sarcomère est entouré de tubules T ce qui augmente considérablement la surface de « communication » de la fibre musculaire. Cela facilite la propagation du potentiel

d'action rapidement au centre de la fibre musculaire, important dans le mécanisme du couplage excitation-contraction. Ces invaginations sont aussi enrichies en une protéine déterminante pour le couplage excitation-contraction : le canal calcique de type L, protéine canal permettant l'influx du calcium du milieu extracellulaire vers le sarcoplasme de la cellule.

#### *d. La mitochondrie*

Selon la théorie endosymbiotique établie dès 1960 par Lynn Margulis, les mitochondries possèdent une origine phylogénétique unique. En effet, il y a environ 1,5 milliards d'année, une cellule eucaryote de type *Archae* aurait intégré un endosymbiote procaryote apparenté aux alpha-protéobactéries. Ces arguments sont étayés par la présence au niveau mitochondrial d'ADN, d'ARN et d'enzymes présentant des analogies avec les cellules procaryotes au niveau structural (Kurland et Andersson, 2000) et fonctionnel. C'est donc le seul organite possédant sa propre molécule d'ADN, circulaire et double brin lui conférant la capacité de produire ses propres protéines en collaboration étroite avec le noyau cellulaire. L'organisation génomique et protéique spécifique de la mitochondrie sera développée dans le chapitre trois concernant la biogenèse mitochondriale.

Au niveau structural, les mitochondries sont des organites filiformes, elliptiques, d'une taille de l'ordre du micromètre pouvant aller de 1 à 10  $\mu\text{m}$  de long et de 0.5 à 1  $\mu\text{m}$  de large. Elles sont composées de deux membranes distinctes ayant chacune la même structure générale que la membrane plasmique, permettant de délimiter deux compartiments majeurs au sein de la mitochondrie : la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire (Figure 5).



**Figure 5. Structure 3D (tomographie) mitochondriale**

La membrane externe est représentée en violet, la membrane interne est représentée en bleu ciel et les crêtes en jaune. La membrane interne forme des extensions tubulaires vers le centre de la mitochondrie formant les crêtes mitochondriales. *Issue de (Frey et Mannella, 2000).*

La membrane externe est formée de 60 % de protéines et de 40 % de lipides majoritairement polaires. Les deux grandes familles protéiques présentes sont des porines formant des canaux permettant le passage de molécules hydrophiles de taille inférieure à 10 KDa (ions, acides gras, nucléotides...). Sont présents également des complexes protéiques permettant l'entrée de protéines d'origine nucléaire ou l'insertion de ces mêmes protéines au niveau de la membrane externe.

La membrane interne présente une perméabilité moindre par rapport à la membrane externe du fait d'un enrichissement protéique : 75 % et seulement 25 % de lipides. Elle est totalement imperméable aux ions par la présence en quantité d'un phospholipide renfermant quatre acides gras : la cardiolipine. La membrane interne présente à sa surface divers complexes protéiques permettant le passage de protéines de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale ou inversement, et aussi impliqués dans l'insertion de certaines protéines au sein de la membrane interne. Cette membrane porte la particularité de former des replis au sein de la matrice mitochondriale, appelés crêtes, qui permettent d'augmenter la surface membranaire.

La matrice mitochondriale n'est pas seulement le lieu de la synthèse protéique ou de sous-unités protéiques dépendant de l'ADN mitochondrial. Elle est aussi le lieu du catabolisme des glucides, lipides ou acides aminés en acétyl-CoA impliqué dans le cycle de krebs, une des origines de la production d'ATP mais surtout en coenzymes utiles pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Cette dernière est située au sein de la membrane interne mitochondriale, et permet le transport d'électrons d'un donneur réduit vers une molécule acceptrice : l'O<sub>2</sub>. Ce transport étant couplé à la production d'ATP, on parle alors de phosphorylation oxydative, ce qui conduit à une production massive d'ATP. Ces processus métaboliques seront décrits dans la deuxième partie de ce chapitre.

Considérant que 30 % du volume cellulaire du cardiomyocyte est occupé par les mitochondries et que 90 % de sa production énergétique dépend de la phosphorylation oxydative, la mitochondrie est un organe déterminant pour répondre à un besoin énergétique fort. C'est notamment le cas dans les cellules excitables et contractiles telles que les cellules cardiaque ou musculaire squelettique qui nécessitent un fort apport en ATP pour la contraction et le maintien de l'homéostasie ionique (mobilité des têtes de myosines, fonctionnement de certains canaux comme SERCA...). De plus, les mitochondries présentent une grande motilité et plasticité, puisque pour répondre à une demande accrue d'énergie, comme par exemple lors d'une activité physique, elles sont capables de se diviser. C'est un mécanisme appelé « fission mitochondriale » qui permet l'augmentation du nombre de mitochondries, une fourniture accrue en ATP, et une synthèse de crêtes supplémentaire pour accroître considérablement la surface membranaire. Son fort « pouvoir » métabolique lui confère l'appellation de centrale énergétique de la cellule.

Indépendamment de son rôle métabolique, la mitochondrie est aussi impliquée dans de nombreux processus physiologiques comme l'apoptose, la biosynthèse des hormones stéroïdiennes, la biosynthèse de l'hème, la production d'espèces réactives de l'O<sub>2</sub> et la mise en place de défenses anti-oxydantes. De cette manière, la mitochondrie joue un rôle déterminant dans l'homéostasie cellulaire.



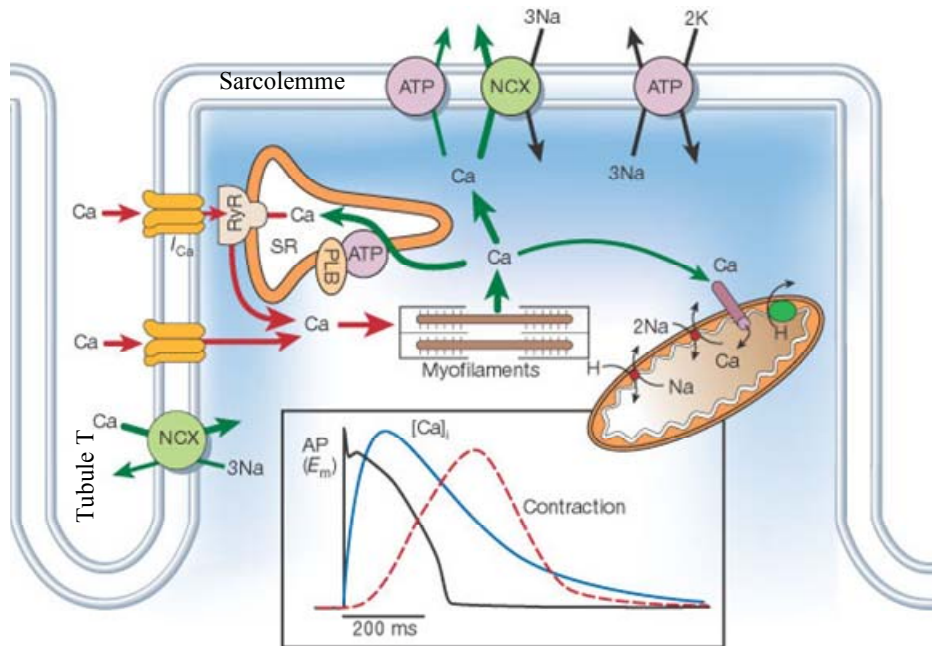
## 2) *Couplage excitation-contraction*

### a. *Bases fonctionnelles*

Le couplage excitation-contraction correspond à l'ensemble d'évènements qui convertit un signal électrique, le potentiel d'action, en un signal mécanique, le glissement des myofilaments, à l'origine de la contraction du myocarde. Comme toute membrane plasmique, le sarcolemme est polarisé, ce qui signifie une différence de potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane. Au repos, cette différence de potentiel est négative et d'environ -90 mV.

La naissance d'un potentiel d'action spontanément au niveau des cellules pacemakers et sa propagation jusqu'aux cellules contractiles est le point initiateur de ce couplage excitation-contraction. En effet, le potentiel d'action se propage le long du sarcolemme et gagne les tubules T. Cette dépolarisation locale a pour conséquence le passage du potentiel de membrane de -90 mV à -40 mV, qui correspond au seuil d'activation des canaux calciques de type L présents à la surface des tubules T. L'ouverture de ces canaux ne permettra pas par elle-même l'activation de la contraction, mais une entrée légère de calcium locale à l'interface entre le tubule T et le RS. Cette élévation de calcium intracellulaire à proximité des RyR du RS, va provoquer l'ouverture de ces récepteurs-canaux, à l'origine d'un relargage massif du calcium des stocks intra-RS vers le sarcoplasme (Bers, 2002). Ce phénomène est appelé «  $\text{Ca}^{2+}$ -induced- $\text{Ca}^{2+}$ -release » (Figure 6). Ce fort signal calcique est la résultante de l'ouverture de multiples RyR s'additionnant. Le calcium diffuse alors dans le cytosol jusqu'aux éléments contractiles où il va lier la TnC à l'origine du glissement des myofilaments et donc de la contraction.

Le phénomène de relaxation correspondra globalement à une diminution du taux intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ , ce dernier se détachant de la TnC et inhibant ainsi le glissement des myofilaments. Cette diminution de  $\text{Ca}^{2+}$  est permise par trois mécanismes concomitants : un repompage du calcium à l'intérieur du RS via la pompe ATPasique SERCA, « l'extrusion » du calcium vers le compartiment extracellulaire via une  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ou via un échangeur antiport  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  qui permet la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  contre son gradient électrochimique. Le  $\text{Na}^+$  entré dans la cellule est lui expulsé par la pompe  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Figure 6). Chaque pompe ATPase constitue donc un des acteurs importants du mécanisme contraction-relaxation ce qui montre l'importance de la production d'ATP.



**Figure 6. Couplage excitation-contraction cardiaque**

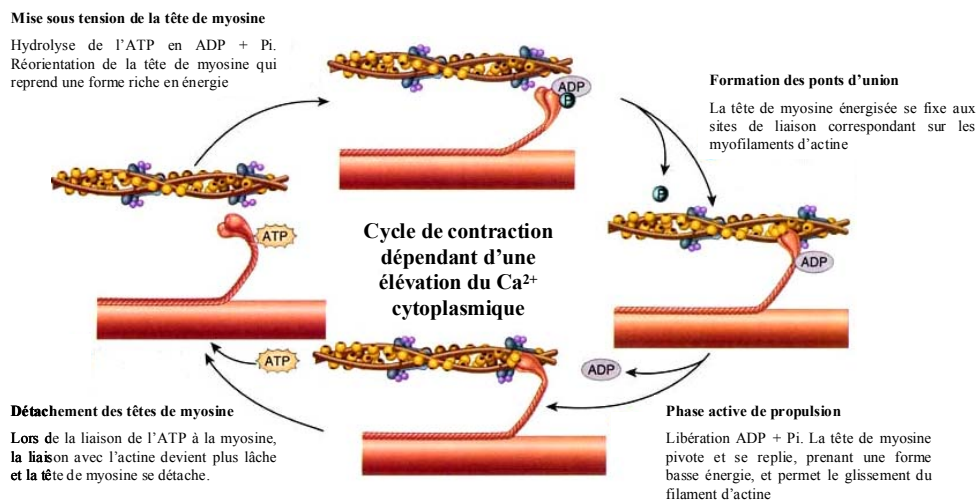
Les flèches rouges représentent le phénomène du «  $\text{Ca}^{2+}$  induced-  $\text{Ca}^{2+}$  release ». Les flèches vertes représentent la recapture ou l'expulsion du  $\text{Ca}^{2+}$ . Issue de (Bers, 2002).

### *b. Bases anatomiques*

Rappelons que les filaments fins et épais, parallèles, sont connectés par des ponts d'union formés par la liaison des têtes de myosine des filaments épais à l'actine des filaments fins. C'est l'activation de ces ponts d'union qui est à l'origine du phénomène de contraction, une suite d'évènements durant laquelle les têtes de myosine tirent les filaments d'actine vers le centre du sarcomère.

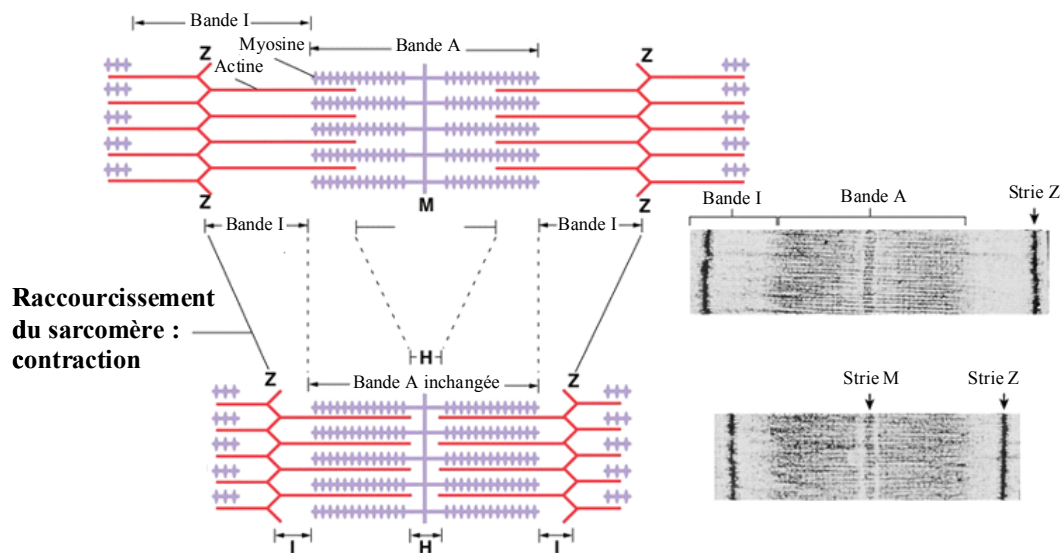
Au repos, lorsque la concentration intracytoplasmique en  $\text{Ca}^{2+}$  est faible, le complexe tropomyosine-troponine s'intercale entre les sites actifs de liaison myosine/actine. Une élévation du calcium intracellulaire due à la libération autocatalytique du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ -induced- $\text{Ca}^{2+}$ -release), va entraîner la fixation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  sur la TnC. Il va y avoir un changement de conformation déplaçant la tropomyosine vers l'intérieur du sillon entre les deux filaments d'actine ce qui va lever l'inhibition de la TnI. Les sites de liaison de l'actine à la myosine sont exposés et la myosine se retrouve en conformation basse énergie car liée à l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP en ADP plus phosphate inorganique (Pi) permet le passage vers

une forme riche en énergie mettant la tête de myosine sous tension. Elle forme alors des ponts d'union en se liant à l'actine formant un angle de  $90^\circ$ . C'est la libération de l'ADP et du  $P_i$  qui va entraîner un repliement de la tête de myosine pour former un angle de  $45^\circ$  et être à l'origine du glissement du filament d'actine (Figure 7). Il en résulte un mouvement de propulsion et un raccourcissement des sarcomères ce qui provoque la contraction (Figure 8). La tête de myosine est alors en conformation basse énergie et le cycle est prêt à repartir avec la fixation d'une nouvelle molécule d'ATP.



**Figure 7. Bases moléculaires de la contraction**

Modifiée d'après <http://www.sivabio.50webs.com>

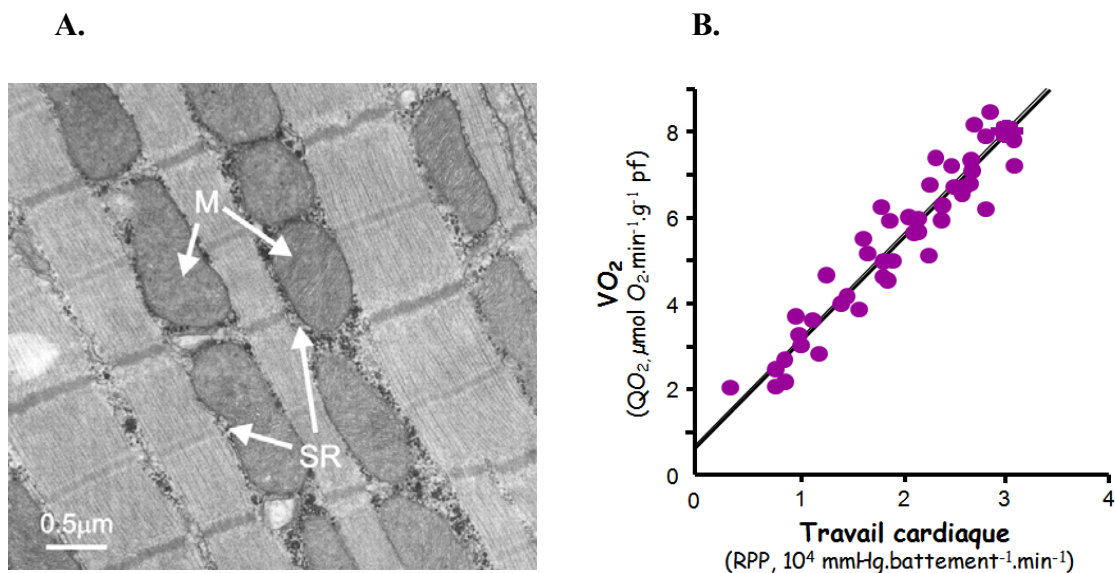


**Figure 8. Raccourcissement des sarcomères lors de la contraction**

Modifiée d'après <http://www.colorado.edu>

## II) Métabolisme énergétique cardiaque

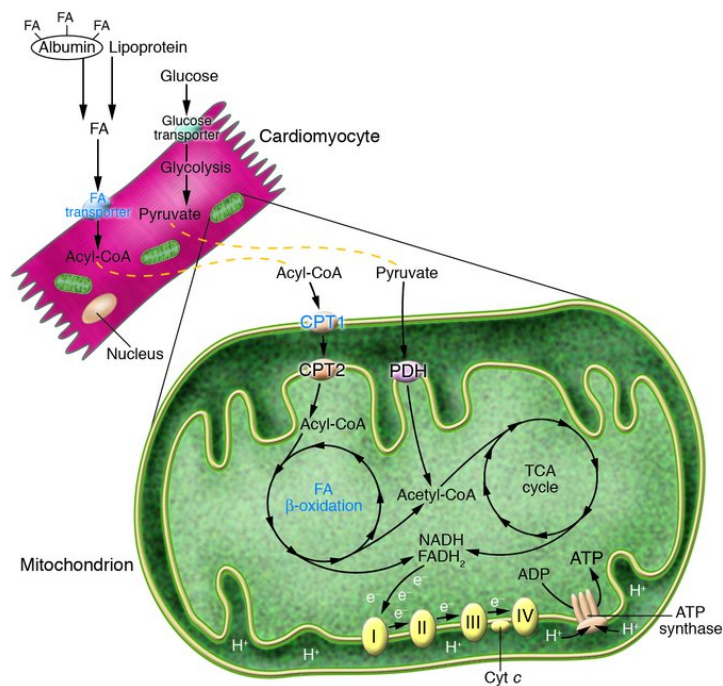
Bien que la mitochondrie soit impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que l'apoptose, le contrôle de l'homéostasie calcique ou encore la régulation des radicaux libres de l'oxygène, elle joue un rôle clé dans l'homéostasie énergétique. En effet, il existe une tissu-spécificité de la fonction mitochondriale qui s'adapte en fonction du type et de la fonction tissulaire, et notamment concernant l'utilisation des substrats et les capacités oxydatives musculaires (Rossignol et al., 1999) (Ponsot et al., 2005; Benard et al., 2006). Dans le coeur, la mitochondrie occupe environ 30 % du volume cellulaire du cardiomyocyte (Figure 9A) qui utilise près de 11 % de la consommation en oxygène de l'organisme. L'activité contractile permanente du coeur et le rôle central de l'ATP dans le fonctionnement de nombreuses protéines contractiles comme la myosine ou les ATPases expliquent aisément la nécessité d'un apport constant en énergie qui provient à plus de 90 % du métabolisme oxydatif. En effet, il existe un lien étroit entre travail cardiaque et consommation en oxygène puisque le coeur n'ayant que peu de réserve énergétique, il adapte constamment sa production énergétique en fonction du travail cardiaque : il travaille donc à flux tendu (Figure 9B).



**Figure 9. A. Ultrastructure du cardiomyocyte**, M = mitochondrie, SR = réticulum sarcoplasmique. **B. concept de travail à flux tendu.** *Issue de Stepanov et al, 1997.*

Sur les 80 % de la consommation en oxygène couplée à la synthèse de l'ATP, environ 30 % sont utilisés pour la synthèse protéique, 25 % par la  $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$ , environ 8

% par les  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases et 10 % pour la gluconéogénèse (Rolfe et Brown, 1997). Un apport en substrat oxydatif est donc essentiel pour le bon fonctionnement de l'activité du myocarde. Le muscle cardiaque est considéré comme un organe « omnivore » puisqu'il est capable d'utiliser l'ensemble des substrats endogènes (glycogène, acides aminés) ou exogènes (glucose, lipides, lactate). De nombreuses voies métaboliques découlent de l'utilisation de ces substrats : la glycolyse, la  $\beta$ -oxydation, le cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative. La mitochondrie apparaît comme un carrefour métabolique à l'ensemble de ces voies puisque la production énergétique majeure dépendant de ces voies siège au sein de la mitochondrie (Figure 10).



**Figure 10. Voies métaboliques impliquées dans le métabolisme énergétique cardiaque**  
 L'oxydation des AG et du glucose représente les principales voies de génération d'ATP dans le cœur. L'acétyl-CoA qui en dérive est oxydé dans le cycle de Krebs pour générer du NADH et du  $\text{FADH}_2$  qui sont utilisés au niveau de la chaîne respiratoire et à l'origine de la synthèse d'ATP. Issue de (Huss et Kelly, 2005).

### 1) La mitochondrie, carrefour métabolique

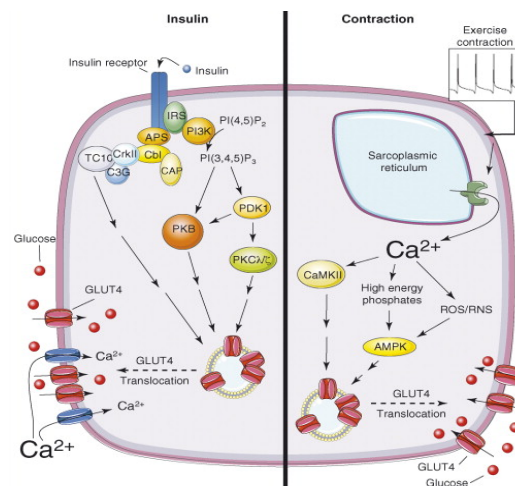
L'oxydation des acides gras et du glucose dans la mitochondrie représente la source majeure de la production d'ATP dans le cœur adulte sain. En dépit d'une utilisation préférentielle des acides gras par le cœur adulte qui permet 70 % de la production en ATP

(Wisneski et al., 1987), l'utilisation du glucose peut momentanément prendre une place plus importante. C'est le cas lors d'un exercice physique intense puisque c'est une ressource énergétique utilisable rapidement ou lors d'une élévation brutale de la glycémie.

a. Catabolisme du glucose

i. **Transport du glucose dans le cardiomyocyte**

Le transport du glucose à travers la membrane plasmique met en jeu des protéines de transport appartenant à la superfamille des protéines de transport des sucres, les GLUT, qui comporte 13 membres. Concernant les cellules cardiaques, les 2 transporteurs de cette famille majoritairement décrits sont GLUT 1 et GLUT 4 (Zorzano et al., 1997). GLUT 4 est quantitativement le plus exprimé au sein de la cellule cardiaque, mais à l'état basal (glycémie normale), GLUT 1, constitutivement actif, est responsable de l'entrée du glucose sanguin vers le compartiment cardiaque et est présent dans la majorité des types cellulaires. GLUT 4 est un transporteur spécifique des muscles striés (squelettiques et cardiaques) et du tissu adipeux (Lanner et al., 2008). En l'absence de variation de la glycémie, ce transporteur est stocké dans des vésicules intra-cytoplasmiques. Sa translocation vers la membrane pour faciliter le transport du glucose dépend de divers stimuli comme l'insuline, via notamment la voie de signalisation PI3 kinase/PKB, ou l'exercice selon un mécanisme d'activation dépendant du calcium (Figure 11).



**Figure 11. Mécanismes d'activation de la translocation de GLUT 4**

A gauche, voie de signalisation dépendante de l'insuline. A droite, voie de signalisation dépendante du calcium. Issue de (Lanner et al., 2008).

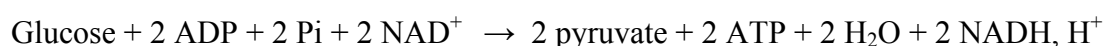
En plus de la famille des GLUT, il existe une autre famille de transporteurs de sucres : la famille SGLT (sodium/glucose cotransporteur), l'isoforme 1 étant décrite comme étant présente dans le cœur préférentiellement au niveau du sarcolemme. Elle permet la facilitation de l'entrée du glucose en réponse à l'insuline et à la leptine (Banerjee et al., 2009) via un mécanisme cellulaire dépendant de l'AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) (Banerjee et al., 2010).

## *ii. Glycolyse*

C'est la voie d'assimilation du glucose, dans le cytoplasme, pour donner en fin de cycle deux molécules de pyruvate (Figure 12). De manière originale, cette voie métabolique démarre par la consommation de deux molécules d'ATP par molécule de glucose. Dès son entrée dans la cellule, le glucose est converti en glucose-6-phosphate (glc-6-P) via une hexokinase, ce qui permet de maintenir la concentration cytoplasmique en glucose relativement basse. Cette première réaction est irréversible et consommatrice d'une molécule d'ATP. La seconde consommation d'ATP a lieu par la conversion du fructose-6-phosphate (isomérisé à partir du glc-6-P) en fructose-1,6-diphosphate via l'action de la phosphofructokinase 1 (PFK-1).

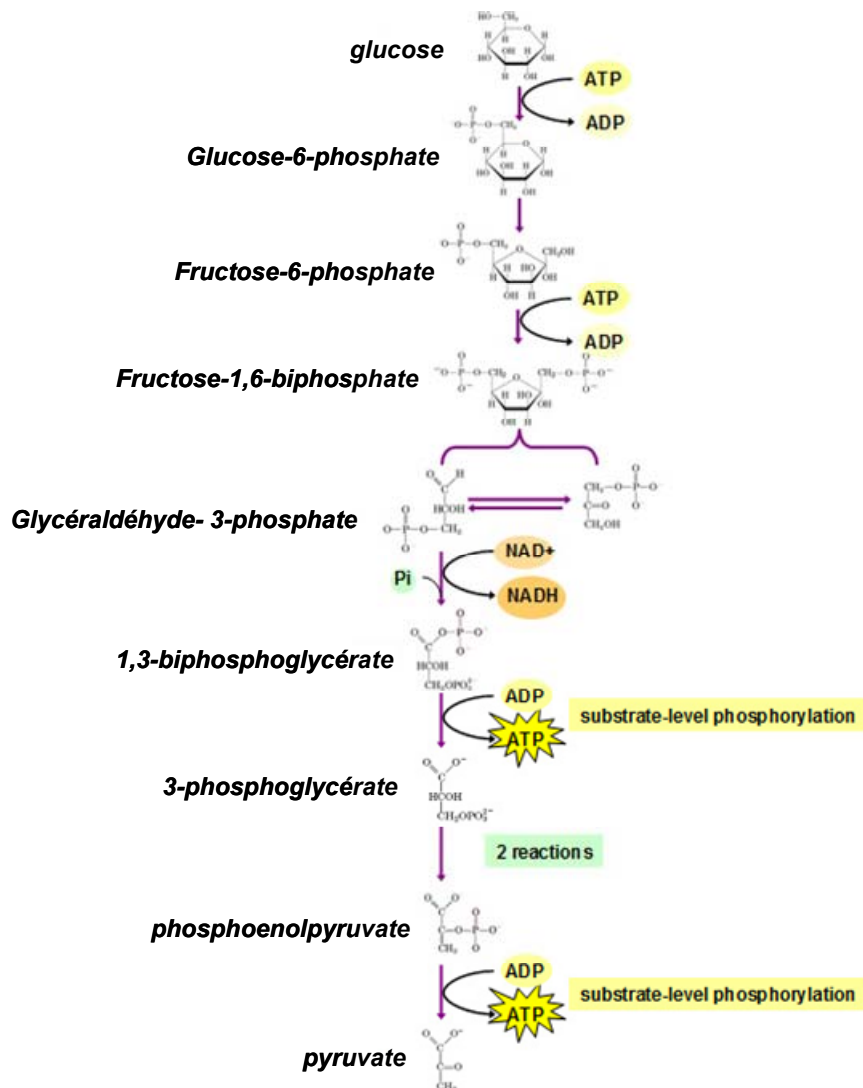
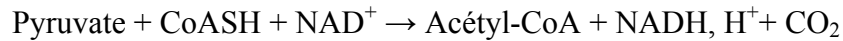
La deuxième partie du cycle est productrice de liaisons à haut potentiel de transfert énergétique à l'origine de la synthèse d'ATP, par l'oxydation du groupement aldéhyde du glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P) pour former du 1,3-biphosphoglycérate, molécule riche en énergie par la présence d'une liaison acylthioester. Cette étape est concomitante à la réduction du  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . La deuxième réaction entraînant la synthèse d'une molécule d'ATP correspond à la conversion du phospho-énolpyruvate (PEP) en pyruvate. En effet, la présence de liaisons phospho-esters confère un potentiel de transfert énergétique élevé à ce composé (Figure 12).

Le bilan énergétique final est cependant faible puisque une molécule de glucose conduit seulement à la formation de 2 molécules d'ATP :



Pour une oxydation complète et en condition aérobie, le pyruvate est transporté à l'intérieur de la matrice mitochondriale. Il est soumis à une décarboxylation par la pyruvate

déshydrogénase (PDH) présente sur la membrane interne mitochondriale (et inversement régulé par la pyruvate déshydrogénase kinase : PDK), pour donner de l'acétyl-coenzyme A (acétylCoA) qui sera pris en charge par le cycle de Krebs :



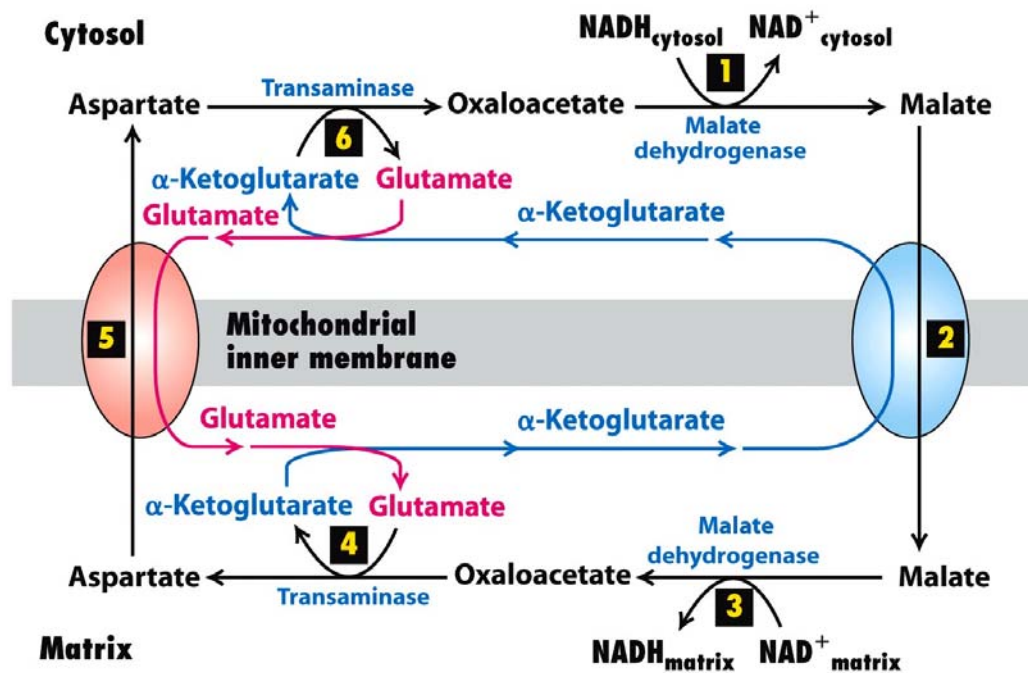
**Figure 12. Voie de la glycolyse**

Le catabolisme d'une molécule de glucose conduit à la formation de 2 molécules de pyruvate, 2 ATP et 2 NADH. Issue de "cell origins and metabolism, www.nature.com".

Les molécules de NADH produites lors de la glycolyse ont un fort potentiel énergétique puisque leur oxydation mitochondriale est couplée à la synthèse d'ATP. Dans le cytosol, le NADH est oxydé en NAD<sup>+</sup> de manière concomitante à la formation de malate via



la malate déshydrogénase cytosolique. Le malate est alors transporté vers la matrice mitochondriale grâce à une translocase par antiport avec un  $\alpha$ -cétoglutarate. Une fois dans la matrice mitochondriale, le malate est converti en oxaloacétate et ceci est couplé à la réduction du  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}$  (Figure 13). Cet équivalent réduit sera ensuite utilisé au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, sur la membrane interne mitochondriale, lors du transfert d'électrons à l'origine de la formation d'ATP.



**Figure 13. Navette malate-aspartate**

Le couplage des translocases pour le malate et l'aspartate permet la génération de  $\text{NADH}$  dans la matrice mitochondriale. *Issue de « molecular cell biology ».*

Dans certains cas, lorsque la consommation en glucose devient supérieure à l'apport en oxygène (exemple d'un effort physique intense), une partie du pyruvate est convertie en lactate via la lactate déshydrogénase couplée à la formation d'un équivalent oxydé : le  $\text{NAD}^+$ . Ceci permet donc au cycle de la glycolyse de continuer et peut momentanément contribuer à un apport énergétique supplémentaire en condition anaérobie.

Par ailleurs, malgré un niveau de glycogène faible dans le myocarde, celui-ci formé à partir de glucose via la glycogène synthase, peut aussi constituer une source énergétique supplémentaire par son hydrolyse en glucose ou glucose-6-phosphate lors d'un effort physique notamment.

### ***iii. Régulation de la glycolyse***

La glycolyse est principalement régulée au niveau de trois enzymes clés impliquées dans le catabolisme du glucose : l'hexokinase, la PFK-1 et la PDH.

L'activité de l'hexokinase est inhibée par un excédent du produit de la réaction : le glc-6-P, ce qui permet de maintenir un équilibre constant entre sa production et sa consommation et évite l'accumulation de produits intermédiaires.

La PFK-1 est régulée de manière allostérique et elle est soit inhibée par le citrate ou l'ATP soit activée par l'AMP et l'ADP qui augmentent lors d'une demande énergétique accrue.

Enfin, la PDH est régulée par les niveaux d'ATP/ADP pour s'adapter à la demande énergétique ainsi que par phosphorylation via la PDK qui inhibe ainsi la glycolyse.

#### ***b. Catabolisme des acides gras***

De nombreux tissus utilisent majoritairement les acides gras (AG) comme substrats énergétiques, le cœur en est l'exemple majeur, mais contrairement au foie et au tissu adipeux, ces tissus n'ont pas l'équipement nécessaire pour la synthèse des acides gras. Les cellules doivent donc être capables de réguler le transport des acides gras à l'intérieur de leur cytoplasme pour pouvoir s'adapter continuellement à la demande énergétique à partir des AG circulants.

#### ***i. Transport des acides gras dans le cardiomyocyte***

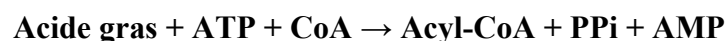
Parce que les AG sont lipophiles, ces derniers peuvent aisément traverser la membrane plasmique des cardiomyocytes par diffusion passive et rapide via un mécanisme « flip-flop » (Abumrad et al., 1998; Kleinfeld, 2000). Néanmoins, leur passage à travers la membrane est aussi largement facilité par la présence de protéines de transport (Figure 14) : la protéine FABPpm (Fatty Acid Binding Protein plasma membrane), la translocase CD36/FAT et les protéines FATP (Abumrad et al., 1999). La contribution relative de chaque moyen de transport est dépendante de la concentration et du ratio acides gras/albumine dans la circulation sanguine.

FABPpm est une protéine membranaire de liaison de 40 kDa qui n'est pas transmembranaire. Présente à la surface membranaire, son niveau d'expression dans un tissu donné dépend de la capacité oxydative du tissu. Ainsi, dans une cellule cardiaque, qui a une forte capacité oxydative, FABPpm est plus exprimée que dans un tissu de type glycolytique (Turcotte et al., 1997).

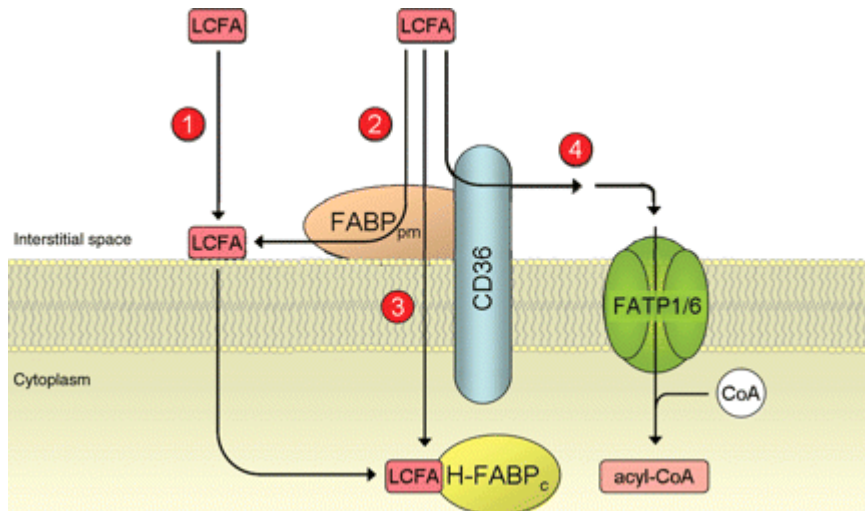
En 1993, Harmon *et al.* ont identifié une protéine de 88 kDa, la FAT (fatty acid translocase), ayant une activité de translocase et une forte homologie avec le récepteur CD36 (cluster of differentiation 36), d'où l'appellation CD36/FAT (Abumrad et al., 1993 ; Harmon et Abumrad, 1993). C'est une glycoprotéine exprimée à la fois à la surface membranaire et dans les endosomes, sa translocation à la membrane dépendant des mêmes stimuli que pour la translocation du transporteur GLUT 4. Au niveau membranaire, CD36/FAT est associée à des microdomaines de type « lipid raft » (radeaux lipidiques) riches en cholestérol et sphingolipides, caractérisés par leurs faibles densités et leurs résistances à des détergents doux. Enfin, cette translocase est abondamment exprimée dans les cellules oxydatives, et facilite le transport essentiellement des AG à longue chaîne, LCFA (long chain fatty acid), à travers la membrane plasmique.

Schaffer *et al.* ont identifié comme transporteur des AG une protéine de 63 kDa possédant six domaines transmembranaires, appelé FATP-1 (fatty acid transPorter-1) (Schaffer et Lodish, 1994). Par la suite, il a été démontré que ce transporteur faisait partie d'une large famille de protéines homologues, et un certain nombre d'isoformes de FATP ont été trouvées (Hirsch et al., 1998). Les isoformes exprimées majoritairement dans le cœur sont les isoformes 1 et 6.

Lorsque les acides gras atteignent le compartiment intracellulaire, ils sont pris en charge par une protéine chaperonne de 15 kDa, la FABPc (fatty acid binding protein cytoplasmic), qui permet leur transport vers les sites utilisateurs et majoritairement vers la membrane externe mitochondriale. Au niveau de la membrane externe mitochondriale, l'acétyl-CoA synthase (ACS) active la conversion des LCFA en Acyl-CoA selon l'équation suivante :



C'est une étape clé juste en amont de la  $\beta$ -oxydation qui démarre par l'oxydation de l'acyl-CoA.



**Figure 14. Transport des acides gras à longue chaîne mettant en jeu des transporteurs spécifiques**

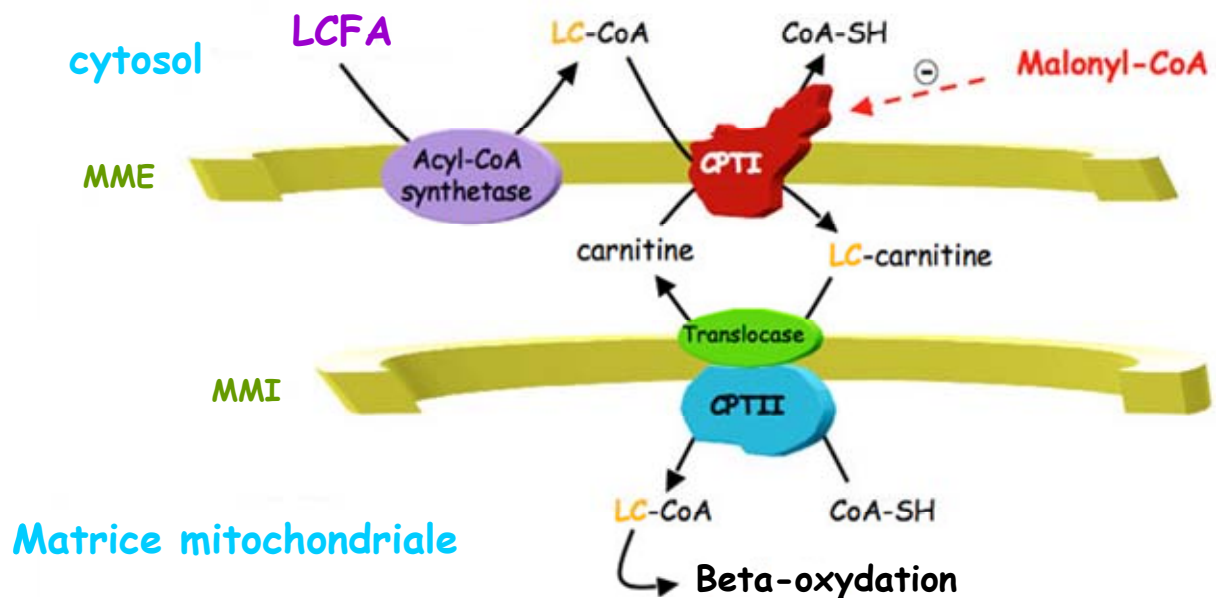
Acheminement des acides gras circulants vers les différents transporteurs. Implication des transporteurs FABP<sub>pm</sub>, FATP et FAT/CD36 et prise en charge cytoplasmique par la chaperonne FABP<sub>c</sub> (H-FABP étant l'isoforme cardiaque). Issue de (Schwenk et al., 2008).

### *ii. Transport des acides gras dans la mitochondrie (Figure 15)*

Les acyl-CoA issus de l'activation des LCFA ne peuvent pas traverser la membrane interne mitochondriale par diffusion simple. La  $\beta$ -oxydation ayant lieu dans la matrice mitochondriale, leur entrée nécessite l'intervention de transporteurs spécifiques : les carnitine-palmitoyltransférases. Ce système de transport est constitué d'un complexe tri-protéique, chacune des protéines ayant une localisation mitochondriale bien spécifique : la carnitine palmitoyltransférase I (CPT-I) au niveau de la membrane externe mitochondriale, la carnitine/acyl-carnitine translocase (CACT) localisée à la membrane interne mitochondriale et la carnitine palmitoyltransférase II (CPT-II) attachée à la membrane interne du côté de la matrice mitochondriale (Kerner et Hoppel, 2000).

Il existe deux isoformes majoritaires de CPT-I : CPT-IA, isoforme spécifique du foie et CPT-IB, isoforme spécifique des muscles dont le cœur et du tissu adipeux. CPT-I catalyse la formation d'acyl-carnitines à longue chaîne à partir des acyl-CoA. CPT-IA est le premier intervenant du système carnitine palmitoyltransférase et constitue l'étape limitante du transport des AG dans la mitochondrie. Cette enzyme catalyse le transfert d'un groupement

acyl de l'acétyl-CoA sur la carnitine à l'origine de la formation d'acylcarnitine. L'acylcarnitine à longue chaîne formée entre dans la matrice mitochondriale en antiport avec une molécule de carnitine, cet échange étant catalysé par la CACT. La dernière étape de ce transfert nécessite l'intervention de CPT-II qui permet la reconversion de cet ester de carnitine en acyl-CoA.



**Figure 15. Transport des acides gras dans la matrice mitochondriale avant  $\beta$ -oxydation**

Les LCFA (long chain fatty acid) sont convertis en acyl-CoA par l'ACS et ces derniers pénètrent dans la mitochondrie via un système de transport composé de 3 protéines : CPT-I (carnitine palmitoyltransférase-I), CACT (carnitine/acylcarnitine translocase simplifiée dans le schéma sous le nom de translocase) et CPT-II (carnitine palmitoyltransférase-II).

Issue de « <http://www.ub.edu/betaoxi/research1.html> »

### *iii. $\beta$ -oxydation*

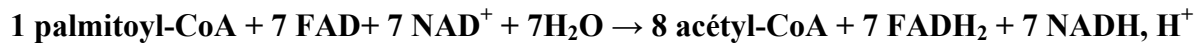
Au niveau de la matrice mitochondriale, l'acyl-CoA généré via CPT-II, va pouvoir entrer dans le cycle de  $\beta$ -oxydation. Chaque cycle de  $\beta$ -oxydation va conduire à la libération de deux carbones sous forme d'acyl-CoA et d'acétyl-CoA (indispensable à l'initiation du cycle de Krebs). L'acyl-CoA ainsi généré peut à nouveau entrer dans un cycle de  $\beta$ -oxydation (Figure 16). La première étape consiste à l'oxydation de l'acyl-CoA via une acyl-CoA-déshydrogénase aboutissant à la formation d'une double liaison entre le carbone C2 et le C3

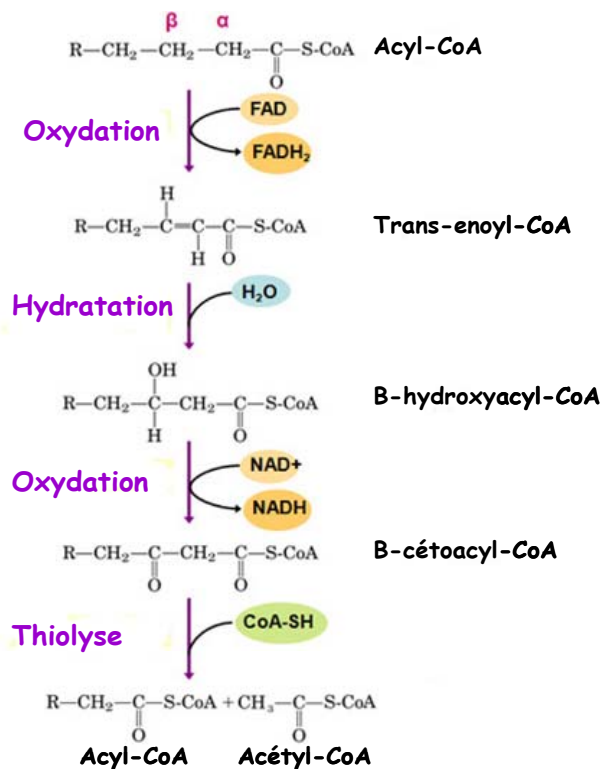
(ou entre le C $\beta$  et le C $\alpha$ ) ce qui donne du trans- $\Delta^2$ -enoyl-CoA de manière concomitante à la formation d'un équivalent réduit : le FADH<sub>2</sub>.

Ce dernier composé est alors hydraté au niveau de la double liaison par une enoyl-CoA-hydratase pour générer le L- $\beta$ -hydroxyacyl-CoA. La troisième étape est une nouvelle oxydation qui, en parallèle de la réduction du NAD<sup>+</sup> en NADH, entraîne la conversion du groupement hydroxyle en un groupement cétonique pour donner du  $\beta$ -cétolacyl-CoA via l'action de la L- $\beta$ -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase.

Enfin, la coupure de la chaîne carbonée à l'origine de la formation d'un acyl-CoA et d'un acétyl-CoA se fait par insertion d'un groupement thiol entre C2 et C3 par l'action d'une thiolase. Ce cycle est répété autant de fois que nécessaire jusqu'au clivage total d'une unité d'acyl-CoA. Le dernier cycle s'achève par la production de deux molécules distinctes d'acétyl-CoA (au lieu d'une molécule d'acyl-CoA + une molécule d'acétyl-CoA).

Ainsi, si l'on prend l'exemple du palmitoyl-CoA (molécule à 16C), la résultante générale de la  $\beta$ -oxydation suit l'équation suivante :





**Figure 16. Dégradation des acides gras par  $\beta$ -oxydation**

Pour chaque cycle de  $\beta$ -oxydation, la résultante est un acétyl-CoA ainsi que deux équivalents réduits : NADH et FADH<sub>2</sub>. *Issue de « <http://www.nature.com> ».*

#### *iv. Régulation du transport et du catabolisme des acides gras*

La  $\beta$ -oxydation qui permet le catabolisme des acides gras, dépend très étroitement du transport de ces derniers. Elle dépend donc de la formation d'acyl-CoA. Ainsi, toute stimulation et/ou inhibition en amont aura un impact sur la  $\beta$ -oxydation. C'est pourquoi la régulation des différents transporteurs, soit à travers le sarcolemme, soit à travers la membrane mitochondriale sera déterminante pour le catabolisme des acides gras.

- **Transport dans le cytoplasme**

Suite à un exercice physique intense et répété, le contenu protéique en FABPpm est augmenté et ceci de manière parallèle à une augmentation des capacités oxydatives musculaires squelettiques (Kiens et al., 1997).

Concernant l'expression de CD36/FAT, celle-ci est fortement induite dans des conditions où l'utilisation des acides gras augmente, par exemple au cours du développement cardiaque (Van Nieuwenhoven et al., 1995). Son expression est aussi stimulée par les agonistes des PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptor), par exemple les fibrates, agonistes des PPAR $\alpha$ , ou les thiazolidinediones, agonistes des PPAR $\gamma$ . Il a aussi été montré une activation de l'expression de cette translocase lors de régimes riches en LCFA dans le cœur notamment (Greenwalt et al., 1995). A l'inverse, il a été observé une diminution de son expression avec des régimes riches en acides gras à chaîne courte et moyenne et de manière étonnante une augmentation de la traduction de son ARNm (pas d'effet montré sur la transcription) en présence de fortes concentrations en glucose (Griffin et al., 2001).

Enfin, la régulation de l'expression de FATP est sous le contrôle positif des PPARs ainsi que de médiateurs de l'inflammation comme le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) ou négatif de l'IL-1 (InterLeukine-1). Cette inhibition est à l'origine d'une diminution périphérique de l'oxydation des acides gras en faveur d'une augmentation du taux de triglycérides (Memon et al., 1998).

- **Transport dans la mitochondrie**

CPT-II et CACT n'ayant pas un rôle régulateur déterminant, l'étude des régulations du transport mitochondrial des acides gras est focalisée sur CPT-I.

Les acétyl-CoA générés lors de la  $\beta$ -oxydation peuvent être aussi carboxylés par une enzyme carboxylase : l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'isoforme cardiaque étant l'ACC $\alpha$ , pour générer du malonyl-CoA. Il existe une relation inverse entre la concentration en malonyl-CoA et le niveau d'oxydation des acides gras. En effet, l'activité de CPT-I est inhibée par le malonyl-CoA, c'est pourquoi il est consensuellement admis que l'étape de trans-estérification de l'acétyl-CoA par CPT-I est l'étape limitante.

L'expression de CPT-I est aussi régulée au niveau transcriptionnel, notamment par un régime riche en acide gras à longue chaîne (Thumelin et al., 1994) ou lors d'une production accrue d'AMP cyclique (AMPc) (Chatelain et al., 1996). De manière équivalente à la translocation des GLUT, l'expression de CPT-I est sensible à la sécrétion d'insuline et de glucagon, l'insuline ayant un effet inhibiteur et le glucagon un effet activateur.



### c. Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs apparait comme un point de convergence de différentes voies métaboliques puisque ce cycle permet l'oxydation de l'acétyl-CoA qui est le produit commun du catabolisme des glucides, des acides gras et du lactate. Ce cycle, appelé aussi cycle du citrate ou cycle tricarboxylique, comprend une série de réactions biochimiques dans la matrice mitochondriale dont la finalité est de produire des intermédiaires énergétiques, qui permettront la synthèse d'ATP au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. De plus, le dernier métabolite généré, l'oxaloacétate, est aussi impliqué dans la première réaction, c'est pourquoi il s'agit d'un cycle (Figure 17).

Ce cycle assure la formation d'un équivalent ATP, le GTP, de plusieurs équivalents réduits, 3 NADH, H<sup>+</sup> et un FADH<sub>2</sub>, ainsi que d'une molécule de CO<sub>2</sub>. Contrairement à la glycolyse qui génère strictement 2 molécules d'ATP, le cycle de Krebs ne produit qu'un équivalent ATP. Cependant, il génère bien plus d'équivalents réduits dont l'énergie chimique potentielle est indispensable au bon fonctionnement de la phosphorylation oxydative.

Lorsque les besoins métaboliques sont à l'équilibre, un excès de certains intervenants du cycle de Krebs, comme le citrate ou le NADH, agira comme un frein sur le fonctionnement du cycle de Krebs au niveau notamment de la citrate synthase (CS). De plus, un excès d'ATP inhibe la CS alors que l'ADP exerce un effet positif sur cette même enzyme.

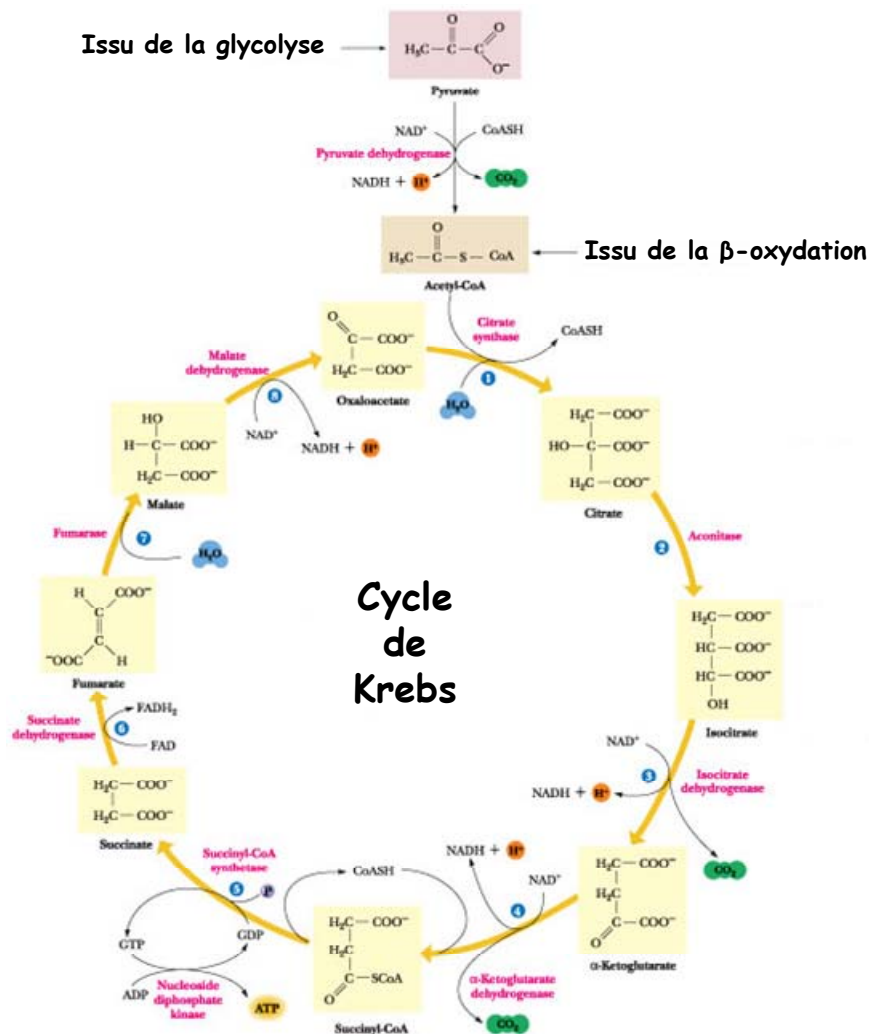


Figure 17. Cycle de Krebs

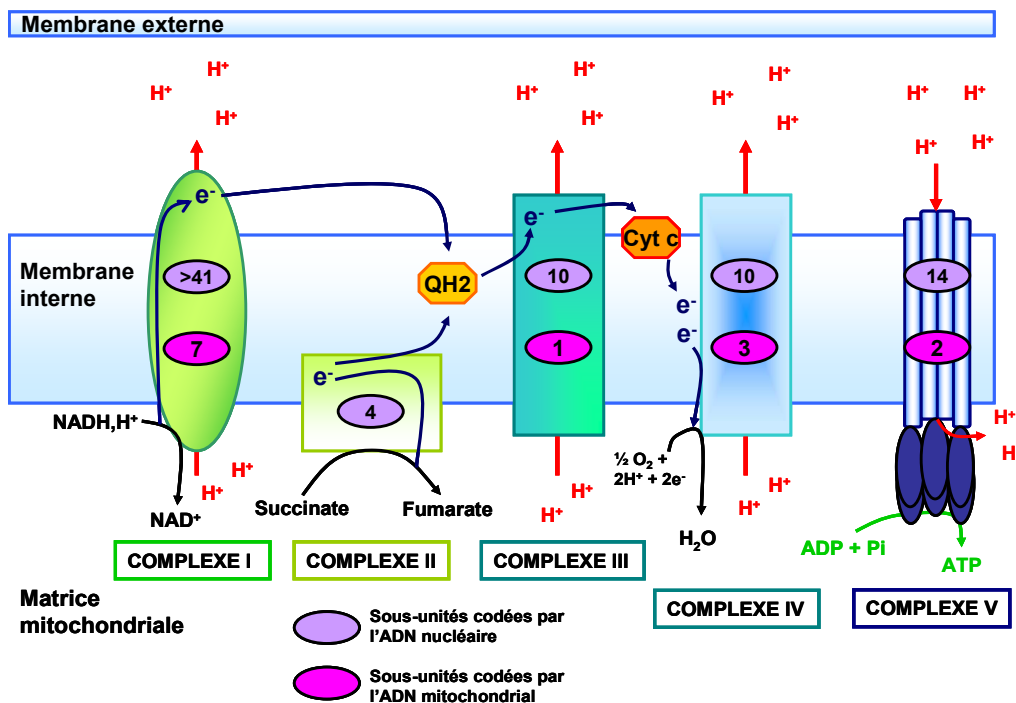
L'oxydation de l'acétyl-CoA, généré via la glycolyse ou la β-oxydation, permet la production d'une molécule de GTP, de trois molécules de CO<sub>2</sub> et de quatre équivalents réduits : 3 NADH, H<sup>+</sup> et 1 FADH<sub>2</sub>. Issue de « <http://web.virginia.edu> ».

d. Phosphorylation oxydative

En 1961, Mitchell formule l'hypothèse de la théorie chimio-osmotique dont le postulat est le suivant : « les oxydations respiratoires génèrent des flux de protons à travers la membrane interne des mitochondries ; les flux de protons activent des ATP-synthases qui phosphorylent l'ADP ».

D'un point de vue mécanistique, l'ensemble des équivalents réduits (NADH et FADH<sub>2</sub>) générés au cours de la glycolyse, de la β-oxydation et du cycle de Krebs, sont

« réoxydés » au niveau de la chaîne respiratoire de la membrane interne mitochondriale. La chaîne respiratoire est constituée de cinq complexes multiprotéiques : la NADH déshydrogénase (complexe I), la succinate déshydrogénase (complexe II), la coenzyme Q déshydrogénase (complexe III), la cytochrome c oxydase (complexe IV) et l'ATP synthase (complexe V). Les complexes I à IV sont impliqués dans la genèse et le transfert d'électrons. Tandis que la production d'électrons est permise par l'oxydation du NADH (par le complexe I) ou du FADH<sub>2</sub> (par le complexe II), le transfert d'électrons est quant à lui facilité par un système de transporteurs impliquant le coenzyme Q (CoQ), le complexe III et le cytochrome c jusqu'à un accepteur final : l'O<sub>2</sub> au niveau du complexe IV. L'O<sub>2</sub> est alors réduit en H<sub>2</sub>O, étape qui donne le nom de respiration cellulaire à ce processus (Figure 18).



**Figure 18. Phosphorylation oxydative**

Organisation de la chaîne respiratoire au niveau de la membrane interne mitochondriale. Les flèches bleues foncées représentent les flux d'électrons et les flèches rouges représentent les flux de protons.

L'énergie, libérée au cours du transfert d'électrons, est utilisée par les différents complexes de la chaîne respiratoire pour permettre l'export des protons (H<sup>+</sup>) vers l'espace intermembranaire, on parle de « potentiel chimio-osmotique ». Etant donné l'imperméabilité de la membrane interne aux protons, il se crée un gradient de H<sup>+</sup> en faveur d'une « ré-entrée »

vers la matrice mitochondriale à travers l'ATP synthase. Cette force protomotrice est à l'origine de la phosphorylation d'ADP en ATP par l'ATP synthase. Ainsi l'ensemble des réactions d'oxydation couplé à la phosphorylation de l'ADP constitue la phosphorylation oxydative, terme générique pour oxydations phosphorylantes (OXPHOS).

Les molécules d'ATP ainsi générées sont exportées de la matrice mitochondriale vers le cytosol via un transporteur antiport ATP/ADP : l'ANT (adénine nucléotide transférase) à l'origine de la mise à disposition de l'ADP pour l'ATP synthase. De manière simplifiée, il est considéré que l'oxydation du NADH est couplée à l'export de 3 H<sup>+</sup> vers l'espace intermembranaire tandis que l'oxydation du FADH<sub>2</sub> est couplée à l'extrusion de 2 H<sup>+</sup> seulement. Par extrapolation, une molécule de NADH abouti à la formation de trois molécules d'ATP et une molécule de FADH<sub>2</sub> permet la synthèse de deux molécules d'ATP.

Ainsi, le couplage  $\beta$ -oxydation/Cycle de krebs/OXPHOS a un potentiel énergétique supérieur à l'association glycolyse/Cycle de krebs/OXPHOS. En effet, l'oxydation du glucose conduit à la production de 36 molécules d'ATP :

**Au total, 10 NADH et 2 FADH<sub>2</sub> sont générés à partir du début de la glycolyse soit (10 NADH X 3) + (2 FADH<sub>2</sub> X 2) = 34 molécules d'ATP, auxquelles sont rajoutées les 2 molécules d'ATP formées lors de la glycolyse.**

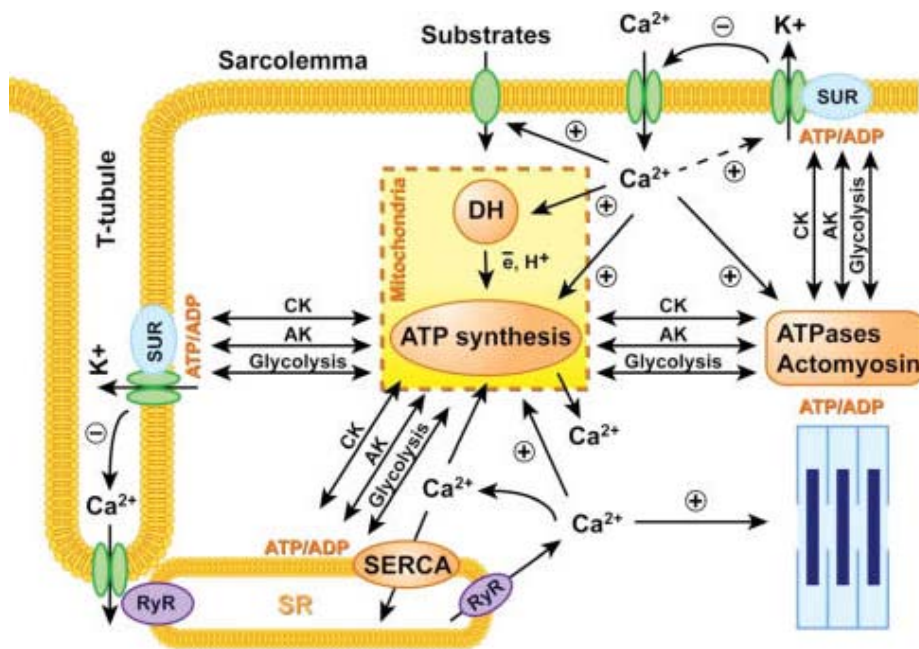
En ce qui concerne l'oxydation des acides gras, en reprenant l'exemple du palmitoyl-CoA, le bilan énergétique est plus de 3 fois supérieur puisqu'il équivaut à la production de 123 molécules d'ATP :

**Au total, il y a génération de 8 acétyl-CoA qui donneront 24 NADH + 8 FADH<sub>2</sub> via le cycle de Krebs auxquels se rajoutent les 7 NADH et les 7 FADH<sub>2</sub> de la  $\beta$ -oxydation soit (31 NADH X 3) + (15 FADH<sub>2</sub> X 2) = 123 molécules d'ATP produites après oxydation d'un acides gras à 16 C.**

C'est pourquoi dans un organe hautement oxydatif, comme le cœur, qui nécessite un apport énergétique important et constant, l'oxydation des acides gras est une source énergétique majoritaire puisqu'elle permet une production massive en ATP.

## 2) Transferts énergétiques

Le cardiomyocyte, de par son architecture hautement organisée, sa fonction contractile et sa dépendance au fonctionnement d'un grand nombre de protéines utilisant l'ATP, nécessite la présence d'un rapport ATP/ADP local important au voisinage des ATPases et des myofilaments. Pour assurer le maintien optimal de ce rapport, il existe différents mécanismes de transfert énergétique entre les mitochondries, lieu de synthèse de l'ATP, et les sites utilisateurs. Ces mécanismes font appel essentiellement à des systèmes enzymatiques et notamment celui de la créatine kinase et de l'adénylate kinase (Dzeja et Terzic, 2003). Cependant, il existe aussi un mécanisme lié à la proximité des sites producteurs et utilisateurs d'énergie appelé canalisation directe (Figure 19).



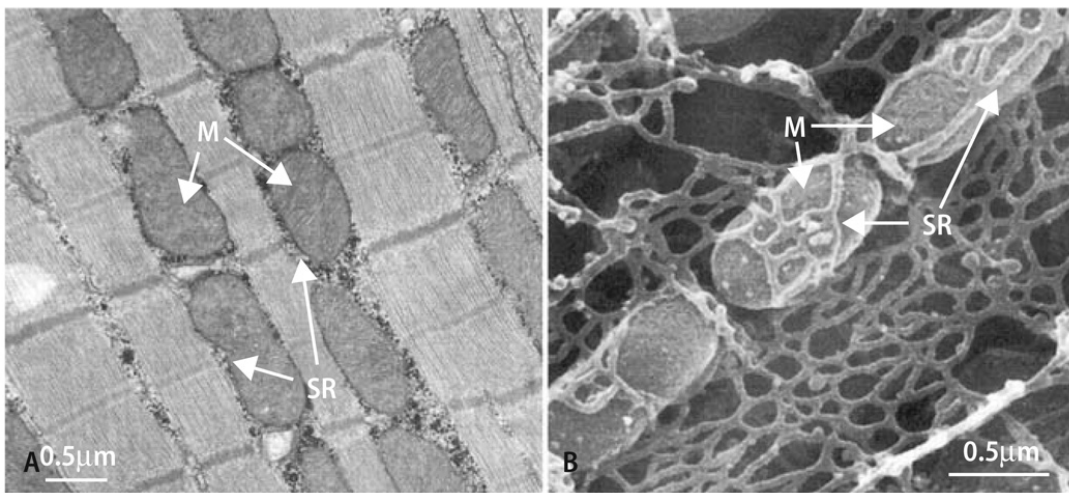
**Figure 19. Transfert et couplage énergétique**

AK : adénylate kinase, CK : créatine kinase, DH : déshydrogénase, SUR : récepteur sulfonyles. Issue de (Saks et al., 2006).

### a. Canalisation directe

Le cardiomyocyte ayant une architecture hautement spécialisée et différenciée, l'organisation spatiale des organites le composant définit des micro-domaines fonctionnels.

Les sites producteurs (les mitochondries) et les sites utilisateurs d'énergie (ATPases) y sont étroitement colocalisés ce qui favorise grandement l'utilisation locale et rapide de l'ADP ou de l'ATP (Figure 20). De ce fait, localement, les ATPases sont approvisionnées en ATP et l'ADP, issu du fonctionnement de ces dernières, contrôle en retour la respiration mitochondriale mais aussi l'activité de certaines enzymes glycolytiques. Ce système, bien que localement efficace, reste limité par des contraintes évidentes de diffusion cytoplasmique ce qui nécessite l'intervention de systèmes de transfert.



**Figure 20. Organisation ultrastructurale du cardiomyocyte**

A. Coupe longitudinale d'un myocyte cardiaque.

B. Scan d'un myocyte cardiaque. M : mitochondrie, SR : réticulum sarcoplasmique.

*Issue de (Maack et O'Rourke, 2007)*

### *b. Système créatine kinase*

Les transferts énergétiques au sein du cardiomyocyte sont essentiellement liés au fonctionnement des créatines kinases (CK). En effet, les CK catalysent le transfert réversible d'un groupement phosphate riche en énergie, d'une molécule d'ATP vers une molécule de créatine et inversement :



Il existe quatre enzymes majoritaires au sein du myocarde : une isoforme mitochondriale, la CK mitochondriale (mi-CK) et trois isoenzymes cytoplasmiques, à savoir, la MM-CK

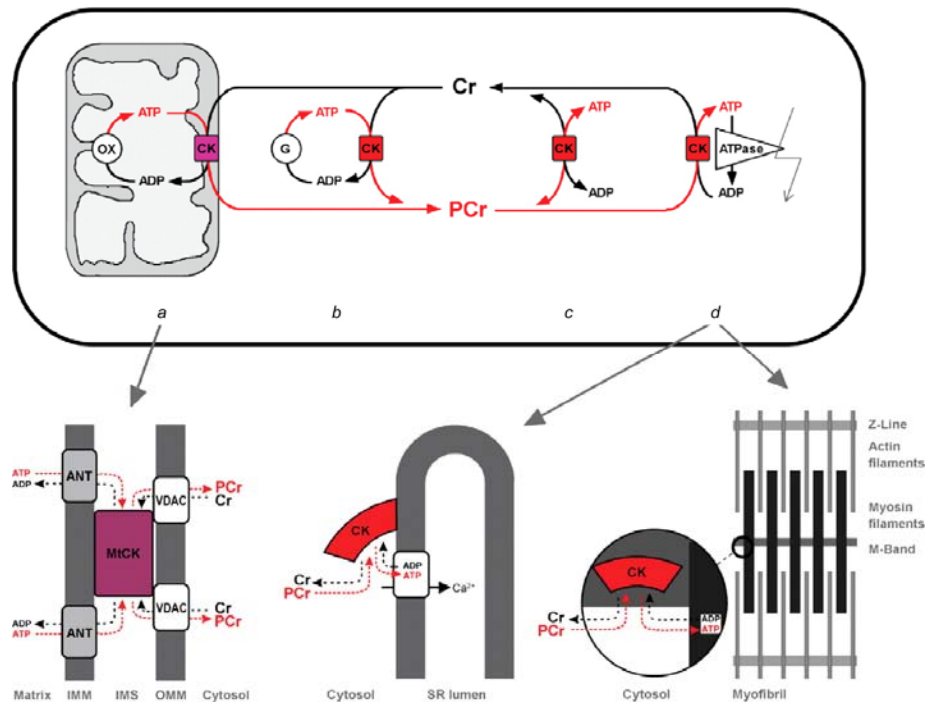
(isoforme musculaire), la BB-CK (isoforme du cerveau) et la MB-CK (isoforme mixte). Dans un cœur sain, les isoformes BB et MB-CK étant très faiblement exprimées, ne seront abordées dans ce chapitre que l'isoforme mitochondriale et l'isoforme MM (Marchisio et al., 1979; Ventura-Clapier et al., 1998).

La mi-CK est localisé entre la membrane interne et externe mitochondriale au voisinage strict de l'ANT et de l'ATP synthase au niveau d'un micro-domaine riche en cardiolipines. Elle permet ainsi la production locale de PCr à partir de l'ATP généré pour un transfert rapide et efficace. L'ADP généré localement peut ainsi être rapidement mis à disposition de la mitochondrie via l'ANT pour la stimulation de la respiration mitochondriale (Figure 21).

La MM-CK est quant à elle à proximité des ATPases soit par simple colocalisation, soit par interaction directe au niveau des bandes M sarcomériques des myofibrilles ou couplée fonctionnellement à la SERCA. Dans tout les cas, elle catalyse la phosphorylation de l'ADP issu des réactions ATPasiques pour maintenir un ratio ATP/ADP optimal et ainsi un fonctionnement optimum de ces ATPases (Kaasik et al., 2001).

Le fonctionnement des deux isoformes de CK est intimement connecté par la CK cytosolique pour assurer un transfert rapide de liaisons riches en énergie entre la mitochondrie et les sites utilisateurs d'énergie. La réaction étant réversible, la présence de la créatine à proximité de la mi-CK a un effet stimulateur sur l'ATP synthétase et la production d'ATP, à l'origine d'un couplage efficace entre production et utilisation (Figure 21).

La CK joue donc un rôle clé dans la mobilisation rapide et spatiotemporelle de l'ATP, assurant ainsi un contrôle cinétique et thermodynamique des ATPases avec lesquelles elle coopère.



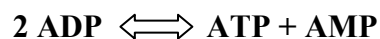
**Figure 21. Système de transfert énergétique lié à la créatine kinase (CK)**

Les isoformes CK sont retrouvées au niveau de différents compartiments cellulaires : mitochondrial (a), cytoplasmique (b et c) et à proximité des ATPases (d).

*Issue de (Saks et al., 2006)*

### c. Système adénylate kinase

Le système adénylate kinase constitue un mécanisme de transfert énergétique complémentaire au système créatine kinase qui catalyse de manière réversible l'interconversion des nucléotides adényliques ATP, ADP et AMP selon la réaction suivante :



Différentes isoformes ont été identifiées, chacune ayant une localisation bien particulière : AK1, majoritairement exprimée dans le myocarde, est localisée au niveau du sarcoplasme. Cette isoforme permet l'approvisionnement local en ATP au voisinage de la machinerie actine/myosine. L'AK2 est plutôt localisée dans l'espace intermembranaire



mitochondrial et l'AK3 serait plutôt dans l'espace matriciel. C'est donc l'action concertée des AK cytoplasmiques et mitochondriales qui facilite le transfert de liaisons riches en énergie vers les ATPases cellulaires (Noma, 2005). Cependant bien que le système adénylate kinase ne soit pas à négliger, il ne semble pas constituer un système de transfert limitant puisque dans des conditions physiologiques la contribution relative de l'AK dans les transferts énergétiques est estimée à 10 % contre 90 % pour la CK (Dzeja et al., 1999).

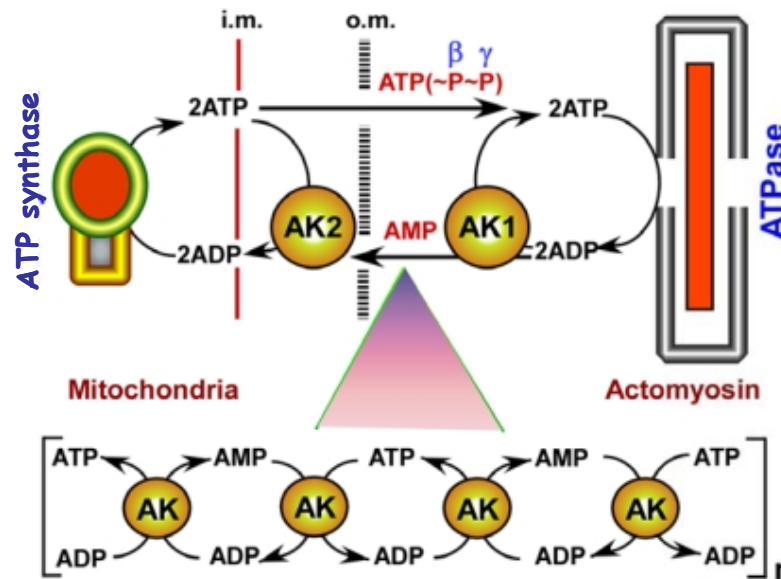


Figure 22. Système adénylate kinase

AK : adénylate kinase, i.m. (inner membrane), o.m. (outer membrane). Issue de (Dzeja et Terzic, 2009).

A l'issu de ce chapitre, il apparait clairement l'importance de ce que l'on peut nommer le couplage « excitation-contraction-énergétique ». En effet, le cœur de par sa fonction contractile, est un organe hautement oxydatif car il nécessite un apport important en énergie, de manière continue, et qui doit être constamment ajusté en fonction de son travail. Autrement dit, la production énergétique dépend du travail cardiaque et inversement. Cette dépendance étroite entre les systèmes producteurs d'énergie et les systèmes utilisateurs confère un équilibre constant et un fonctionnement optimal aux cellules cardiaques. La mitochondrie apparait donc comme le siège central de la production énergétique conférant plus de 90 % de l'apport en ATP dans le cœur. Son rôle déterminant dépend de régulations fines et spécifiques de sa fonction et d'une grande plasticité du réseau mitochondrial pour s'adapter à de forts besoins

**énergétiques. Cette plasticité résulte notamment de la biogenèse et de la dynamique mitochondriale qui contrôlent la croissance, la structure et la mise en place du réseau mitochondrial. Ainsi le chapitre qui suit abordera la notion de contrôle de la biogenèse mitochondriale d'un point de vue mécanistique. Cette biogenèse mitochondriale étant finement régulée, les voies de régulations mises en jeu seront également détaillées.**

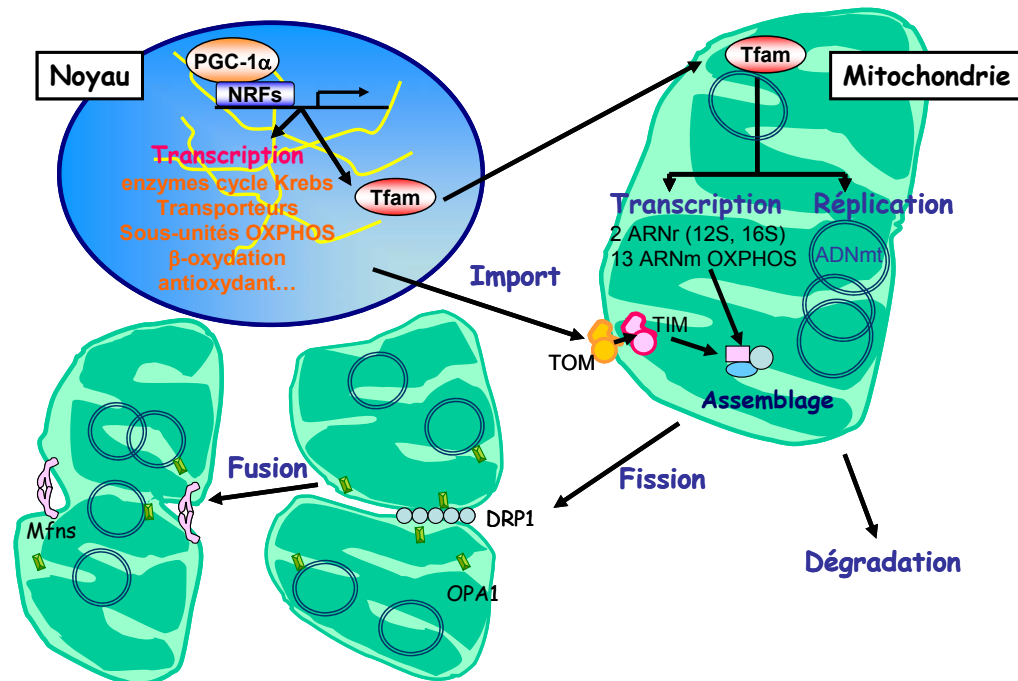
### Chapitre II : Contrôle de la biogenèse mitochondriale

La mitochondrie doit son organisation particulière à la théorie endosymbiotique postulant son origine phylogénétique unique issue des bactéries *Archae*. Une de ses particularités repose essentiellement sur l'existence d'un ADN mitochondrial (ADNmt) circulaire et double brin qui fait de la mitochondrie le seul organite possédant son propre génome, en dehors du noyau. La découverte de l'ADNmt remonte aux années 1960, Rabinowitz *et al.* ayant validé l'existence d'une molécule d'ADN dans la mitochondrie impliquée dans les processus de synthèse et de développement de la structure mitochondriale (Nass et Nass, 1963; Rabinowitz et al., 1965). Par la suite, de nombreuses études ont confirmé cette existence et tenté de caractériser son organisation, sa composition génique et il a été mis en évidence une capacité limitée au niveau de l'expression des gènes mitochondriaux. Il a d'ailleurs été montré une étroite collaboration entre l'ADN nucléaire (ADNn) et l'ADNmt dans l'expression des gènes codant pour les protéines mitochondriales. L'ADN nucléaire code pour plus de 95 % des protéines mitochondriales, le reste étant codé par l'ADNmt. L'ADNmt est donc considéré génétiquement comme semi-autonome, l'équipement protéique de la mitochondrie dépendant en majeure partie de la coordination des deux types d'ADN (Mounolou et Lacroute, 2005).

Ces travaux mettent à nouveau l'accent sur l'importance de la mitochondrie, qui outre son rôle central au niveau énergétique, possède une partie de l'équipement nécessaire à la synthèse de ses protéines et participe donc à sa propre plasticité. Ce fonctionnement propre suppose une organisation et une régulation spécifique à la fois pour la biogenèse de la mitochondrie à partir de la croissance et de la division des organelles préexistants, mais aussi pour adapter ses synthèses protéiques en fonction des besoins énergétiques pour une production optimale d'ATP au sein de la cellule.

**La biogenèse mitochondriale correspond aux processus de formation des mitochondries et/ou de multiplication du nombre de mitochondries dans un souci d'adaptation continue aux besoins métaboliques et plus généralement physiologiques de la cellule. Le terme de biogenèse mitochondriale correspond de manière générale à la**

formation de nouvelles mitochondries grâce à l'expression de protéines mitochondriales mais inclus également le transport des protéines mitochondriales, la synthèse des membranes, la dynamique mitochondriale (fusion/fission) ainsi que le phénomène de mitophagie (Figure 23).



**Figure 23. Biogenèse mitochondriale à l'échelle moléculaire**

Cette Figure illustre les différents événements de la biogenèse mitochondriale qui comprend : la synthèse de protéine mitochondriale, le transport des protéines mitochondriales, la dynamique mitochondriale caractérisée par les phénomènes de fusion et de fission ainsi que la dégradation mitochondriale.

DRP1: dynamin-related protein, Mfn: mitofusins, NRF: nuclear respiratory factor, OPA1: optic atrophy 1, Tfam: transcriptional factor A mitochondrial, TIM: translocase of the inner membrane, TOM: translocase of the outer membrane.

*Issue de (Ventura-Clapier et al., 2008)*

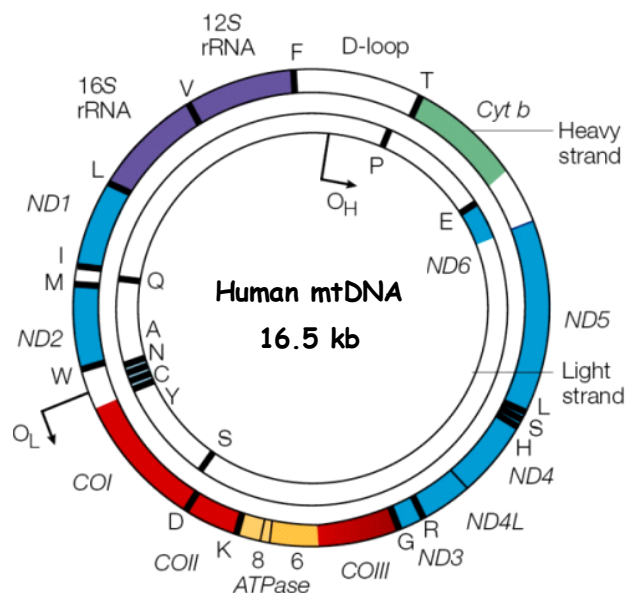
Le contrôle de cette biogenèse complexe nécessite une orchestration fine et régulée et il est maintenant bien établi que le co-activateur transcriptionnel PGC-1 $\alpha$  occupe un rôle crucial dans la régulation des processus métaboliques du système cardiovasculaire. Le rôle de ce co-activateur transcriptionnel dans la biogenèse mitochondriale et plus particulièrement dans le contrôle de l'expression des protéines mitochondriales ainsi que ses régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles seront donc abordés dans ce chapitre.

## I) Contrôle coordonné de la biogenèse mitochondriale

### 1) *Expression des protéines mitochondriales*

#### a) Coordination entre les génomes nucléaire et mitochondrial

Il existe plusieurs copies d'ADN mitochondrial par cellule dont le nombre varie d'une cellule à l'autre et d'un tissu à l'autre (Miller et al., 2003; Frahm et al., 2005). Chez les vertébrés, le génome mitochondrial est organisé sous forme d'ADN double brin et circulaire d'une taille de 16.5 kb (Figure 24). La composition différentielle des deux brins en bases azotées permet de distinguer un brin de type lourd (enrichi en guanine et en thymine) et un brin léger, la majorité de l'information génique étant codée par le brin lourd. Ce dernier code pour 14 ARN de transferts (ARNt), 2 ARN ribosomiaux (ARNr) et 12 polypeptides, tandis que le brin léger code pour 8 ARNt et 1 seul polypeptide. 37 gènes sont donc présents au niveau de l'ADNmt et participent à la synthèse de 13 sous-unités des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire (Figure 24) (Taanman, 1999). La compartimentation extrachromosomique de l'ADNmt contribue à un mode d'hérédité différent des gènes nucléaires et celui-ci est presque exclusivement d'origine maternelle (Schwartz et Vissing, 2002).



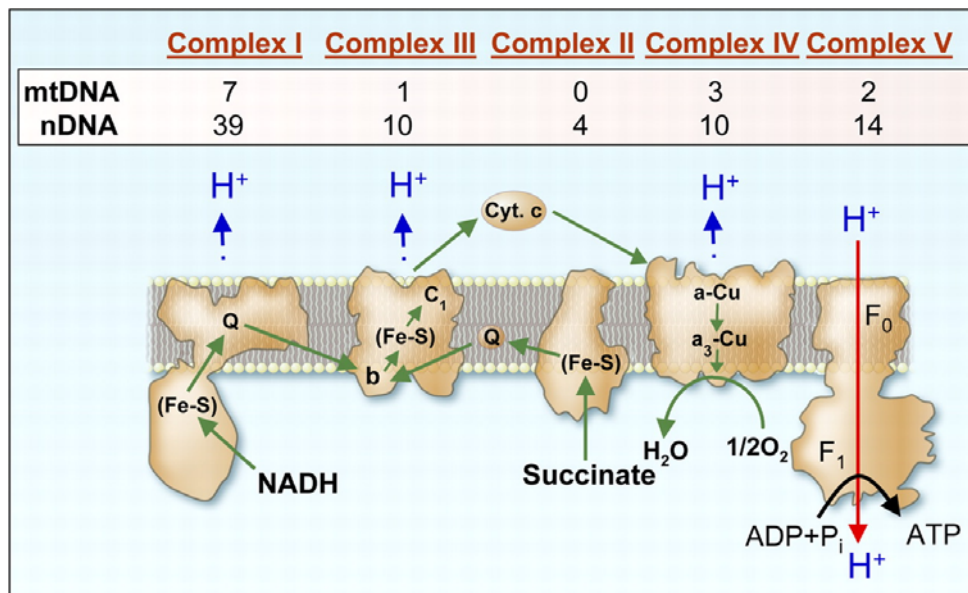
**Figure 24. Représentation schématique du génome mitochondrial humain**

Organisation circulaire et en double brin. Heavy strand: brin lourd, light strand: brin léger.

<http://www.nature.com/scitable/content/the-role-of-the-mitochondrial-genome-in-61848>

Les 77 sous-unités restantes de la chaîne respiratoire sont codées par le génome nucléaire (Figure 25) qui participe non seulement à la synthèse de l'ensemble des protéines impliquées dans l'oxydation du pyruvate et des acides gras, dans le cycle de krebs, mais aussi à la synthèse de protéines nécessaires au transport de protéines du cytosol vers la matrice mitochondriale (Shadel et Clayton, 1997). En effet, certaines protéines codées par l'ADNn doivent rejoindre la matrice mitochondriale pour un assemblage coordonné et correct des sous-unités nucléaires et mitochondriales.

Les sous-unités nucléaires de divers complexes protéiques mitochondriaux sont traduites dans le cytosol en précurseurs protéiques ou pré-protéines possédant des séquences d'adressage mitochondrial et le transport vers la matrice mitochondriale nécessite la présence de protéines spécifiques de transport.



**Figure 25. Sous-unités protéiques de la chaîne respiratoire mitochondriale**

Répartition du nombre de sous-unités protéiques des complexes de la chaîne respiratoire codées soit par l'ADN nucléaire (ADNn) soit par l'ADN mitochondrial (ADNmt) et l'ADNn. Issue de (Shadel et Clayton, 1997).

*b) Expression et transport des protéines mitochondriales*

L'assemblage des protéines mitochondriales a lieu dans la matrice mitochondriale, puis les protéines matures sont insérées au niveau de la membrane mitochondriale. Cela nécessite donc l'intervention de protéines de transport spécifiques aussi bien pour le transport

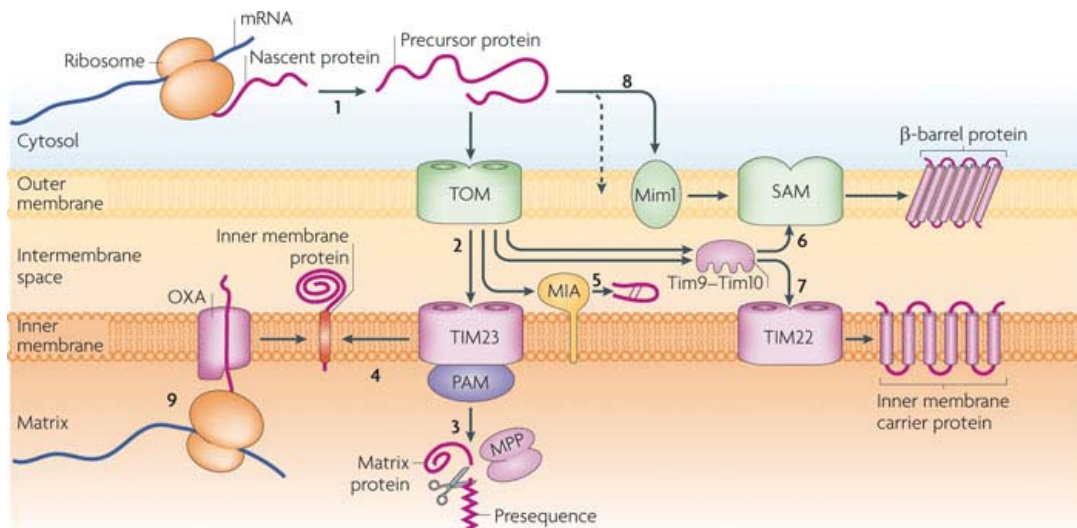
intra-mitochondrial que pour l'insertion au niveau de la membrane mitochondriale (Figure 26).

La translocation des pré-protéines d'origine nucléaire repose dans un premier temps sur leur interaction avec des protéines chaperonnes cytosoliques comme cHSP70 (cytosolic Heat Shock Protein 70) et MSF (Mitochondrial import Stimulation Factor), permettant leur adressage au niveau de la membrane externe mitochondriale.

Le passage dans l'espace inter-membranaire mitochondrial a lieu à travers une translocase de la membrane externe mitochondriale ou TOM (Translocase of the Outer mitochondrial Membrane), organisée sous forme d'un complexe multiprotéique. Ce complexe est constitué de protéines « récepteurs » (TOM 20, 22, 37 et 70), de petites protéines impliquées dans la dynamique et la stabilisation du complexe (TOM 6 et 7) et d'une protéine ayant la fonction de pore (TOM 40) (Pfanner et Meijer, 1997; Becker et al., 2009).

Le passage à travers la membrane interne mitochondriale fait intervenir la machinerie TIM (Translocase of the Inner Membrane). Au moins quatre protéines ont été identifiées comme appartenant à ce complexe : TIM23-44 et TIM23-17 et forment un canal de transport vers la matrice mitochondriale. La translocation protéique ATP-dépendante est facilitée par la présence d'une chaperonne mitochondriale : mtHSP70 (mitochondrial Heat Shock Protein 70) et d'une « co-chaperonne » : Mge1 (Mitochondrial GrpE1).

Consécutivement au passage de la pré-protéine à travers la membrane interne, cette dernière est prise en charge par une peptidase, MPP (mitochondrial processing peptidase) qui enlève sélectivement la séquence d'import mitochondrial (Figure 26) (Baker et al., 2007 ; Chacinska et al., 2009; Becker et al., 2011).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

### Figure 26. Transport des protéines mitochondriales

Transport de pré-protéines du cytoplasme vers la matrice mitochondriale à travers le complexe TOM (1) puis du complexe TIM (2). Certaines protéines sont directement insérées dans la membrane lipidique interne (4), d'autres subissent une maturation dans la matrice mitochondriale par action de la MPP (mitochondrial processing peptidase). La protéine MIA (mitochondrial intermembrane space assembly) permet la rétention des protéines destinées à résider dans l'espace intermembranaire (5). Tim9-Tim10 permet le transfert des précurseurs protéiques hydrophobes soit à la membrane externe impliquant ainsi SAM (sorting and assembly machinery) (6) soit à la membrane interne via TIM22 (7). Enfin certaines protéines sont insérées directement à la membrane externe via la protéine Mim1 (8) (mitochondrial import 1), d'autres directement synthétisées dans la matrice mitochondriales sont insérées à la membrane interne par le complexe OXA (9) (oxidase assembly) (9).

*Issue de (Schmidt et al., 2010)*

Après intervention de la MPP, certains précurseurs nécessitent l'action d'une autre metalloprotéase : MIP (Mitochondrial Intermediate Peptidase). Dans tout les cas, la résultante est la génération d'une protéine de poids moléculaire plus faible que la protéine précurseur nécessitant l'intervention d'un couple chaperone/cochaperone, respectivement Hsp60/chaperonine10, pour acquérir son repliement final. Ces protéines ainsi maturées sont ensuite assemblées avec les sous-unités protéiques d'origine mitochondriale pour former les complexes fonctionnels de la phosphorylation oxydative. Cet assemblage est facilité par la machinerie d'export mitochondrial qui permet la translocation des protéines de la matrice



mitochondriale vers la membrane interne mitochondriale. Certaines protéines ont été identifiées comme étant essentielles à cet ancrage sur la membrane interne : la protéine cytochrome c oxydase 18, la protéine SURF-1 (surfeit1) et la protéine d'assemblage oxydase 1 (Hood et Joseph, 2004).

**Ainsi une biogenèse mitochondriale fonctionnelle nécessite donc une étroite coordination de l'expression des gènes nucléaires et mitochondriaux. Cette coordination est essentielle, puisqu'elle permet notamment l'expression des protéines indispensables à la phosphorylation oxydative, et tout déséquilibre pourrait conduire à une détérioration de la fonction mitochondriale. Pour éviter ce phénomène, il existe au sein de la cellule un contrôle transcriptionnel strict pour assurer une coordination parfaite.**

*c) Contrôle transcriptionnel*

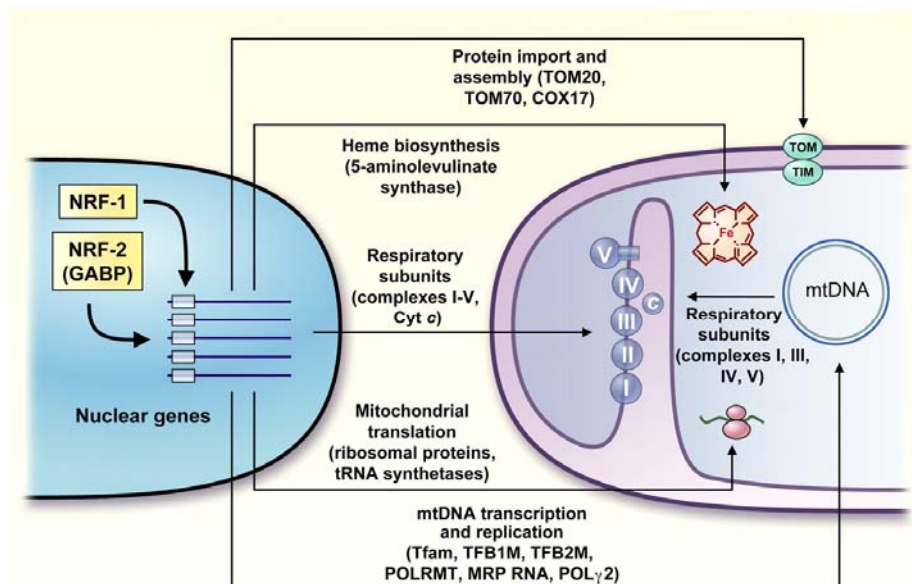
La synthèse « bi-génomique » de certains des complexes de la chaîne respiratoire nécessite une régulation fine et coordonnée de l'expression des gènes nucléaires et mitochondriaux. La capacité de synthèse protéique de l'ADNmt étant limitée à la chaîne respiratoire, l'ensemble des facteurs régulateurs est d'origine nucléaire. Autrement dit, l'ADNn, outre sa participation à la synthèse de certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire, gouverne les synthèses mitochondriales spécifiques via l'expression de gènes codant pour une ARN polymérase (POLRMT), un facteur de transcription et de maintenance de l'ADNmt (Tfam) et des facteurs auxiliaires : TFB1M et TFB2M. En parallèle, deux familles de facteurs nucléaires prédominants ont été décrites, les NRFs (nuclear respiratory factor 1 et 2) et les ERR (estrogen related receptors) (Scarpulla, 2006) comme gouvernant les synthèses nucléaires et étant à l'origine de cette étroite coordination entre synthèse nucléaire et mitochondriale. Ainsi, le contrôle de l'expression des gènes mitochondriaux est étroitement lié aux synthèses nucléaires.

## ***i. Contrôle de la biogenèse mitochondriale par des facteurs nucléaires***

- Les NRFs

A ce jour, deux isoformes ont été étudiées : NRF-1 et NRF-2. Ces facteurs de transcription d'origine nucléaire ont la capacité de se lier à des séquences spécifiques présentes sur les promoteurs d'un certain nombre de gènes nucléaires régulant la fonction mitochondriale. NRF-1 agit sur la majorité des gènes requis pour la synthèse des protéines OXPHOS (Evans et Scarpulla, 1990), mais permet aussi l'expression des facteurs qui régulent l'expression des gènes mitochondriaux et notamment Tfam (Virbasius et Scarpulla, 1994), TFB1M, TFB2M (Gleyzer et al., 2005) et POLRMT. De plus, NRF-1 est associé à l'expression de protéines impliquées dans l'import et l'assemblage des sous-unités protéiques d'origine nucléaire avec celles d'origine mitochondriale.

NRF-2, quant à lui, a été au départ caractérisé comme un activateur spécifique de l'expression d'une sous-unité nucléaire du complexe IV par reconnaissance sur son promoteur d'un motif consensus de type GGAA (Kelly et Scarpulla, 2004). Depuis, sa participation dans la régulation de l'expression des autres gènes impliqués dans l'expression des protéines de la chaîne respiratoire, mais également de l'expression du facteur de transcription Tfam a été clairement établie (Bruni et al., 2010) (Figure 27).



**Figure 27. Contrôle nucléaire de la biogenèse mitochondriale**

L'activation de gènes nucléaires par les NRFs permet la synthèse de sous-unités de la chaîne respiratoire non codées par la mitochondrie, de protéines impliquées dans le transport de ces sous-unités vers la mitochondrie ainsi que l'expression de facteurs clés contrôlant la transcription de l'ADNmt. *Issue de (Scarpulla, 2008).*

- Les ERRs

Les ERRs (Estrogen Related Receptors) font partie de la famille des récepteurs nucléaires orphelins, à savoir des récepteurs pour lesquels aucun ligand spécifique n'a été identifié. Ces récepteurs sont proches au niveau structural des récepteurs aux œstrogènes (ERs) mais ne lient en aucun cas les œstrogènes naturels. Leur identification en tant que récepteur nucléaire impliqué dans le contrôle la biogenèse mitochondriale est récente. En absence de ligands connus, pour associer l'activation des ERRs à une fonction biologique, des études de promotologie couplées à des techniques de type ChIP (chromatin immunoprecipitation) ont été menées pour identifier un ensemble de gènes cibles des ERRs (Eichner et Giguere, 2011).

Il existe trois isoformes des ERRs :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Néanmoins,  $ERR\alpha$  apparait comme l'isoforme majoritaire associée au contrôle de la biogenèse mitochondriale et au contrôle de l'expression coordonnée des sous-unités protéiques mitochondriales. En effet,  $ERR\alpha$  contrôle l'expression de translocases impliquées dans le transport des précurseurs protéiques

nucléaires à travers la membrane interne mitochondriale ainsi que du facteur de transcription TFB2M (Giguere, 2008).

De plus, il a été largement associé à l'induction de la biogenèse mitochondriale de la même manière que les NRFs (Schreiber et al., 2004; Mootha et al., 2004).

## *ii. Initiation de la transcription de l'ADNmt*

Les facteurs nucléaires précédemment décrits apparaissent donc comme des facteurs clés dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale, et sont également à l'origine de la transcription des gènes mitochondriaux. En effet, la transcription de l'ADNmt nécessite l'intervention d'un complexe multiprotéique d'origine nucléaire dont l'expression est étroitement liée aux facteurs nucléaires NRFs et ERRs.

- Mécanisme général

Chaque brin de l'ADNmt contient un promoteur unique indispensable à l'initiation de la transcription. Le brin lourd, communément appelé H-strand (heavy strand) contient un promoteur appelé par analogie HSP (heavy-strand promoter), et possède deux sites d'initiation distincts : HSP1 et HSP2. De la même manière, le brin léger ou L-strand (light strand) possède un promoteur appelé LSP (light-strand promoter) mais ne possède cependant qu'un seul site d'initiation. La transcription à partir de ces promoteurs mitochondriaux est bidirectionnelle et conduit à l'obtention d'ARN précurseurs polycistroniques. Autrement dit, un même ARN conduit à la synthèse de plusieurs polypeptides (Shadel et Clayton, 1997).

L'initiation de la transcription de l'ADNmt au niveau de chacun des promoteurs dépend d'une machinerie transcriptionnelle spécifique de la mitochondrie. Ce complexe transcriptionnel comprend notamment une ARN polymérase (POLRMT), des facteurs auxiliaires importants pour la reconnaissance du site de fixation sur le promoteur (TFB1M et TFB2M) et un facteur de transcription mitochondrial (Tfam). La liaison de ce complexe sur les zones promotrices des deux brins de l'ADNmt est à l'origine de l'initiation de la transcription des gènes mitochondriaux.

- ARN polymérase mitochondriale : POLRMT

Composée d'une seule sous-unité, cette ARN polymérase, aussi connue sous l'appellation h-mtRPOL (human-mitochondrial RNA polymerase), possède une forte homologie avec les ARN polymérases des bactériophages (Tiranti et al., 1997). Elle possède une partie N-terminale spécifique et unique, essentielle pour la transcription de l'ADN mitochondrial. Cette partie N-terminale possède deux motifs répétés de 35 acides aminés de type pentatricopeptidique : motif PPR qui semble être l'élément indispensable à la synthèse des ARNs (Gaspari et al., 2004). POLMRT interagit directement avec des séquences spécifiques promotrices, néanmoins sa fonctionnalité dépend strictement de sa liaison avec d'autres protéines essentielles à l'initiation de la transcription.

- Facteurs auxiliaires de la POLRMT : les TFBMs (Transcriptional Factor B Mitochondrial)

POLRMT forme un complexe stable avec TFB1M et TFB2M ce dernier étant décrit comme ayant une meilleure affinité avec POLRMT. Ces deux facteurs sont assimilés à des ARN ribosomiaux méthyltransférases mais l'activité méthyltransférase n'est pas indispensable à la transcription puisque son inactivation n'affecte pas la transcription. Il est consensuellement admis que l'activité de POLRMT dépend strictement de son association avec les TFBMs mais leur action transcriptionnelle reste à élucider (Falkenberg et al., 2002). Par contre, le domaine carboxy-terminal des TFBMs reconnaît le domaine d'activation du facteur de transcription Tfam. Les TFBMs peuvent donc être assimilés à des adaptateurs qui permettent la connexion entre POLRMT et Tfam au niveau du promoteur (McCulloch et Shadel, 2003) indépendamment d'une liaison directe avec l'ADN (Figure 28).

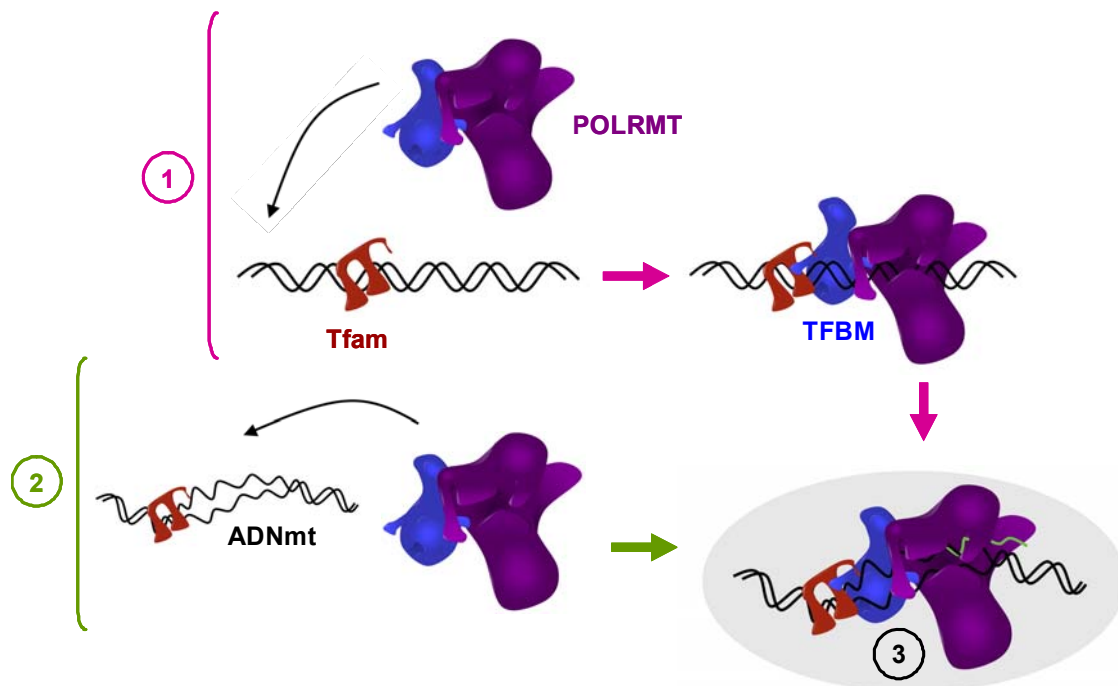
- Facteur de transcription mitochondrial : Tfam

Tfam apparaît comme l'élément critique pour l'initiation de la transcription de l'ADN mitochondrial. Le complexe précédemment décrit nécessite absolument la reconnaissance du promoteur par Tfam (Figure 28). Ce facteur fait partie d'un groupe de protéines appelées HMG-box, protéines décrites comme essentielles à la stimulation de la transcription grâce à la

reconnaissance de sites consensus, ici en amont des LSP et HSP (Asin-Cayuela et Gustafsson, 2007). En outre, Tfam reconnaît des séquences spécifiques de type activatrice juste en amont du promoteur (« enhancers ») ce qui potentialise l'activation de la transcription par le complexe transcriptionnel Tfam/TFBM/POLRMT. Par ailleurs, sa conformation tétramérique facilite sa fixation notamment avec les TFBMs (Fisher et al, 1992). Ainsi, sa fixation sur l'ADN et son interaction avec les facteurs TFBMs seraient le point initiateur du recrutement de POLRMT et donc le facteur clé de la transcription de l'ADNmt (Scarpulla, 2008).

De plus, la régulation de son expression génique en réponse notamment aux NRFs le place comme l'élément reliant l'ADN nucléaire à l'ADN mitochondrial et permet ainsi une expression de protéines mitochondriales complètes, matures et fonctionnelles.

- Proposition d'un modèle schématique de l'initiation de la transcription de l'ADNmt



**Figure 28. Modélisation du complexe d'initiation de la transcription de l'ADNmt**

*Adaptée d'après (Bonawitz et al., 2006).*

Cela nécessite la présence simultanée de Tfam, POLRMT et les TFBMs. La contribution précise de chaque facteur restant à préciser, deux modèles sont actuellement proposés (Figure 28) :

1. L'ADN est sous forme double hélice non déformée. La fixation du complexe POLRMT/TFBM fixe le promoteur sous forme d'un complexe de pré-initiation. Son interaction avec Tfam entraîne la déformation de la double hélice.

2. Tfam lie l'ADN avec une haute affinité et permet l'exposition de sites nécessaires à la transcription. Cet ADN ainsi déformé permet l'accès au promoteur du complexe POLRMT/TFBM.

3. Dans tout les cas, TFBM permet la liaison entre Tfam et POLRMT et le complexe associé à une déformation de la double hélice de l'ADN au niveau du promoteur est la conformation idéale au démarrage de la transcription (3).

La biogenèse mitochondriale implique donc l'intégration de facteurs clés dans le contrôle de l'expression des gènes à la fois nucléaires et mitochondriaux. Cela suppose cependant de pouvoir coordonner le fonctionnement de l'ensemble de ces voies de régulation. De plus, l'émergence ces dernières années de l'existence de co-activateurs et de co-répresseurs transcriptionnels, facteurs ne pouvant pas lier directement l'ADN, a largement contribué à redéfinir partiellement certains concepts proposant les facteurs de transcription comme seuls éléments modulables par différents signaux cellulaires. Ainsi, il est désormais admis que les premières cibles hautement régulées par des signaux hormonaux et/ou diverses voies de signalisation sont les co-activateurs et les co-répresseurs transcriptionnels. De plus, les complexes nucléaires de transcription généralement décrits n'ont pas l'activité enzymatique nécessaire à la modification de la chromatine, au déroulement de l'ADN et au recrutement de l'ARN polymérase. Ce rôle est détenu par les co-activateurs qui apparaissent donc comme des facteurs clés et centraux pour activer la transcription des gènes nucléaires.

Dans les tissus ayant un fort métabolisme oxydatif, l'expression de ces co-activateurs est hautement inductible en réponse à divers signaux cellulaires pour constamment adapter la production énergétique aux besoins métaboliques. Autrement dit ces facteurs peuvent être assimilés à des senseurs de l'homéostasie énergétique de la cellule. Un des co-activateurs le plus décrit et fortement exprimé dans les tissus oxydatifs est le co-activateur transcriptionnel PGC-1 $\alpha$  (PPARgamma co-activator-1alpha).

**La suite de ce chapitre a donc pour objectif de démontrer le rôle central de ce facteur dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale.**

## **2) *Le co-activateur transcriptionnel PGC-1 $\alpha$ et la biogenèse mitochondriale***

### ***a) Découverte de PGC-1 $\alpha$***

Initialement, ce co-activateur a été découvert dans le tissu adipeux brun comme co-activateur interagissant avec un récepteur nucléaire spécifique : PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma) pour la régulation au niveau physiologique de la thermogénèse adaptative. C'est pourquoi il a été nommé PGC-1 $\alpha$  (PPARGamma Coactivator-1alpha). De plus, il a été montré comme étant un co-activateur dont l'expression est largement induite en réponse à divers stimuli externes. Dans le cas d'une thermogénèse adaptative, son expression est drastiquement augmentée en réponse à une exposition au froid dans le tissu adipeux brun et dans le muscle squelettique (Puigserver et al., 1998) et est associée à l'expression de protéines mitochondriales découplantes (UCPs : uncoupling proteins). Cette étude a permis pour la première fois de proposer PGC-1 $\alpha$  comme un co-activateur inductible, permettant la mise en place d'une réponse adaptative par activation de l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ .

### ***b) Rôle de PGC-1 $\alpha$ dans la biogenèse mitochondriale***

Par la suite, l'activation de PGC-1 $\alpha$  a été corrélée à une induction de la biogénèse mitochondriale en réponse à divers stimuli externes tels que le froid ou l'exercice. En effet, Wu *et al.* ont montré l'induction par PGC-1 $\alpha$  d'un ensemble de gènes nucléaires impliqués dans le processus de biogénèse mitochondriale, à savoir : les NRFs, Tfam, ou encore COXIV ou l'ATP synthétase. De plus, l'expression de Tfam serait potentialisée par la fixation de PGC-1 $\alpha$  sur les NRFs. Cette induction de la biogénèse mitochondriale via l'activation de PGC-1 $\alpha$  est d'ailleurs associée à une augmentation de la consommation mitochondriale en oxygène traduisant une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire dans des cellules musculaires striées en culture (Wu et al., 1999). Cette étude supporte le concept proposant PGC-1 $\alpha$  comme un facteur central dans l'induction de la biogénèse mitochondriale.

Cependant, ces premières études ont été menées sur des tissus associés à une thermogénèse adaptative. Sachant que la thermogénèse adaptative en réponse à une baisse de



température met en jeu une phosphorylation oxydative découplée, des études ultérieures se sont focalisées sur la place de PGC-1 $\alpha$  dans des tissus non associés dans des conditions physiologiques à une phosphorylation oxydative découplée. En effet, Puigserver *et al.*, et d'autres, ont validé la présence de PGC-1 $\alpha$  dans des tissus ne présentant pas de thermogenèse adaptative tels que le cerveau ou le cœur (Puigserver et al., 1998; Esterbauer et al., 1999), légitimant ainsi un rôle plus large de PGC-1 $\alpha$ . Ceci a été confirmé dans le cœur par l'observation d'une augmentation de la biogenèse mitochondriale associée à une induction de l'expression de PGC-1 $\alpha$  durant le développement périnatal du cœur. Cette relation entre biogenèse mitochondriale et PGC-1 $\alpha$  dans le tissu cardiaque a été validée par sa surexpression soit dans des cellules cardiaques néonatales, soit *in vivo* par la création de souris transgéniques (Lehman et al., 2000). De manière intéressante l'activation de PGC-1 $\alpha$  a été associée pour la première fois à une augmentation de la phosphorylation oxydative non découplée.

### c) Activité transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$

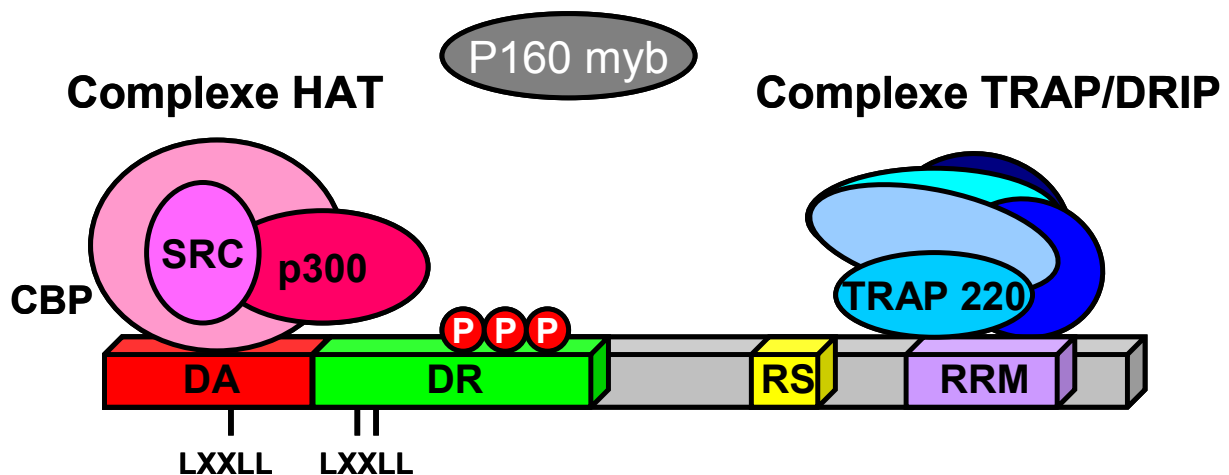
Parce que PGC-1 $\alpha$  est incapable par lui-même de lier directement l'ADN, son activité transcriptionnelle dépend étroitement du recrutement d'un complexe protéique essentiel au remodelage de la chromatine. En absence de recrutement par un facteur nucléaire dont les récepteurs nucléaires, l'activité transcriptionnelle basale de PGC-1 $\alpha$  est faible du fait de la présence d'un domaine inhibiteur (Puigserver et al., 1999).

D'autre part, il semblerait que la levée de l'inhibition puisse aussi être liée à une phosphorylation via la MAPK p38 (mitogen-activated protein kinase p38) spécifiquement sur les résidus T262 (thréonine 262), S265 (sérine 265) et T298 (thréonine 298) (Puigserver et al., 2001). Cette phosphorylation perturberait la liaison de la protéine p160 myb au niveau du domaine inhibiteur en faveur d'une activation de PGC-1 $\alpha$  (Spiegelman et Heinrich, 2004).

Ainsi, concernant les récepteurs nucléaires, la fonctionnalité de PGC-1 $\alpha$  dépend dans un premier temps de son interaction avec des facteurs de transcriptions liant l'ADN sur des séquences promotrices spécifiques de type NRRE (nuclear receptor response element). Le recrutement de PGC-1 $\alpha$  par un récepteur nucléaire est permis par la présence de petites séquences riches en leucine de type LXXLL (X étant associé à un acide aminé quelconque) au niveau N-terminal, éléments de reconnaissance spécifiques à tous les récepteurs nucléaires (Wu et al., 2003).

Dans un deuxième temps, PGC-1 $\alpha$  permet le recrutement d'un ensemble de protéines essentielles pour l'activation de la transcription. Ce recrutement multiprotéique forme un complexe transcriptionnel de régulation. Les co-activateurs transcriptionnels sont classiquement répartis en deux classes : I et II, la classe I regroupant les co-activateurs possédant une activité enzymatique essentielle à la modification de la chromatine, la classe II étant composée de co-activateurs interagissant avec la machinerie impliquant l'ARN polymérase. PGC-1 $\alpha$  fait partie de la classe II, ce qui suppose que ce facteur ne possède pas d'activité intrinsèque de modification de la chromatine.

Cependant, PGC-1 $\alpha$  permet de recruter un certain nombre de facteurs de la classe I et notamment des protéines de la famille des histones acétylases (HAT) au niveau N-terminal via le domaine d'activation. D'autre part, il permet le recrutement de l'ARN polymérase II (POLII) via le complexe TRAP/DRIP (Thyroid hormone Receptor Associated Protein/D vitamine Receptor interacting protein) au niveau C-terminal (Duncan et Finck, 2008) (Figure 29). PGC-1 $\alpha$  apparaît donc comme l'élément central de cette machinerie complexe à l'origine du bon déroulement de la transcription.



**Figure 29. Structure et fonction de PGC-1 $\alpha$**

Cette figure présente les différents complexes protéiques associés à PGC-1 $\alpha$ . Le complexe HAT (histone acétylase) lie PGC-1 $\alpha$  au niveau N-terminal sur le domaine d'activation (DA). Le complexe TRAP/DRIP est quant à lui recruté au niveau C-terminal. La présence de domaines LXXLL indique la liaison possible avec les récepteurs nucléaires. P160 myb se fixe sur le domaine de répression (DR) inhibant ainsi l'activité de PGC-1 $\alpha$ . La phosphorylation du DR lève la répression.

RS = rich serin domain, RRM = RNA recognition motif.

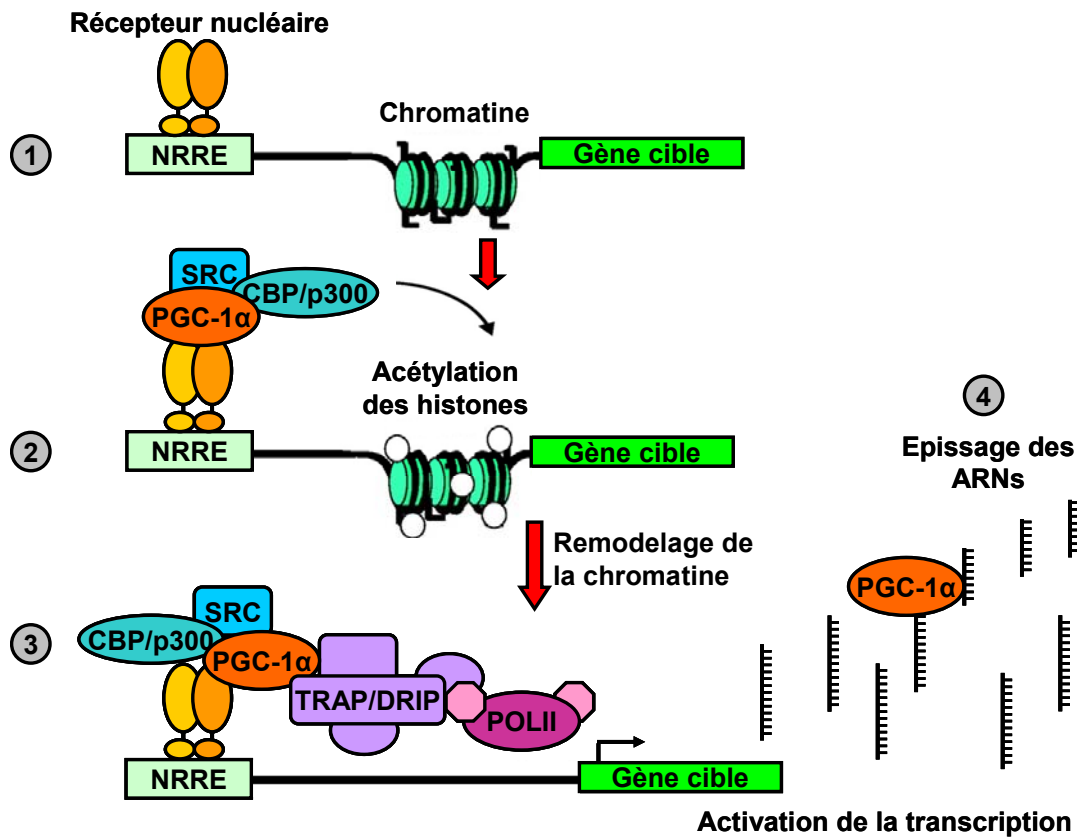
*Modifiée d'après (Lin et al., 2005)*

Le recrutement du complexe HAT, une fois PGC-1 $\alpha$  activé, est à l'origine d'une modification de la chromatine favorisant ainsi l'accès de la machinerie de transcription au gène. En effet, ce complexe HAT est composé d'histones acétylases, les plus décrites étant SRC-1 (Steroid Receptor coactivator-1) et CBP/p300 (CREB-Binding-Protein/E1A binding protein p300). Celles-ci possèdent une activité intrinsèque histone acétyl transférase à l'origine de l'acétylation des histones. Cette acétylation des histones provoque un remodelage de la chromatine en faveur d'une meilleure accessibilité du complexe de transcription sur la région promotrice du gène à transcrire.

En parallèle, PGC-1 $\alpha$  s'associe à POLII via le complexe TRAP/DRIP ou complexe médiateur. Ce complexe médiateur est composé de différentes sous-unités protéiques et notamment la sous-unité TRAP 220 reconnue par PGC-1 $\alpha$ . PGC-1 $\alpha$  agit donc comme un lien moléculaire entre le complexe HAT, le complexe d'initiation à la transcription et le récepteur nucléaire au niveau du promoteur du gène à transcrire (Wallberg et al., 2003; Roeder, 2005). Ce complexe moléculaire, une fois mis en place, potentialise fortement l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire impliqué et dépend étroitement du recrutement de PGC-1 $\alpha$ .

PGC-1 $\alpha$  se lie également à la forme activée de POLII et à des facteurs spécifiques impliqués dans l'élongation et l'épissage de l'ARN (Monsalve et al., 2000). En effet, au niveau C-terminal de ce co-activateur, sont retrouvés deux motifs protéiques généralement associés à la maturation des pré-ARNm et à l'export des ARNm ainsi maturés. Ces domaines caractéristiques, respectivement un court domaine riche en sérine/arginine et un domaine de type RRM (RNA recognition motif), permettent le recrutement de protéines clés telles que U1 snRNP (U1 small nuclear RiboNucleoProtein) ou SRp40, impliquées dans l'épissage des pré-ARNm (Knutti et Kralli, 2001).

**PGC-1 $\alpha$  apparaît donc comme un acteur central de l'activation de la transcription puisque son recrutement conduit à une modification de la chromatine, une initiation de la transcription et permet d'engager la maturation des pré-ARNm via le recrutement de facteurs spécifiques. Le complexe de transcription ainsi mis en place potentialise fortement l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire impliqué (Figure 30 pour bilan).**



**Figure 30. Activation de la transcription : rôle central de PGC-1 $\alpha$**

1. Reconnaissance par les récepteurs nucléaires des séquences promotrices NRRE en amont du gène cible d'intérêt.
2. Recrutement de PGC-1 $\alpha$  puis du complexe HAT à l'origine d'une acétylation des histones et du remodelage de la chromatine.
3. Recrutement du complexe TRAP/DRIP, et de POLII
4. Epissage des ARNs

*Adaptée d'après (Finck et Kelly, 2007)*

## **II) PGC-1 $\alpha$ , chef d'orchestre de la fonction mitochondriale**

PGC-1 $\alpha$  apparaît comme un acteur central du contrôle de la biogenèse mitochondriale et de manière plus large du métabolisme énergétique et notamment de l'utilisation des substrats. Sa découverte comme facteur inductible le place comme un élément important dans la mise en place des adaptations métaboliques en réponse à un déséquilibre énergétique au

sein de la cellule. Les travaux de Puigserver en 1998 ont montré que son induction lors d'une exposition au froid était tissu spécifique avec une induction dans le tissu adipeux et le muscle squelettique, mais pas dans le cerveau et le cœur (Puigserver et al., 1998). De plus, l'induction de son expression a été associée à une thermogénèse adaptative dépendante de l'activation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . Cependant, les besoins métaboliques au sein d'un tissu sont susceptibles d'être modulés en réponse à d'autres signaux externes comme l'exercice physique ou encore le jeûne (restriction calorique). Il n'est donc pas improbable de supposer que selon le tissu considéré et le stimulus mis en jeu, les réponses peuvent être différentes.

**A travers un exemple de stimulus physiologique externe comme l'exercice, vont être détaillées dans la section suivante la tissu-spécificité des adaptations métaboliques engendrées ainsi que les voies de régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles de PGC-1 $\alpha$  mises en jeu.**

### ***1) Exemple de l'exercice physique***

Un des pionniers ayant proposé l'exercice physique comme un inducteur physiologique de la masse mitochondriale est J. Holloszy en 1967. En effet, la comparaison entre un groupe de rats soumis à un exercice modéré tous les jours pendant 12 semaines et un groupe de rats sédentaires a montré une augmentation massive de la consommation en oxygène couplée à une augmentation de la masse mitochondriale dans le muscle squelettique gastrocnémien et soléaire (Holloszy, 1967).

Depuis, de nombreuses études ont largement validé le concept d'une augmentation de la biogénèse mitochondriale comme réponse adaptative à l'exercice physique au sein du muscle squelettique.

#### ***a) Adaptations métaboliques du muscle squelettique***

En réponse à un entraînement en endurance, le muscle squelettique fait preuve d'une incroyable plasticité qui passe par un changement phénotypique contractile, métabolique et vasculaire. En effet, une reprogrammation génétique se met en place conduisant à l'augmentation de l'expression de transporteurs membranaires, d'enzymes du métabolisme

énergétique, de protéines contractiles et une augmentation de la vascularisation du muscle squelettique.

Cette plasticité concourt à l'amélioration des capacités oxydatives du muscle ainsi qu'à une augmentation de l'apport et de l'utilisation des substrats tels que les hydrates de carbone et les acides gras. PGC-1 $\alpha$  a été proposé comme un élément central à l'origine de la coordination de ces adaptations métaboliques, contractiles et vasculaires du muscle squelettique en réponse à l'exercice. De manière convaincante, une surexpression muscle-spécifique de PGC-1 $\alpha$  reproduit les effets métaboliques de l'entraînement à savoir une meilleure performance associée à une augmentation des marqueurs de la phosphorylation oxydative ainsi que du transport et de l'oxydation des acides gras (Calvo et al., 2008).

### *i. Biogenèse mitochondriale*

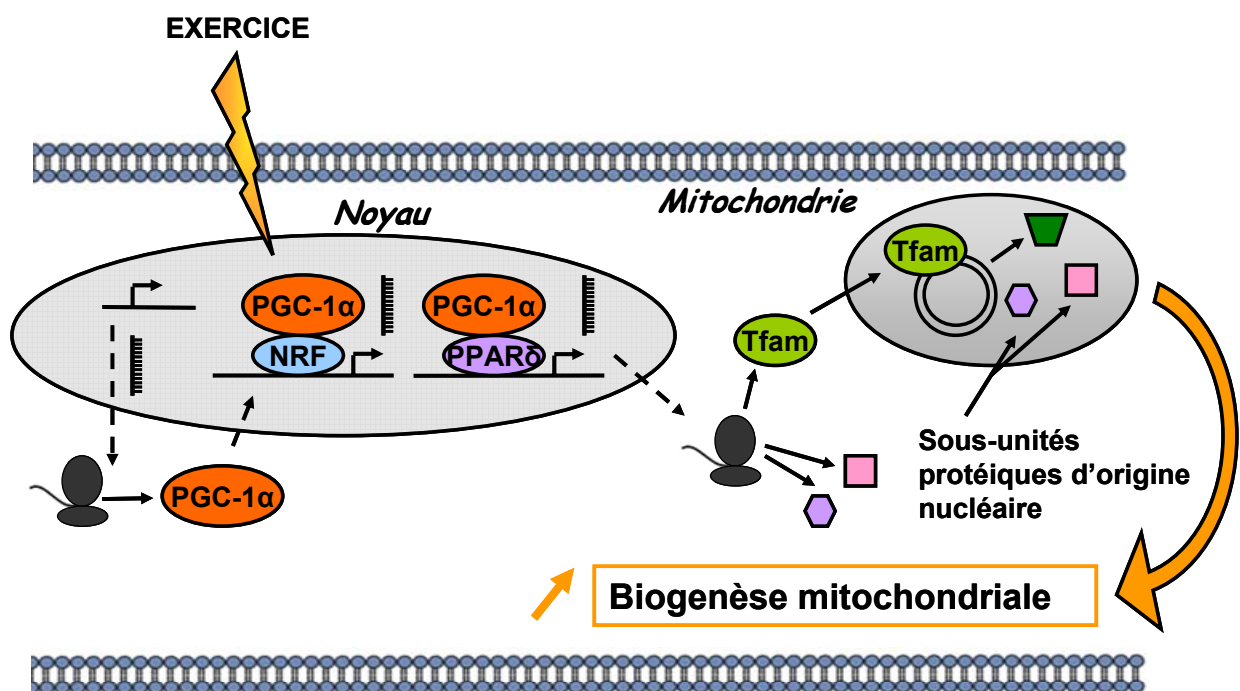
Les évidences montrant une activation de la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique en réponse à l'exercice sont nombreuses et ont été observées dans de nombreux modèles animaux ainsi que chez l'homme. Chez la souris, suite à un entraînement volontaire et répété, l'expression de PGC-1 $\alpha$  est augmentée dans le muscle plantaire (Akimoto et al., 2005). La même démonstration a été faite dans le muscle gastrocnémien après trois mois d'exercice en endurance. L'augmentation de PGC-1 $\alpha$  a été également associée à une augmentation des marqueurs de la biogenèse mitochondriale tels que NRF-1 et Tfam.

En outre, cette augmentation de la biogenèse mitochondriale est corrélée à une augmentation de la masse mitochondriale, dont un des marqueurs le plus représentatif est l'activité de la citrate synthase, ainsi qu'à une augmentation du contenu en ADN mitochondrial (Li et al., 2011a). De plus, l'expression de sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire est également augmentée (Li et al., 2011b). Il apparaît clairement une relation étroite entre exercice physique et biogenèse mitochondriale (Figure 31). Cette relation est par ailleurs largement confirmée chez le rat (Baar et al., 2002; Wright et al., 2007b) et chez l'homme (Norrbom et al., 2004).

Certaines études ont mis en évidence que l'augmentation de la biogenèse mitochondriale en réponse à l'exercice serait aussi associée à l'activation du récepteur nucléaire PPAR $\delta/\beta$  (Kramer et al., 2006). En effet, son activation contribue à une

augmentation des marqueurs de la masse mitochondriale (CS), du contenu en ADNmt et de l'expression des sous-unités protéiques OXPHOS (COXII ou COXIV) (Wang et al., 2004).

Ces résultats sont confortés par des travaux menés sur des souris KO muscle-spécifique pour PGC-1 $\alpha$ . En effet, les souris déficientes en PGC-1 $\alpha$  présentent une diminution de leur activité locomotrice et de leur tolérance à l'exercice. Ces altérations sont accompagnées d'une dysfonction mitochondriale et notamment d'une atténuation des capacités oxydatives. Ces observations mettent donc en avant PGC-1 $\alpha$  comme un orchestrateur majeur de la biogenèse mitochondriale et des capacités oxydatives du muscle squelettique (Figure 31).



**Figure 31. Induction de la biogenèse mitochondriale par l'exercice physique**

En réponse à l'exercice, l'expression de PGC-1 $\alpha$  est augmentée. Cette augmentation est associée à une induction des marqueurs classiques de la biogenèse mitochondriale.

## ii. Métabolisme des substrats

Ces adaptations mitochondriales en réponse à l'exercice sont également couplées à une augmentation de l'utilisation des substrats. En effet, une augmentation de l'entrée de glucose au sein de la cellule musculaire accompagnée d'une augmentation de la synthèse en

glycogène est observée. D'autre part, les lipides deviennent les substrats préférentiels du muscle en situation d'exercice en endurance pour une production plus soutenue d'ATP. Ces adaptations du métabolisme des substrats sont proposées comme étant intimement liées à l'induction de PGC-1 $\alpha$  par l'exercice (Handschin, 2010).

- Métabolisme des hydrates de carbone

Le transport du glucose à l'intérieur de la cellule musculaire squelettique nécessite l'intervention de transporteurs spécifiques GLUT1 et 4. Pour rappel, GLUT1 est constitutivement actif, tandis que la translocation de GLUT4 à la membrane dépend de divers stimuli et notamment l'exercice (Ren et al., 1994).

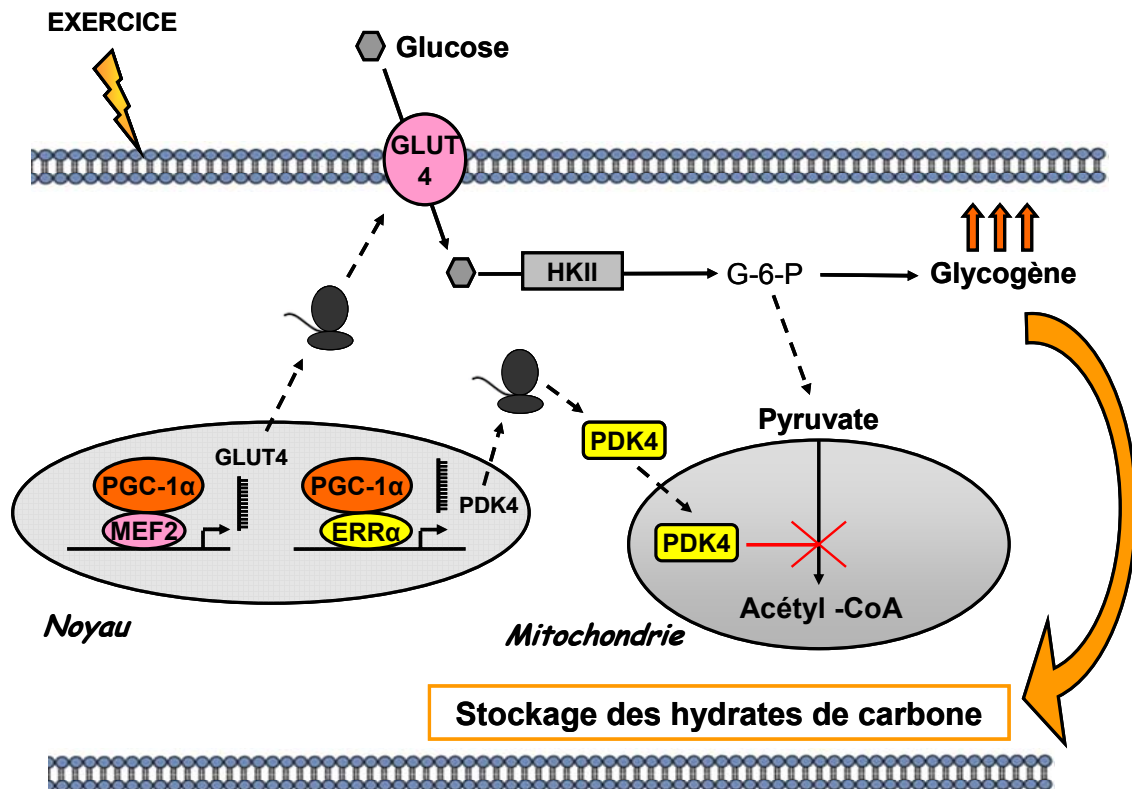
Cette augmentation du transport des hydrates de carbone a été corrélée à une augmentation de la synthèse de glycogène au détriment de son utilisation directe par la voie de la glycolyse qui semble être inhibée. En effet, une surexpression muscle-spécifique de PGC-1 $\alpha$  est associée à une augmentation de l'expression des transporteurs GLUT1 et GLUT4 et de l'entrée de glucose dans la cellule. Les effets de PGC-1 $\alpha$  sur l'expression notamment de GLUT4 mettent en jeu la co-activation du facteur de transcription MEF2 (myocyte enhance factor 2) (Michael et al., 2001).

Cette augmentation du taux intracellulaire de glucose est couplée à une diminution de la glycolyse, et à une augmentation du stockage sous forme de glycogène (Wende et al., 2007). Ces résultats sont renforcés par une activation de PDK4 (pyruvate deshydrogénase kinase 4) PGC-1 $\alpha$ /ERR $\alpha$  dépendante, connue pour inhiber l'oxydation du glucose et donc favoriser la synthèse de glycogène par inhibition notamment de la PDH (Wende et al., 2005; Safdar et al., 2011).

Enfin, l'accumulation de glucose et donc de glucose-6-phosphate favorise l'augmentation de la synthèse de glycogène par son effet stimulateur sur la glycogène synthase (GS).

Ainsi, dans le muscle squelettique en réponse à l'exercice, l'activation de PGC-1 $\alpha$  est étroitement liée à l'augmentation du stockage des hydrates de carbone sous forme de glycogène. Ce stockage est favorisé d'une part par l'augmentation de l'expression de GLUT4 via le complexe PGC-1 $\alpha$ /MEF2 et d'autre part par l'induction de l'expression de PDK4 selon un mécanisme PGC-1 $\alpha$ /ERR $\alpha$  dépendant (Figure 32).





**Figure 32. Contrôle du métabolisme des hydrates de carbone en réponse à l'exercice physique**

PGC-1 $\alpha$  contrôle le transport du glucose et l'inhibition de son oxydation. Ce mécanisme implique l'augmentation de l'expression de GLUT4 et de PDK4, respectivement MEF2 et ERR $\alpha$  dépendante.

- Métabolisme des acides gras

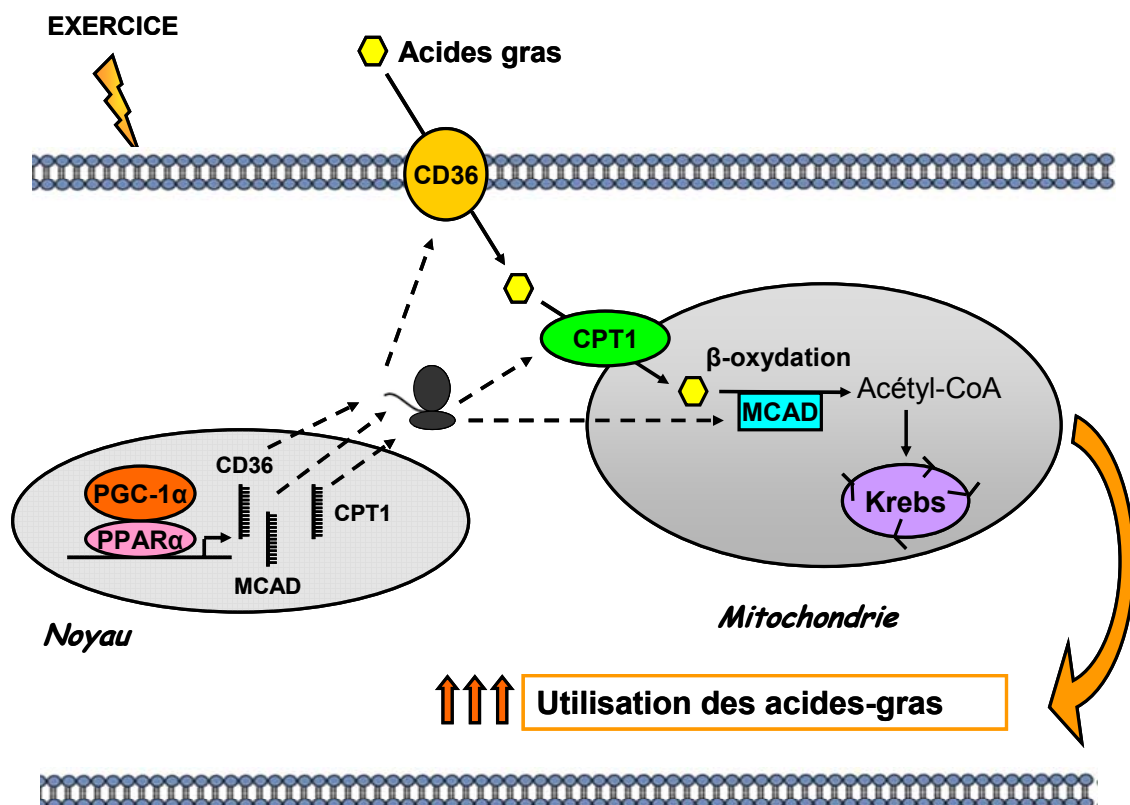
Il est généralement admis que l'utilisation des acides gras lors de l'entraînement est augmentée et ceci de manière parallèle à une augmentation de l'expression des transporteurs clés des acides gras. Cette utilisation des acides gras est d'ailleurs maximale lors d'un entraînement à 60 % de la consommation maximale d'oxygène (VO<sub>2</sub> max) (Horowitz, 2003).

En effet, des rats soumis à des cycles d'exercice en endurance à 60 % de VO<sub>2</sub> max, et ayant un régime standardisé, voient augmenter leur contenu lipidique musculaire et notamment dans le muscle soléaire. Cette disponibilité intramusculaire des acides gras pour la  $\beta$ -oxydation est par ailleurs facilitée par l'induction de l'expression des transporteurs CD36 et

CPT1 respectivement pour le transport à l'intérieur de la cellule musculaire squelettique puis au sein de la mitochondrie où a lieu la  $\beta$ -oxydation.

De manière intéressante, cette augmentation de l'oxydation des acides gras est corrélée à une augmentation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  et de PPAR $\alpha$  suggérant ainsi un contrôle du transport et de l'utilisation des acides gras via l'axe PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  (Dobrzyn et al., 2010). Ces résultats sont d'ailleurs corroborés par la surexpression muscle-spécifique de PGC-1 $\alpha$  qui est associée à une nette augmentation de l'expression des transporteurs des acides gras CD36 et CPT1, mais aussi FATP et FABP.

D'autre part, cette surexpression conduit à une induction de l'expression d'enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras, telle que MCAD (Calvo et al., 2008). De surcroît, l'expression des gènes codant pour les protéines de transport et les enzymes de l'oxydation des acides gras est largement associée à une activation de PPAR $\alpha$  en interaction avec PGC-1 $\alpha$  (Vega et al., 2000). L'ensemble de ces données concourent donc à démontrer un rôle clé de PGC-1 $\alpha$  dans le transport et l'utilisation des acides gras selon un axe incluant PPAR $\alpha$  comme récepteur nucléaire (Figure 33).



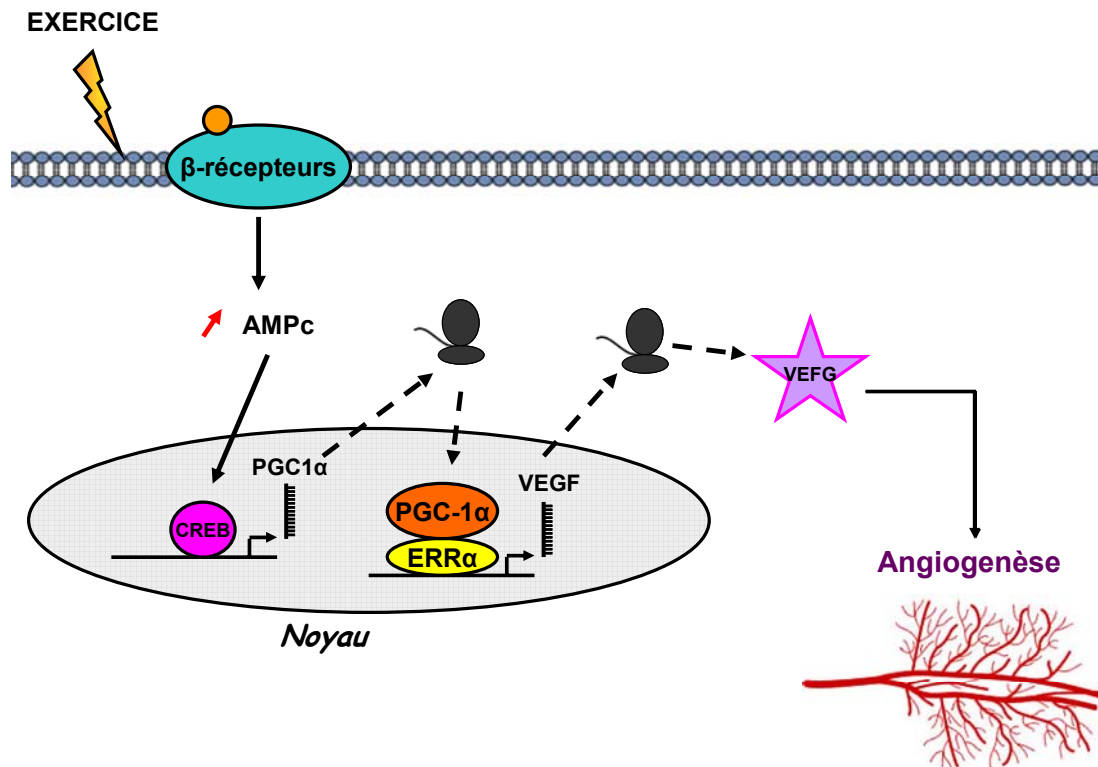
**Figure 33. Contrôle de l'utilisation des acides gras en réponse à l'exercice physique**  
PGC-1 $\alpha$  contrôle le transport des acides gras et leur oxydation via l'induction de l'expression de CD36, CPT1 et MCAD par un mécanisme PPAR $\alpha$  dépendant.

### ***iii. Modulation de l'apport en O<sub>2</sub>: angiogenèse***

L'adaptation du muscle squelettique en réponse à l'exercice passe également par une augmentation de l'apport en oxygène au niveau cellulaire. Celle-ci passe par une activation de l'angiogenèse qui a pour objectif d'accroître la vascularisation du muscle squelettique. Des études récentes menées par le groupe de Spiegelman ont démontré l'implication de PGC-1 $\alpha$  dans l'activation des processus angiogéniques en réponse à l'hypoxie. En effet, la culture primaire de cellules squelettiques dans un milieu pauvre en nutriments et à faible concentration en O<sub>2</sub> conduit à une induction massive de l'expression de PGC-1 $\alpha$ . De plus, l'hypoxie est connue pour déclencher l'induction d'un programme génétique spécifique de l'angiogenèse, incluant notamment l'induction de l'expression du VEGF (vascular endothelial growth factor). En outre, la surexpression de PGC-1 $\alpha$  conduit à cette induction et ceci est associé à une sécrétion augmentée du VEGF dans le milieu de culture. Ce programme adaptatif est par ailleurs corrélé à une néovascularisation du muscle squelettique qui est abolie lors de l'inactivation de PGC-1 $\alpha$ . Classiquement, la régulation du VEGF en réponse à l'hypoxie implique le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1). Or, lors de la surexpression de PGC-1 $\alpha$ , l'induction du VEGF est indépendante de l'expression de HIF-1 $\alpha$ , suggérant une régulation de l'angiogenèse dépendante de PGC-1 $\alpha$  et excluant l'action de HIF-1 $\alpha$ . De manière intéressante, cette néovascularisation n'est pas observée chez des souris KO ERR $\alpha$  soumises aux mêmes conditions d'hypoxie. De plus, des sites spécifiques de liaisons d'ERR $\alpha$  ont été identifiés sur le promoteur du VEGF (Arany et al., 2008; Arany, 2008).

L'induction de l'angiogenèse via ce mécanisme a également été démontrée en réponse à l'exercice. De plus, l'induction de PGC-1 $\alpha$ , à l'origine de l'activation de l'expression du VEGF et de la néovascularisation, serait dépendante d'une activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et donc d'une élévation du taux intracellulaire d'AMPc (Chinsomboon et al., 2009).

**Ces résultats originaux mettent en évidence pour la première fois un rôle clé de PGC-1 $\alpha$  dans la régulation de l'angiogenèse par son interaction avec le récepteur nucléaire ERR $\alpha$  en réponse à l'hypoxie (Figure 34). Ainsi, PGC-1 $\alpha$  peut réguler de manière harmonieuse l'apport en oxygène et nutriments au niveau mitochondrial par le réseau vasculaire et leur consommation au travers de la phosphorylation oxydative en réponse à des modifications du statut énergétique cellulaire.**



**Figure 34. Contrôle de l'angiogenèse via l'axe PGC-1 $\alpha$ /ERR $\alpha$**

PGC-1 $\alpha$  conduit à l'activation du facteur VEGF via un mécanisme ERR $\alpha$  dépendant et en réponse à une stimulation  $\beta$ -adrénergique. Ce mécanisme permet la mise en place d'un processus angiogénique.

*b) Adaptation à l'exercice et tissu spécificité*

L'ensemble de ces études dans le muscle squelettique souligne le rôle prépondérant de PGC-1 $\alpha$  à la fois dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale et du métabolisme énergétique incluant l'utilisation des acides gras. Par le biais de l'exercice, PGC-1 $\alpha$  apparaît encore une fois comme étant inductible, son niveau d'expression dépendant du niveau de stress énergétique. Toutefois, malgré l'avancée des connaissances sur le rôle de PGC-1 $\alpha$  dans le contrôle de la fonction mitochondriale en réponse à l'exercice physique, il est difficile d'extrapoler ces connaissances à l'ensemble des tissus. En effet, l'induction de PGC-1 $\alpha$  et des marqueurs de la biogenèse mitochondriale en réponse à l'exercice n'a pas été observée dans tous les tissus.

Une étude récente chez la souris après huit semaines d'exercice montre dans le cerveau une augmentation de l'expression de PGC-1 $\alpha$ , de la CS, marqueur de la masse

mitochondriale et une augmentation du contenu en ADNmt. De plus, ces observations sont retrouvées spécifiquement dans différentes zones du cerveau incluant le cortex, le lobe frontal, l'hippocampe ou encore l'hypothalamus (Steiner et al., 2011).

En revanche, dans le cœur, il n'y a pas d'évidence montrant l'induction de PGC-1 $\alpha$  en réponse à l'exercice. En effet, suite à un exercice en endurance de trois mois chez la souris, aucune modification des marqueurs de la biogenèse mitochondriale n'a été observée dans le ventricule gauche. Ces résultats sont d'ailleurs confortés par un contenu en ADNmt et une activité de la CS identiques entre les souris sédentaires et les souris entraînées (Li et al., 2011a). Le même constat a été fait au sein du laboratoire sur des rats entraînés pendant 8 semaines qui développent une hypertrophie dite physiologique sans augmentation de la biogenèse mitochondriale. De la même manière, aucune induction de PGC-1 $\alpha$  ou des marqueurs de la masse mitochondriale n'a été relevée (Rimbaud et al., 2009). Ces résultats soulignent à nouveau une tissu-spécificité de l'induction de PGC-1 $\alpha$ .

### *c) Régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles de PGC-1 $\alpha$*

Différentes voies de signalisation intervenant dans la réponse à l'exercice physique ont largement été décrites, notamment en faveur d'une augmentation de la contractilité du muscle squelettique. De manière intéressante, la majorité de ces voies convergent vers une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de PGC-1 $\alpha$  via des modifications transcriptionnelles et post traductionnelles (pour revue : (Fernandez-Marcos et Auwerx, 2011). Toutefois, la majorité des données concernant les régulations de PGC-1 $\alpha$  découlent de ces études réalisées sur les effets de l'exercice, et il faut rester prudent vis-à-vis d'une généralisation de ces connaissances à l'ensemble des tissus.

En effet, en l'état actuel des connaissances, pour un même stimulus, ici l'exercice physique, les réponses sur la régulation de la biogenèse mitochondriale divergent, puisque l'activation de PGC-1 $\alpha$  n'est pas retrouvée dans l'intégralité des tissus. En tout état de cause, les mécanismes de régulation de PGC-1 $\alpha$  qui vont être décrits dans cette section, se basent sur nos connaissances dans le muscle squelettique, mais demandent à être validés de manière indépendante dans les autres tissus et notamment dans le cœur.

### ***i. Signalisation calcique : voie Calcium-calmoduline kinase (CaMK)***

Classiquement, en réponse à l'exercice, la contraction musculaire se manifeste suite à une élévation intracellulaire de la concentration calcique. Au niveau moléculaire, une augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$  se traduit notamment par l'activation coordonnée d'une protéine kinase : la CaM Kinase (CaMK) et d'une phosphatase : la calcineurine A (CnA). Ces deux protéines ont été identifiées comme étant aussi associées au contrôle transcriptionnel de PGC-1 $\alpha$ .

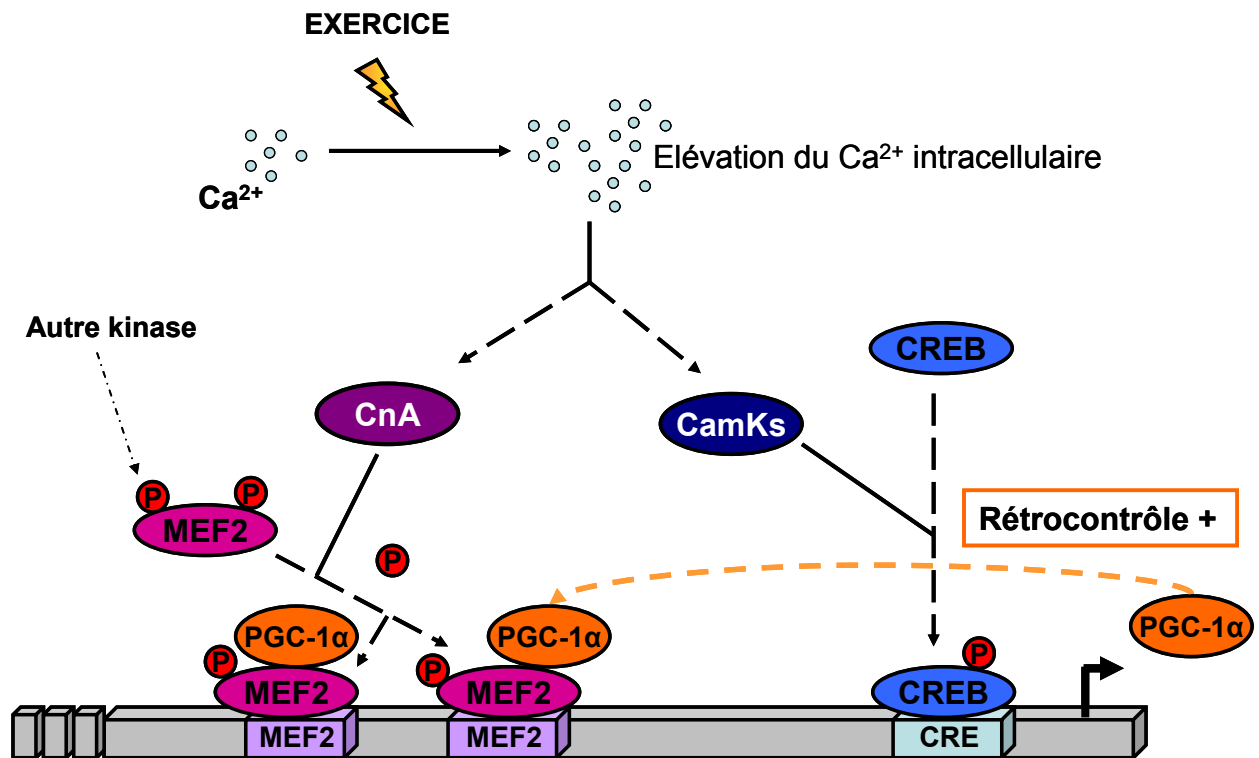
En effet, la surexpression chez la souris de la CaMKIV spécifiquement dans le muscle squelettique ou une surexpression de la CaMKIV *in vitro* dans des cellules musculaires squelettiques entraînent une forte induction de l'expression de PGC-1 $\alpha$  (Wu et al., 2002). De manière intéressante, cette activation est potentialisée par la surexpression de la CnA (Handschin et al., 2003).

La présence d'éléments de réponse à l'AMPc de type CRE (cyclic AMP Response Element) sur le promoteur de PGC-1 $\alpha$  et les connaissances sur les cibles potentielles de la CaMKIV telle que CREB (cAMP Response Element Binding Protein) ont permis de supposer une activation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  par un mécanisme  $Ca^{2+}$ /CaMKIV dépendant via l'activation du facteur de transcription CREB. Cette hypothèse a d'ailleurs été validée par la mutation du domaine CRE entraînant l'abolition des effets de la CaMKIV (Handschin et al., 2003). De plus, une étude antérieure réalisée dans le foie a montré l'induction de l'expression de PGC-1 $\alpha$  en réponse à CREB (Herzig et al., 2001). Ces observations ne se limitent pas à l'isoforme IV de la CaMK mais sont aussi vraies pour la CaMKII (Egan et al., 2010).

Concernant la CnA, celle-ci est connue pour augmenter l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription MEF2 (myocyte enhance factor 2) (Wu et al., 2001). De plus, deux sites de reconnaissance MEF2 ont été identifiés sur le promoteur de PGC-1 $\alpha$  suggérant un contrôle transcriptionnel de PGC-1 $\alpha$  par MEF2 (Akimoto et al., 2004).

La mutation spécifique du domaine de liaison à MEF2 sur le promoteur de PGC-1 $\alpha$  bloque totalement les effets de la CnA, proposant ainsi l'axe CnA/MEF2 comme une voie d'activation transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$  (Handschin et al., 2003; Akimoto et al., 2008). PGC-1 $\alpha$  ayant été auparavant décrit comme co-activateur transcriptionnel de MEF2 (Michael et al., 2001), il peut alors exercer un rétrocontrôle positif sur sa propre expression.

Ainsi, la signalisation calcique impliquant la CaMK et la Calcineurine A apparait comme un élément clé de la régulation transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$  dans le muscle squelettique, mettant en jeu deux facteurs de transcription majoritaires, respectivement CREB et MEF2 (Figure 35).



### **Promoteur de PGC-1 $\alpha$**

**Figure 35. Contrôle de l'expression transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$  via la signalisation calcique**

Une élévation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire conduit à l'activation de la CamK et de la CnA. L'induction respectivement de CREB et de MEF2 entraîne l'expression de PGC-1 $\alpha$ . Ce dernier exerce un rétrocontrôle positif sur sa propre expression par la co-activation de MEF2.

### **ii. Implication des MAPK**

La signalisation des MAPK est reconnue comme une voie stimulée, entre autres, par des facteurs de croissance, mais aussi en réponse à un stress cellulaire. L'exercice physique

étant considéré comme une situation de stress mécanique et de forte demande énergétique, certaines études se sont naturellement focalisées sur l'activation des MAPK et plus particulièrement de p38 dans le muscle squelettique en réponse à l'exercice (Kramer et Goodyear, 2007). Par ailleurs, cette voie semble jouer un rôle majeur dans la régulation de PGC-1 $\alpha$  puisqu'elle intervient d'une part dans sa régulation transcriptionnelle et d'autre part dans la régulation de son activité.

- Régulation de l'activité de PGC-1 $\alpha$

Les premières études ayant mis en évidence une phosphorylation de PGC-1 $\alpha$  par p38 ont permis de révéler un certain nombre de cytokines, telles que l'IL-1 et le TNF $\alpha$ , comme capables d'induire l'activation de p38 et la phosphorylation de PGC-1 $\alpha$ . De manière intéressante, cette phosphorylation serait spécifique de trois résidus : T262, S265 et T298 et entièrement abolie lors de leur mutation par mutagenèse dirigée.

De plus, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de p38 bloque parfaitement la phosphorylation de PGC-1 $\alpha$ . Cette kinase apparait donc comme un régulateur positif de l'activité de PGC-1 $\alpha$  et permettrait d'améliorer sa stabilité en limitant sa dégradation (Puigserver et al., 2001). D'autre part, les résidus T262, S265 et T298 sont retrouvés au niveau du domaine de répression (DR) de PGC-1 $\alpha$ , site de fixation du répresseur p160 myb.

En absence de phosphorylation, p160 myb se fixe sur le DR et inhibe l'activité de PGC-1 $\alpha$ . En revanche, lorsqu'il y a phosphorylation des résidus T262, S265 et T298, p160 myb ne peut plus se fixer sur le DR rendant ainsi PGC-1 $\alpha$  actif. De ce fait, p38 intervient comme un modulateur de l'interaction p160 myb/PGC-1 $\alpha$  en levant la répression de l'activité de PGC-1 $\alpha$  (Fan et al., 2004).

- Régulation transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$

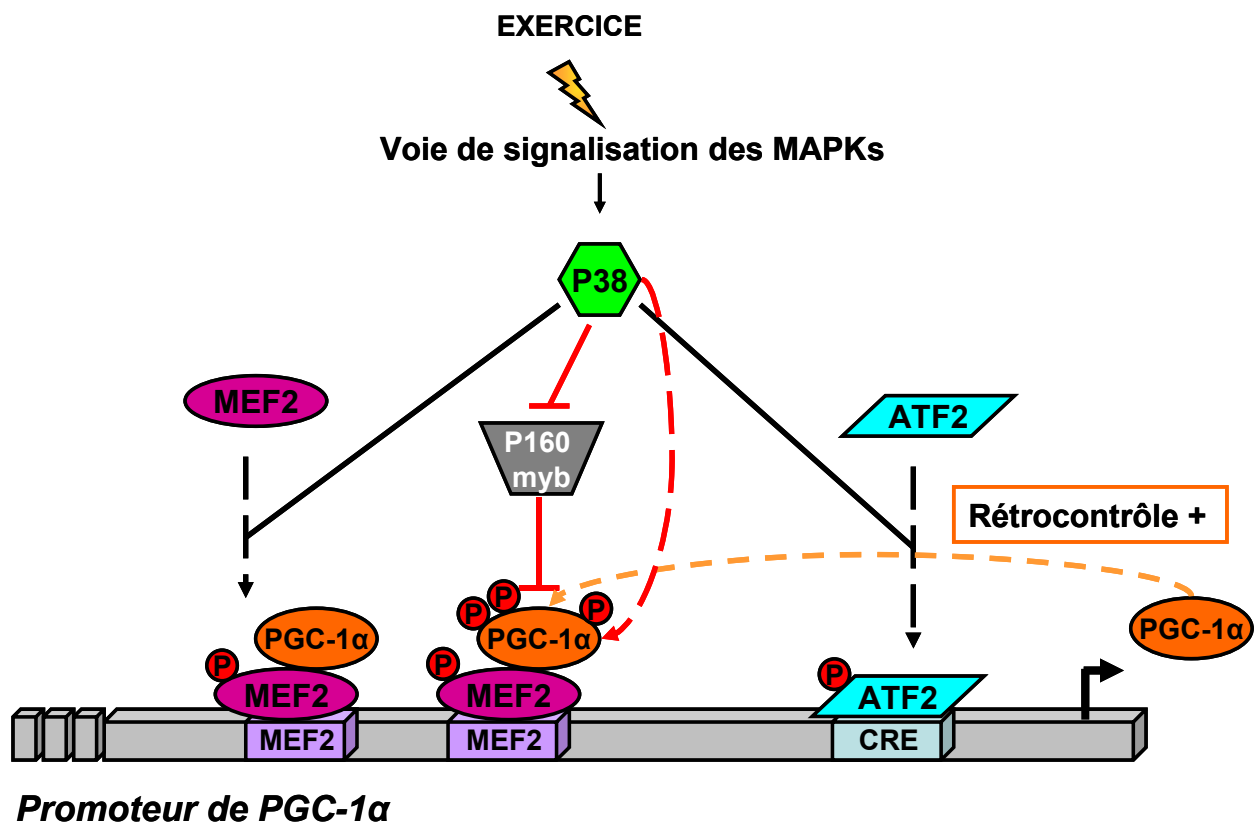
La protéine p38 est par ailleurs connue pour phosphoryler et activer certains facteurs de transcription, tels que MEF2 (Zhao et al., 1999) et ATF2 (Cao et al., 2004). Au travers de l'exemple de la signalisation calcique, le rôle de MEF2 sur la régulation transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$  a été mis en avant. Concernant ATF2, celui-ci a été décrit comme pouvant lier les domaines CRE, domaines de liaison présents sur le promoteur de PGC-1 $\alpha$  (Livingstone et al.,



1995). De plus, la surexpression d'ATF2 dans des cellules musculaires squelettiques conduit à l'activation transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$  (Akimoto et al., 2005).

L'ensemble de ces données souligne donc un rôle de la MAPK p38 tant dans la régulation transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$  via les facteurs de transcription MEF2 et ATF2, que dans la régulation de son activité (Figure 36).

La signalisation associée aux MAPK se place donc comme une des voies clés du contrôle de la biogenèse mitochondriale et plus particulièrement de PGC-1 $\alpha$  à la fois sur sa régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle.



**Figure 36. Contrôle de l'expression de PGC-1 $\alpha$  via la signalisation MAPK**

Une activation de p38 exerce un contrôle transcriptionnel et post-traductionnel sur PGC-1 $\alpha$ . La phosphorylation d'ATF2 et MEF2 par p38 conduit à l'induction de PGC-1 $\alpha$ . La phosphorylation de PGC-1 $\alpha$ -p38 dépendante empêche p160 myb d'exercer son effet inhibiteur.

### iii. Voie de l'AMPK

L'AMPK (AMP-activated protein kinase) est une enzyme du type sérine-thréonine kinase hétérodimérique composée d'une sous-unité catalytique :  $\alpha$  et de deux sous-unités régulatrices :  $\beta$  et  $\gamma$ . Cette kinase est considérée comme l'un des senseurs métaboliques de la cellule jouant un rôle déterminant dans le contrôle de la balance énergétique. En effet, elle est sensible au ratio AMP/ATP et dépend donc étroitement de la production et de la consommation d'ATP. Son activation est intimement liée à un stress métabolique affectant la production d'ATP, soit en inhibant sa production (hypoxie ou privation en glucose), soit en favorisant sa consommation (exercice physique). Lors de l'augmentation de ce ratio, l'AMPK joue donc le rôle de senseur de l'état énergétique cellulaire en faveur d'une restauration de l'homéostasie énergétique (Figure 37) (Hardie, 2007; Canto et Auwerx, 2009).

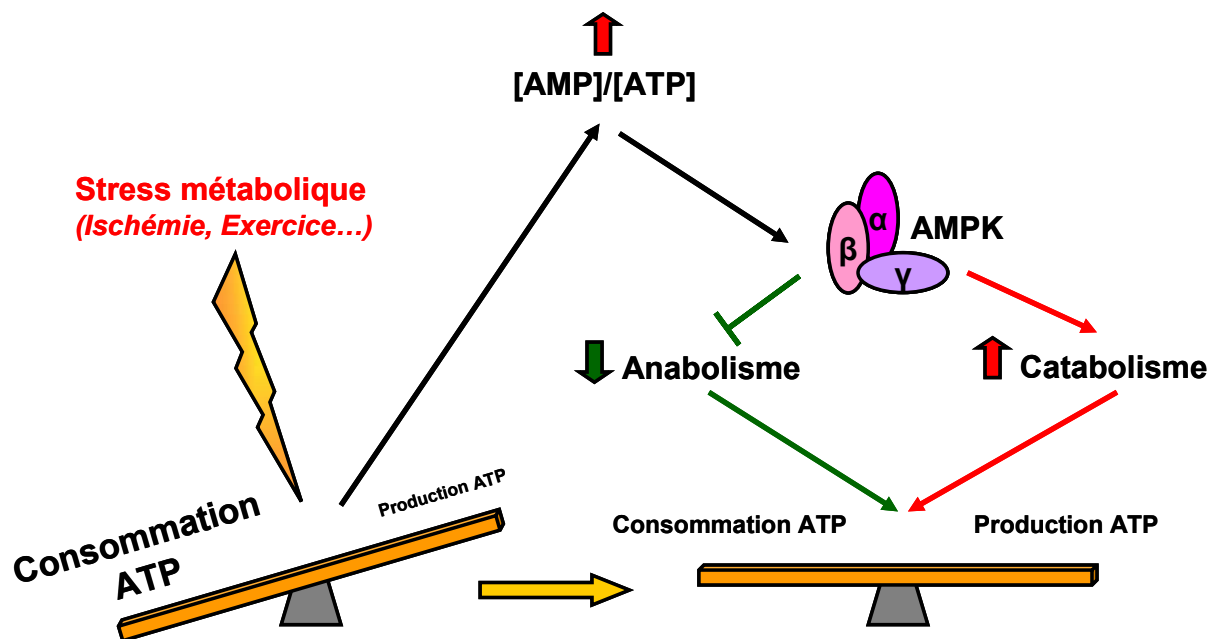


Figure 37. L'AMPK, senseur énergétique de la cellule

Une augmentation du ratio  $[AMP] / [ATP]$  en réponse à une augmentation de la consommation d'ATP au détriment de sa production active l'AMPK à l'origine du maintien de l'homéostasie énergétique.

Dans le muscle squelettique, les adaptations métaboliques, suite à une activation de l'AMPK, mettent en jeu une induction du métabolisme oxydatif et sont associées à une augmentation de l'activité de PGC-1 $\alpha$  et de son expression. L'utilisation d'agonistes de

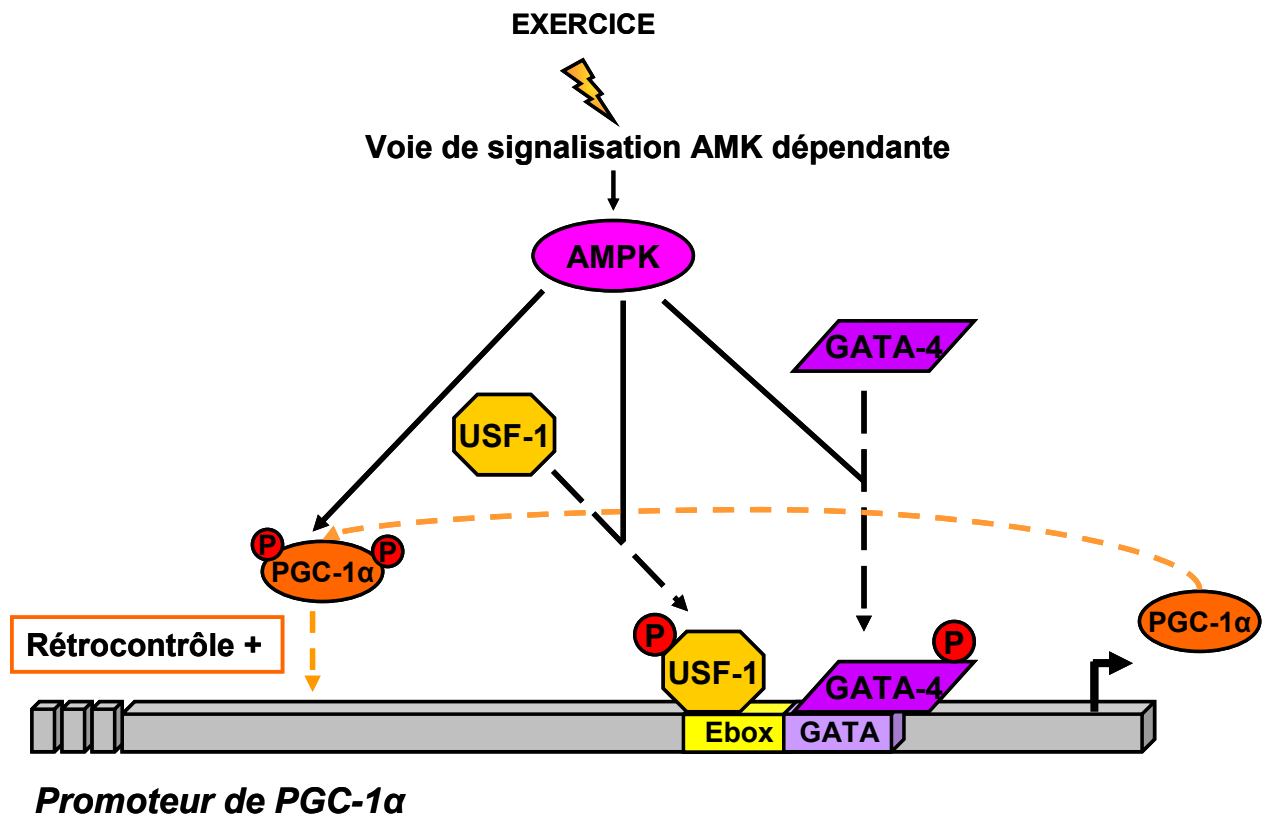
l'AMPK, tel que l'AICAR (5-Amino-4-Imidazole Carboxamide Riboside), a montré une mise en place d'adaptations métaboliques proches de celles mises en place en réponse à l'exercice ainsi qu'une induction de l'expression de PGC-1 $\alpha$  (Narkar et al., 2008). De plus, des évidences montrent une augmentation de l'activité de l'AMPK dans le muscle squelettique en réponse à l'exercice, associée à une augmentation de l'expression endogène en ARNm et en protéine de PGC-1 $\alpha$  (Terada et al., 2002 ; Suwa et al., 2003).

En outre, l'AMPK est capable de phosphoryler PGC-1 $\alpha$  sur deux résidus : T177 (thréonine 177) et S538 (Sérine 538), à l'origine de l'augmentation de l'activité de PGC-1 $\alpha$ . Cette activation a par ailleurs été corrélée à un effet de PGC-1 $\alpha$  sur sa propre transcription, puisque la mutation de ces deux sites critiques de phosphorylation abolit totalement les effets de l'AICAR sur l'expression génique de PGC-1 $\alpha$  (Jager et al., 2007).

Récemment, des domaines de liaison de type Ebox/GATA aux facteurs de transcription GATA-4 (appellation due à la reconnaissance de motifs de type GATA sur les promoteurs des gènes) et USF-1 (UpStream transcription Factor 1) ont été identifiés sur le promoteur de PGC-1 $\alpha$ , et un traitement à l'AICAR de cellules musculaires squelettiques a mis en évidence une augmentation de la liaison de GATA-4 et USF-1 sur ce promoteur.

De plus, une surexpression de GATA-4 ou d'USF-1 dans ces mêmes cellules est associée à une augmentation de l'activité du promoteur de PGC-1 $\alpha$ , elle-même diminuée lors de mutations sur leur site consensus. Enfin, ces mutations bloquent totalement les effets positifs de l'AICAR sur l'induction de PGC-1 $\alpha$  (Irrcher et al., 2008). Ces travaux suggèrent donc pour la première fois un rôle de l'AMPK sur la régulation transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$ , indépendamment de la phosphorylation de PGC-1 $\alpha$ .

**L'AMPK joue donc un rôle important dans le contrôle du métabolisme énergétique cellulaire et notamment par le contrôle de PGC-1 $\alpha$  en augmentant son activité. Par ailleurs, l'AMPK permet l'induction de son expression via un mécanisme génique indirect incluant les facteurs de transcription GATA-4 et USF-1 ou directement en permettant à PGC-1 $\alpha$  d'exercer un rétrocontrôle positif sur sa propre expression (Figure 38).**



**Figure 38. Contrôle de l'expression de PGC-1 $\alpha$  par l'AMPK**

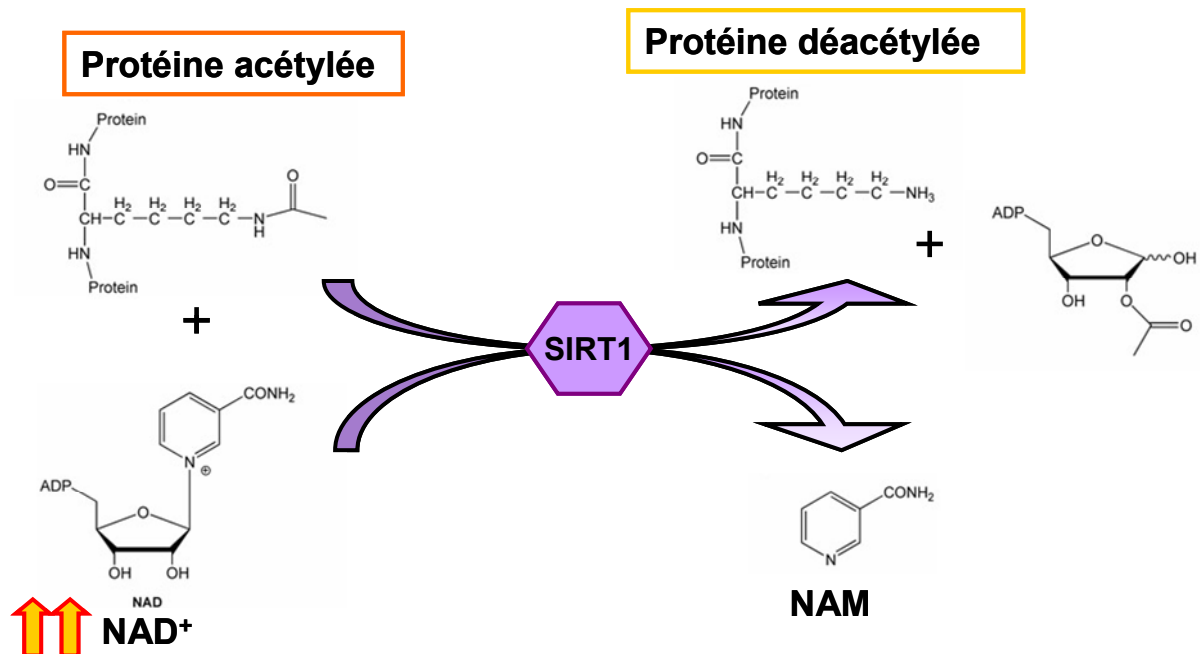
L'AMPK contrôle l'expression de PGC-1 $\alpha$  en augmentant son activité par phosphorylation et favorisant son rétrocontrôle positif. Elle contrôle également son activité transcriptionnelle via les facteurs de transcription USF-1 et GATA-4.

#### *iv. Acétylation : rôle des sirtuines*

Les sirtuines sont des désacétylases NAD<sup>+</sup>-dépendante (nicotinamide adénine dinucléotide) initialement identifiées comme des régulateurs de la longévité chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae* et chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, Sir2 (silencing information regulator 2) étant la première isoforme étudiée. Son homologue chez le mammifère, SIRT1, contrôle de nombreux processus métaboliques et son activité dépend strictement du ratio NAD<sup>+</sup>/NADH reflétant le statut énergétique de la cellule (Houtkooper et al., 2010).

L'activité désacétylase de SIRT1 est consommatrice de NAD<sup>+</sup>, et exerce son effet de désacétylation via le clivage de groupements acétyl sur des résidus lysine. Cette réaction s'accompagne d'une libération de NAM (nicotinamide) et de la génération de 2'-O-acétyl-

ADP-ribose (Sauve et al., 2006) (Figure 39). Il a par ailleurs été montré que le NADH entrerait en compétition avec le  $\text{NAD}^+$  pour lier SIRT1 et inhiber son activité catalytique. C'est pourquoi le ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  apparaît comme central dans la régulation de l'activité de SIRT1, plaçant cette protéine comme un deuxième senseur du statut énergétique de la cellule.



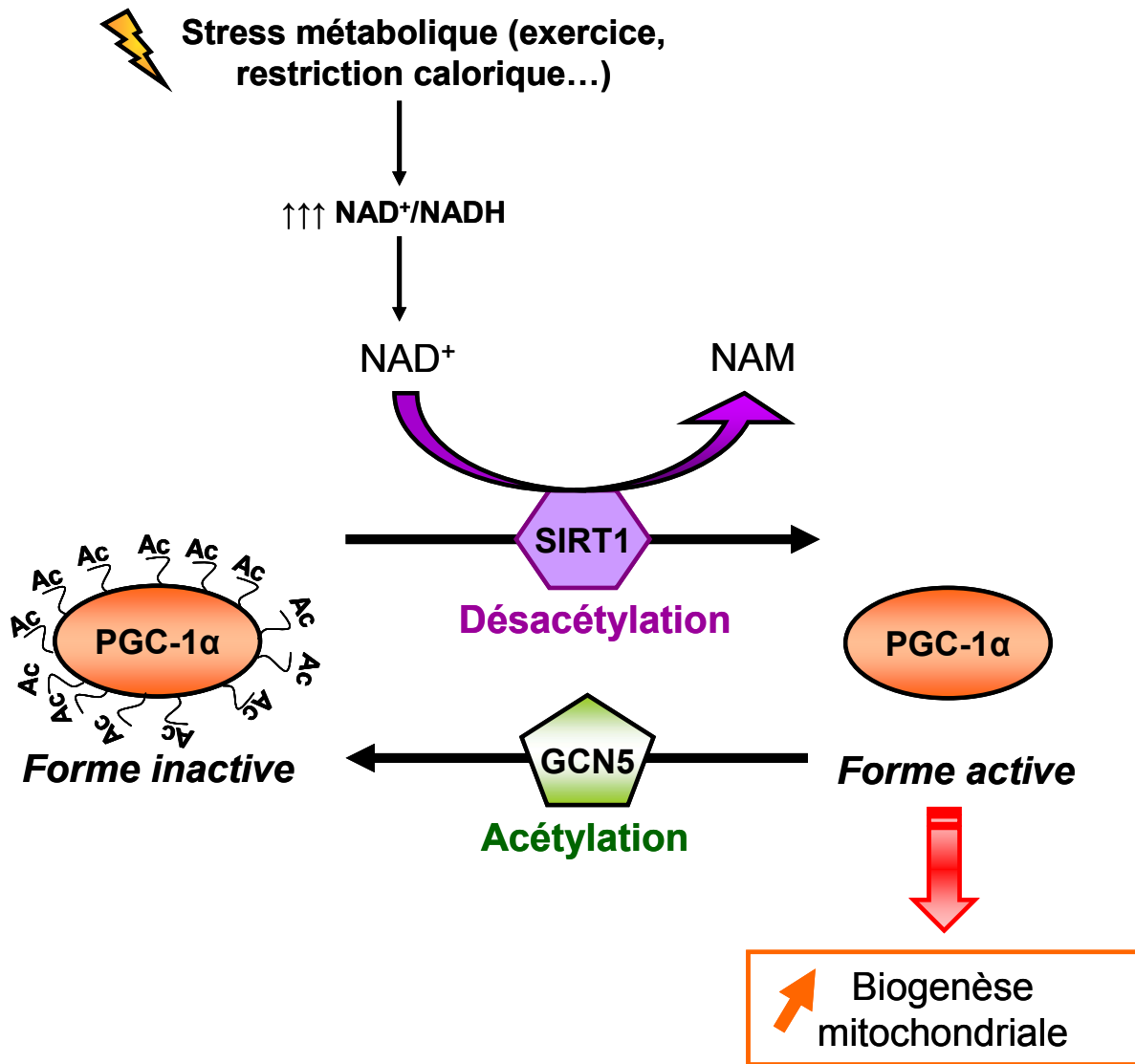
**Figure 39. SIRT1, 2<sup>ème</sup> senseur énergétique au sein de la cellule**

Une augmentation de la concentration en  $\text{NAD}^+$  (nicotinamide adenine dinucleotide) permet l'activation de SIRT1, protéine déacétylase. NAM = nicotinamide.

Ainsi, l'activité SIRT1 augmente dans le but d'accroître la charge énergétique cellulaire. Afin d'augmenter la fonction mitochondriale en faveur du maintien de l'homéostasie énergétique, une des protéines cible de SIRT1 est PGC-1 $\alpha$ . La désacétylation de PGC-1 $\alpha$  sur 13 résidus lysine conduit donc à une augmentation de son activité qui favorise alors l'activité transcriptionnelle de divers facteurs clés tels, que les NRFs, tFAM ou PPAR $\alpha$ , impliqués dans la biogenèse mitochondriale ou encore l'utilisation des acides gras (Rodgers et al., 2008).

Cependant, une régulation inverse est également possible. En effet, il a été identifié une protéine portant une activité acétyltransférase : GCN5 (general control non repressed 5), inhibant l'activité de PGC-1 $\alpha$  (Lerin et al., 2006). L'activité de ce dernier est donc contrôlée par une balance acétylation/déacétylation dépendant respectivement de GCN5 et de SIRT1. Lors d'un statut énergétique déficitaire, l'augmentation de la concentration de  $\text{NAD}^+$  est en faveur d'une activation de SIRT1 et de la mise en place d'un programme adapté en faveur

d'une activation du métabolisme mitochondrial. Néanmoins, dans le cas d'une production énergétique excédentaire, l'activité de GCN5 augmente au détriment de celle de SIRT1 permettant ainsi une diminution du métabolisme mitochondrial (Gerhart-Hines et al., 2007) (Figure 40).



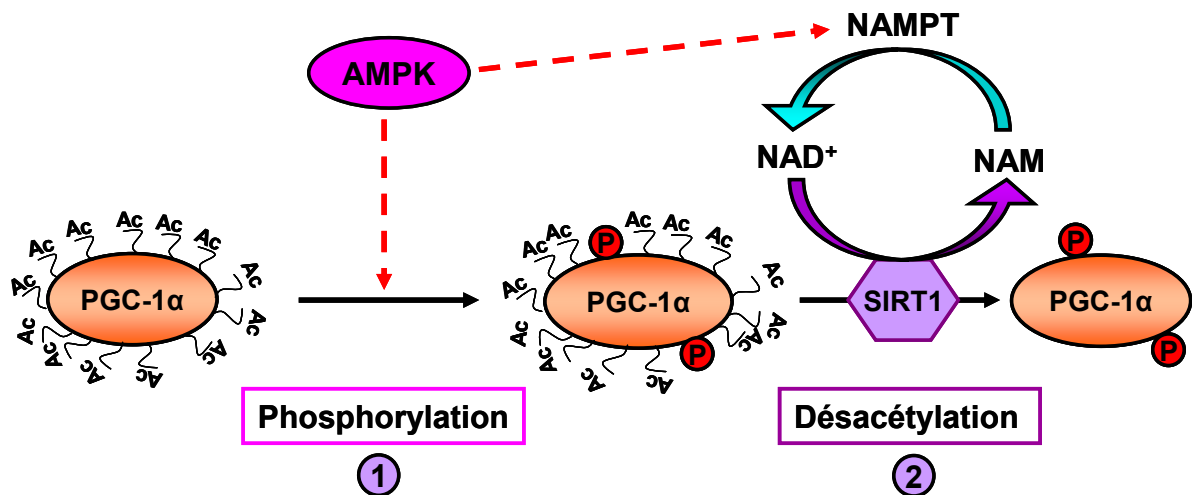
**Figure 40. Régulation de PGC-1 $\alpha$  par acétylation/désacétylation**

En réponse à un stress métabolique, l'augmentation du ratio NAD<sup>+</sup>/NADH conduit à la désacétylation de PGC-1 $\alpha$  via SIRT1. PGC-1 $\alpha$  ainsi activé peut induire la biogenèse mitochondriale. A l'inverse, l'acétylation de PGC-1 $\alpha$  via GCN5 contribue à son inhibition.

Plusieurs situations de stress métabolique peuvent conduire à l'activation de SIRT1. En réponse à l'exercice en endurance, il a été observé une augmentation de l'expression de SIRT1 corrélée à une augmentation de marqueurs de la masse mitochondriale dans le muscle squelettique (Suwa et al., 2008; Li et al., 2011b). Par ailleurs, outre l'exercice, la restriction

calorique est aussi associée à une augmentation de la concentration en  $\text{NAD}^+$  et conduit à l'activation de SIRT1 dans le foie. Via l'activation de PGC-1 $\alpha$ , la mise en place d'un programme génétique adapté permet de contrebalancer le déficit énergétique dépendant de la restriction calorique (Rodgers et al., 2005). Ces effets de l'activation de SIRT1 en faveur d'une déacétylation de PGC-1 $\alpha$  ont aussi été retrouvés suite à un traitement au resvératrol. Ce polyphénol connu pour être un activateur de SIRT1 induit une réponse similaire à l'exercice dans le tissu adipeux brun et le muscle squelettique, mais pas dans le cœur (Lagouge et al., 2006). Ces données suggèrent à nouveau une tissu-spécificité de la régulation de PGC-1 $\alpha$ .

De plus, une étroite relation a été mise en évidence entre l'AMPK et SIRT1. En effet des données récentes suggèrent un rôle de SIRT1 en aval de l'AMPK, cette dernière pouvant moduler le ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . De plus, dans le muscle squelettique, il semblerait que la phosphorylation de PGC-1 $\alpha$  AMPK-dépendante soit indispensable pour la déacétylation par SIRT1 (Canto et al., 2009). Ces résultats sont étayés par la mise en évidence d'une induction de l'expression de la Nampt (NAM phosphoribosyltransférase) via l'AMPK à l'origine d'une augmentation de la concentration cellulaire de  $\text{NAD}^+$  (Figure 41). Enfin, une extinction de l'expression de l'AMPK est associée à une diminution de l'activité SIRT1 et une perte de déacétylation de PGC-1 $\alpha$  dans le muscle squelettique (Um et al., 2010).



**Figure 41. Relation entre les voies de signalisation AMPK et SIRT1**

L'AMPK et SIRT1 apparaissent comme les deux senseurs du statut énergétique cellulaire. L'AMPK serait activée en premier lieu et à l'origine de la phosphorylation de PGC-1 $\alpha$ . La désacétylation par SIRT1 interviendrait seulement dans un deuxième temps. De plus l'activité SIRT1 est régulée par l'AMPK au niveau de la NAMPT (NAM phosphoribosyltransférase).

**Le statut énergétique de la cellule est donc intimement lié au contrôle de la biogenèse mitochondriale via PGC-1 $\alpha$ . En effet, ce co-activateur est finement régulé à la fois par l'AMPK et la SIRT1, définis comme étant des senseurs métaboliques cellulaires. Ainsi, sa régulation transcriptionnelle notamment via l'AMPK mais aussi post-traductionnelle par phosphorylation ou déacétylation respectivement via l'AMPK et la SIRT1 apparait comme primordiale pour le maintien de l'homéostasie énergétique cellulaire.**

#### ***v. Autres mécanismes de régulation***

Des données récentes suggèrent de nouvelles voies de régulation post-traductionnelles de PGC-1 $\alpha$  par méthylation, sumoylation ou ubiquitination. En effet, la méthylation de PGC-1 $\alpha$  sur des résidus arginine par la protéine arginine méthyl transférase 1 (PRMT1) augmente son activité en favorisant notamment sa liaison aux facteurs de transcription (Teyssier et al., 2005). A l'inverse, PGC-1 $\alpha$  peut également être modifié par la protéine SUMO1 (small ubiquitin-like modifier 1) sur un résidu lysine en position 183. Cette sumoylation est à l'origine d'une diminution de son activité transcriptionnelle (Rytinki et Palvimo, 2009). Enfin, le niveau cellulaire de PGC-1 $\alpha$  est aussi contrôlé par ubiquitination sur sa partie C-terminale ce qui favorise sa dégradation par le protéasome (Sano et al., 2007).

#### ***vi. Les espèces réactives de l'oxygène : EROs***

Bien que l'exercice physique ait montré de nombreux bénéfices d'un point de vue santé publique, paradoxalement, en réponse à un exercice prolongé, le muscle squelettique génère de nombreux radicaux libres à l'origine d'un stress oxydant cellulaire (Davies et al., 1982; Packer et al., 2008).

- Production d'EROs

Une partie des radicaux libres intracellulaires sont regroupés sous l'appellation EROs (Espèces Réactives de l'Oxygène), la première source d'EROs produite étant l'ion superoxyde ou O<sub>2</sub><sup>-</sup>. L'O<sub>2</sub><sup>-</sup> est généré suite à une réduction incomplète de l'oxygène au niveau

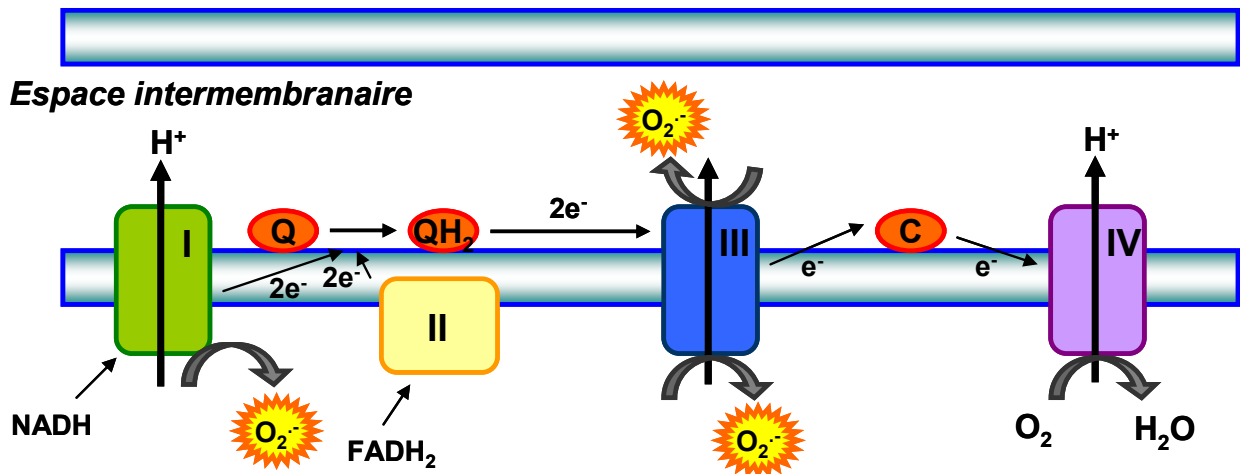


des systèmes de transport des électrons et notamment de la chaîne respiratoire mitochondriale, faisant de la mitochondrie un des sites producteurs d'EROs (Barja, 1999). De plus les complexes identifiés comme étant majoritairement producteurs d'EROs sont les complexes I et III. La production d'EROs par le complexe I est exclusivement intra-mitochondriale tandis que la production par le complexe III se fait des 2 côtés de la membrane interne mitochondriale (Hamanaka et Chandel, 2010) (Figure 42).

Il est considéré que 2 à 5 % de la consommation totale en oxygène sont associés à la génération d'ions superoxydes. Lorsque cette consommation en oxygène augmente drastiquement et notamment dans le cas de l'exercice, la génération d'ions superoxyde est accrue (Powers et Jackson, 2008).

Au niveau cellulaire, divers mécanismes sont mis en jeu de façon à tendre rapidement vers une diminution de ces EROs, l' $O_2^-$  étant fortement délétère notamment en créant des dommages au niveau de l'ADN, des lipides dont les cardiolipides et l'inactivation d'un certain nombre d'enzymes dont la mi-CK.

### Cytoplasme



### Matrice mitochondriale

**Figure 42. Production d'espèces réactives de l' $O_2$  par la chaîne respiratoire mitochondriale**

Les complexes I et III de la chaîne respiratoire produisent des ions superoxydes par une réduction incomplète de l' $O_2$ . La production d' $O_2^-$  est essentiellement intra-matriculaire à l'exception de la production via le complexe III qui a lieu aussi dans l'espace inter-membranaire.

- Détoxification cellulaire des EROS

Diverses enzymes dites anti-oxydantes ont la capacité de contribuer à la protection de la cellule contre les dommages oxydatifs et en particulier la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx).

La SOD catalyse la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  et  $O_2$ . Trois isoformes ont été identifiées et se différencient par leur localisation et les cofacteurs impliqués : SOD1 au niveau de l'espace intermembranaire mitochondrial via son cofacteur cuivre-zinc, SOD2 localisée dans la matrice mitochondriale et nécessitant l'intervention de manganèse, et enfin SOD3 au niveau de l'espace extracellulaire couplé à l'action du couple cuivre-zinc (Powers et Jackson, 2008).

La GPx quant à elle, catalyse la réduction de l' $H_2O_2$  ou d'ions hyperoxyde organiques en  $H_2O$  et alcool. Diverses isoformes ont été identifiées comme catalysant la même réaction mais ayant une spécificité en fonction de leur substrat et de leur localisation cytosolique ou mitochondriale (Brigelius-Flohe, 1999), GPx1 étant principalement cytosolique mais une partie est tout de même retrouvée dans la mitochondrie où l'isoforme 4 est prédominante.

De manière intéressante, il a largement été montré qu'en réponse à l'exercice, l'induction de la production d'espèces radicalaires était associée à une activation de l'expression et de l'activité de ces enzymes anti-oxydantes (Powers et al., 1994; Kavazis et al., 2010). Ces travaux montrent d'ailleurs qu'en réponse à l'exercice, les réponses anti-oxydantes passent majoritairement par l'activité de SOD et GPx. En outre, il a également été démontré une augmentation de la CS, marqueur de la masse mitochondriale, suggérant un lien entre biogenèse mitochondriale et défenses anti-oxydantes.

- Stress oxydant et biogenèse mitochondriale

De récentes évidences suggèrent un lien étroit entre stress oxydant et biogenèse mitochondriale, plaçant à nouveau PGC-1 $\alpha$  comme un acteur central du contrôle de la balance pro/anti-oxydante. En effet, des expériences de stimulation électrique du muscle squelettique favorisant la contraction musculaire ont permis de mettre en évidence une induction de l'expression de PGC-1 $\alpha$  associée à la formation d'EROs chez le rat. Par ailleurs, les mêmes expériences montrent que l'utilisation d'un cocktail anti-oxydant composé de SOD, GPX, catalase, vitamine E et C et de CoQ10, prévient l'augmentation de PGC-1 $\alpha$ , suggérant ainsi

une régulation de ce co-activateur de manière stress-oxydant-dépendante (Silveira et al., 2006).

Ces résultats sont confortés par des études sur des rats soumis à un exercice en endurance pendant 3 semaines, avec un régime alimentaire classique supplémenté ou non d'un anti-oxydant : la vitamine C. L'induction de l'expression de la SOD2 et de GPx valide l'apparition d'un stress oxydant en réponse à l'exercice, induction totalement prévenue par la vitamine C. De plus, l'apparition de ce stress oxydant est corrélée à une induction de PGC-1 $\alpha$  et de certaines de ses cibles, telles que NRF-1 et tFAM, induction limitée par le traitement à la vitamine C (Gomez-Cabrera et al., 2008).

De la même manière, le groupe de B.M. Spiegelman a montré récemment sur des souris « Knock down » (KO) pour PGC-1 $\alpha$  la diminution des marqueurs du stress oxydant et notamment dans le cerveau et le cœur. De plus, sur des cellules fibroblastiques en culture, l'induction des acteurs de la biogenèse mitochondriale en réponse à un traitement par de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est fortement réduite par l'extinction de PGC-1 $\alpha$  (St-Pierre et al., 2006) de la même manière que l'expression des enzymes anti-oxydantes.

Enfin, l'induction des gènes codant pour des enzymes anti-oxydantes via PGC-1 $\alpha$  impliquerait le récepteur nucléaire PPAR $\delta$ . En effet, le traitement de cellules musculaires lisses par un agoniste de PPAR $\delta$  abouti à une diminution de l'accumulation d'EROs, protection antagonisée par l'utilisation d'un siRNA spécifique de PPAR $\delta$ . En outre, cela conduit à l'induction de l'expression d'enzymes anti-oxydantes, telles que GPx1 et SOD2, induction à nouveau abolie par inactivation de PPAR $\delta$  (Kim et al., 2011). Une étude similaire a été réalisée au niveau cardiaque permettant de suggérer de la même manière une régulation du stress oxydant dans le cœur par un mécanisme PPAR $\delta$ -dépendant (Wang et al., 2010).

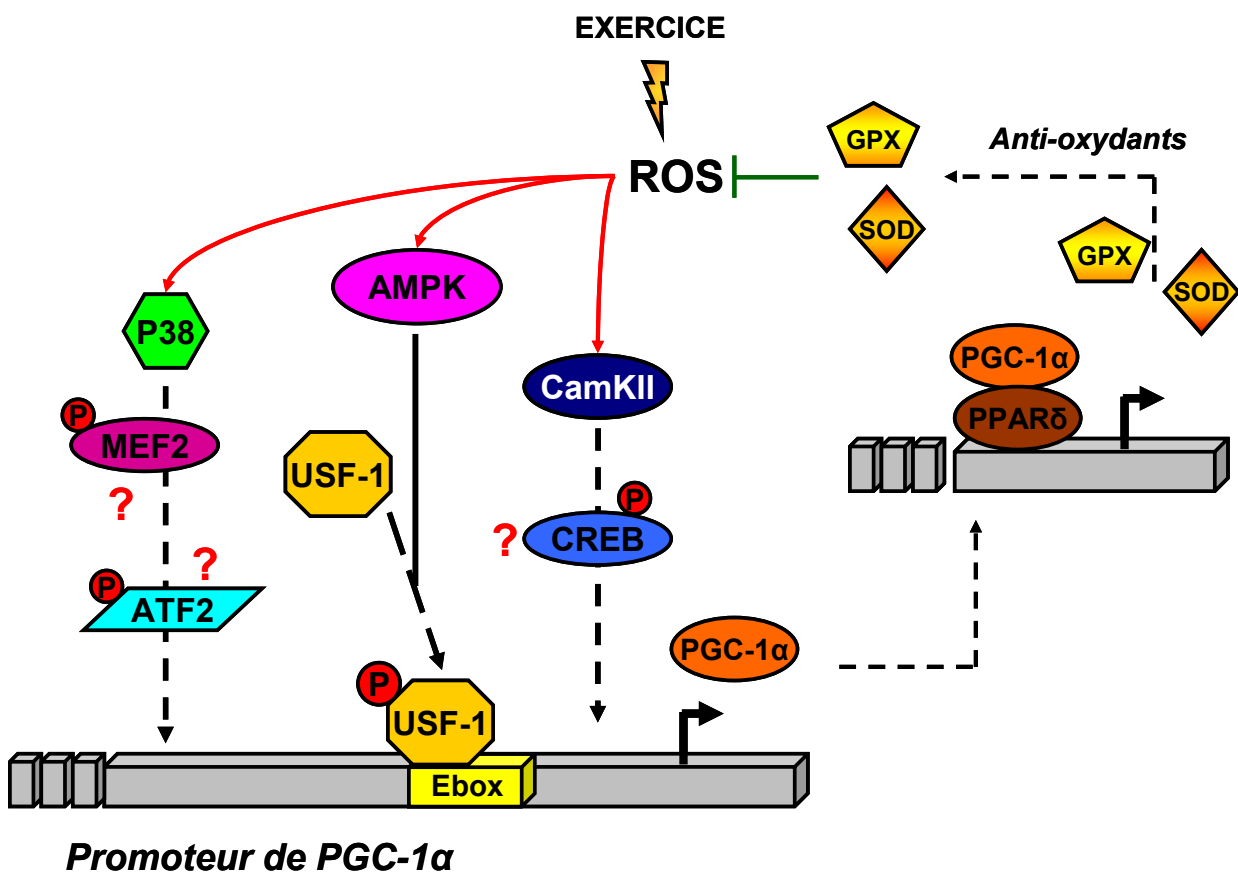
- Signalisation cellulaire associée

Les mécanismes de signalisation liant la régulation de PGC-1 $\alpha$  aux EROs ne sont pas encore totalement élucidés, certains étant encore au stade hypothétique.

Cependant, indépendamment de la biogenèse mitochondriale, la voie des MAPK impliquant notamment ERK et p38 a largement été associée à la signalisation dépendante du stress oxydant (Powers et al., 2010). Il n'est donc pas exclu que la voie des MAPK soit un des mécanismes impliqué dans la régulation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  dans un contexte de stress oxydant (Figure 43).

De plus, une voie alternative au calcium mais impliquant les EROs a récemment été proposée comme activant la CaMKII (Christensen et al., 2009). Comme décrit précédemment, la CaMKII est impliquée dans la régulation de PGC-1 $\alpha$  via le facteur de transcription CREB. Ainsi, il est probable que cette voie de signalisation soit induite en réponse au stress oxydant pour augmenter la biogenèse mitochondriale (Figure 43).

D'autre part, il a été montré une implication de l'AMPK dans la signalisation EROs-dépendante. Des expériences menées sur des cellules musculaires squelettiques en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont montré une induction de l'expression de PGC-1 $\alpha$  AMPK-dépendante via le facteur de transcription USF-1, mécanisme entièrement bloqué par l'utilisation d'un anti-oxydant : le N-acétylcysteine (NAC) (Irrcher et al., 2009) (Figure 43).



**Figure 43. Signalisation ROS-dépendante sur la régulation transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$**

Ce schéma hypothétique regroupe les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  et connues pour être sensibles au stress oxydant. PGC-1 $\alpha$  occupe une place fondamentale dans la régulation via les EROs puisqu'il contrôle l'expression des enzymes anti-oxydantes, notamment GPx et SOD, via le récepteur nucléaire PPAR $\delta$ .

**L'ensemble de ces travaux suggère donc fortement un rôle déterminant de PGC-1 $\alpha$  dans la mise en place d'une réponse adaptative protectrice contre le stress oxydant, via un axe PPAR $\delta$ -dépendant. Les voies de signalisation cellulaire contrôlant cette réponse adaptative restent toutefois à être entièrement élucidées.**

## ***2) Place de PGC-1 $\alpha$ dans le cœur ?***

Au travers de l'exemple du muscle squelettique et de la réponse à l'exercice physique, il apparaît clairement que PGC-1 $\alpha$  joue un rôle central dans le contrôle de la fonction mitochondriale. Apparaissant comme le chef d'orchestre de la biogenèse mitochondriale, il coordonne l'expression des protéines clé impliquées dans la phosphorylation oxydative, il contrôle l'utilisation des acides gras et des hydrates de carbone, joue un rôle dans la balance pro/anti-oxydante et est impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse. Ce co-activateur inductible, finement régulé tant au niveau transcriptionnel que post-traductionnel, est donc inextricablement lié au métabolisme oxydatif de la cellule.

Basés sur nos connaissances actuelles au niveau du muscle squelettique, les mécanismes précédemment décrits sont proposés comme étant extrapolables à d'autres organes oxydatifs et notamment le cœur. Toutefois, certains constats au niveau du muscle squelettique n'ont pas été retrouvés au niveau cardiaque. En effet, dans des situations où PGC-1 $\alpha$  a été montré comme étant induit dans le muscle squelettique ou encore le tissu adipeux brun, ce co-activateur ne semble pas être induit dans le cœur. C'est le cas notamment en réponse à l'exercice (Rimbaud et al., 2009), lors de l'exposition au froid (Puigserver et al., 1998), ou après traitement au resvératrol (Lagouge et al., 2006).

**Ces études suggèrent donc un contrôle de PGC-1 $\alpha$  de manière tissu-spécifique, et une régulation plus « verrouillée » de son expression et/ou activité dans le cœur sain. Néanmoins, certaines études basées sur la réponse cellulaire à la restriction calorique ou bien encore utilisant la surexpression ou l'inactivation de PGC-1 $\alpha$  convergent vers un rôle déterminant de PGC-1 $\alpha$  dans le cœur, et vraisemblablement dans la physiopathologie cardiaque.**

### *a) La restriction calorique*

Tout comme l'exercice ou la réponse au froid, la restriction calorique a été décrite comme un stimulus exogène à l'origine de l'induction de PGC-1 $\alpha$ . De manière intéressante et contrairement aux 2 autres stimuli physiologiques que sont l'exposition au froid et l'exercice, le jeûne apparaît comme induisant la biogenèse mitochondriale dans plusieurs organes tels que le muscle squelettique, le cerveau, le tissu adipeux brun mais aussi le cœur (Nisoli et al., 2005).

Après 3 mois de restriction calorique et en comparaison à des rats nourris « ad libitum », un certain nombre de paramètres étudiés concourent à valider l'induction de PGC-1 $\alpha$  et la mise en place d'une biogenèse mitochondriale dans le cœur. En effet, des expériences de PCR et/ou de western blot mettent en avant une augmentation d'environ 50% de l'expression de PGC-1 $\alpha$ , ainsi que de l'expression de certains de ses gènes cibles et notamment NRF-1, Tfam et certaines sous-unités protéiques de la chaîne respiratoire telle que COXIV. De surcroît, en réponse à la restriction calorique, la masse mitochondriale globale est augmentée, en accord avec une augmentation du contenu en ADN mitochondrial. De plus, l'activation de cette biogenèse mitochondriale s'accompagne d'une stimulation de la phosphorylation oxydative.

**Ces travaux sur la restriction calorique permettent de conclure pour la première fois quant au caractère inductible de PGC-1 $\alpha$  dans le cœur, à l'origine d'une biogenèse mitochondriale accrue et d'une phosphorylation oxydative majorée. Ces résultats incitent fortement à positionner à nouveau PGC-1 $\alpha$  comme un acteur central du contrôle de la fonction mitochondriale.**

### *b) Modèles de surexpression de PGC-1 $\alpha$*

Des études sur la surexpression de PGC-1 $\alpha$  de manière inductible chez la souris ont été menées en 2004 par le groupe de D.P Kelly. Le modèle développé est basé sur un système de type « Tet-on » (tétracycline-on) double transgénique. En effet, une première lignée exprime le transgène rtTA (reverse tetracycline TransActivator) sous le contrôle du promoteur l' $\alpha$ -MHC cardiaque-spécifique. La deuxième lignée quant à elle, exprime le transgène PGC-1 $\alpha$  sous le contrôle du promoteur TRE (Tetracycline Response Element). La génération d'une

lignée double transgénique tet-on/PGC-1 $\alpha$  permet d'activer spécifiquement dans le cœur l'expression de PGC-1 $\alpha$  après traitement à la doxycycline (dox). En effet, la dox en se fixant sur la protéine rtTA permet sa liaison sur le promoteur TRE et ainsi entraîne l'expression de PGC-1 $\alpha$ .

Basés sur ce modèle, les effets de la surexpression de PGC-1 $\alpha$  ont d'abord été étudiés sur les cœurs de souris nouveau-nés puis sur des cœurs adultes. Concernant le développement périnatal, une prolifération massive des mitochondries a été observée en faveur de l'apparition de mitochondries plus grosses. Cette prolifération mitochondriale est en accord avec une augmentation des marqueurs de la biogenèse mitochondriale, à savoir NRF-1 et Tfam. Sur les cœurs de souris adultes, la prolifération mitochondriale apparaît de manière plus discrète suggérant ainsi un rôle clé de PGC-1 $\alpha$  dans la biogenèse mitochondriale dépendante du développement cardiaque (Russell et al., 2004).

Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec l'induction massive de PGC-1 $\alpha$  à la naissance, qui devient plus modérée lors du développement post-natal. De plus, chez des souris âgées de 2 mois, considéré comme âge adulte, l'expression de PGC-1 $\alpha$  augmente à nouveau de manière importante. De manière intéressante, le niveau d'expression de PGC-1 $\alpha$  corrèle parfaitement avec l'expression des marqueurs de l'utilisation des acides gras tels que CPT1, MCAD ou encore PPAR $\alpha$ . Ces données suggèrent donc que PGC-1 $\alpha$  joue un rôle majeur dans le développement cardiaque et à l'âge adulte, et notamment dans le contrôle de l'utilisation des acides gras. En outre, une expression forcée de PGC-1 $\alpha$  par infection adénovirale dans des cardiomyocytes de rats nouveau-nés conduit à l'induction de l'expression de gènes nucléaires et mitochondriaux impliqués dans la biogenèse mitochondriale et l'utilisation des acides gras corroborant ainsi fortement les résultats précédents (Lehman et al., 2000).

**Ce modèle permet, de la même manière que dans le muscle squelettique, de proposer un rôle déterminant de PGC-1 $\alpha$  dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale cardiaque puisque sa surexpression est associée à une prolifération mitochondriale.**

### *c) Modèles d'inactivation de PGC-1 $\alpha$*

De façon à valider la place de PGC-1 $\alpha$  dans le cœur et d'évaluer son implication au niveau physiopathologique, des expériences similaires ont été conduites sur des animaux cette fois-ci KO pour PGC-1 $\alpha$ . Ces études ont permis de mettre en évidence un certain nombre de dysfonctions associées à l'absence de PGC-1 $\alpha$ .

#### *i. Atteintes hémodynamiques*

Une première lignée KO-total a été générée, par délétion des exons 4 et 5 du gène de PGC-1 $\alpha$  conduisant à l'obtention d'un transcrit non stable et dégradé, que ce soit dans le tissu adipeux brun, le muscle squelettique ou le cœur. Cette étude majoritairement menée dans le muscle squelettique et le tissu adipeux brun, permet tout de même de montrer une diminution de la masse du ventricule cardiaque mais aussi une altération de la réponse du cœur à un stress physiologique causé par la dobutamine avec une diminution de la fréquence cardiaque. Par ailleurs, des études hémodynamiques sur cœur isolé et perfusé travaillant mettent en avant une altération du travail cardiaque et une diminution du débit cardiaque (Leone et al., 2005).

**Ces résultats suggèrent ainsi un rôle délétère de l'absence de PGC-1 $\alpha$  sur la fonction cardiaque.**

#### *ii. Dysfonction mitochondriale*

Une deuxième lignée transgénique KO pour PGC-1 $\alpha$  a été obtenue conduisant à l'extinction de l'expression de PGC-1 $\alpha$  dans tous les tissus (Lin et al., 2004; Arany et al., 2005).

D'un point de vue phénotypique chez des souris adultes âgées de 3 mois, ce modèle KO est associé à une diminution de 30 à 50 % de l'expression des gènes de la phosphorylation oxydative, de l'oxydation des acides gras et de la synthèse d'ATP. Ces altérations de la fonction mitochondriale sont par ailleurs accompagnées d'une altération de la cascade transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale incluant notamment ERR $\alpha$  et Tfam.



**Ainsi ces résultats révèlent à nouveau un rôle clé de PGC-1 $\alpha$  dans le contrôle de la fonction mitochondriale cardiaque incluant l'expression des protéines mitochondriales, l'utilisation des acides gras et la phosphorylation oxydative.**

### ***iii. Déficience énergétique cardiaque***

Une étude sur cœur isolé perfusé en Langendorff a été menée pour étudier la répercussion de la délétion de PGC-1 $\alpha$  sur la fonction contractile cardiaque. Cette étude pointe une altération de la fonction contractile chez les animaux KO, altération encore plus prononcée après application d'un stress physiologique provoqué par injection de dobutamine. De plus, les cœurs issus des animaux KO apparaissent comme déficients énergétiquement. En effet cette déficience est caractérisée par une diminution de 20 % de la concentration en ATP et de phosphocréatine (Arany et al., 2006).

### ***iv. Dysfonction ventriculaire***

La même étude poursuivie sur des souris âgées de 7 à 8 mois a permis par des mesures échocardiographiques de mettre en évidence un certain nombre d'altérations caractéristiques d'une dysfonction ventriculaire. En effet, les échocardiogrammes des souris KO soulignent une dilatation de la cavité ventriculaire ainsi qu'une diminution de la fraction de raccourcissement. D'autre part, l'augmentation de l'expression de gènes fœtaux, tels que l'ANP (atrial-natriuretic peptide), l'isoforme  $\beta$  de la MHC et l'isoforme  $\alpha$  de l'actine squelettique, signe l'apparition d'un stress cardiaque et étaye les données en faveur du développement d'une dysfonction ventriculaire.

En outre, la mise en place d'une constriction de l'aorte transverse sur des souris KO de 3 mois, pour une durée de 2 mois, conduit au développement d'une sévère dysfonction ventriculaire avec une forte diminution de la fraction de raccourcissement (>50 %), un doublement du diamètre ventriculaire en diastole en faveur d'une dilatation ventriculaire, une augmentation de l'expression des gènes fœtaux ANP et  $\beta$ -MHC ainsi qu'une augmentation du poids des poumons signant une congestion pulmonaire. L'ensemble de ces résultats ainsi que l'apparition d'une cachexie chez ces animaux sont en faveur d'une profonde dysfonction cardiaque avec des signes apparents d'insuffisance cardiaque (Arany et al., 2006).

**L'ensemble de ces données permettent donc aisément d'établir un lien étroit entre fonction mitochondriale et fonction ventriculaire sous le contrôle strict de PGC-1 $\alpha$ , son absence étant associée à une dysfonction ventriculaire dont la gravité augmente en réponse à un stress pathologique.**

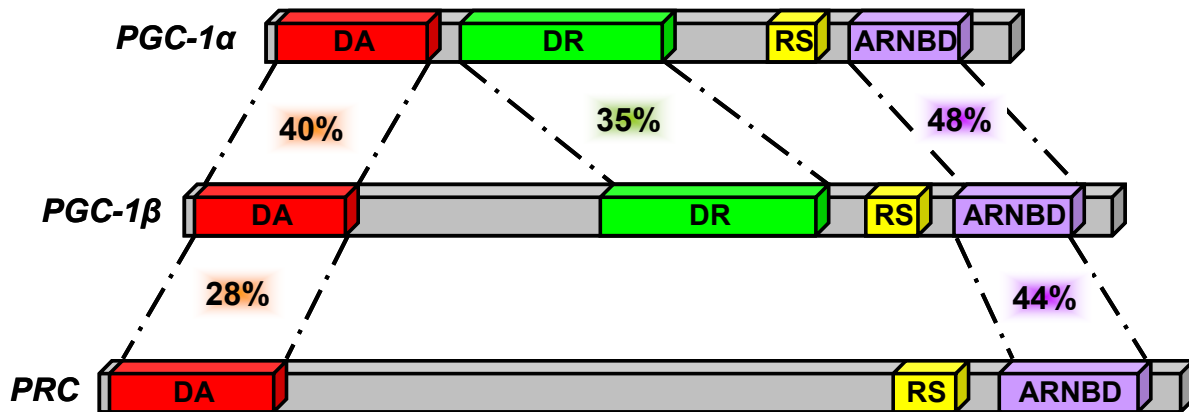
### ***3) PGC-1 $\beta$ et PRC, homologues de PGC-1 $\alpha$***

Durant cette dernière décennie, PGC-1 $\alpha$  a été associé à une famille de co-activateurs regroupés sous l'appellation générique PGC-1. En effet, sa découverte en 1998 a précédé la découverte de deux nouveaux co-activateurs présentant un certain degré d'homologie de séquence avec PGC-1 $\alpha$  : PGC-1 $\beta$  et PRC (PGC-related co-activator) (Lin et al., 2005; Scarpulla, 2010).

#### *a) Homologie de séquence*

PGC-1 $\beta$  apparaît comme le plus proche de PGC-1 $\alpha$  en homologie de séquence (Lin et al., 2002). En effet, la majorité des domaines protéiques décrits sur l'isoforme  $\alpha$  est retrouvée sur l'isoforme  $\beta$ , incluant le domaine N-terminal, le domaine central de régulation ainsi que le domaine C-terminal de liaison à l'ARN avec respectivement 40 %, 35 % et 48 % de séquences conservées. Ces similitudes avec PGC-1 $\alpha$  le prédisposent donc à des fonctions communes (Figure 44).

PRC est quant à lui plus limité en homologie de séquence avec PGC-1 $\alpha$ , les seules similitudes reposant sur la présence du domaine N-terminal et celui de liaison à l'ARN, supposant ainsi des fonctions plus éloignées par rapport au deux autres co-activateurs (Figure 44).



**Figure 44. Structure comparative des co-activateurs de la famille PGC-1**

L'homologie de séquence pour chaque domaine, représentée en %, est en comparaison avec le co-activateur PGC-1 $\alpha$ . DA en rouge représente le domaine d'activation, DR en vert représente le domaine de répression, RS en jaune représente le domaine riche en arginine/sérine et ARNBD en violet représente le domaine de liaison aux ARNs. PGC-1 $\alpha$  et  $\beta$  apparaissent comme les plus proches en séquence, PRC étant dépourvu du domaine répresseur.

*b) PGC-1 $\beta$*

Ce co-activateur proche de PGC-1 $\alpha$  au niveau séquence, l'est aussi d'un point de vue fonctionnel. En effet, l'étude du phénotype cardiaque d'une lignée de souris KO pour PGC-1 $\beta$  démontre un effet délétère sur la fonction mitochondriale, suggérant tout comme pour PGC-1 $\alpha$ , un rôle important dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale et du métabolisme oxydatif. Ce KO généré de manière conditionnelle permet d'exciser les exons 4 et 5 et conduit à l'apparition d'un codon stop prématuré et à la synthèse d'une protéine tronquée et non fonctionnelle. Ce KO est à l'origine d'une déficience de l'expression des gènes impliqués dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale et de la phosphorylation oxydative, mais de manière modérée par rapport aux modèles d'extinction de l'expression de PGC-1 $\alpha$ . Ces altérations sont retrouvées dans le cœur et le muscle squelettique, mais pas dans le tissu adipeux brun probablement par compensation PGC-1 $\alpha$  dépendante (Lelliott et al., 2006). Ces résultats sont corroborés par une étude similaire dans un modèle conduisant à l'excision des exons 4 à 6 (Lai et al., 2008). Néanmoins, le phénotype cardiaque observé ne permet pas de conclure quant à une altération de la fonction mitochondriale et de la fonction cardiaque en

absence de PGC-1 $\beta$ , certainement par induction de PGC-1 $\alpha$  en compensation, observée aussi dans un autre modèle d'extinction de PGC-1 $\beta$  (Sonoda et al., 2007).

Cependant, une expression comparative des profils géniques de cardiomyocytes nouveaux-nés suite à une infection virale soit par l'isoforme  $\alpha$  soit par l'isoforme  $\beta$ , a permis de montrer que la plupart des cibles mitochondriales induites par PGC-1 $\alpha$  l'étaient aussi par PGC-1 $\beta$ , et notamment concernant l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras, la phosphorylation oxydative ou l'oxydation des hydrates de carbone (Lai et al., 2008).

De plus, la génération de souris double KO, PGC-1 $\alpha^{-/-}$ /PGC-1 $\beta^{-/-}$  a récemment permis de démontrer que l'absence concomitante des deux co-activateurs était associée à un défaut sévère de maturation des mitochondries pendant le développement pré-natal. D'autre part, il a également été montré un retard de développement du cœur et une apparition précoce de signes apparents d'IC conduisant à une mortalité très rapide après la naissance (Lai et al., 2008). Ces données suggèrent donc l'importance des deux co-activateurs dans le contrôle de la fonction mitochondriale. Ainsi, bien que PGC-1 $\alpha$  soit le plus décrit, le rôle de PGC-1 $\beta$  ne doit pas être négligé.

### c) PRC

En dépit de ses différences de structure, PRC partage certaines similitudes avec PGC-1 $\alpha$  et notamment sa capacité à lier certains facteurs de transcription incluant NRF-1 ou encore ERR $\alpha$ . En outre, il a aussi été décrit comme participant à la transactivation de gènes nucléaires identifiés comme contrôlant l'expression des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale. En d'autres termes, ce co-activateur semble aussi jouer un rôle clé dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale (Gleyzer et al., 2005).

Encore peu connu, des évidences récentes le proposent tout de même comme un co-activateur impliqué de manière générale dans le contrôle de la prolifération cellulaire. En effet, ce dernier est peu exprimé dans des cellules différenciées mais majoritairement induit en état prolifératif, et connu pour être inductible par le sérum et plus particulièrement par la protéine SRF (serum response factor) dans des cellules fibroblastiques ou musculaires squelettiques (Andersson et Scarpulla, 2001).

#### **4) Conclusion chapitre II**

La biogenèse mitochondriale dépend en partie de la coordination finement régulée de l'expression de gènes nucléaires et mitochondriaux. Cette coordination est possible grâce à un co-activateur transcriptionnel, PGC-1 $\alpha$ , et ce dernier a été ainsi décrit comme « chef d'orchestre » de la fonction mitochondriale.

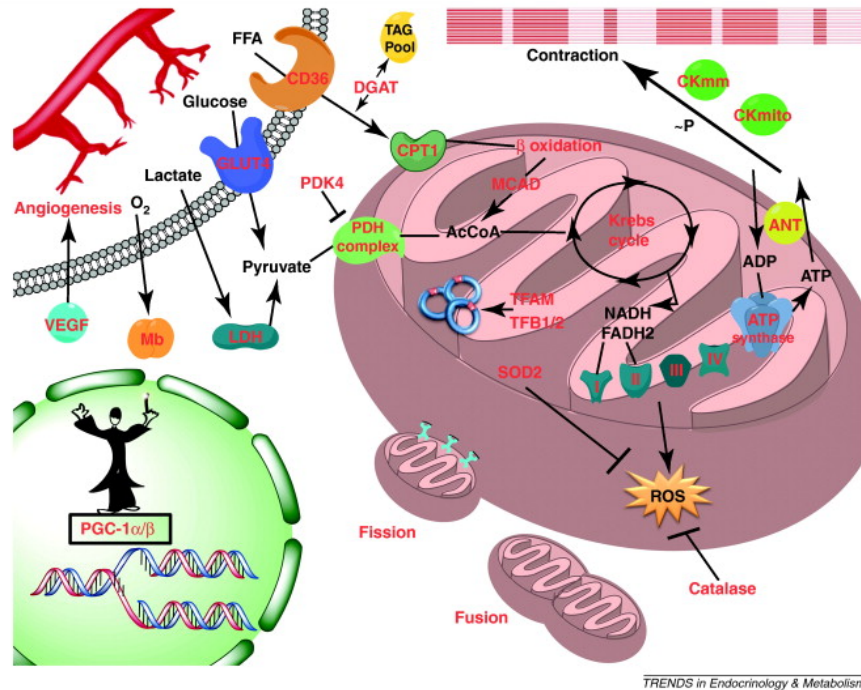
PGC-1 $\alpha$  contrôle ainsi la transcription de nombreux facteurs de transcription, et a été identifié initialement comme induisant la cascade de signalisation régulant l'expression de protéines mitochondriales. En activant l'expression de différents facteurs nucléaire et notamment les facteurs NRF et ERR $\alpha$ , il coordonne à la fois l'expression des sous-unités protéiques mitochondriales d'origine nucléaires telle que COXIV et celles directement synthétisées par l'ADNmt, via le facteur de transcription Tfam, comme COXI.

Par ailleurs, au travers de l'exemple du muscle squelettique en réponse à l'exercice, le rôle de PGC-1 $\alpha$  n'apparaît pas se limiter à la biogenèse mitochondriale mais s'étend à la fonction mitochondriale dans son ensemble. En effet, il favorise notamment l'utilisation des substrats, acides gras et hydrates de carbone, participe au contrôle de la balance pro-anti-oxydante, mais également favorise les processus angiogéniques pour accroître l'apport en O<sub>2</sub> (pour revue (Patten et Arany, 2011)) (Figure 45).

D'autre part, concernant le contrôle de son expression et/ou activité, PGC-1 $\alpha$  est finement régulé tant au niveau transcriptionnel que post-traductionnel. Toujours à partir des études menées dans le muscle squelettique, différentes voies de signalisation ont été associées au contrôle de PGC-1 $\alpha$ , incluant en particulier la voie Calcineurine/CaMK et la voie des MAPK. De plus, deux protéines considérées comme des senseurs métaboliques de la cellule et contrôlant la balance énergétique cellulaire, l'AMPK et la SIRT1 apparaissent comme des régulateurs clés de l'expression et de l'activité de PGC-1 $\alpha$ .

Malgré les limitations de nos connaissances sur les mécanismes de régulation de PGC-1 $\alpha$  dans le cœur, des évidences récentes lui confèrent une place centrale et déterminante dans le contrôle de la fonction mitochondriale et en particulier en réponse à la restriction calorique ou après surexpression de PGC-1 $\alpha$ . Par ailleurs, par le biais de l'établissement de lignées de souris transgéniques invalidant PGC-1 $\alpha$ , l'altération drastique de la fonction mitochondriale apparaît comme inextricablement liée aux

altérations de la fonction cardiaque, supposant ainsi un rôle important de PGC-1 $\alpha$  dans le développement de la physiopathologie du cœur.



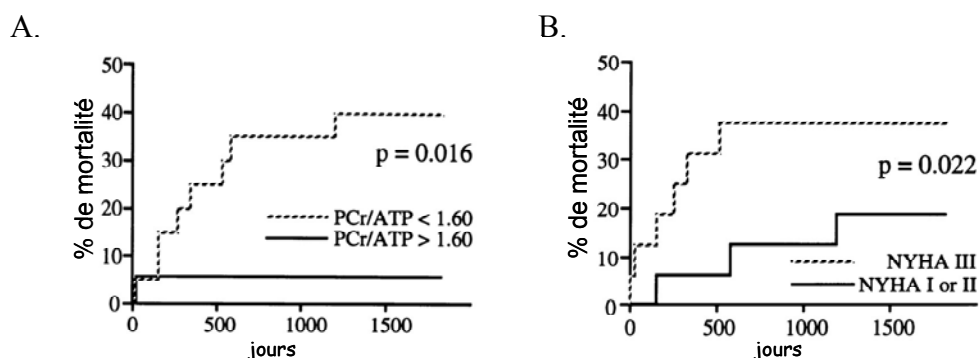
**Figure 45. PGC-1 $\alpha$ , chef d'orchestre de la fonction mitochondriale.**

PGC-1 $\alpha$  exerce un rôle central dans la régulation d'un programme génétique spécifique à l'origine du contrôle de la fonction mitochondriale incluant l'utilisation des substrats, glucose et acides gras, le contrôle de la biogenèse mitochondriale (synthèse et transport de protéines mitochondriales, dynamique mitochondriale...), les défenses anti-oxydantes, mais également l'angiogénèse. *Issue de Patten et Arany, 2011.*

### Chapitre III : le cœur défaillant, « moteur en panne d'essence » : cas de l'insuffisance cardiaque.

Selon l'OMS (organisme mondial de la santé), « l'insuffisance cardiaque (IC) est un syndrome clinique, complexe, résultant de l'incapacité du cœur à fournir un débit sanguin suffisant pour répondre aux besoins métaboliques de l'organisme ». Malgré l'avancée des thérapies actuelles, elle reste la première cause de mortalité au monde et deux millions de nouveaux cas d'IC sont décelés chaque année. Selon un rapport de l'OMS datant de 2009, les maladies cardiovasculaires sont à l'origine de 17,1 millions de décès par an dans le monde. En 2006, elles représentaient 28 % des décès en France dont 23 % liés à l'IC.

En 1939, il a été proposé par Herrmann *et al.* une association entre défaillance métabolique et IC par l'observation d'une déplétion drastique en créatine dans le myocarde défaillant. Cette observation est à l'origine du concept de « cœur défaillant, organe en manque de carburant », qui a fait l'objet de nombreuses études jusqu'à aujourd'hui et a fait du métabolisme énergétique un sujet d'intérêt majeur. Il est d'ailleurs actuellement admis que le métabolisme énergétique peut être un facteur prédictif de mortalité au même titre que la classe NYHA. En effet, il a été montré par Neubauer *et al.* que le ratio PCr/ATP, reflétant la charge énergétique du cœur, inférieur à une valeur seuil de 1.6 est significativement associé à l'augmentation du taux de mortalité de patients atteints de cardiomyopathies dilatées (Neubauer *et al.*, 1997) (Figure 46).



**Figure 46. Courbes de survie chez des patients présentant une cardiomyopathie dilatée**

- A. facteur prédictif : PCr/ATP
- B. facteur prédictif : classe NYHA

Issue de (Neubauer *et al.*, 1997)

En outre, l'IC peut être assimilée à une pathologie de type métabolique puisque le métabolisme énergétique est drastiquement altéré dans le cœur insuffisant. En effet, l'ensemble des composantes du métabolisme incluant l'utilisation des substrats, la phosphorylation oxydative et donc la production énergétique, ainsi que les transferts énergétiques, apparaissent comme défailants dans cette pathologie (Neubauer, 2007).

PGC-1 $\alpha$  ayant été sans ambiguïté montré comme central dans le contrôle de la fonction mitochondriale, et son inactivation conduisant au développement de cardiomyopathies sévères, ce co-activateur a fait l'objet de nombreuses recherches le positionnant actuellement comme une cible thérapeutique d'intérêt pour le développement de thérapies métaboliques futures.

**Ainsi le troisième chapitre sera consacré d'une part, à définir dans son ensemble les altérations du métabolisme énergétique dans le cœur insuffisant et d'autre part, à justifier le choix de PGC-1 $\alpha$  comme cible thérapeutique potentielle de l'IC.**

## **I) Altérations du métabolisme énergétique dans l'insuffisance cardiaque**

### ***1) Utilisation des substrats***

Classiquement, dans le cœur insuffisant, la limitation de l'utilisation des substrats est caractérisée en fonction des travaux soit par une diminution du transport des substrats, soit par une réduction de leur oxydation ou bien par l'altération des 2 composantes. Dans un cœur sain, les substrats énergétiques préférentiels pour la production d'ATP sont les acides gras à hauteur de 70 % (AG). Bien que le glucose ne soit pas le substrat majoritairement utilisé, il participe tout de même aussi à cette production énergétique à hauteur de 30 %.

Lors d'une IC avancée, un certain nombre d'évidences concourent à montrer une baisse drastique de l'oxydation des acides gras (Stanley et al., 2005), en faveur d'un métabolisme plus glycolytique par augmentation de la consommation de glucose (van Bilsen, 2004).

#### ***a) Métabolisme des acides gras***

L'altération de la capacité mitochondriale à oxyder les AG dépend étroitement d'une dérégulation importante de l'expression et de l'activité d'enzymes clés impliquées dans le



métabolisme des acides gras. D'autre part, cette diminution de l'utilisation des AG est fortement corrélée à une diminution de l'expression de différents transporteurs des AG.

Chez des patients atteints d'une cardiomyopathie dilatée, la consommation ainsi que l'oxydation des AG apparaissent comme fortement diminuées (Davila-Roman et al., 2002; Neglia et al., 2007). Ces résultats corroborent ceux obtenus chez le rat après ligature de l'artère coronaire gauche, qui montrent à nouveau une diminution de l'oxydation des AG et une corrélation positive avec la diminution de la fraction d'éjection (Heather et al., 2006). Par ailleurs, ce même modèle a permis la mise en évidence d'une diminution de l'expression des différents transporteurs des AG à savoir FAT/CD36, FABPpm et cFABP, et ces résultats ont été confirmés chez le rat SHHF présentant une dysfonction cardiaque dès l'âge de 13 mois (Sack et al., 1996).

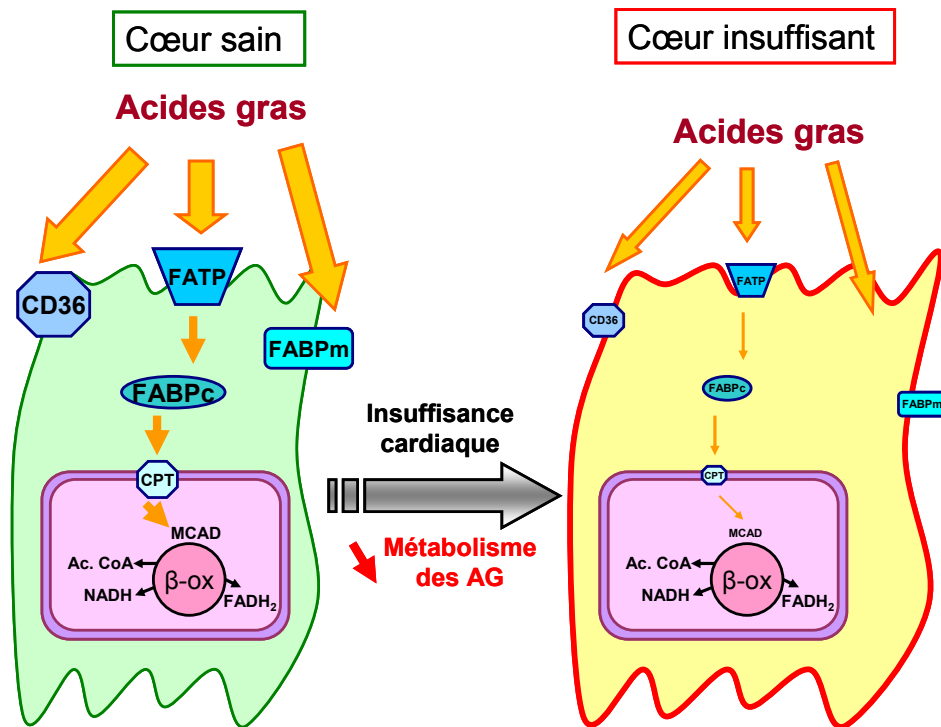
Des études chez le chien confortent ces résultats et montrent une diminution concomitante à l'altération de l'oxydation des acides gras, de CPT1 et de MCAD tant au niveau de leur expression que de leur activité (Osorio et al., 2002). D'autre part l'altération de l'expression des enzymes impliquées dans l'oxydation des AG incluant MCAD a aussi été observée chez le rat ayant subi une constriction de l'aorte transverse (Bugger et al., 2010).

**Ces résultats permettent ainsi de conclure à une défaillance nette de l'oxydation des AG dans le cœur insuffisant par altération à la fois des transporteurs et des enzymes clés de l'oxydation des AG (Figure 47).**

L'expression des enzymes impliquées dans la voie d'oxydation des AG étant en majorité contrôlée par le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ , il a été suggéré une diminution de son expression à l'origine de l'altération de l'utilisation des AG. En effet, l'inactivation de PPAR $\alpha$  est étroitement corrélée à une diminution du transport et de l'oxydation des AG (Djouadi et al., 1999). De plus, la diminution de son expression a été retrouvée dans différents modèles d'insuffisance cardiaque et notamment chez le rat Dahl (Rimbaud et al., 2011), ou encore chez l'homme (Goikoetxea et al., 2006; Sebastiani et al., 2007).

Par ailleurs, l'activité de PPAR $\alpha$  dépend strictement de son association avec RXR, et la diminution de l'expression de ce dernier altère la fonctionnalité de PPAR $\alpha$ . De surcroît, une diminution de l'expression de RXR et non de PPAR $\alpha$  a été observée dans un modèle d'IC chez le chien, et a été parfaitement corrélée à la diminution de l'expression et de l'activité de MCAD (Osorio et al., 2002).

Ainsi, l'axe PPAR $\alpha$ /RXR apparait comme défaillant dans l'insuffisance cardiaque et peut en partie expliquer l'altération majeure du transport et de l'oxydation des AG.



**Figure 47. Utilisation et oxydation des acides gras**

L'expression des transporteurs des acides gras apparait comme fortement diminuée dans l'IC, tout comme l'expression d'enzymes de la  $\beta$ -oxydation et notamment MCAD, et ceci concoure donc à une diminution du métabolisme des acides gras dans le cœur défaillant.

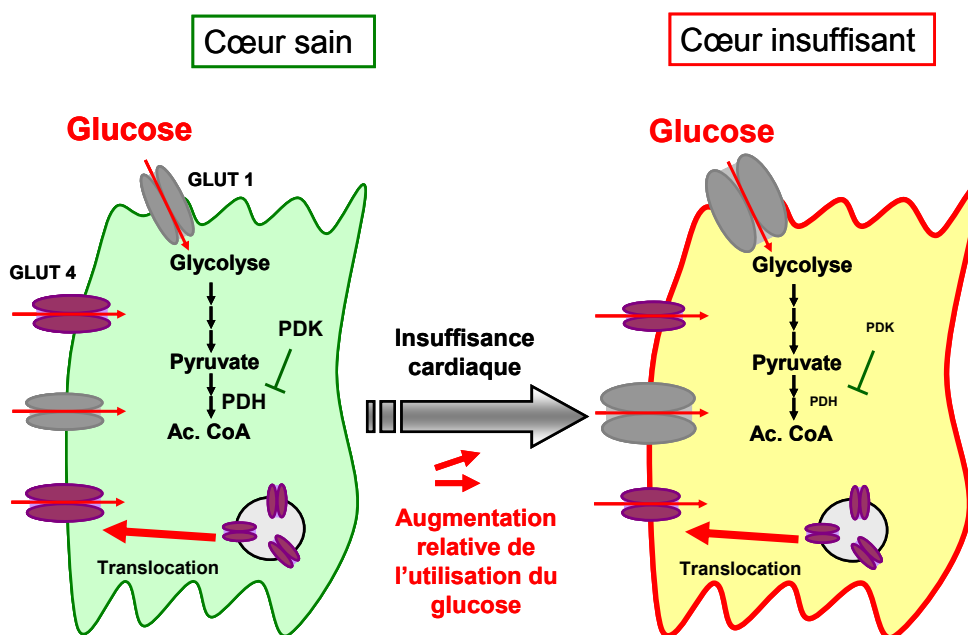
### *b) Métabolisme des hydrates de carbone*

Concernant l'oxydation du glucose dans le cœur défaillant, les conclusions sont plus difficiles à émettre. En effet, malgré les évidences montrant une augmentation de la vitesse d'oxydation du glucose, il a aussi été décrit une diminution de l'expression et de l'activité des transporteurs du glucose et des enzymes glycolytiques.

Ce constat provient de diverses études menées dans différents modèles expérimentaux d'IC. Chez le chien, en dépit de l'augmentation nette de l'oxydation des hydrates de carbone, l'expression des transporteurs du glucose GLUT1 et 4 est fortement diminuée mais la translocation de GLUT4 à la membrane apparait comme inchangée (Lei et al., 2004). D'autre part, chez le rat Dahl soumis à un régime hypersodé pendant 17 semaines, il a été rapportée une diminution de l'expression de l'ensemble des enzymes clés impliquées dans la glycolyse

incluant la PFK, la PDK et la PDH. Malgré la diminution de l'expression de GLUT4, il a cependant été montré une augmentation de l'expression de GLUT1 (Kato et al., 2010). Par ailleurs, chez l'homme, il a été décrit une diminution de l'expression notamment de PDK4 en faveur d'une augmentation de l'oxydation du glucose et du lactate (Razeghi et al., 2001). Enfin, chez le rat insuffisant cardiaque après sténose aortique, il a été montré une diminution de l'activité des enzymes de la glycolyse (De Sousa et al., 1999).

**Ainsi contrairement à l'utilisation des acides gras, celle du glucose apparaît être moins altérée avec des évidences en faveur d'une augmentation de l'oxydation du glucose et d'autres en faveur d'une altération modérée de la glycolyse (Figure 48).**

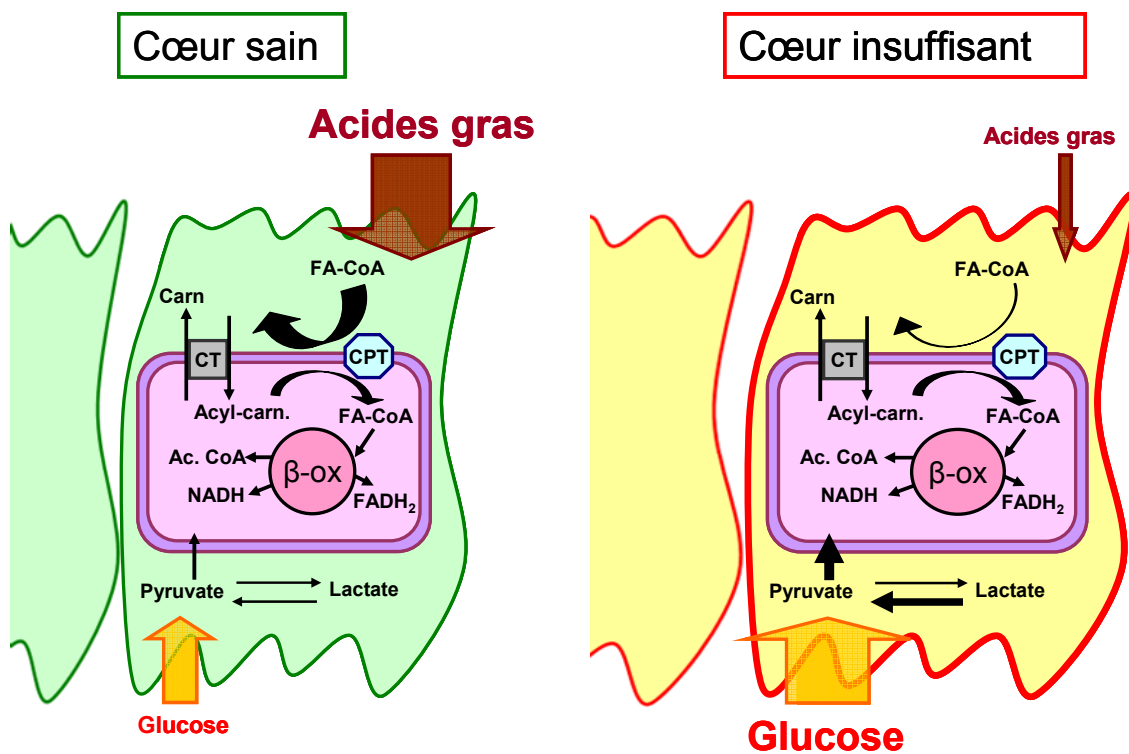


**Figure 48. Utilisation et oxydation du glucose**

L'altération de l'oxydation du glucose apparaît comme paradoxale dans l'insuffisance cardiaque en raison d'une diminution notamment de l'expression des enzymes de la glycolyse telle que la PDH mais aussi de la PDK. De plus, malgré la diminution de l'expression du transporteur GLUT4, sa translocation n'est pas altérée et l'expression de GLUT 1 est augmentée. Ainsi, le passage d'un métabolisme oxydatif à un métabolisme glycolytique dans l'IC est relatif par rapport à la diminution drastique de l'oxydation des acides gras.

c) Schéma bilan

Ces résultats quoique paradoxaux, tendent à suggérer par rapport à une atteinte claire de l'oxydation des acides gras, une altération plus discrète du métabolisme des hydrates de carbone, en faveur d'une diminution globale de la capacité du myocarde insuffisant à oxyder les substrats énergétiques. En considérant la chute drastique des capacités mitochondriales à oxyder les acides gras, et celle plus modérée concernant les hydrates de carbone, il a été proposé que globalement le métabolisme du cœur insuffisant devient en proportion relative plus glycolytique (Lionetti et al., 2011) (Figure 49).



**Figure 49. Utilisation des substrats dans le cœur sain et le cœur insuffisant**

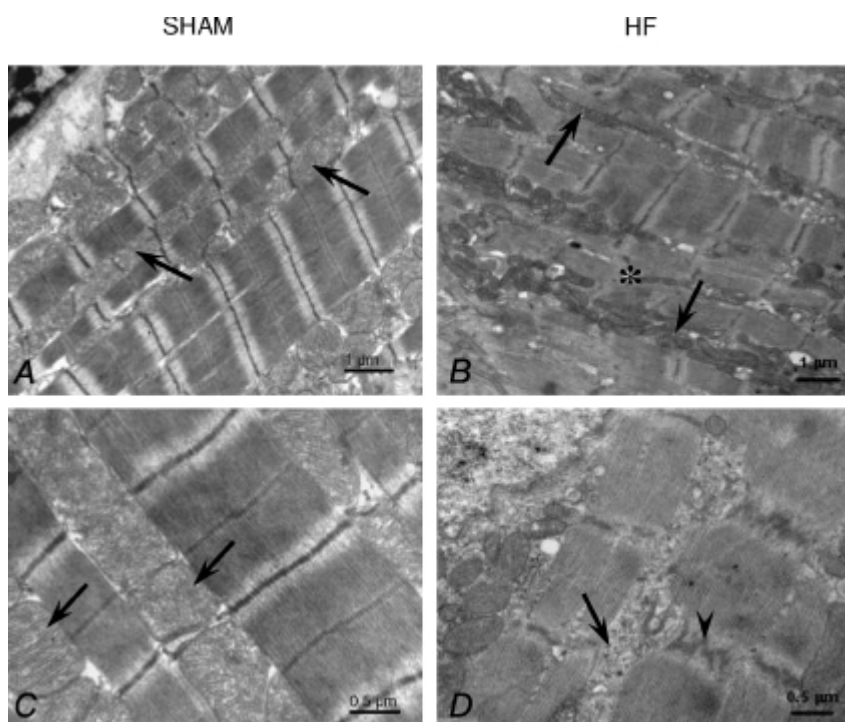
A gauche, un cardiomyocyte sain utilise préférentiellement les acides gras et donc la voie de la  $\beta$ -oxydation.

A droite, dans un cardiomyocyte de cœur insuffisant, l'ensemble des protéines impliquées dans le transport et l'oxydation des acides gras étant fortement sous-exprimé par rapport à l'oxydation du glucose, la voie glycolytique devient préférentielle au détriment de celle des acides gras. *Adaptée d'après (Lionetti et al., 2011).*

## 2) Altérations structurales et fonctionnelles de la mitochondrie

D'un point de vue structural, les mitochondries de cœur insuffisant sont décrites comme ayant une taille réduite, certaines étant fragmentées et avec une morphologie altérée (Schaper et al., 1991; Chen et al., 2009) (Figure 50). Ces altérations sont accompagnées d'un dysfonctionnement clair de la chaîne respiratoire. En conséquence, la production d'ATP décroît ce qui explique la diminution de la concentration cellulaire en ATP et l'altération du ratio ATP/ADP au voisinage des ATPases des myofilaments et du RS. De plus, ces altérations sont associées à une perturbation des interactions entre organelles et une désorganisation de l'architecture cellulaire. Ainsi, l'altération globale mitochondriale concourt étroitement à la dysfonction ventriculaire qui ne peut plus assurer ses besoins métaboliques et conduit à une défaillance du couplage excitation-contraction (Joubert et al., 2008).

De plus, la dysfonction mitochondriale du cœur insuffisant corrèle positivement avec différents marqueurs de l'insuffisance cardiaque et notamment la fraction d'éjection (Sabbah et al., 1992; Sharov et al., 1998).



**Figure 50. Photographies de microscopie électronique de cardiomyocytes de rats contrôles (A et C) et de rats insuffisants (B et D)**

L'organisation régulière des mitochondries dans le cardiomyocyte de rat contrôle apparaît comme désorganisée dans le cardiomyocytes de rats insuffisants. Les flèches indiquent les mitochondries. *Issue de Joubert et al., 2008.*

### *a) Dysfonction de la chaîne respiratoire*

Les altérations, tant au niveau de l'expression des complexes de la chaîne respiratoire que de l'activité de ces mêmes complexes, corrélient significativement avec une diminution de la fraction d'éjection qui signe une dysfonction cardiaque, et ce dans différents modèles expérimentaux ainsi que chez l'homme.

Chez des patients atteints de cardiomyopathie dilatée, il a été noté une diminution majeure de l'activité de la CS et de la COX (Quigley et al., 2000). Ces résultats sont retrouvés chez le chien présentant une diminution de l'activité de la CS et des complexes III et V de la chaîne respiratoire, mais également une diminution du nombre de copies de l'ADN mitochondrial (Marin-Garcia et al., 2001). La diminution du nombre de copie de l'ADN mitochondrial a été observée de la même manière sur un modèle de dysfonction ventriculaire induit par infarctus du myocarde chez la souris. Parallèlement à ce déficit génétique, l'activité des complexes I, III et V dont certaines sous-unités sont codées par l'ADN mitochondrial, est fortement diminuée (Ide et al., 2001).

Il apparait clairement une association entre altération de l'ADN mitochondrial et l'activité des complexes de la chaîne respiratoire (Rocher et al., 2008). Cette défaillance peut concourir à la diminution de la production d'ATP, notamment par un déficit du fonctionnement de l'ATP synthétase. Ces résultats sont d'ailleurs largement validés au niveau fonctionnel par la mesure de la respiration mitochondriale, celle-ci apparaissant comme fortement diminuée : chez l'homme (Sharov et al., 2000), le chien (Sharov et al., 1998) ou encore le rongeur (Garnier et al., 2003; Jullig et al., 2008).

### *b) Stress oxydant*

Outre la diminution de la capacité mitochondriale à produire de l'ATP dans le cœur insuffisant, le défaut de fonctionnement de la chaîne respiratoire est aussi associé à une augmentation de la production d'EROs, la mitochondrie étant le lieu de production principal (Di Lisa et al., 2009). Cette augmentation du stress oxydant participe alors à la dysfonction de la phosphorylation oxydative (Tsutsui et al., 2008; Scolletta et Biagioli, 2010). Dans le cœur insuffisant, il apparait un stress oxydant prolongé et massif à l'origine de dommages génétiques sur l'ADN mitochondrial et d'une production accrue d'EROs participant ainsi à la défaillance de la chaîne respiratoire (Blum, 2009).

Les complexes proposés comme étant à l'origine de la formation des EROs sont les complexes I et III par la libération d'électrons non appariés favorisant ainsi la création d'anions superoxydes. Leur activité étant diminuée dans l'IC, la production d'EROs est d'autant plus favorisée (Pitkanen et Robinson, 1996). Outre l'altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire par action directe des EROS sur l'activité des complexes, il a été proposé une altération des lipides membranaires et notamment des cardiolipines à l'origine d'une déstructuration membranaire. De fait, cette peroxydation lipidique favorise très certainement le dysfonctionnement de la phosphorylation oxydative et notamment des complexes I et III (Paradies et al., 2001; Paradies et al., 2002).

### ***3) Altération des transferts énergétiques***

Outre ces remaniements de substrats et du fonctionnement de la chaîne respiratoire, la défaillance cardiaque est associée à une altération du transfert énergétique ainsi qu'à une diminution de la concentration globale en ATP selon le degré de sévérité de l'insuffisance. Pour renforcer l'hypothèse du cœur insuffisant « énergie déprimé » proposée depuis plusieurs décennies, l'émergence de techniques telles que la RMN (résonance magnétique nucléaire) ou le TEP (tomographie par émission de positrons) ont permis de quantifier de manière absolue les concentrations en ATP intracellulaire et de valider le concept de défaillance énergétique du myocarde insuffisant. Il est actuellement admis une diminution de l'ordre de 25 à 30 % de la concentration en ATP dans le cœur insuffisant (Ingwall et Weiss, 2004). Cependant, cette diminution ne suffit pas à entraîner des altérations de la fonction contractile du myocarde et suppose une altération des flux énergétiques à l'origine d'une disponibilité moins importante d'ATP au voisinage des ATPases.

En effet, des variations bien plus drastiques ont été constatées concernant les composantes du transfert énergétique impliquant notamment le système de la créatine kinase. D'une part, le contenu en créatine totale et phosphocréatine diminue de 30 à 70% en fonction du stade de l'insuffisance (Shen et al., 1999; Beer et al., 2002) et d'autre part, ces résultats sont associés à une diminution notable de l'activité de la CK et en particulier de l'isoforme mitochondriale (Nascimben et al., 1996; De Sousa et al., 1999).

**Ainsi ces altérations contribuent à une déficience des transferts énergétiques au sein du cardiomyocyte défaillant. Celle-ci se caractérise alors par une diminution de**

**l'apport en ATP vers les sites consommateurs d'énergie. Par conséquent, ces anomalies métaboliques concourent fortement à la dysfonction contractile caractéristique du cœur insuffisant ((Ventura-Clapier et al., 2004) pour revue).**

**Par conséquent, la dysfonction de la phosphorylation oxydative est associée à une production limitée d'ATP expliquant la diminution globale de sa concentration intracellulaire. D'autre part, la déficience dans les transferts énergétiques contribue à une mauvaise distribution de l'ATP aux sites consommateurs. Tout ceci participe donc à l'altération du couplage excitation-contraction. En outre, une défaillance de la chaîne respiratoire est associée à la génération d'un stress oxydant, interférant lui-même avec le fonctionnement de la chaîne respiratoire et étant à l'origine de dommages de l'ADNmt.**

## **II) Biogenèse mitochondriale et insuffisance cardiaque**

Ces dernières années, une déficience de la biogenèse mitochondriale et plus particulièrement de son contrôle transcriptionnel, a été proposée comme pouvant être à l'origine des altérations métaboliques de l'IC.

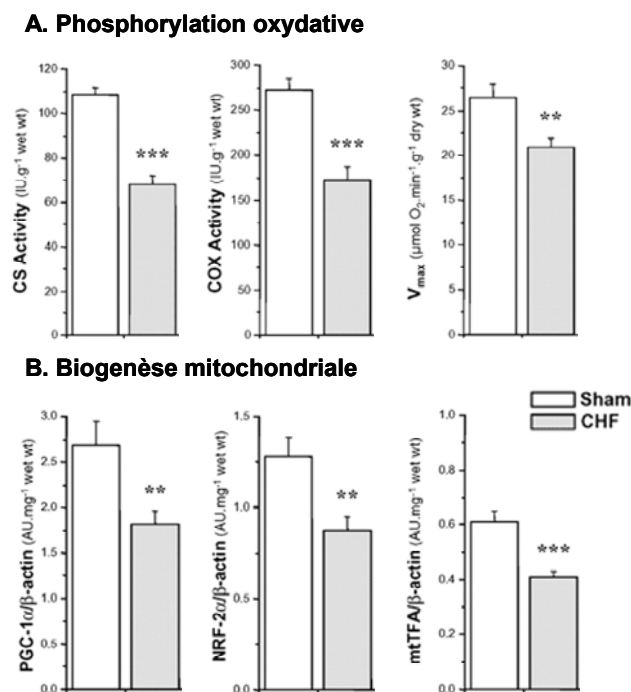
En effet, de nombreuses évidences tirées d'observations expérimentales, soit sur des modèles animaux d'IC, soit sur des patients présentant une dysfonction cardiaque, montrent une diminution nette de l'ensemble des acteurs de la biogenèse mitochondriale et notamment PGC-1 $\alpha$ . Il est ainsi fort probable qu'un lien de cause à effet puisse exister entre une altération de la biogenèse mitochondriale, une dysfonction mitochondriale et le développement de l'IC puisque outre la biogenèse mitochondriale, PGC-1 $\alpha$  contrôle la fonction mitochondriale dans son ensemble.

**Ainsi, une altération du contrôle de la biogenèse mitochondriale avec PGC-1 $\alpha$  comme acteur central est sérieusement proposée comme l'origine moléculaire de la défaillance de la phosphorylation oxydative et de la fonction mitochondriale dans l'IC.**



## 1) Modèles expérimentaux animaux

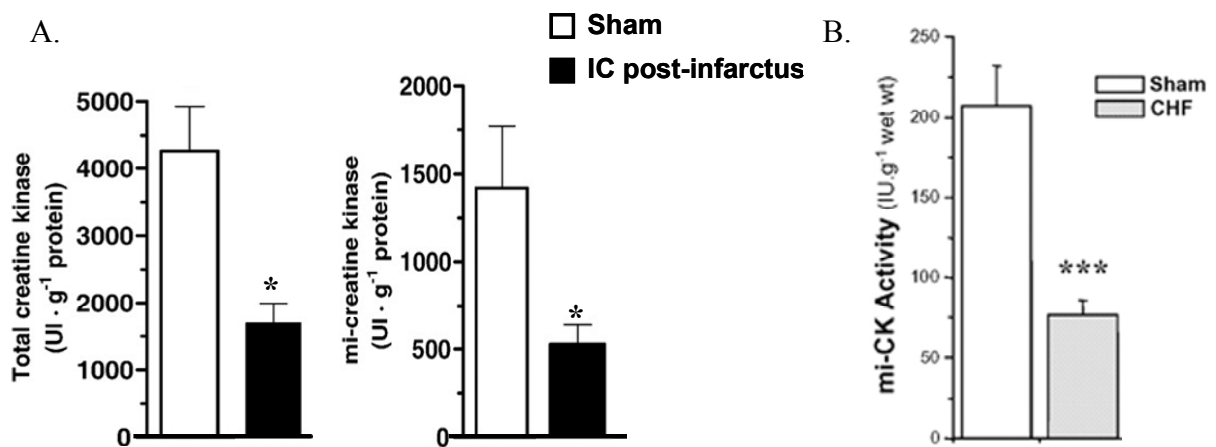
L'induction d'une IC chez le rat par sténose aortique est caractérisée par une diminution des capacités oxydatives mitochondriales cardiaques. De la même manière, la cascade de signalisation de la biogenèse mitochondriale incluant les facteurs de transcription Tfam et NRF2 est altérée, parallèlement à la diminution de l'expression de PGC-1 $\alpha$ . Ces résultats sont associés à la diminution de l'activité de la CS et de la COX signant ainsi une diminution globale de la masse mitochondriale. En outre, l'expression de PGC-1 $\alpha$  corrèle fortement avec l'activité de la CS, de la COX ou encore la respiration maximale mitochondriale, validant ainsi une relation étroite entre PGC-1 $\alpha$  et capacité oxydative. Ces données confortent le rôle central de PGC-1 $\alpha$  dans le contrôle de la phosphorylation oxydative, et une diminution de son expression peut être associée au développement de l'IC (Figure 51) (Garnier et al., 2003).



**Figure 51. Biogenèse et fonction mitochondriale dans l'IC chez le rat**

- A. L'activité des marqueurs de la masse mitochondriale, CS et COX, est diminuée de manière parallèle à une diminution de la respiration mitochondriale ou V<sub>max</sub>.
- B. Les acteurs de la biogenèse mitochondriale PGC-1 $\alpha$ , NRF-2 et Tfam voient leur expression diminuer. Sham = VG contrôle, CHF (chronic heart failure) = VG IC. *Issue de (Garnier et al., 2003).*

Cette étude a largement été confirmée dans de nombreux autres modèles et notamment après ligature de l'artère coronaire gauche chez le rat développant un infarctus du myocarde évoluant vers une IC. De la même manière, un autre groupe a montré une diminution de l'expression des acteurs de la biogenèse mitochondriale y compris PGC-1 $\alpha$  (Sun et al., 2007). Cette diminution de PGC-1 $\alpha$  apparait à nouveau comme corrélée avec la diminution des capacités oxydatives du myocarde insuffisant et de l'activité de la CS et de COX (Zoll et al., 2006; Garnier et al., 2009). Outre la diminution de la fonction mitochondriale, ce modèle met en évidence une altération de l'activité de la CK dont l'isoforme mitochondriale (Figure 52) (Kemi et al., 2007). La diminution de l'activité de la miCK a d'ailleurs été corrélée à la diminution de PGC-1 $\alpha$  après sténose aortique du rat (Garnier et al., 2003).



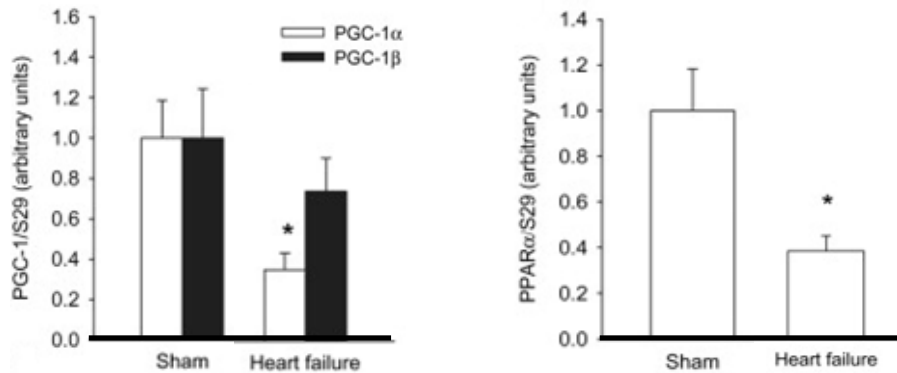
**Figure 52. Système de la CK dans l'IC chez le rat**

A. Lors d'une IC induite par infarctus, l'activité totale de la CK et celle de l'isoforme mitochondriale diminue drastiquement (Kemi et al., 2007).

B. Après sténose aortique et développement d'une IC, l'activité miCK est également diminuée (Garnier et al., 2003).

Chez la souris, la déficience énergétique après IC apparait aussi intimement liée à l'altération de la biogenèse mitochondriale. Dans un modèle de souris transgénique développant une cardiomyopathie, une diminution de PGC-1 $\alpha$  a été retrouvée (Watson et al., 2007). De même, l'induction d'une IC par constriction de l'aorte transverse chez la souris est associée d'une part à la diminution des capacités oxydatives et d'autre part à un défaut d'expression de PGC-1 $\alpha$ . De manière intéressante, il a été observé dans ce modèle une diminution de l'expression de PPAR $\alpha$  impliqué dans le contrôle de la  $\beta$ -oxydation, et étant par ailleurs sous le contrôle de PGC-1 $\alpha$ . En dépit de ces seuls résultats, cela indique tout de même

un lien étroit entre l'expression de PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\alpha$  et l'utilisation des acides gras (Faerber et al., 2011) (Figure 53). En effet, une étude précédente chez la souris après constriction aortique, a montré que l'apparition de l'IC était, certes corrélée à une diminution de l'expression de PGC-1 $\alpha$ , mais également associée à une diminution de l'expression de PDK4 et LCAD positionnant ainsi PGC-1 $\alpha$  comme un acteur clé du contrôle de l'utilisation des substrats (Witt et al., 2008).



**Figure 53. Altération de l'axe PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  dans l'IC expérimentale**

La diminution de l'expression de PGC-1 $\alpha$  dans l'IC, mais pas de l'isoforme  $\beta$ , est associée à une diminution de l'expression de PPAR $\alpha$ .

*D'après (Faerber et al., 2011)*

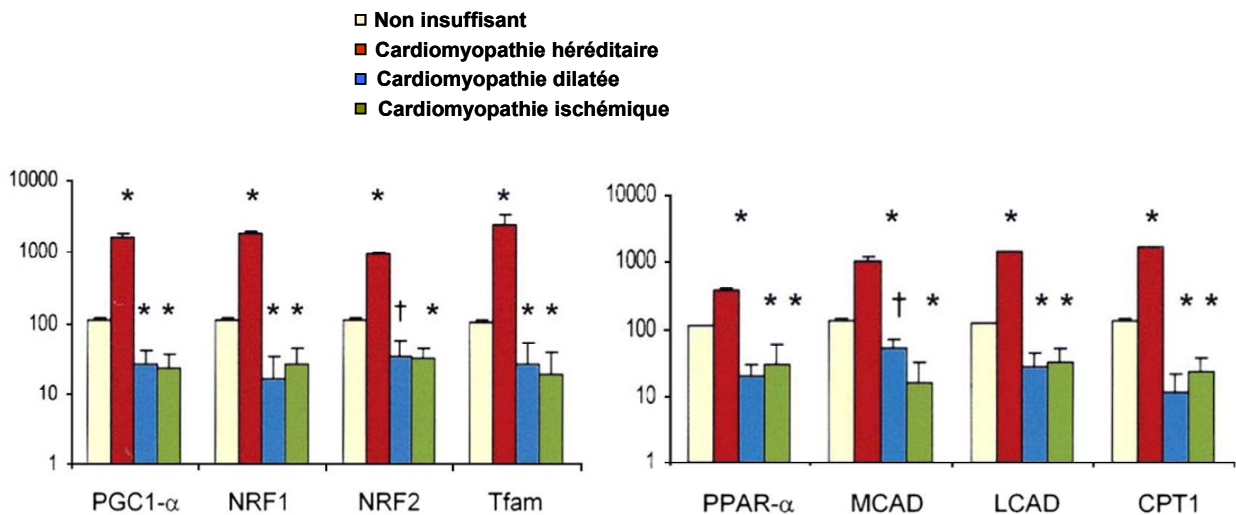
Enfin, outre l'altération de l'axe PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$ , il a également été montré une diminution de ERR $\alpha$ , de PGC-1 $\beta$  mais pas de PRC dans un modèle de sténose aortique chez le rat (Ventura-Clapier et al., 2011).

## 2) *Cardiomyopathies humaines*

La pertinence de la dysfonction mitochondriale associée à l'IC, via un déficit de l'expression de PGC-1 $\alpha$ , est confortée par des études sur biopsies de cœurs provenant de patients présentant une cardiomyopathie dilatée ou ischémique.

Une première étude datant de 2007 montre sans ambiguïté une diminution de l'expression des acteurs de la cascade transcriptionnelle impliquée dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale. De plus, le défaut d'expression de PGC-1 $\alpha$  est associé à une

défaillance de l'axe PPAR $\alpha$  avec une diminution d'expression de gènes cibles impliqués dans l'oxydation des acides gras comme MCAD, LCAD et CPT1 (Figure 54). (Sebastiani et al., 2007). Suivant la même démarche, un autre groupe a montré que la diminution de l'expression de PGC-1 $\alpha$  dans l'IC humaine était significativement corrélée à la diminution de la fraction d'éjection et associée à une diminution de l'expression d'ERR $\alpha$  (Sihag et al., 2009).



**Figure 54. Altération des acteurs contrôlant la biogenèse mitochondriale et l'utilisation des AG dans l'IC humaine**

Excepté dans la cardiomyopathie héréditaire, les cardiomyopathies dilatée et ischémique sont associées à un défaut d'expression de PGC-1 $\alpha$  et de ses cibles impliquées dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale, le transport des AG et la  $\beta$ -oxydation.

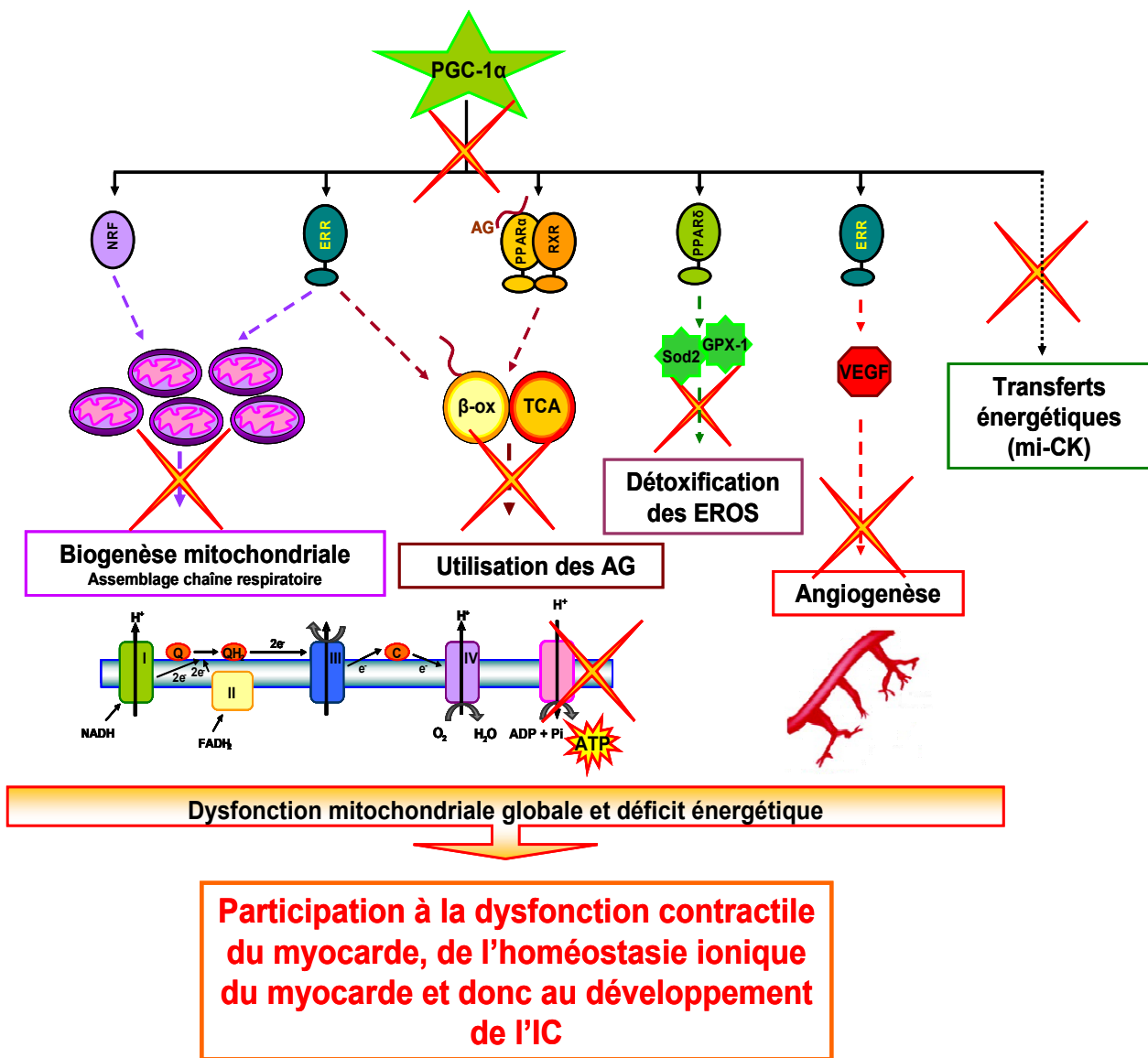
*Issue de (Sebastiani et al., 2007)*

Plus récemment, à partir de biopsies de patients souffrant d'IC chronique, il a été observé de la même manière une diminution des capacités oxydatives du myocarde étroitement corrélée à une altération de l'activité à la fois de la CS, de COX et de la miCK ainsi qu'à une diminution de l'expression de PGC-1 $\alpha$  (Garnier et al., 2009).

Bien qu'il y ait de nombreuses évidences d'un défaut d'expression de PGC-1 $\alpha$  dans les modèles expérimentaux d'IC ainsi que chez l'homme, une étude récente menée par le groupe de R.Tian sur des cœurs insuffisants humains, a mis en évidence une altération de la biogenèse mitochondriale sans dérégulation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  (Karamanlidis et al., 2010). Ces résultats attirent notre attention sur les précautions à prendre lors de ce genre

d'étude chez l'homme. En effet, il existe un déclin de l'expression de PGC-1 $\alpha$  au cours du vieillissement (Ling et al., 2004), d'autre part, un traitement par des catécholamines ou des inhibiteurs de phosphodiésterases conduit à une augmentation de la signalisation AMPc-dépendante connue pour induire l'expression de PGC-1 $\alpha$ . Ces résultats suggèrent donc que la dérégulation de PGC-1 $\alpha$  peut ne pas être uniforme d'un groupe de patients à l'autre et diffère en comparaison des observations sur modèles animaux d'IC où l'âge est contrôlé, et aucun traitement n'est mis en place.

**L'ensemble de ces travaux suggère un rôle central de PGC-1 $\alpha$  dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale, de l'utilisation des substrats, en particulier l'oxydation des acides gras et probablement des transferts énergétiques impliquant la mi-CK (Figure 55). Les modèles expérimentaux d'IC et la plupart des études menées chez des patients atteints de cardiomyopathies confortent d'émettre l'hypothèse d'un rôle clé de PGC-1 $\alpha$  dans le développement de la dysfonction mitochondriale associée à l'IC. Autrement dit, PGC-1 $\alpha$  peut être proposé comme un acteur moléculaire incontournable dans le contrôle de la production énergétique du cœur sain, sa déficience pouvant entraîner une réponse maladaptative dans le cœur défaillant (pour revue (Finck et Kelly, 2007; Rowe et al., 2010; Ventura-Clapier et al., 2011)).**



**Figure 55. Positionnement central de PGC-1 $\alpha$  dans le contrôle de la fonction mitochondriale**

PGC-1 $\alpha$  apparaît comme un chef d'orchestre de la fonction mitochondriale en contrôlant la mise en place de la biogenèse mitochondriale, l'utilisation des AG, l'angiogenèse, la détoxification, mais également probablement la mise en place des transferts énergétiques. Suite à une dérégulation de PGC-1 $\alpha$ , la fonction mitochondriale est déficitaire dans le myocarde insuffisant et participe au développement de la pathologie.

### **III) Vers un concept de thérapie métabolique de l'insuffisance cardiaque**

#### ***1) Diagnostic et pronostic vital de l'IC***

L'établissement d'un diagnostic en faveur d'une IC repose sur une combinaison de symptômes associée à certains marqueurs cliniques signant la défaillance du myocarde. Les symptômes justifiant des examens approfondis sont essentiellement une fatigabilité à l'effort ainsi qu'une dyspnée.

L'utilisation d'examens échocardiographiques et la mesure du taux plasmatique de BNP concourent majoritairement à poser un diagnostic.

Le diagnostic clinique par échocardiographie repose sur l'étude de différents paramètres structuraux et notamment le diamètre de la cavité ventriculaire gauche en systole et en diastole. Cette étude se base également sur des paramètres fonctionnels, et plus précisément la fraction d'éjection (FE) et la fraction de raccourcissement permettant d'évaluer la capacité du cœur à se contracter efficacement. Une IC est notamment caractérisée par une FE inférieure à 50 %, ainsi que par une élévation du taux plasmatique de BNP au-delà de 200 pg/ml (Paulus et al., 2007).

De plus, d'autres paramètres permettent de préciser le diagnostic et notamment les troubles du rythme évalués par ECG, la présence d'un œdème pulmonaire observée par radiographie ou encore l'apparition de troubles respiratoires, en particulier une dyspnée à l'effort associée à une toux : l'ensemble de ces paramètres permet d'établir une classification qui signe le degré de sévérité de la pathologie (classes NYHA, New York Heart Association).

#### ***2) Traitements usuels de l'IC***

Les thérapies couramment utilisées reposent sur une amélioration de la capacité contractile du myocarde et notamment par une diminution de la volémie ou une action sur certaines voies neurohormonales. Les traitements les plus classiquement prescrits sont, entre autres, les  $\beta$ -bloquants, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC), ainsi que les diurétiques (Gheorghide et al., 2000; Klein et al., 2003), cette liste n'étant évidemment pas exhaustive.

Les IEC représentent la classe thérapeutique majoritairement utilisée, le but étant l'amélioration des fonctions hémodynamiques par diminution du taux circulant d'angiotensine II (AngII). Mécanistiquement, cela permet de bloquer la conversion de l'angiotensine I en

AngII. Cette diminution d'AngII est en faveur d'une vasodilatation périphérique favorisant la fonction cardiaque en diminuant la précharge et la postcharge, ainsi que d'une amélioration de la tolérance du patient à l'exercice. En diminuant notamment la postcharge, cela contribue ainsi à diminuer la demande énergétique. Ce traitement possède cependant certaines limitations et notamment la possibilité de développer une hypotension, ainsi qu'une atteinte de la fonction rénale (Konstam et al., 1992).

En combinaison avec les IEC, les diurétiques peuvent être prescrits, l'idée étant de limiter la volémie et la rétention hydrosodée et ainsi diminuer à nouveau la demande énergétique (Patterson et al., 1994). Il en existe de différentes sortes, à savoir les diurétiques de l'anse de Henlé favorisant l'excrétion de  $\text{Na}^+$  et les diurétiques thiazidiques inhibant la réabsorption de  $\text{Na}^+$ . Ces traitements peuvent néanmoins être la cause d'un déséquilibre électrolytique en faveur d'une augmentation du taux de la concentration plasmatique de  $\text{K}^+$  ou hyperkaliémie. Dans le même objectif d'une diminution de la volémie et de la réabsorption de  $\text{Na}^+$ , les antagonistes des récepteurs au minéralocorticoïdes et notamment l'éplérénone ont été développés, les patients atteints d'IC présentant un taux plasmatique élevé d'aldostérone (Pitt, 2004). Néanmoins, les risques d'hyperkaliémie sont aussi présents avec ce type de traitement.

Enfin, en supplément de ces traitements peuvent être rajoutés les  $\beta$ -bloquants à l'origine d'une inhibition de la stimulation du système nerveux autonome sympathique, et qui permettent la diminution de la demande énergétique du myocarde en améliorant la fonction ventriculaire (Hjalmarson et al., 2000). En effet, l'IC est caractérisée par une suractivation chronique du système sympathique à l'origine d'une augmentation du volume et de la pression ventriculaire par vasoconstriction périphérique. De plus, une activation continue du système sympathique peut être associée à un phénomène d'arythmogénèse.

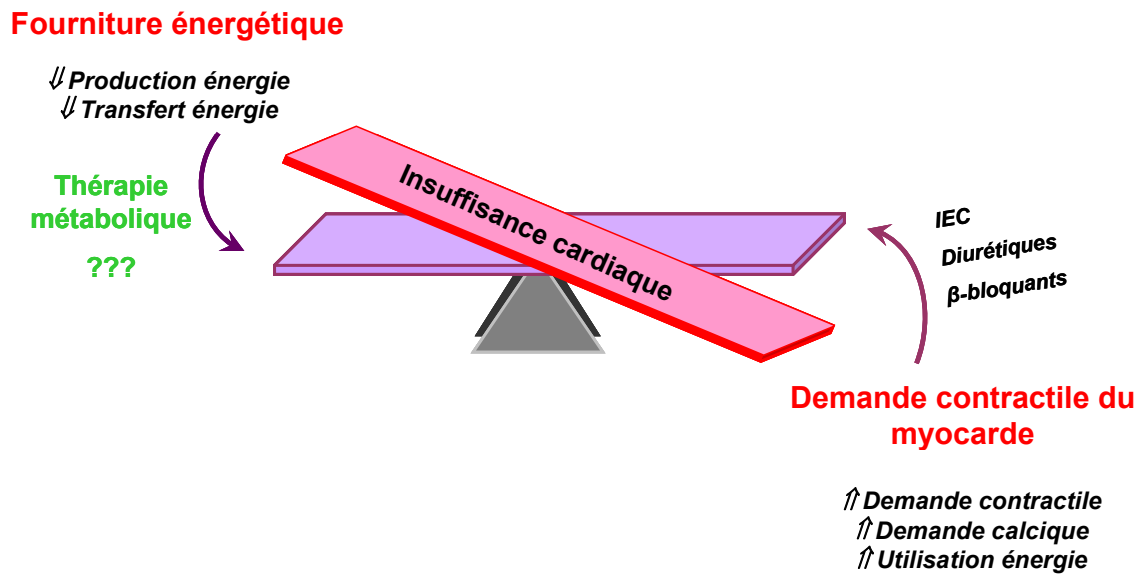
Dans le cas d'une asynchronisation du myocarde caractérisée par des troubles du rythme, la resynchronisation cardiaque est fortement conseillée de façon à imposer au myocarde un rythme régulier, et a été montrée comme efficace dans l'amélioration de la fonction cardiaque.

Lors d'une IC terminale, la seule stratégie actuellement disponible reste la transplantation cardiaque.

**Les traitements pharmacologiques actuels visent essentiellement à améliorer la contractilité cardiaque ou diminuer la demande énergétique du myocarde. Il a été largement démontré une défaillance énergétique dans le muscle cardiaque insuffisant. Il existe donc un déséquilibre entre la demande énergétique du myocarde qui augmente**



fortement dans l'IC et la production énergétique qui apparaît comme défaillante. De fait, la tentative d'amélioration de la fonction cardiaque par la thérapie ne permet cependant pas de rétablir une homéostasie énergétique correcte, puisque la production énergétique reste altérée (Figure 56). Aussi, les efforts actuels de la recherche sont concentrés sur le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, la modulation du métabolisme énergétique apparaissant comme une des thérapies émergentes.



**Figure 56. Déséquilibre énergétique et stratégie thérapeutique**

L'IC est caractérisée par un déséquilibre entre l'utilisation énergétique qui augmente et la production énergétique qui ne répond pas à l'augmentation des besoins. Les stratégies thérapeutiques actuelles visent à rétablir un côté de la balance en diminuant le travail du myocarde et en diminuant les besoins énergétiques. D'actives recherches sont en cours pour mettre en place des thérapies de type métabolique en vue d'améliorer la production énergétique.

### **3) Thérapies métaboliques**

Les stratégies en cours de développement concernant la mise en place d'une thérapie métabolique reposent essentiellement sur l'amélioration de l'efficacité des systèmes énergétiques du myocarde et notamment en modulant la flexibilité d'utilisation des substrats. Le cœur insuffisant favorisant la glycolyse au détriment de la  $\beta$ -oxydation dans les stades précoces du développement de l'IC, les recherches ont tenté d'optimiser la production énergétique basée sur l'utilisation du glucose comme substrat énergétique préférentiel. Ainsi,

la modulation pharmacologique de l'utilisation des substrats par le myocarde apparait comme un avantage thérapeutique potentiel pour limiter la progression de l'IC (Fragasso et al., 2008).

Deux approches sont envisageables pour favoriser l'oxydation du glucose : une approche indirecte visant à diminuer le taux circulant d'AG, une approche directe dans le but de bloquer l'utilisation ou l'oxydation des AG (Lionetti et al., 2011; Jaswal et al., 2011).

*a) Modulateurs indirects*

La diminution de la capacité du myocarde insuffisant à oxyder les AG peut être associée à une accumulation d'AG et de triglycérides circulants à l'origine d'une lipotoxicité pouvant contribuer à la sévérité de l'IC (Sharma et al., 2004). Il a donc naturellement été proposé de limiter le taux circulant d'AG pour contrecarrer cette lipotoxicité. L'utilisation d'acide nicotinique ou de dérivés comme l'acipimox a été montré comme le meilleur moyen de limiter l'accumulation d'AG et donc la lipotoxicité (Tuunanen et al., 2006). Cependant, malgré la diminution du taux d'AG plasmatique, aucun bénéfice pour la fonction cardiaque n'a été révélé (Halbirk et al., 2010).

*b) Modulateurs directs*

***i. Inhibition du transport des acides gras***

La stratégie repose sur l'inhibition de l'entrée des AG dans la mitochondrie pour favoriser l'oxydation des hydrates de carbone par une moindre inhibition de la PDH. La cible préférentiellement étudiée a été le transporteur CPT-1. Son inhibition irréversible par l'etomoxir ou via la perhexiline a montré un bénéfice potentiel mais ceci reste à être confirmé par des études cliniques plus poussées.

Concernant l'etomoxir, les premiers essais cliniques suggèrent un effet bénéfique potentiel de l'etomoxir dans l'IC mais une hépatotoxicité après traitement a précipité l'arrêt prématuré de l'essai clinique (Bristow, 2000; Holubarsch et al., 2007).

La perhexiline quant à elle apparait comme un traitement prometteur puisque les premières études cliniques ont montré une amélioration de la fraction d'éjection chez des patients ayant une dysfonction contractile (Lee et al., 2005). De plus, ce traitement est associé à une amélioration du ratio PCr/ATP suggérant ainsi une action de type métabolique

(Abozguia et al., 2010). Ces résultats restent cependant à être validés par la mise en place d'essais cliniques à grande échelle.

## ***ii. Inhibition de la $\beta$ -oxydation***

A nouveau, l'idée émanant de l'inhibition de la  $\beta$ -oxydation repose sur l'activation de manière indirecte de l'oxydation des hydrates de carbone. Deux inhibiteurs, actuellement prometteurs pour le traitement de l'angine de poitrine chronique, ont été proposés pour le traitement de l'IC : la trimetazidine et la ranolazine (Bagger et al., 1997; Stanley et Marzilli, 2003).

Diverses études ont été menées pour la trimetazidine et suggèrent une amélioration de la fonction cardiaque, basée sur la diminution du taux plasmatique de BNP et de cytokines pro-inflammatoires (Di Napoli et al., 2005 ; Di Napoli et al., 2007) ainsi qu'une amélioration de la fraction d'éjection (Fragasso et al., 2006).

En ce qui concerne la ranolazine, son action entraîne une augmentation de l'activité de la PDH et donc de l'utilisation du glucose (Clarke et al., 1996). Par ailleurs, des études chez le chien ont montré des bénéfices sur la fonction cardiaque après 3 mois de traitement (Chandler et al., 2002; Sabbah et al., 2002).

Néanmoins, le manque d'essais cliniques conduits à grande échelle ne permet pas à l'heure actuelle de proposer une inhibition de la  $\beta$ -oxydation pour le traitement de l'IC.

## ***iii. Agonistes PPAR $\alpha$***

Les données relatives à l'utilisation d'agonistes de PPAR $\alpha$ , et notamment les fénofibrates, sont à ce jour sujettes à contradiction. En effet, certaines études, en particulier chez le chien, montrent une amélioration de l'oxydation des AG par une augmentation de l'activité des acyl-CoA à chaîne moyenne sans réelle amélioration de la fonction cardiaque (Labinskyy et al., 2007). A l'inverse, une étude menée chez le cochon montre une prévention de l'hypertrophie du myocarde et un ralentissement du développement de l'IC en association avec une augmentation de l'expression des gènes cibles de PPAR $\alpha$  (Brigadeau et al., 2007). Ces résultats suggèrent que cette approche est une autre alternative pour cibler la  $\beta$ -oxydation et améliorer l'utilisation des AG mais qui reste largement à être validée.

#### *iv. Acides-gras à chaîne moyenne*

Les effets directs de l'utilisation des AG à chaîne moyenne dans le cœur insuffisant sont encore peu connus. Cependant, certaines évidences suggèrent un rôle potentiel dans l'amélioration de la fonction cardiaque (Labarthe et al., 2005), notamment en limitant la progression de l'hypertrophie. Des études, chez le rat spontanément hypertendu, montrent qu'une alimentation riche en AG à chaîne moyenne diminue l'hypertrophie cardiaque, prévient de l'augmentation de la pression diastolique du ventricule gauche et limite les altérations de la fonction cardiaque en association avec une augmentation de l'activité des enzymes de la  $\beta$ -oxydation (Iemitsu et al., 2008; Shimojo et al., 2004). Cette amélioration est associée à une augmentation de l'expression de MCAD et une diminution de l'expression de PFK-1, suggérant ainsi une amélioration du métabolisme oxydatif.

**L'ensemble de ces résultats, encore précoces, suggèrent tout de même un réel potentiel thérapeutique de la modulation de l'utilisation des substrats. Cependant, de nombreuses questions restent ouvertes et notamment la pertinence de limiter l'oxydation des AG en faveur d'une oxydation des hydrates de carbone. D'autre part, le blocage du transport des AG dans la mitochondrie conduit naturellement à leur accumulation au niveau cytoplasmique et favorise une lipotoxicité éventuelle. Enfin, le bénéfice de l'utilisation d'agonistes de PPAR $\alpha$  n'est pas encore totalement établi mais suggère tout de même un champ de recherche d'intérêt majeur, et en particulier, le rôle des AG à chaîne moyenne, ainsi que le rôle régulateur de l'axe PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  dans la modulation de l'oxydation des acides gras au niveau transcriptionnel.**

#### ***4) PGC-1 $\alpha$ , une nouvelle cible thérapeutique de l'insuffisance cardiaque ?***

Malgré une accumulation d'évidences suggérant un rôle thérapeutique potentiel de la modulation de l'utilisation des AG ou des hydrates de carbone, d'autres champs d'action sur les composantes du métabolisme énergétique restent ouverts. Améliorer l'utilisation des substrats énergétique peut apparaître comme insuffisant si la fonction mitochondriale reste altérée ne permettant pas ainsi une production optimale d'ATP.

En effet, certaines interrogations persistent sur la pertinence de ce type de thérapies métaboliques en considérant que l'IC est associée à une altération globale de la fonction mitochondriale. En d'autres termes, outre l'altération de l'utilisation des AG, l'IC est caractérisée par une diminution de la biogenèse mitochondriale, une dysfonction de la phosphorylation oxydative, une diminution de l'apport en O<sub>2</sub> ainsi qu'une défaillance affectant les transferts énergétiques (Ventura-Clapier et al., 2011). La diminution de la masse mitochondriale limite de fait l'utilisation des substrats et il apparaît donc comme primordial d'améliorer toutes les composantes de la fonction mitochondriale pour qu'il y ait une adéquation entre utilisation des substrats et fonctionnement de la chaîne respiratoire notamment, pour une production optimale d'ATP.

Par conséquent, une alternative a été proposée ces dernières années pour améliorer non seulement l'utilisation des substrats, mais également les différentes composantes de la fonction mitochondriale (Stanley et Hoppel, 2000). L'idée sous-jacente est de cibler un facteur pouvant contrôler l'ensemble de ces voies. Basé sur ce concept, PGC-1 $\alpha$  ayant été mis en avant dans de nombreuses études quant à son rôle déterminant dans le contrôle du métabolisme énergétique, ce facteur apparaît comme une cible thérapeutique de choix pouvant préserver la fonction mitochondriale et optimiser l'utilisation des substrats dans le cœur insuffisant (pour revues (Ventura-Clapier et al., 2008 ; Schilling et Kelly, 2010).



## OBJECTIFS DE L'ETUDE

---

Au travers de cette introduction, le métabolisme énergétique apparaît comme une composante essentielle à la physiologie cardiaque. Par ailleurs, la production énergétique du myocarde est majoritairement assurée par la mitochondrie puisque 90% de cette production dépend de la phosphorylation oxydative qui a lieu au sein de la mitochondrie. De plus, le cœur, travaillant à « flux tendu », adapte continuellement sa production énergétique en fonction de son travail. Cette adaptation résulte d'une adéquation parfaite entre utilisation des substrats, fonctionnement de la chaîne respiratoire, transferts énergétiques et utilisation de l'ATP au niveau des sites consommateurs, et notamment des ATPases (Ventura-Clapier et al., 2004). Le maintien de cette adéquation implique un contrôle fin et coordonné de l'ensemble de ces composantes.

Ces dernières années, le co-activateur transcriptionnel PGC-1 $\alpha$  a été identifié comme un acteur moléculaire central du contrôle de la cascade transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale et plus largement de la fonction mitochondriale. En effet, ce dernier participe aussi activement au contrôle du transport et de l'oxydation des substrats, au maintien d'un apport optimal d'O<sub>2</sub> et de nutriments au sein de la mitochondrie en favorisant l'angiogenèse, à l'équilibre de la balance anti/prooxydante et vraisemblablement aussi au contrôle des transferts énergétiques impliquant la créatine kinase. Autrement dit, ce co-activateur apparaît comme essentiel au maintien de l'homéostasie énergétique (Patten et Arany, 2011).

Dans un contexte pathologique avancé telle que l'IC, de nombreuses altérations du métabolisme énergétique ont été répertoriées, en particulier une altération de l'utilisation des substrats, une dysfonction de la chaîne respiratoire, ainsi qu'une défaillance des transferts énergétiques. L'ensemble de ces désordres a permis de proposer une hypothèse aujourd'hui largement établie du « cœur défaillant en panne d'essence » (Neubauer, 2007). D'autre part, ces altérations sont corrélées et probablement en partie dues à une dérégulation de la cascade transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale impliquant PGC-1 $\alpha$ . Ce chef d'orchestre de la fonction mitochondriale est donc naturellement proposé comme une cible thérapeutique d'intérêt (Neubauer, 2007; Schilling et al., 2011), l'objectif étant d'améliorer la fonction mitochondriale dans son ensemble et donc de restaurer une production énergétique suffisante pour assurer le fonctionnement normal du cœur.

L'émergence de ce facteur comme cible thérapeutique a suscité ces dernières années un effort de recherche considérable basé sur la place centrale de ce co-activateur dans la

physiopathologie des maladies métaboliques en général. D'ailleurs, nos connaissances actuelles le concernant, tant sur ses fonctions, que sur ses régulations, sont essentiellement basées sur des recherches menées notamment sur le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux brun. Néanmoins, les données actuelles relatives au cœur sont principalement issues de manipulations génétiques par surexpression ou inactivation de PGC-1 $\alpha$ .

**Ainsi, l'objectif de mon travail était d'identifier de nouveaux activateurs de PGC-1 $\alpha$  dans un contexte cellulaire cardiaque. Pour répondre à cet objectif, j'ai mis en place un test cellulaire robotisé dans une lignée cellulaire proche du phénotype cardiaque (les H9c2). Dans cette optique, ces cellules ont été transfectées de manière stable avec un plasmide codant pour une luciférase sécrétée placée sous le contrôle du promoteur humain de PGC-1 $\alpha$ . Une fois le test cellulaire développé, validé comme fonctionnel et miniaturisé, une sélection de ligands humains endogènes (Greenpharma) a été criblée afin d'identifier des molécules capables d'induire l'expression de PGC-1 $\alpha$ . Dans un deuxième temps, les effets des molécules sélectionnées ont été étudiés d'une part, sur la respiration mitochondriale dans les H9c2, et d'autre part, sur l'expression endogène de PGC-1 $\alpha$  dans des cardiomyocytes de rat adulte. J'ai également vérifié qu'une induction de l'expression de PGC-1 $\alpha$  par ces molécules se répercutait bien sur l'ensemble de la cascade transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale par mesure de l'expression des gènes par RT-PCR.**

**Une validation positive de l'ensemble de ces étapes a permis de manière plus générale de valider la pertinence de ce test cellulaire robotisé quant à une application à plus long terme pour la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques.**

Dans une deuxième partie, la preuve de concept d'une thérapie métabolique dans l'IC sera brièvement abordée. En effet, j'ai pu participer à une étude testant les effets du resvératrol, un polyphénol connu pour exercer ses effets bénéfiques par activation de différentes cibles métaboliques, dans un modèle expérimental de pathologie cardiaque. Cette étude a été menée sur un modèle de rat développant une hypertension et une hypertrophie cardiaque rapide, et évoluant vers une dysfonction ventriculaire suite à un régime hypersodé : les rats Dahl. Les effets de cette molécule ont été évalués sur la fonction cardiaque et métabolique, mais aussi sur la fonction endothéliale et vasculaire puisque le modèle choisi est avant tout un modèle d'hypertension.

Bien que l'objectif principal ait résidé dans la validation du concept de thérapie métabolique cardiaque, ce modèle m'a permis de démarrer en parallèle une étude sur la



régulation de la biogenèse mitochondriale dans un contexte vasculaire.

**En effet, dans un contexte d'hypertension, la cellule musculaire lisse est sous l'influence d'une activation neurohormonale accrue à l'origine d'une hyperprolifération (Rivard et Andres, 2000; Li et al., 2010). Par ailleurs, d'un point de vue pathologique, l'hypertension est aussi caractérisée par une hyperproduction d'EROs. Etant donné les données récentes quant au rôle de PGC-1 $\alpha$  dans le contrôle du stress oxydant et son caractère inductible par les EROs, j'ai alors utilisé ce modèle pour étudier dans le muscle lisse la régulation de la biogenèse mitochondriale dans l'hypertension ainsi que sa dépendance au stress oxydant. Par la suite, les hypothèses formulées à partir de ce modèle *in vivo*, ont été validées *in vitro*, sur des cultures primaires de cellules musculaires lisses aortiques de rat.**



### I) Modèles expérimentaux

#### 1) *Modèle animal : les rats Dahl sensibles au sel*

##### a) Description de la souche

Dans les années 1960, le docteur Lewis K. Dahl a sélectionné une population de rat présentant une forte sensibilité au sel dans une souche de type Sprague-Dawley. En effet, il a montré que certains de ces rats développaient une hypertension sévère suite à un régime hypersodé (8 % de NaCl). Cette souche de rat a donc été « entretenue » pour conserver une nouvelle population appelée « Dahl-salt sensitive rats » (DAHL et al., 1962).

Par la suite deux types de mutations ont été identifiés dans cette population de rat sur les gènes codant pour des transporteurs rénaux impliqués dans le transport du sodium ( $\text{Na}^+$ ) : le cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  et la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Orosz et Hopfer, 1996; Ruiz-Opazo et al., 1994; Herrera et al., 1998). Ces mutations sont à l'origine d'une réabsorption accrue de NaCl au niveau de l'anse de Henlé du rein conduisant ainsi au développement d'une hypertension par augmentation de la volémie.

Cette hypertension conduit au développement progressif d'une hypertrophie cardiaque en réponse à une surcharge de pression évoluant vers une dilatation et une dysfonction ventriculaire à partir de 12 semaines suite à une alimentation riche en sel, en comparaison à un régime hyposodé (Klotz et al., 2006; Seymour et al., 2006). Le développement d'une dysfonction ventriculaire chez ces rats est associé à certains symptômes du syndrome métabolique à savoir l'insulino-résistance, l'hypercholestérolémie (Channa et al., 2004) ainsi qu'une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) concourant au développement d'un fort stress oxydant (Guo et al., 2006).

Cette souche de rat constitue donc un modèle expérimental pertinent car il combine à la dysfonction ventriculaire des altérations du métabolisme basal, comme cela a été décrit dans la pathologie humaine.

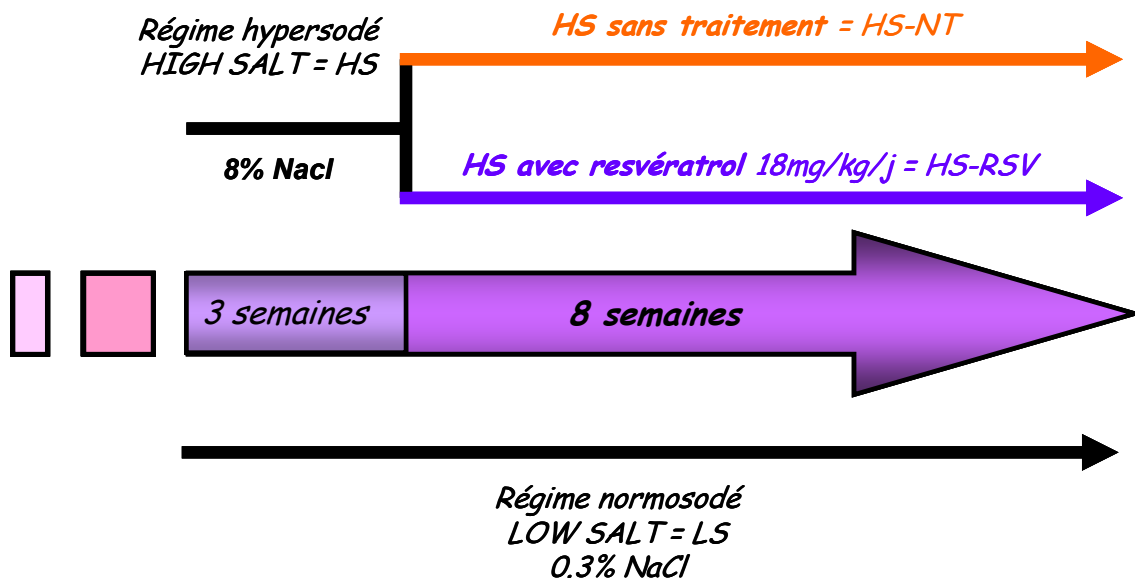
*b) Conditionnement et traitement des rats (Figure 57)*

Cette étape a été réalisée par le Dr Stéphanie Rimbaud dans le cadre de sa thèse réalisée au sein de notre équipe.

Deux groupes de rats Dahl sensibles au sel âgés de 7 semaines au début du conditionnement ont été constitués :

- 9 rats placés sous un régime normosodé à 0.3 % de NaCl pendant 11 semaines, ce groupe constituant le groupe contrôle ou low salt (LS),
- 62 rats soumis à un régime hypersodé à 8% de NaCl pendant 3 semaines. Ce groupe constituant le groupe « pathologique » ou high salt (HS), est ensuite divisé au hasard en deux sous populations pour 8 semaines de plus :
  - o 48 rats conservant le même régime riche en sel : groupe non traité (NT) ou HS-NT,
  - o 14 rats avec un régime HS supplémenté en resvératrol (RSV) à raison de 18 mg/kg/j : groupe traité ou HS-RSV.

A l'issue des 3 premières semaines de conditionnement, certains paramètres hémodynamiques sont mesurés pour valider le développement de l'hypertension et de l'hypertrophie cardiaque. A la fin du traitement, au bout de 11 semaines, les mêmes mesures sont effectuées pour confirmer l'apparition d'une dysfonction ventriculaire.



**Figure 57. Schéma du conditionnement et traitement des rats Dahl sensibles au sel**

## 2) *Modèles cellulaires*

### a) *Lignée cellulaire cardiomyoblastique H9c2*

Originellement isolée de cœurs embryonnaires de rats issus de la souche BDX1, cette lignée cellulaire H9c2 (ATCC n° CRL-1446) présente certaines caractéristiques typiques du muscle squelettique et/ou du muscle cardiaque en fonction des conditions de culture (Kimes et Brandt, 1976). En effet, en présence d'une faible concentration de sérum de veau fœtal (SVF 1 %) et à confluence, ces cellules peuvent fusionner et former des myotubes polynucléés. De la même manière mais en absence de confluence, en présence d'acide rétinoïque (10 nM) et à faible concentration en SVF (1 %), ces cellules acquièrent des caractéristiques de type cellule cardiaque. Il en va de même en présence de sérum de cheval à 1 % (SC) (Menard et al., 1999; Lau et al., 2012).

Ces cellules sont maintenues en culture dans un milieu complet composé de : DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant 4.5 g/L de glucose, du pyruvate de sodium et de la glutamine supplémenté de 10 % de SVF et d'un mélange d'antibiotiques Pénicilline/streptomycine 1X (PS) et placées dans un incubateur 95 % O<sub>2</sub> – 5 % CO<sub>2</sub> à 37°C. Le milieu de culture est changé tous les 3 jours et les cellules à 70 % de confluence sont périodiquement détachées à l'aide de la trypsine et remises en culture (passage) à raison d'un ratio 1 :2 ou 1 :4. Régulièrement, des aliquots cellulaires de 1.10<sup>6</sup> cellules sont conservés dans de l'azote liquide dans un milieu complet additionné de 5% de DMSO. Une congélation lente est réalisée à l'aide d'une boîte de congélation spécifique contenant de l'isopropanol à -80°C pendant 24h minimum (descente en température de 1°C par minute). La décongélation est quant à elle rapide et a lieu à 37°C.

La différenciation des cellules est réalisée lorsque celles-ci atteignent 50 % de confluence. Le milieu complet est alors remplacé par un milieu dit « de différenciation » contenant du DMEM, un mélange PS et 1 % de SC ou 1 % SVF additionné d'acide rétinoïque à 10 nM, puis changé tous les 2 jours pendant 7 jours. Le stade de différenciation est évalué par la mesure de l'expression endogène en ARNm de deux marqueurs cardiaques : la sous-unité du canal calcique de type L et la troponine T cardiaque.

Pour chaque série de stimulation, les cellules sont privées de SVF pendant 24 heures. Ce milieu dit « de privation » contient du DMEM et un mélange PS. Le milieu de stimulation quant à lui correspond au milieu de privation ± sérum albumine bovine (BS) à 0.1 %

additionné de la molécule à tester (l'intérêt de la BSA sera décrit ultérieurement dans la partie « validation de la fonctionnalité de la lignée stable »).

### *b) Culture primaire de cardiomyocytes de rats adultes*

*La composition des différentes solutions utilisées est présentée dans le tableau 1.*

Les cardiomyocytes sont isolés à partir de cœurs de rats adultes de souche Wistar âgés de 8 semaines (environ 300g). Suite à une anesthésie avec 0.5 ml de pentobarbital monosodique à 50 mg/ml en intra-péritonéal, le cœur est rapidement prélevé après thoracotomie et placé dans une solution physiologique sans calcium appelée solution A, préalablement placée à 4°C afin de rincer le cœur de son sang. Après dégagement de l'aorte en enlevant les morceaux de poumons et de thymus, le cœur est canulé par l'aorte sur un appareil de Langendorff en perfusion rétrograde des coronaires avec la solution A constamment oxygénée et maintenue à 37°C. Cette première perfusion dite de lavage se fait à un débit de perfusion de 6 ml/min pendant 5 minutes.

#### *i. Dissociation des cardiomyocytes*

La dissociation débute par le passage en perfusion de solution A supplémentée de collagénase de type A à 1mg/ml (0.232 U/mg, Roche Diagnostics) avec une concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  libre fixée entre 20 et 25  $\mu\text{M}$  (solution B). Cette étape permet la digestion enzymatique de la matrice extracellulaire de façon homogène. C'est une étape critique qui nécessite un lavage préalable parfait pour éviter la formation de caillots sanguins qui rendrait la digestion hétérogène. Après 45 minutes de perfusion de solution B à un débit de 4 ml/min, le cœur est décroché de la canule, séparé de ses oreillettes et les myocytes sont dissociés mécaniquement dans la solution C (Tableau 1) et laissés à décanter.

#### *ii. Retour calcique*

Pour éviter un paradoxe calcique en présence d'une forte concentration de  $\text{Ca}^{2+}$ , un retour calcique est effectué progressivement en deux temps dans la solution C. Cette remontée calcique lente permet de tendre vers une concentration calcique intracellulaire physiologique

sans altérer l'intégrité cellulaire. Un premier palier est atteint par ajout de 70  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  pendant 5 minutes à 37°C sous agitation lente (80 rotations par minute ou rpm). Le deuxième est atteint suite à une incubation de 10 minutes en présence de 320  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### ***iii. Séparation des cellules vivantes et des cellules mortes***

La dernière étape consiste en la séparation des cellules vivantes et des cellules mortes par la mise en place d'un gradient en présence de BSA 5 mg/ml dans la solution D (Tableau 1). Les cellules préalablement décantées, sont resuspendues deux fois dans cette solution pendant 10 minutes de façon à ne favoriser que la sédimentation des cellules vivantes.

### ***iv. Mise en culture des cardiomyocytes***

Après numération des cardiomyocytes en cellule de Malassez, les cellules sont réparties dans des boîtes de pétri au préalable tapissées de laminine 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour favoriser leur adhésion. Classiquement, les rendements de dissociation obtenus s'étalent entre 2 et 3.10<sup>6</sup> de cellules par dissociation. Les cellules sont alorsensemencées à raison de 2 à 3.10<sup>5</sup> de cellules par boîte (3,5 cm de diamètre) pour des expériences ultérieures de mesure d'expression génique ou protéique dans un milieu MEM (minimum essential medium) additionné de SVF 2.5 %, P/S 1 %, HEPES 2 % et  $\text{Ca}^{2+}$  1.2 mM.

Après environ 1 heure d'incubation à 37 °C en atmosphère humide et à 95 %  $\text{O}_2$  - 5 %  $\text{CO}_2$ , les cellules adhèrent à la lamine et le milieu est remplacé par un milieu sans SVF pour éviter la dédifférenciation des cardiomyocytes. Les cardiomyocytes sont alors maintenus jusqu'à 48 h en culture pour l'ensemble des expérimentations.

	<i>Solution A</i> (mM)	<i>Solution B</i> (mM)	<i>Solution C</i> (mM)	<i>Solution D</i> (mM)
<b>NaCl</b>	117	117	117	117
<b>KCl</b>	5.7	5.7	5.7	5.7
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	4.4	4.4	4.4	4.4
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1.5	1.5	1.5	1.5
<b>MgCl<sub>2</sub> (6H<sub>2</sub>O)</b>	1.7	1.7	1.7	1.7
<b>HEPES</b>	2.1	2.1	2.1	2.1
<b>Glucose</b>	11.7	11.7	11.7	11.7
<b>Créatine</b>	10	10	10	10
<b>Taurine</b>	20	20	20	20
<b>Calcium</b>	-	20-25 µM	20-25 µM	300 µM
<b>Collagénase A</b>	-	25 mg/ml	-	-
<b>BSA</b>	-	-	-	5 mg/ml

**Tableau 1. Composition des solutions utilisées pour la dissociation des cardiomyocytes de rat adulte**

Solution A = solution de lavage, solution B = solution enzymatique, solution C = solution de digestion mécanique et décantation, solution D = solution gradient.

*c) Culture primaire de cellules musculaires lisses (CML) d'aortes de rats (Figure 58)*

*Les CML ont été isolées et mises en culture selon un protocole adapté d'après (Vallot et al., 2000).*

Au niveau structural, la paroi de l'aorte est composée de trois couches de cellules : l'intima, la média et l'adventice, respectivement de l'intérieur vers l'extérieur. L'intima est essentiellement constituée de cellules endothéliales, la média correspond à la couche de cellules musculaires lisses (CML) et l'adventice est constituée principalement de fibres de collagène. La mise en culture des CML nécessite donc d'une part la séparation des différentes couches composant l'aorte, puis d'autre part la dissociation des cellules entre elles.



Pour obtenir un nombre suffisant de cellules en fin de dissociation, chaque expérience de dissociation est réalisée à partir de 3 aortes thoraciques.

Après anesthésie des rats de souche Wistars de 225g par 0.3-0.5 ml de pentobarbital monosodique à 50 mg/ml, l'aorte thoracique est prélevée le long de la colonne vertébrale juste après la crosse aortique. Elle est placée dans une boîte de pétri contenant un milieu froid de type DMEM avec 4.5 g/L de glucose, du pyruvate de sodium et de la glutamin, supplémenté extemporanément d'un cocktail d'antibiotique/antifongique 1X (milieu 1). Cette étape permet de nettoyer l'aorte en enlevant le tissu adipeux et le tissu conjonctif.

### ***i. Elimination de l'endothélium***

L'aorte est ouverte longitudinalement de façon à exposer la couche endothéliale de la face interne. Celle-ci est enlevée par grattage avec une pince à disséquer. L'aorte est alors transférée dans une nouvelle boîte de pétri. Elle est disposée de telle façon à ce que la face contenant les CML soit contre la paroi de la boîte et la couche correspondant à l'adventice soit directement au contact du milieu.

### ***ii. Elimination de l'adventice***

L'aorte ainsi exposée est placée dans un milieu contenant 1 ml de milieu 1 et 1 ml d'une solution de collagénase II CLS2 à 150 Unités/ml. Après 45 minutes dans un incubateur à 37°C (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>), l'aorte est transférée dans une nouvelle boîte contenant du milieu 1 à 37°C. L'adventice ainsi digérée apparaît comme une membrane fine plus claire. Il suffit alors de la décoller à l'aide de 2 pinces fines en tirant délicatement longitudinalement. Le tissu musculaire lisse restant est transféré dans une nouvelle boîte contenant du milieu à 37°C pour la dissociation des CML entre elles.

### ***iii. Dissociation des CML***

Le tissu musculaire lisse est découpé en petits morceaux qui sont transférés dans un erlen contenant 3 ml de milieu 1 avec 1 ml de collagénase II CLS2 150 U/ml et 1ml d'une solution d'élastase à 1.5 mg/ml. Une première incubation à 37°C dans un bain-marie est

réalisée sous agitation (180 rpm) pendant 30 minutes. Le liquide sans les morceaux de tissus est récupéré dans un tube conique de 15 ml et centrifugé à 1300 rpm pendant 3 minutes à température ambiante. Le surnageant est récupéré et remis dans l'erien au contact des morceaux de tissus. Le premier culot est jeté, puisqu'il contient des cellules endothéliales et des fibroblastes résiduels.

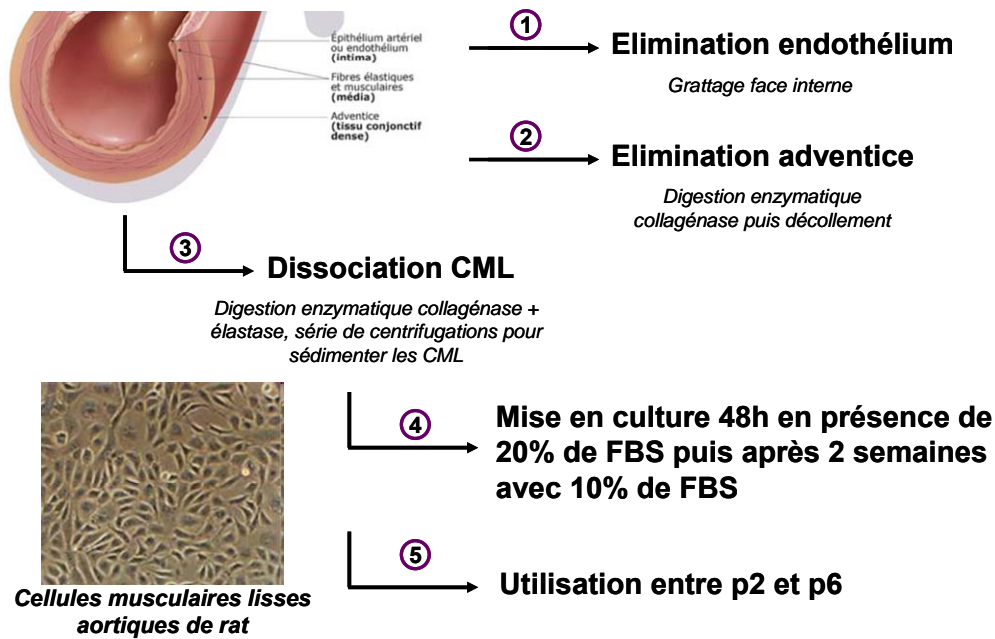
L'incubation de 30 minutes à 37°C sous agitation est alors répétée 4 fois. Après chaque centrifugation, le culot contenant les CML, est resuspendu dans 2 ml de milieu 1 contenant 20 % de SVF « gold » (milieu 2) et mis dans l'incubateur. Pour la dernière centrifugation, le tissu résiduel est homogénéisé et la centrifugation est dupliquée. Chaque culot obtenu et repris dans 2 ml de milieu 2 est mis en commun avec les précédents culots resuspendus pour constituer un « pool » commun.

#### ***iv. Mise en culture des CML***

Le pool cellulaire obtenu est centrifugé de la même manière que précédemment, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 5 ml de milieu 2 pour resuspendre délicatement les CML. Ces dernières sont alors transférées dans une flasque de culture de type T25 et laissées en milieu 2 pendant 48h pour favoriser l'adhésion des cellules. Cela correspond au passage 0 (P0). Le milieu de culture est ensuite remplacé tous les 2-3 jours par le même milieu mais additionné de 10% de SVF « gold » au lieu de 20% (milieu 3). Quand les cellules deviennent confluentes au bout de 2 à 3 semaines, elles sont détachées en présence de trypsine et transférées dans une flasque de type T75 (p1). Les CML sont utilisées pour les expérimentations ultérieures entre p3 et p6 afin de conserver un phénotype prolifératif équivalent.

#### ***v. Congélation des CML***

Les CML pouvant être utilisées entre p3 et p6, il est possible de conserver des aliquots dans de l'azote liquide (environ  $1.10^6$  cellules par aliquot) dans du milieu 2 supplémenté de 10% de DMSO.



**Figure 58. Schéma général de mise en culture des cellules musculaires lisses (CML) d'aorte de rat**

1. Élimination des cellules endothéliales,
2. Élimination de l'adventice,
3. Dissociation des CML,
4. et 5. Mise en culture des CML.

## II) Réactivité vasculaire

### 1) *Préparation et montage des anneaux d'aorte*

L'aorte thoracique, est prélevée immédiatement après l'excision du cœur et placée dans une solution physiologique de Krebs avec 2.5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  et placée au préalable à 4°C. Cette solution est composée de (en mM) : NaCl (119), KCl (4.7),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2.5),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1.17),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.18),  $\text{NaHCO}_3$  (25) et glucose (11) à pH 7.4. Les aortes sont alors nettoyées de leur tissu conjonctif et du tissu adipeux résiduel. Les aortes fraîchement isolées sont utilisées pour les mesures de réactivité vasculaire. Celles-ci sont découpées en 8 anneaux de taille régulière de 2 à 3 mm de longueur, chacun monté dans une cuve à organe isolé. Le reste de l'aorte est conservé à -80°C pour les analyses moléculaires ultérieures. Le montage se

fait entre deux crochets. Le premier, fixe, permet le maintien de l'anneau dans la cuve, tandis que le deuxième, mobile, est relié à un capteur de force. Ce capteur de force permet d'enregistrer la force isométrique développée par l'anneau. Le signal électrique ainsi généré et converti en signal numérique en mV via l'interface d'acquisition Powerlab. Le signal en mV est transformé en force (en gramme : g) suite à une calibration préalable et enregistré grâce au logiciel Chart 5.

Chaque cuve contient un volume de 5 ml de solution Krebs précédemment décrite, thermostatée à 37°C et oxygénée avec un mélange de carbogène (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>) ce qui permet à la fois le maintien du pH et l'oxygénation des anneaux d'aorte. Avant toute expérimentation, une tension basale de 2 g équivalente au tonus contractile physiologique est imposée à l'anneau. Cette force de repos est atteinte par paliers progressifs d'une durée de 1 heure.

De façon à identifier de manière indépendante le rôle de l'endothélium et du tissu musculaire lisse, une partie des anneaux est dénudée pour éliminer les cellules endothéliales.

## ***2) Evaluation de la capacité contractile***

Afin de vérifier l'intégrité des anneaux, leur capacité contractile est évaluée par la mise en présence d'une solution hyperpotassique. Contrairement à la solution de Krebs dite physiologique, la concentration en KCl est augmentée à 80 mM tandis que celle en NaCl est diminuée à 63.7 mM. La mise en présence de cette solution dépolarisante, permet l'activation de canaux calciques voltage-dépendants à l'origine d'une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire favorisant la contraction du muscle lisse. Au bout d'environ 30 minutes, la contraction en réponse à cette dépolarisation atteint un plateau. La fonctionnalité du vaisseau est alors considérée comme correcte pour une valeur atteignant plus de 50% du tonus contractile de base à savoir au minimum plus 1g.

Après chaque expérimentation, les anneaux sont lavés 3 fois en présence de Krebs physiologique pendant 1 heure afin de retrouver un tonus contractile basal.

### ***3) Evaluation de la fonction endothéliale***

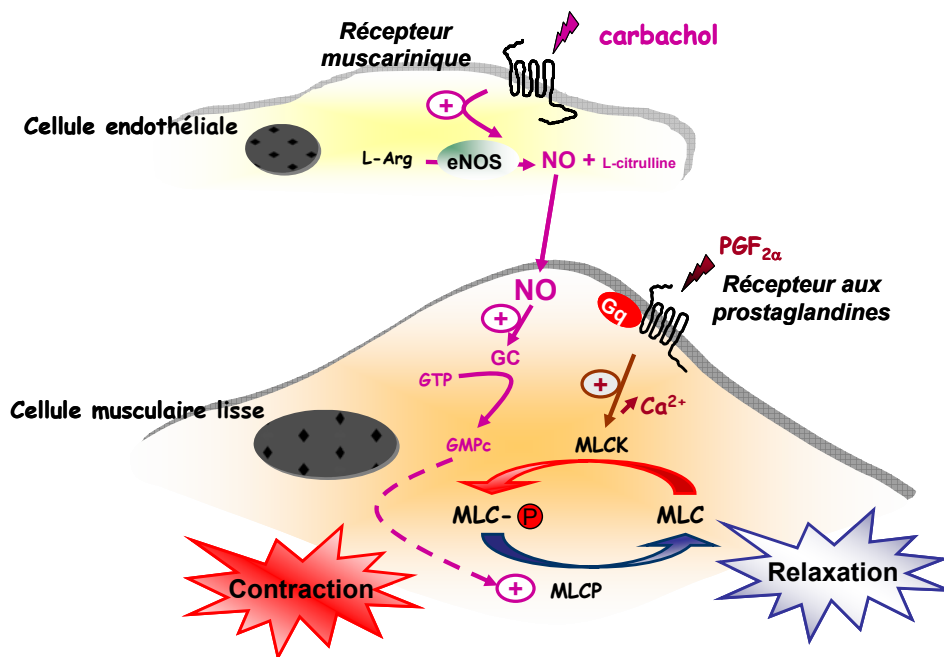
Les pathologies cardiovasculaires étant aussi caractérisées par des atteintes périphériques et notamment une dysfonction endothéliale, évaluer la fonction endothéliale est nécessaire pour rendre compte de ces atteintes vasculaires périphériques.

Cette fonctionnalité est évaluée par le carbachol, un agoniste des récepteurs muscariniques et analogue non hydrolysable de l'acétylcholine, ces derniers n'étant présents que sur l'endothélium. La fixation du carbachol sur son récepteur entraîne la stimulation de la NO-synthétase (nitric oxide synthase : NOS) qui permet la conversion de la L-arginine en L-citrulline et NO. Le NO peut alors diffuser dans le cytoplasme de la cellule musculaire lisse et par activation d'une guanylate cyclase entraîne une augmentation du GMP cyclique (GMPc). Ce phénomène conduit à la relaxation du muscle lisse. Ainsi une diminution de la relaxation du vaisseau en réponse au carbachol est signe d'une dysfonction endothéliale (Figure 59).

Une dose réponse au carbachol (de  $1.10^{-9}$  à  $3.10^{-5}$  M) est réalisée suite à une précontraction des anneaux. Cette précontraction est induite par l'ajout de  $PGF2_{\alpha}$  qui en se fixant sur ses récepteurs présents à la membrane de la cellule musculaire lisse, conduit à l'élévation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire à l'origine de la contraction via un mécanisme phospholipase C dépendant (Figure 59).

La dose de  $PGF2_{\alpha}$  est choisie de façon à obtenir une précontraction équivalente à 80 % de la contraction en KCl. Les concentrations utilisées pour obtenir cette précontraction, sont de  $3.10^{-6}$  et de  $1.10^{-6}$  M respectivement avec ou sans endothélium.

La réponse relaxante enregistrée en réponse au carbachol est ensuite exprimée en pourcentage de contraction par rapport à la contraction induite par la  $PGF2_{\alpha}$  qui correspond au 100 % de contraction, en fonction du logarithme décimal de la concentration molaire de carbachol.



**Figure 59. Schéma général du mécanisme de contraction/relaxation du muscle lisse vasculaire**

La relaxation du muscle lisse vasculaire en réponse au carbachol est dépendante de la libération du NO par la cellule endothéliale. La contraction en réponse au  $\text{PGF}_{2\alpha}$  est liée à une élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. GC = guanylate cyclase, MLC = myosin light chain, MLCK = MLC kinase, MLCP = MLC phosphatase, eNOS = endothelial NO synthase.

#### 4) *Evaluation de la fonction musculaire*

La capacité des cellules musculaires lisses à utiliser le NO peut être évaluée par l'utilisation d'un donneur de NO, le S-nitrosothiol-N-acetyl-penicillamine (SNAP), qui diffuse directement dans la cellule musculaire lisse. Cette réponse permet de faire la distinction entre la capacité de production par la cellule endothéliale via la relaxation carbachol dépendante et la capacité des CML à utiliser le NO pour induire une réponse relaxante.

Une dose réponse au SNAP est réalisée sur les anneaux suite à une précontraction induite par la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et la réponse relaxante SNAP dépendante est exprimée en pourcentage de contraction par rapport à la précontraction initiale, en fonction du logarithme décimal de la concentration molaire de SNAP.

### **III) Mise en place d'un test cellulaire de criblage ou test cellulaire robotisé pour la recherche de nouveaux activateurs de PGC-1 $\alpha$**

#### ***1) Etablissement du test cellulaire***

Pour évaluer les effets activateurs de molécules sur le promoteur de PGC-1 $\alpha$ , la technique du gène rapporteur a été choisie pour une détection simple et reproductible de l'expression d'un gène rapporteur reflétant strictement l'activité du promoteur placé en amont.

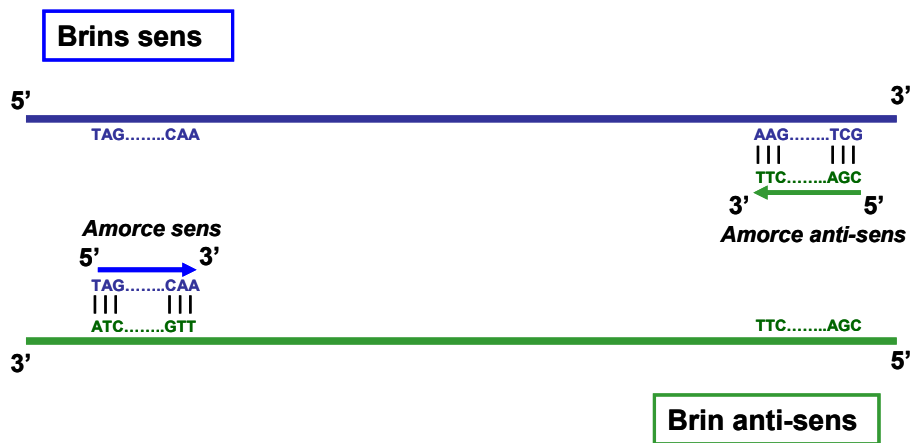
##### ***a) Etablissement de la construction PGC-1 $\alpha$ /GLuc***

###### ***i. Amplification du promoteur humain de PGC-1 $\alpha$***

L'amplification du promoteur humain de PGC-1 $\alpha$  a été réalisée à partir d'une banque d'ADN génomique humain (Clontech). Dans le but de ne pas exclure les éléments de réponse présents sur le promoteur qui ont été auparavant identifiés comme participant à la régulation de son activité, la taille du fragment amplifié a été fixée à 2665 pb (Irrcher et al., 2008).

Cette amplification, réalisée par la réaction de PCR (polymerase chain reaction) permet d'amplifier spécifiquement une molécule unique d'ADN et d'obtenir une grande quantité de cette molécule. En effet, la réaction de PCR étant cyclique, le nombre de cycle fixé conditionne le nombre de produits de PCR ou amplicons obtenus. Par exemple, pour une réaction de 35 cycles et une efficacité de PCR de 100 %, le nombre d'amplicons obtenu est équivalent à  $2^{35}$  molécules d'ADN soit plus de 30 milliards...C'est donc une réaction exponentielle qui se poursuit jusqu'à épuisement des produits de la réaction.

La spécificité du produit amplifié dépend strictement du couple d'amorces oligonucléotidiques choisi permettant de délimiter la partie de la séquence à amplifier. Ce couple d'amorce de synthèse comprenant une amorce dite sens, complémentaire du brin anti-sens, et qui permet de reformer le brin sens. La deuxième amorce, dite amorce anti-sens de l'ADN à amplifier, est complémentaire du brin sens et permet la synthèse du brin anti-sens (Figure 60).



**Figure 60. Schéma du fonctionnement des amorces d'amplification**

L'amorce sens en bleu permet de synthétiser à l'identique le brin sens, sa composition en oligonucléotides étant la même. Le principe est le même pour l'amorce anti-sens, en vert, qui permet de reformer le brin anti-sens.

Les séquences des amorces spécifiques du promoteur humain de PGC-1 $\alpha$  de 2665 pb (numéro d'accès sur GenBank : BD103728) ont été choisies grâce au logiciel Primer 3 et leur spécificité a été validée par utilisation du logiciel BLAST (basic local alignment search tool) :

- amorce sens : 5' - GAG TTG ACG AAG GGG TGA AA - 3',
- amorce anti-sens : 5' - CAA CCA GCC CCT TAC TGA GA - 3'

La formation du nouveau brin se fait alors par ajout de désoxyribonucléotides (dNTPs) grâce à l'action d'une ADN polymérase. La polymérase choisie est une polymérase de type Pfu (*Pyrococcus furiosus*), celle-ci étant décrite comme hautement fidèle contrairement à une polymérase classique de type Taq (*Thermus aquaticus*). En effet, la fidélité de l'enzyme conditionne la qualité du produit amplifié et il est indispensable de ne pas générer des mutations pour la suite des expérimentations.

La réaction de PCR est réalisée dans un volume de 20  $\mu$ l contenant 10 ng de matrice ou ADN génomique, 0,2  $\mu$ M de chaque amorce, 0,25 mM de dNTPs, 50 mU/ $\mu$ l de Pfu et du tampon réactionnel 1X (contenant du MgCl<sub>2</sub>). En présence de 100 ng de matrice, nous avons observé une inhibition de l'amplification.

Enfin, l'amplification a été réalisée dans un thermocycleur de type Techne (TC-512) selon le protocole suivant :



A. Mélange réactionnel PCR/essai			B. Programmation thermocycleur
	Concentration initiale	Concentration finale	Dénaturation initiale 95°C 2 minutes
Tampon réactionnel	10 X	1 X	Dénaturation, 95°C, 20 secondes Hybridation, 60°C, 20 secondes Elongation, 72°C, 45 secondes <b>40 cycles</b>
Amorce sens	5 µM	0.2 µM	
Amorce anti-sens	5 µM	0.2 µM	
dNTP	10 mM	0.25 mM	
Polymérase Pfu	2.5 U/ml	50 mU/ml	Elongation terminale 72°C 3 minutes
ADN	0.1 µg/µl	10 ng	
H2O QSP 20 µl			

**Tableau 2. Conditions d'amplification par PCR du promoteur humain de PGC-1 $\alpha$**

La présence d'un seul fragment amplifié ainsi que sa taille sont vérifiés après migration sur gel d'agarose 0.8 % contenant du bromure d'éthidium (BET) à 0.5 µg/ml sous excitation aux ultraviolets (UV) (Figure 61).



**Figure 61. Amplification du promoteur humain de PGC-1 $\alpha$  de 2665 pb**

M. Marqueur de taille

1. Témoin négatif : H<sub>2</sub>O,
2. Amplification avec 10 ng d'ADN génomique avec un premier couple d'amorce testé,
3. Amplification avec 100 ng d'ADN génomique,
4. Témoin négatif bis,
5. Amplification avec 10 ng d'ADN génomique avec le couple d'amorces choisi.

## ***ii. Purification sur gel du promoteur humain de PGC-1 $\alpha$***

*Pour cela, nous avons utilisé le kit QIAEX II agarose gel Extractio (QIAGEN).*

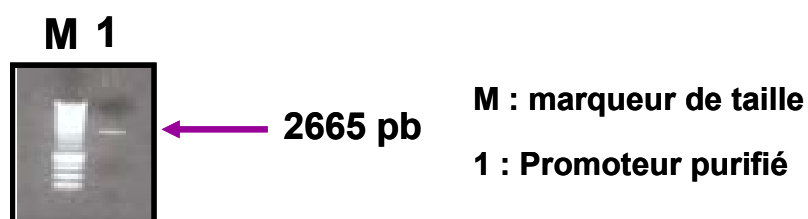
Le produit amplifié par PCR est déposé sur gel d'agarose 0.8% contenant du BET à 0.5  $\mu\text{g/ml}$  pour la détection. Après migration, et par visualisation rapide sous UV, la bande d'ADN est directement excisée dans le gel en vue de sa purification.

La première étape de purification correspond à la solubilisation du gel. La bande découpée est alors pesée, de façon à ajouter 100  $\mu\text{l}$  de tampon de solubilisation pour 100 mg de gel.

Dans un deuxième temps, des microbilles de silice sont rajoutées dans le but de fixer l'ADN. La fixation ADN/microbilles se fait à 50°C pendant 10 minutes. Après centrifugation et élimination du surnageant contenant les contaminants résiduels d'agarose, le culot est resuspendu dans une solution de lavage. Cette étape de lavage permet après centrifugation d'enlever les traces résiduelles de sel dans les différentes solutions.

Enfin, après séchage du culot, celui-ci est resuspendu dans un tampon d'élution contenant 10 mM de TrisHCl, 1mM d'EDTA et à pH 8. Après une brève centrifugation pour éliminer les microbilles de silice, le surnageant contenant l'ADN purifié est transféré dans un tube propre.

La présence de l'ADN ainsi purifié dans le tampon d'élution est vérifiée après migration sur gel d'agarose (Figure 62).



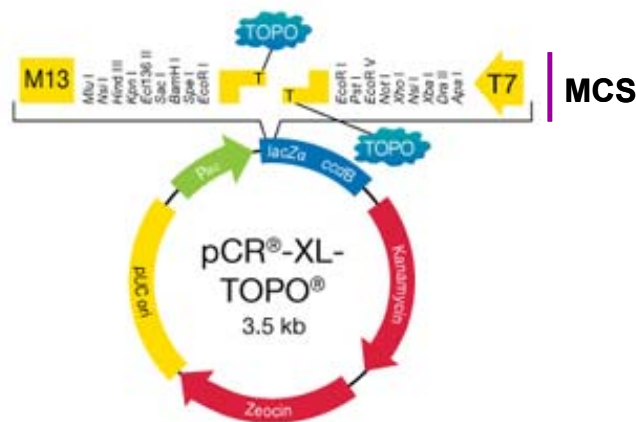
**Figure 62. Vérification de la purification du promoteur humain de PGC-1 $\alpha$**

## ***iii. Clonage de type « TA cloning » du promoteur humain de PGC-1 $\alpha$***

*Cette étape a été réalisée à l'aide du kit TOPO XL PCR cloning kit (invitrogen).*

Pour faciliter le clonage du promoteur dans le vecteur rapporteur, un pré-clonage est réalisé dans un vecteur de clonage de type TA cloning. Le vecteur plasmidique de type TOPO (pTOPO) (Figure 63) a l'avantage d'être maintenu ouvert par la présence de TOPO-

isomérase, ce qui permet de s'affranchir d'une étape de restriction pour ouvrir le plasmide. De plus, la présence du site de clonage multiple (MCS : multi cloning site) offre la possibilité d'un large choix de sites de restriction pour le sous-clonage ultérieur dans le plasmide rapporteur sans ajout préalable de sites de restriction de part et d'autre du promoteur amplifié. Enfin, lors de l'étape de ligation, l'ajout de ligase n'est pas nécessaire, puisque la TOPO isomérase peut jouer ce rôle. Néanmoins, l'appellation TA cloning, vient de la présence d'un T sortant (thymine) à chaque extrémité du pTOPO, ce qui suggère la nécessité de rajouter des A (adénines) sortants sur l'insert pour favoriser sa ligation dans le vecteur par complémentarité T/A.



**Figure 63. Caractéristiques du plasmide TOPO XL**

Le MCS (multi cloning site) est le site de clonage multiple. La présence de T sortant et la liaison d'une TOPO-isomérase indique le site d'intégration de l'insert avec des A sortants. pUC ori désigne l'origine de réplication procaryote pour favoriser la réplication du plasmide dans un système procaryote (bactérie). Le gène Kanamycine est un gène de sélection conférant une résistance à cet antibiotique aux cellules ayant intégré le vecteur.

- Ajout de A sortants sur le promoteur

Pour favoriser l'insertion du promoteur dans le plasmide pTOPO, celui-ci est légèrement modifié de façon à rajouter un A sortant. Il s'agit ici de réaliser une PCR ne contenant qu'une étape d'élongation en présence seulement de dATP. Ainsi en présence d'une Taq polymérase, les A sont ajoutés à la fin du fragment en cours d'amplification. La réaction a lieu dans 20 µl tampon réactionnel supplémenté de 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 0.4 mM de dATP.

L'étape d'élongation dans un thermocycleur se fait alors pendant 30 minutes à 72°C, température optimale de fonctionnement de la Taq polymérase.

- Ligation du promoteur

Le promoteur modifié avec des A sortants est mis en présence du vecteur TOPO-XL à raison d'un ratio 1 : 4 (vol : vol). Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, la réaction est stoppée par ajout d'une solution « STOP » contenant 0.3 M de NaCl et 0.06 M de MgCl<sub>2</sub> (6 X TOPO cloning stop) et le produit de ligation est conservé à +4°C avant transformation des bactéries. Le produit de la réaction correspond au pTOPO ayant intégré l'insert : TOPO/PGC-1 $\alpha$ .

- Amplification du vecteur TOPO/PGC-1 $\alpha$

Le produit de ligation obtenu est ensuite amplifié dans un système bactérien. Les bactéries choisies sont des E.coli chimiocompétentes de type DH5 $\alpha$  reconnues pour garantir la stabilité du vecteur amplifié et éviter toute recombinaison de l'ADN.

Après mise en présence de 25  $\mu$ l de bactéries avec 2  $\mu$ l de produit de ligation pendant 30 minutes à 4°C, un choc thermique est réalisé pendant 45 secondes à 42°C. La réaction est stoppée sur glace et les bactéries ainsi transformées sont mises en présence d'un milieu nutritif de type LB (luria broth) pendant 1 heure à 37°C sous agitation (200 rpm). Après centrifugation brève, le culot obtenu est resuspendu dans 100  $\mu$ l de LB et la suspension bactérienne est étalée sur une gélose LB-AGAR additionnée de Kanamycine à 50  $\mu$ g/ml. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, la présence de colonies bactériennes valide le succès de la transformation : bactéries TOPO/PGC-1 $\alpha$ . Cependant pour valider la présence d'un vecteur contenant l'insert désiré et non le vecteur seul, les colonies bactériennes sont remises en suspension dans 20  $\mu$ l de phosphate buffer saline (PBS) pour réaliser des PCR « dites sur colonie ».

- Vérification par PCR sur colonie

Le principe de la PCR utilisée est le même que précédemment pour l'amplification du promoteur avec les mêmes amorces, excepté la polymérase utilisée qui diffère : Taq polymérase qui nécessite l'ajout extemporanément de MgCl<sub>2</sub> dans le tampon de réaction. De

plus, la programmation du thermocycleur diffère légèrement en temps et nombre de cycle (cf Tableau 3).

Les produits de PCR sont alors analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5%, la présence d'une bande validant la construction (Figure 64).

A. Mélange réactionnel PCR/essai			B. Programmation thermocycleur
	Concentration initiale	Concentration finale	Dénaturation initiale 94°C 3 minutes
Tampon réactionnel	10 X	1 X	Dénaturation, 94°C, 45 secondes Hybridation, 60°C, 30 secondes Elongation, 72°C, 1.30 minutes <b>20 cycles</b>
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	
Amorce sens	5 µM	0.5 µM	
Amorce anti-sens	5 µM	0.5 µM	
dNTP	10 mM	0.2 mM	
Polymérase Taq	5 U/ml	1 U	Elongation terminale 72°C 10 minutes
H2O QSP 20 µl			
bactérie	-	1 colonie	

Tableau 3. Conditions d'amplification par PCR sur colonie

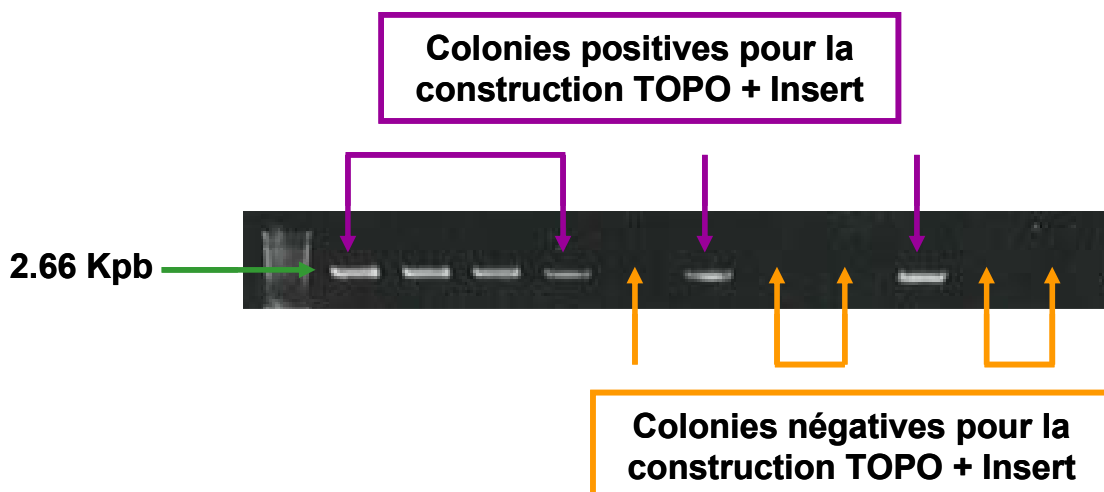


Figure 64. Sélection des bactéries TOPO/PGC-1α : PCR sur colonie

Les flèches violettes indiquent les colonies possédant le vecteur ayant intégré l'insert. Les flèches oranges indiquent les colonies possédant un vecteur vide.

- Purification de la construction TOPO/PGC-1 $\alpha$  : « miniprep »

*Pour procéder à cette purification, nous avons utilisé le kit NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel).*

Les colonies apparues comme positives lors de la PCR sur colonie, sont mises en préculture dans un milieu LB avec de la kanamycine à 50  $\mu\text{g/ml}$  dans un volume total de 3 ml. Après 24h d'incubation à 37°C sous agitation (200 rpm), 1.8 ml de cette préculture sont transférés dans un tube « eppendorf » de 2 ml pour centrifugation pendant 30 secondes à 13400 rpm. Le culot est alors resuspendu dans un tampon de lyse composé :

- de SDS qui permet de dénaturer les protéines et notamment les histones libérant l'ADN génomique,
- de NaOH (soude) pour dénaturer l'ADN génomique,
- et d'une solution de neutralisation à l'origine de l'aggrégation de l'ADN génomique et de la création de conditions appropriées pour la fixation ultérieure de l'ADN plasmidique.

Après clarification du lysat et 5 minutes de centrifugation à 13400 rpm, les débris protéiques et cellulaires ainsi que l'ADN génomique sont culotés. Le surnageant est alors transféré dans un tube contenant une colonne de silice (de type NucleoSpin) permettant la fixation de l'ADN plasmidique, facilitée par une centrifugation de 1 minute à 13400 rpm. Après lavage de la colonne pour éliminer divers contaminants tels que les nucléases, les sels ou les composants cellulaires solubles, la membrane est séchée par centrifugation à 13400 rpm pendant 2 minutes. L'ADN plasmidique est enfin élué par centrifugation dans les mêmes conditions en présence de 50  $\mu\text{L}$  de tampon d'éluion.

La spécificité de la construction a été validée par séquençage automatisé (eurofins MWG operon) et après alignement avec la séquence d'origine.

#### ***iv. Sous clonage dans un vecteur *Gaussia Luciférase****

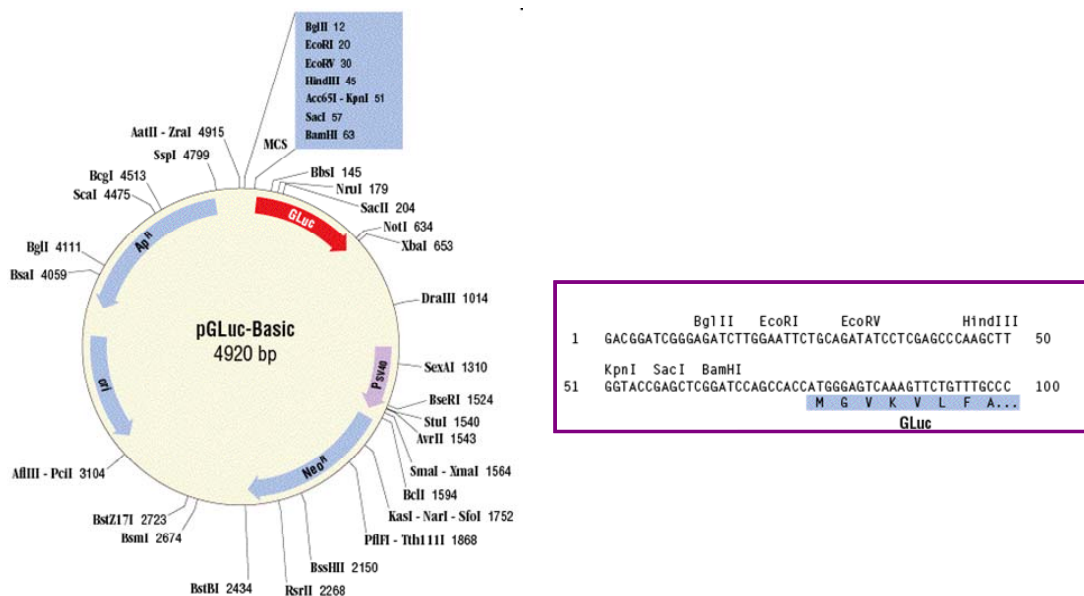
- Caractéristiques et intérêt du vecteur *Gaussia luciférase*

La *Gaussia Luciférase* (GLuc) a été identifiée chez un petit crustacé marin de la famille des copépodes : le *Gaussia Princeps* ayant la faculté de produire un signal

bioluminescent en guise de défense contre ses éventuels prédateurs. L'avantage majeur de cette luciférase, est la présence d'une séquence de sécrétion dans le gène. Elle a donc été par la suite rapidement humanisée et clonée pour son utilisation dans des systèmes eucaryotes en tant que système rapporteur (Tannous et al., 2005).

A l'inverse des luciférases classiques telle que la luciférase Firefly, ce système ingénieux permet de s'affranchir d'une étape de lyse cellulaire, puisque la GLuc étant sécrétée directement dans le surnageant de culture, les cellules peuvent être conservées intactes. Ce système peut donc offrir de nombreux avantages lors de l'utilisation de tests cellulaires et notamment la possibilité de la mise en place d'un test double : mesure de l'activité luciférase dans le surnageant de culture couplé à un test de toxicité cellulaire ou de mesure d'expression de gènes directement sur les mêmes cellules.

Ainsi le fragment du promoteur humain de PGC-1 $\alpha$  au préalable cloné dans le plasmide TOPO, a été par la suite sous-cloné dans un plasmide contenant l'ADN complémentaire (ADNc) de GLuc, le plasmide « pGLuc basic vector » (New England Biolabs) (Figure 65).

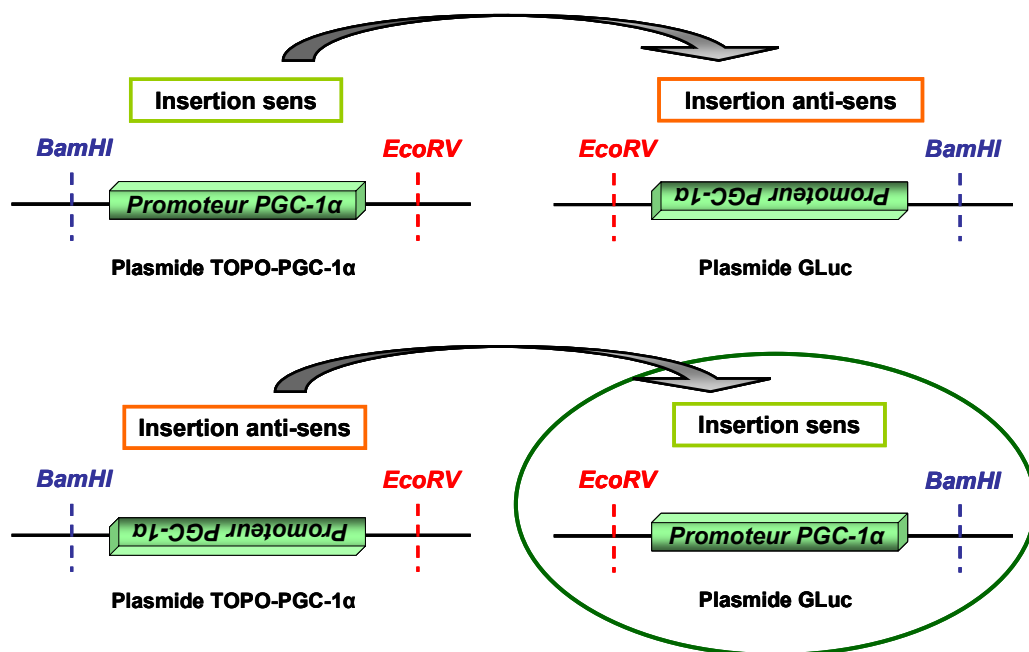


**Figure 65. Caractéristiques du vecteur pGLuc-basic**

pGLuc est un plasmide de 4920 pb contenant la séquence humanisée de la Gaussia Luciférase (GLuc). En amont de cette séquence se trouve le MCS permettant l'intégration d'une séquence promotrice juste en amont de GLuc. Ap<sup>R</sup> désigne un gène de résistance à l'ampicilline, antibiotique procaryote. Ori est l'origine de répliation. Neo<sup>R</sup> désigne un gène de résistance la néomycine, à un antibiotique eucaryote.

- Démarche du sous-clonage

Le sous-clonage correspond à la coupure de l'insert dans le pTOPO et son insertion dans le plasmide GLuc (pGLuc). Cette étape fait appel à l'utilisation d'enzymes de restriction qui reconnaissent spécifiquement des séquences palindromiques. Il est donc indispensable de choisir deux enzymes dont les sites de restriction sont présents sur les deux plasmides. Dans notre cas, ont été choisis les sites spécifiques de BamHI et EcoRV présents respectivement en amont et en aval de l'insert dans le pTOPO et présents aussi sur le MCS du pGLuc. Cependant, la position de ces deux sites est inversée sur pGLuc, à savoir EcoRV en amont de BamHI. Ainsi pour respecter le cadre de lecture de l'insert lors de l'insertion dans le plasmide GLuc, les clones TOPO/PGC-1 $\alpha$  sélectionnés au préalable doivent posséder le promoteur inséré en anti-sens de façon à ce qu'il se retrouve dans la bonne orientation dans pGLuc (Figure 6. Les résultats de clonage ont été par ailleurs vérifiés par séquençage.

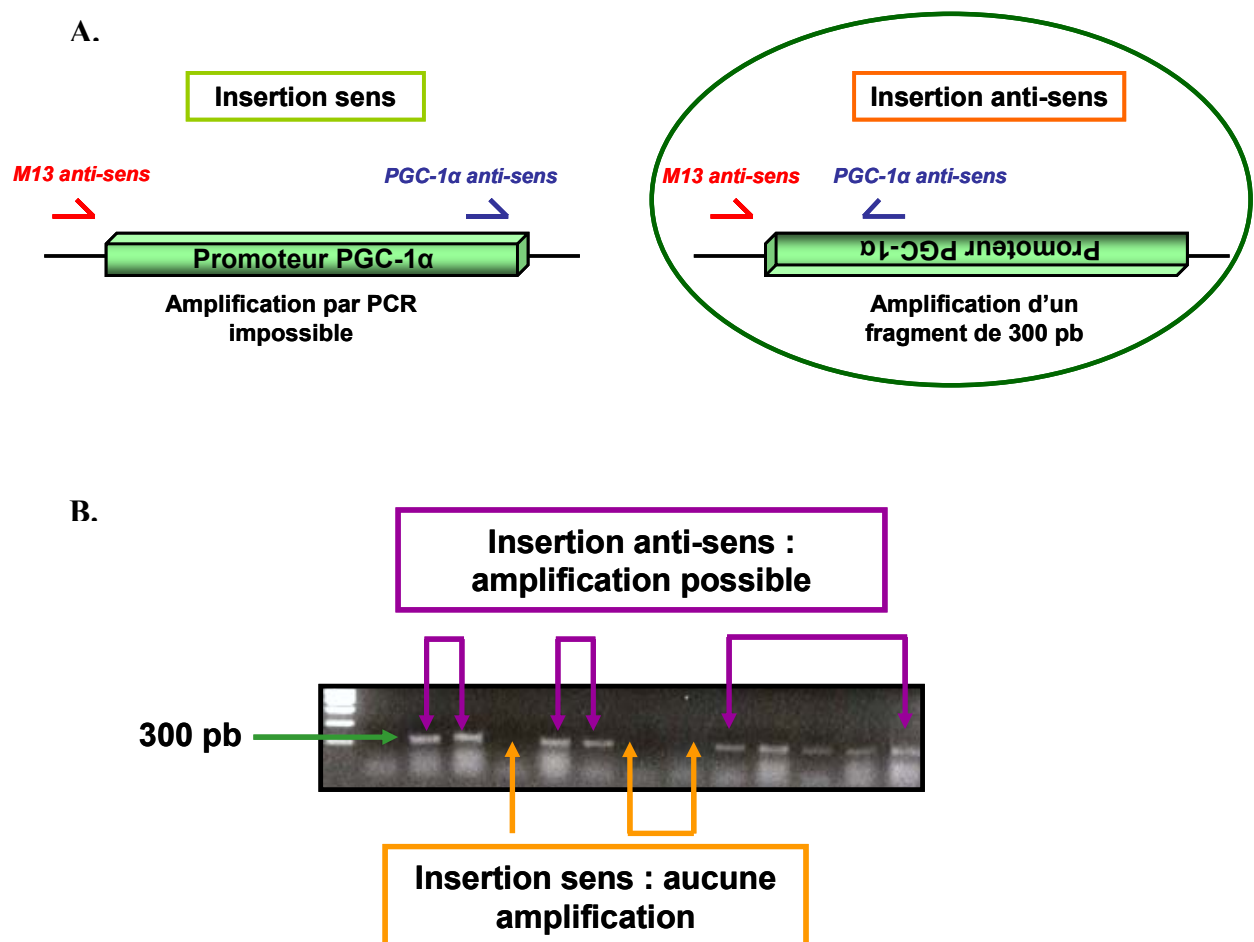


**Figure 66. Sous clonage dans le plasmide GLuc**

L'insertion du promoteur dans le plasmide TOPO se fait aléatoirement et dans les deux sens d'insertion : insertion sens ou anti-sens. La position des sites de restriction choisis étant inversée entre le plasmide TOPO et le pGLuc, les clones TOPO anti-sens sont sélectionnés de façon à permettre une insertion correcte respectant le cadre de lecture 5'→3'.



Expérimentalement, la sélection des clones anti-sens se fait par PCR sur colonie avec un couple d'amorce composé d'une amorce M13 anti-sens (site présent sur le pTOPO et amorce fournie dans le kit de ligation) et d'une amorce utilisée pour l'amplification du promoteur PGC-1 $\alpha$  anti-sens. Ainsi lorsque le promoteur présente une insertion sens, les deux amorces étant anti-sens, il ne peut y avoir d'amplification. A l'inverse, lorsque le promoteur est inséré en anti-sens, l'amorce PGC-1 $\alpha$  anti-sens devient sens et l'amplification est possible (Figure 67). La vérification se fait après migration sur gel d'agarose 1.5 %.



**Figure 67. Sélection des clones TOPO anti-sens**

- A. L'amplification par PCR sur colonie permet de distinguer l'insertion sens de l'insertion en anti-sens. Le choix de deux amorces en anti-sens ne permet l'amplification que des clones possédant le plasmide TOPO avec le promoteur inséré en anti-sens.
- B. Résultat de la sélection des clones anti-sens.

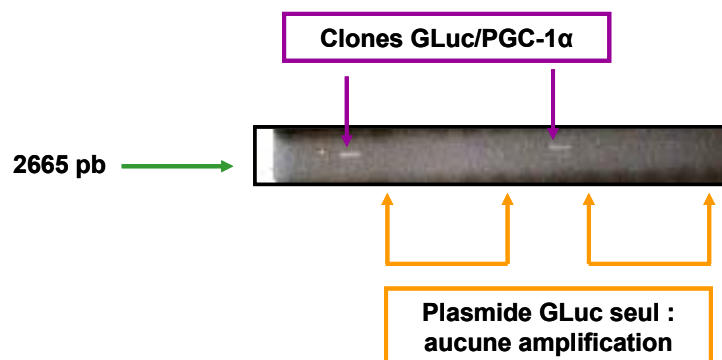
- Construction du pGLuc/PGC-1 $\alpha$

Après purification des plasmides sélectionnés en anti-sens, le pTOPO/PGC-1 $\alpha$  est doublement digéré avec les enzymes de restriction BamHI et ECoRV (New England Biolabs). Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse préparative en gel d'agarose de façon à purifier l'insert, comme décrit précédemment pour la purification du promoteur.

Le plasmide GLuc est alors digéré séquentiellement, dans un premier temps avec BamHI puis avec EcoRV. Chaque digestion est séparée par une étape de purification sur gel.

Le sous clonage de l'insert dans pGLuc, ou étape de ligation, se fait dans des proportions 1 :10 à savoir 1 ng d'insert pour 10 ng de plasmide en présence d'ATP et de ligase. La ligation a été réalisée avec le kit « *Fast-Link DNA ligation* » (Tebu-bio) selon le protocole suivant pour un volume final de 15  $\mu$ l : 1.5  $\mu$ l de tampon de ligation 10 X, 1.5  $\mu$ l d'ATP 10 mM, x  $\mu$ l d'insert et de vecteur en respectant le ratio 1 : 10, H<sub>2</sub>O QSP 14  $\mu$ l et 1  $\mu$ l de ligase fast-link. La réaction se déroule à température ambiante pendant 15 minutes, la coupure par ECoRV générant des extrémités franches, puis l'action de la ligase est inactivée à 70°C pendant 15 minutes.

Le produit de ligation est alors transformé dans des bactéries chimiocompétentes DH5 $\alpha$  et les bactéries sont étalées sur milieu LB-agar supplémenté d'ampicilline à 50  $\mu$ g/ml, les plasmides GLuc possédant le gène de résistance à l'ampicilline. Après 24 heures de culture à 37°C, l'apparition de colonies bactériennes signe la présence du vecteur. La vérification de l'intégration de l'insert dans le vecteur se fait par PCR sur colonie en utilisant les amorces ayant servies à l'amplification du promoteur et la détection est possible après électrophorèse en gel d'agarose (Figure 68).



**Figure 68. Sélection des clones GLuc/PGC-1 $\alpha$**

Les clones GLuc contenant le promoteur PGC-1 $\alpha$  sont sélectionnés par PCR avec le couple d'amorces ayant servi à l'amplification du promoteur.

- Amplification et purification de pGLuc/PGC-1 $\alpha$

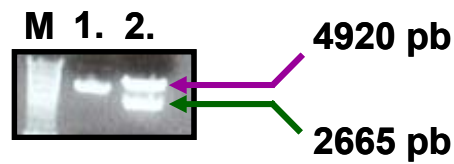
La colonie correspondant au clone sélectionné, est repiquée dans un milieu LB liquide supplémenté d'ampicilline à 50  $\mu\text{g/ml}$  dans un volume de 3 ml : préculture pendant 24h à 37°C et sous agitation à 200 rpm. 500  $\mu\text{l}$  de cette préculture sont prélevés en vue d'une amplification bactérienne plus importante dans un volume de 200 ml de LB et dans les mêmes conditions.

La purification réalisée à partir de cette culture permet d'obtenir le produit final et utilisable pour les transfections ultérieures et l'établissement de la lignée stable (QIAGEN plasmid maxi kit). La suspension bactérienne est centrifugée à 4000 rpm pendant 10 minutes à 4°C, le but étant la sédimentation des bactéries et l'élimination du surnageant de culture. Les étapes à suivre seront décrites succinctement, le principe étant le même que pour la miniprep mais à grande échelle.

Le culot est resuspendu dans un tampon de lyse supplémenté de RNase, SDS et NaOH, le but étant de lyser les bactéries, dénaturer les protéines, l'ARN, ainsi que d'agréger l'ADN génomique. Le lysat obtenu après clarification par centrifugation à 20000g pendant 30 minutes à 4°C est filtré sur colonne (QIAGEN tip 500) pour précipiter l'ADN plasmidique et éliminer les contaminants protéiques et d'ADN génomique. Cette étape de purification est agrémentée de deux lavages successifs qui permettent l'élimination des sels présents dans les différentes solutions utilisées.

Enfin l'ADN plasmidique est élué par un tampon d'éluion puis précipité par de l'isopropanol lors d'une centrifugation à 15000g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot ainsi obtenu est lavé par ajout d'éthanol 70 % et à nouveau centrifugé pendant 15 minutes à 4°C à 10000g. Après séchage du culot, celui-ci est remis en suspension dans 200  $\mu\text{l}$  de tampon Tris 10 mM pH 8.5 sans EDTA.

La séquence du plasmide PGC-1 $\alpha$ /GLuc ainsi purifié est vérifiée par l'établissement d'un profil de restriction avec les enzymes qui ont servi au clonage : BamHI et EcoRV (Figure 69).



**Figure 69. Vérification du plasmide amplifié PGC-1 $\alpha$ /GLuc**

M = marqueur de taille. 1. vecteur non linéarisé, 2. vecteur ayant subi la double digestion EcoRV/ BamH1 : obtention d'un fragment de 4920 pb correspondant au vecteur GLuc et d'un fragment à 2665 pb correspondant au promoteur PGC-1 $\alpha$ .

*b) Etablissement de la lignée stable H9c2*

Le fait de mettre en place une lignée stable permet de s'affranchir des problèmes de reproductibilité des expériences lors de transfections transitoires. En effet, en favorisant l'intégration de l'ADN exogène par recombinaison dans le génome des cellules, la lignée ainsi obtenue exprime continuellement la protéine GLuc en réponse à une activation potentielle du promoteur PGC-1 $\alpha$ . Dans ce cadre, deux cas de Figure sont envisageables : l'obtention d'un clone pur ou d'un pool stable. Le premier signifie un site d'intégration unique dans le génome de la cellule, le deuxième correspondant à des sites multiples d'intégration. Une intégration unique pouvant influencer les réponses cellulaires voir les inhiber selon le site d'intégration, notre choix s'est porté sur l'obtention d'un pool stable.

Ainsi en choisissant la lignée H9c2 précédemment décrite comme une lignée « pseudo-cardiaque », le modèle cellulaire ainsi obtenu permet de refléter l'activité promotrice de PGC-1 $\alpha$  de manière plus spécifique et dans un contexte se rapprochant d'un modèle cardiaque.

Expérimentalement, le plasmide GLuc d'origine ayant un gène de sélection eucaryote codant pour une résistance à la néomycine, toute cellule correctement transfectée devient résistante à la néomycine. Ainsi l'établissement d'une lignée stable repose sur la mise en place d'une pression de sélection pour éliminer les cellules non transfectées et favoriser l'intégration de l'ADN exogène dans le génome de la cellule.

Les cellules sontensemencées dans des boites type p100 (100 cm<sup>2</sup>) à une densité cellulaire de 80 000 cellules par boite. Après adhésion des cellules pendant 24h, les cellules sont transfectées avec le kit Fugène HD (Roche diagnostic) selon les recommandations du

fournisseur en respectant un ratio 5 : 2 à savoir 5 µl de Fugène pour 2 µg d'ADN. La réaction est réalisée dans 25 µl de milieu DMEM classique sans SVF. Séquentiellement, l'ADN est d'abord dilué dans le DMEM, puis le fugène est ajouté directement dans la solution. Après incubation pendant 30 minutes à température ambiante, les complexes ou liposomes formés sont répartis sur les cellules et laissés pendant 24h pour que la transfection soit efficace. Le milieu est alors changé par du milieu complet et l'établissement de la lignée stable démarre par ajout de l'antibiotique équivalent à la néomycine qui sera nommé ici G418 (Gibco).

La pression de sélection, à savoir mise en culture en présence d'antibiotique, est maintenue pendant 2 semaines à une concentration de 500 µg/ml de G418. En parallèle, la même pression de sélection est appliquée à des cellules non transfectées pour rendre compte de l'efficacité de l'antibiotique. A l'atteinte d'une mortalité totale des cellules non transfectées (au bout de 10 jours), la pression de sélection est maintenue une semaine supplémentaire pour les cellules transfectées. A ce stade, le pool stable obtenu car issu d'une population hétérogène et non d'une cellule unique, est amplifié de façon à établir des stocks pour les expérimentations ultérieures. De plus lors de la mise en culture du pool stable obtenu, la pression de sélection est continuellement maintenue mais à concentration plus basse de G418, à savoir 200 µg/ml.

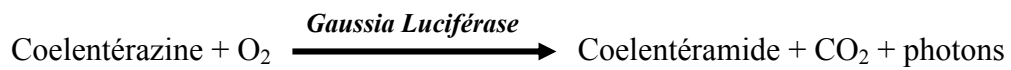
La fonctionnalité de notre lignée stable a été validée par la mesure de l'activité GLuc après stimulation du promoteur pendant 9 heures en présence d'insuline à 10 µg/ml ou de SVF 1 % après 24 heures de privation en SVF (cf paragraphe suivant).

### *c) Mesures de la luminescence et validation de la lignée stable*

#### *i. Principe de la mesure*

GLuc étant une luciférase sécrétée, il suffit de prélever le surnageant de culture pour mesurer son activité indépendamment d'une lyse cellulaire. Par ailleurs, son expression est étroitement corrélée à l'activité du promoteur de PGC-1α placé en amont. Ainsi en présence d'un inducteur de ce dernier, l'expression de GLuc et donc son activité sont augmentées. La mesure de l'activité GLuc se fait via l'utilisation du kit *Biolux GLux Flex* (New England Biolabs). Le principe du test repose sur l'oxydation du substrat Coelentérazine catalysée par la GLuc en un produit appelé Coelentéramide. L'obtention du produit étant couplée à une

émission de photons, la mesure de la luminescence obtenue est directement proportionnelle à l'activité de la GLuc et donc du promoteur PGC-1 $\alpha$  :



La mesure de l'activité luciférase est réalisée sur un appareil de type Envision Xcite (Perkin Elmer) avec un photomultiplicateur ultra-sensible, ce qui permet d'augmenter la sensibilité de détection du nombre de photons.

Le protocole de lecture recommandé par le fournisseur, préconise une lecture suivant un ratio 5-20  $\mu\text{l}$  de surnageant de culture pour 50  $\mu\text{l}$  de substrat 1X (celui-ci étant fourni à 100 X) adapté en format de plaque 96 puits. Ce protocole a été adapté pour un format miniaturisé en plaque 384 puits selon un ratio 10  $\mu\text{l}$  de surnageant pour 7  $\mu\text{l}$  de substrat. Ce ratio a été choisi en comparaison avec d'autres ratio comme donnant les plus faibles variations intra et inter-expérimentales.

Selon les recommandations du fournisseur, les surnageants de culture peuvent être conservés plusieurs jours à +4°C sans perte d'activité. Ainsi, après stimulation à l'insuline 10  $\mu\text{g/ml}$ , l'activité de la GLuc a été mesurée directement ou 16h après prélèvement pour valider l'étape de conservation des surnageants. Les résultats présentés sur la Figure 69 montrent l'instabilité de l'activité de la GLuc après conservation à 4°C pendant une courte période. En effet, l'induction de l'activité promotrice en réponse à l'insuline 10  $\mu\text{g/ml}$  diffère selon le moment de la lecture. Une lecture immédiate après prélèvement révèle un effet faiblement inducteur de l'insuline (+ 24%) alors qu'une lecture après 16 h de conservation des surnageants de culture à + 4°C montre une induction de plus de 3 fois par l'insuline.

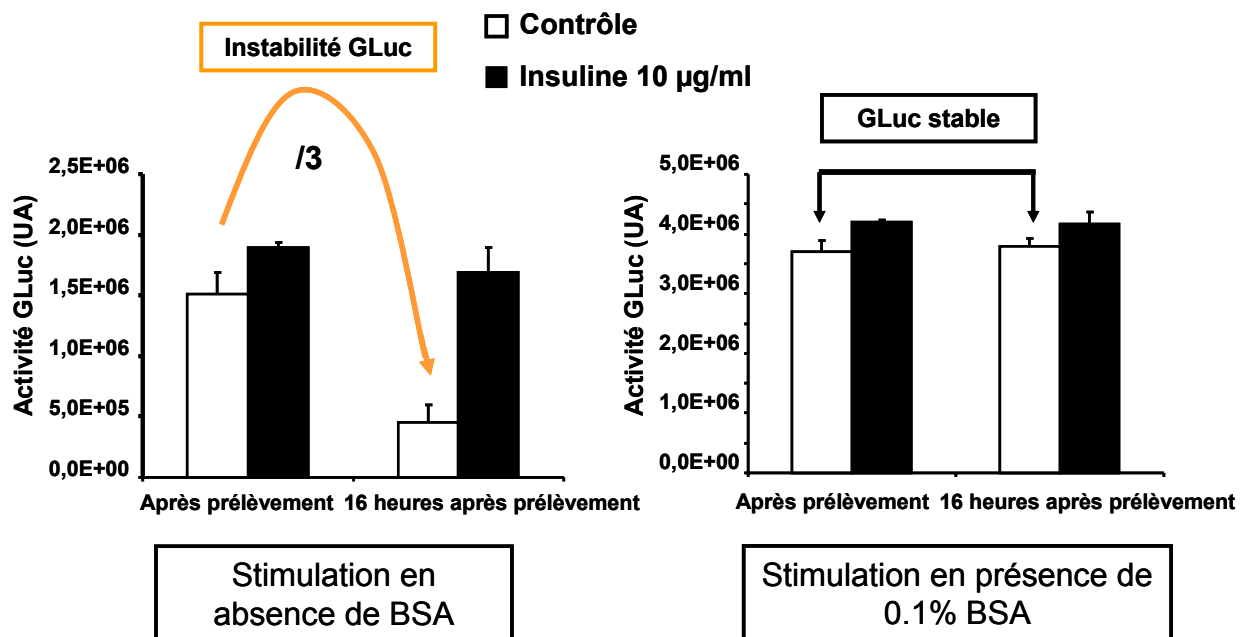
Ces données suggèrent un effet protecteur de l'insuline sur l'activité basale de GLuc puisque en son absence, les valeurs de luminescence chutent de plus de moitié après 16 heures de conservation. Ce problème de stabilité ne permet donc pas de conclure sur un effet activateur significatif de l'insuline sur l'activité du promoteur mais ces résultats montrent tout de même une activité basale de la GLuc et donc du promoteur ce qui valide la fonctionnalité de la construction indépendamment de toute stimulation.

## ***ii. Stabilisation de l'activité enzymatique de la Gaussia Luciférase***

De façon à s'affranchir des problèmes de stabilité de l'activité enzymatique de la GLuc, les mêmes expériences ont été réalisées en présence de BSA à 0.1 % dans le milieu de

stimulation. Après 24 h de privation en SVF et 9 h de stimulation avec l'insuline à 10 µg/ml dans ce milieu supplémenté de 0.1% de BSA, les surnageants de culture sont prélevés et l'activité de la GLuc est mesurée immédiatement ou 16 heures après prélèvement.

En présence de BSA 0.1%, et quelque soit le moment de lecture après prélèvement du surnageant, le niveau de luminescence en absence de stimulation reste constant, ce qui valide l'utilisation de BSA lors de toutes les expérimentations. De plus, la stimulation sous insuline ne produit pas d'effet significatif sur l'activité de la GLuc (Figure 70).



**Figure 70. Vérification de la stabilité de la Gaussia Luciférase**

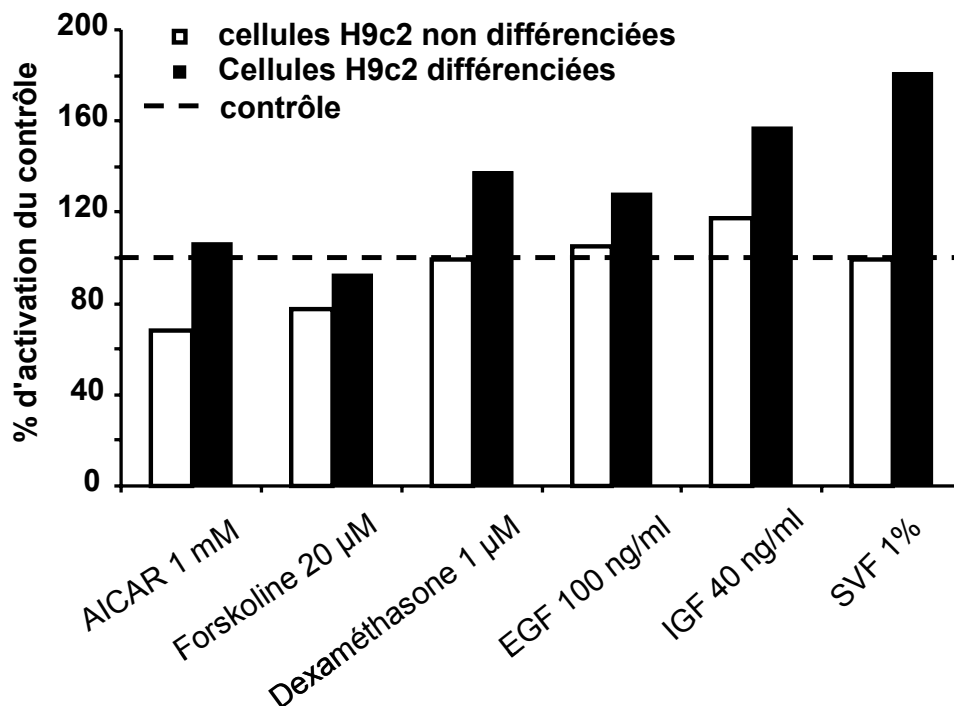
En absence de BSA et sans stimulation par l'insuline, les valeurs de luminescence sont diminuées d'un facteur 3 lors d'une lecture 16 heures après prélèvement. L'ajout de BSA à 0.1 % lors de la stimulation avec ou sans insuline prévient de cette instabilité, et révèle aussi un effet non significatif de l'insuline sur l'induction du promoteur.

Dans ce contexte, nous avons alors testé différents composés présentés dans la littérature comme étant des activateurs potentiels de PGC-1α dans d'autres types cellulaires et notamment les cellules musculaires squelettiques ont été testés : l'AICAR 1 mM (Irrcher et al., 2008), la forskoline 20 µM (Karamitri et al., 2009) et la dexaméthasone 1 µM (Arany et al., 2008).

A ces activateurs potentiels, ont été ajoutés certains facteurs de croissance : l'EGF 100 ng/ml, l'IGF 40 ng/ml ainsi que le SVF 1 % de par sa composition en divers facteurs de croissance et hormones.

Ces composés ont été testés selon les conditions de stimulation validées lors des tests avec l'insuline sur des cellules H9c2 différenciées ou non en présence de BSA 0.1 %. Il est apparu clairement de meilleures réponses sur l'activité de la GLuc dans les cellules différenciées et le SVF semble être le meilleur activateur à hauteur de 80 % d'induction (Figure 71).

Ces premiers résultats ont permis d'une part de valider la fonctionnalité de la construction, d'autre part de montrer l'importance de la différenciation dans les cellules H9c2 dans la qualité des réponses, et enfin de choisir un contrôle positif pour la mise en place du criblage, à savoir le SVF.



**Figure 71. Test de fonctionnalité de la lignée stable H9c2**

La lignée non différenciée répond peu ou pas du tout aux inducteurs potentiels sélectionnés. En revanche, la différenciation des cellules permet de révéler certains effets positifs sur l'activation du promoteur et notamment en présence de SVF qui permet une activation de l'ordre de 80 %.



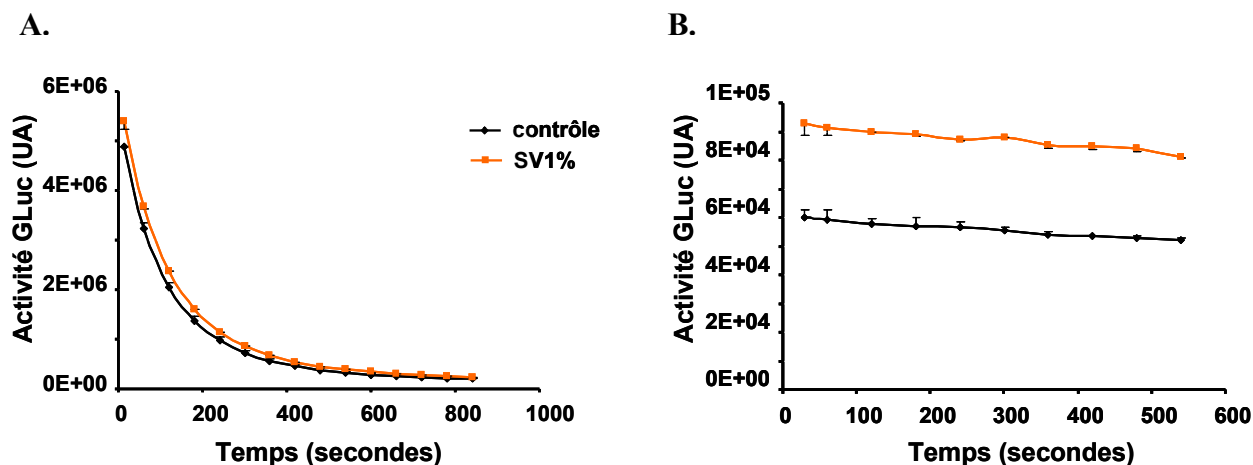
### *iii. Stabilisation du signal de luminescence*

Les conditions de mesure de l'activité de la GLuc décrites précédemment ne sont pas extrapolables à un test miniaturisé en plaque 384 puits. En effet, les photons étant instables, le signal de luminescence décroît très rapidement, ce qui nécessiterait une lecture indépendante de chaque puits (Figure 72 A.). Pour s'affranchir de l'instabilité du signal, les mesures sont réalisées en présence d'un produit dit « stabilisateur » fourni avec le kit. Ce produit confère une nette stabilisation de la luminescence enregistrée pendant quelques minutes ce qui permet de lire une plaque entière sur une gamme de temps plus large sans décroissance du signal et ainsi de pouvoir comparer les résultats sur l'ensemble des puits analysés (Figure 72 B.). Dans ces conditions de lecture, une mesure optimale de l'émission de photons a été définie de la manière suivante :

- ajout de 10  $\mu$ l de surnageant de culture dans chaque puits,
- préparation extemporanée d'un mélange de substrat avec du stabilisateur : substrat dilué au 1/100 ème dans son tampon + stabilisateur au 1/6 ème dans le substrat préparé. Ce mélange obtenu est conservé pendant 20 minutes à température ambiante avant utilisation,
- Ajout de 25  $\mu$ l du mélange substrat et stabilisateur sur le surnageant de culture.

La mesure de l'émission des photons est réalisée immédiatement via un photomultiplicateur ultra-sensible, avec une durée d'acquisition par puits de 0.17s. Cette durée d'acquisition a été calculée de façon à ce que la lecture entre le premier puits et le dernier puits soit stable et correspondant à une phase non décroissante du signal enregistré.

Enfin, chaque lecture est répétée 4 fois toutes les 90 secondes pour valider la stabilité du signal et intégrer l'enregistrement sur 360 secondes.



**Figure 72. Stabilisation de la mesure de luminescence**

A. Enregistrement de l'activité GLuc sur 14 minutes toutes les 60 secondes en absence de stabilisateur selon un ratio 7  $\mu$ l de surnageant/ 10  $\mu$ l de substrat au 1/100 ème.

B. Enregistrement de l'activité GLuc sur 9 minutes toutes les 60 secondes en présence de stabilisateur selon un ratio 10  $\mu$ l de surnageant/ 25  $\mu$ l de mix substrat + stabilisateur.

#### *iv. Conditions optimales de mesure pour le test de criblage*

Ce paragraphe vise à récapituler les étapes clés et critiques entre la mise en culture et la lecture de la luminescence qui sont nécessaires pour obtenir un résultat optimal :

- Les cellules doivent être au préalable différenciées pendant 6 à 7 jours pour acquérir un phénotype pseudo-cardiaque et s'assurer d'une réponse optimale.
- Toute stimulation se fait dans un milieu sans SVF mais supplémenté de 0.1% de BSA pour éviter l'altération de l'activité enzymatique de la GLuc.
- La mesure de luminescence se fait selon un ratio 10  $\mu$ l de surnageant de culture/ 25  $\mu$ l de mix, le mix étant constitué de substrat dilué au 1/100 ème et de stabilisateur au 1/6 ème, dans une plaque 384 puits (Corning Incorporated 3574). Ces conditions confèrent une stabilité des photons émis au cours du temps d'acquisition et permet la lecture d'une plaque entière sans décroissance du signal d'un puits à l'autre.
- L'intégration du signal se fait pendant 0.17 seconde via un photomultiplicateur ultra-sensible et les valeurs obtenues en unités arbitraires de luminescence sont extrapolées pour une intégration du signal d'une durée de 1 seconde.

L'utilisation de la GLuc en tant que luciférase sécrétée offre l'avantage de pouvoir conserver les cellules vivantes et permet de réaliser un second test. La stratégie choisie (décrite dans la partie concernant le protocole général de criblage) repose sur l'utilisation de 4 points expérimentaux répétés (quadruplicate) pour la mesure de luminescence. Ainsi 3 autres tests ont été mis au point :

- le premier est une mesure de l'expression endogène en ARNm de la GLuc. Ce test, réalisé en simple, permet de valider la mesure de luminescence et d'établir une corrélation nécessaire à la sélection des composés activateurs de PGC-1 $\alpha$ .
- Le deuxième repose sur l'évaluation de la toxicité éventuelle des composés testés par l'utilisation de la résazurine appelée aussi bleu alamar.
- Le dernier test vise à s'affranchir d'un effet éventuel des composés testés sur la prolifération cellulaire par la mesure du contenu cellulaire en ADN.

## ***2) Extraction d'ARNm et transcription inverse (RT) sur plaque***

### ***a) Purification des ARNm***

La technique décrite ici a été adaptée d'après (Arany et al., 2008) et nécessite l'utilisation du kit « *TurboCapture mRNA* » (QIAGEN). Ce kit permet une purification rapide des ARNm issus de cellules en culture, et offre l'avantage d'éliminer tous les contaminants cellulaires y compris les ARN de transfert (ARNt) et les ARN ribosomiaux (ARNr). Enfin, cette technologie récente est adaptée à un format de plaque 96 puits et offre l'avantage de pouvoir réaliser la synthèse d'ADNc directement après purification des ARNm sur la même plaque.

Après prélèvement des surnageants de culture pour la mesure de luminescence, les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS (conservation possible des cellules à -20°C jusqu'à utilisation). Les cellules sont lysées par un tampon de lyse supplémenté extemporanément de  $\beta$ -mercaptoéthanol 1 % (v/v) à raison de 50  $\mu$ l par puits. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 40  $\mu$ l du lysat cellulaire est transféré sur une plaque « turbocapture », contenant des oligodT. Cette étape est cruciale puisque les ARNm étant les seuls à posséder une queue polyA, elle permet leur purification de manière sélective par affinité. Après une

brève centrifugation à 1000 rpm pendant une minute, la plaque est incubée à température ambiante pendant 1 heure sous agitation à 1000 rpm pour favoriser la fixation des ARNm.

Après cette incubation, le lysat dépourvu d'ARNm est retiré et 3 lavages successifs sont réalisés avec 100 µl de tampon de lavage par puits. Une brève centrifugation à 1000 rpm est préconisée pour enlever la totalité du tampon et éviter toute dilution ultérieure.

### *b) Synthèse des ADNc ou transcription inverse*

Cette étape est indispensable pour la réalisation des réactions de PCR quantitatives puisque la polymérase utilisée n'est capable que d'initier la réplication de matrices d'ADN. La réaction de transcription inverse est basée sur l'utilisation d'une enzyme d'origine virale dérivée et optimisée d'une transcriptase inverse du MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus), appelée iSCRIPT (Biorad). L'initiation de la réaction nécessite quant à elle, l'utilisation d'amorces hexamères de type « random » ayant la capacité de s'hybrider au hasard avec les ARNm présents dans le tampon réactionnel. De plus, la présence d'un inhibiteur des ARNases dans le tampon permet de limiter la dégradation des ARN.

La réaction de transcription inverse est réalisée dans un volume de 25 µl par puits à raison de 5 µl de tampon réactionnel, 1.25 µl d'enzyme et 18.75 µl d'H<sub>2</sub>O. Le mix réactionnel est préparé pour l'ensemble des puits. Après 5 minutes d'incubation à 25°C, la réaction de transcription inverse se réalise par une incubation de 30 minutes à 42°C, température optimale de fonctionnement de la reverse transcriptase. Enfin, l'enzyme est inactivée à 85°C pendant 5 minutes.

La réaction ayant lieu sur plaque 96 puits, l'utilisation d'un thermocycleur de type CFX96 (Biorad) permet la mise en place d'un programme défini au préalable avec les différentes rampes de température souhaitées.

## **3) *Mesure de la viabilité cellulaire***

### *a) Test du bleu alamar*

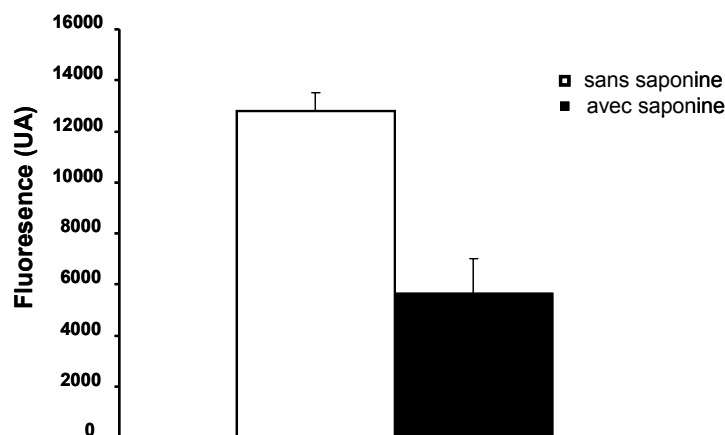
La résazurine est un composé non-fluorescent et de coloration bleue. Commercialisé sous le nom de « bleu alamar » (Sigma), cet agent est couramment utilisé pour la mesure de la viabilité cellulaire. En effet, ce dernier est réduit au niveau de la chaîne respiratoire

mitochondriale en un composé de coloration rose-violacé : la résorufine. En outre, ce produit formé émet une fluorescence rouge (590 nm) après excitation à une longueur d'onde de 545 nm grâce à un fluorimètre de type Envision Xcite (Perkin Elmer). De ce fait, la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de cellules métaboliquement actives et donc vivantes.

Pour limiter l'extinction naturelle de la fluorescence émise, les cellules doivent être en amontensemencées dans une plaque noire.

La solution de résazurine est utilisée à 1  $\mu$ M dans 100  $\mu$ l de milieu de culture DMEM non supplémenté de SVF par puits et préparée au préalable dans de l'eau à une concentration de 1 mM.

Une première lecture est réalisée juste après ajout de bleu alamar : c'est le temps 0 ( $t_0$ ). Après 2 heures dans un incubateur thermostaté à 37°C avec 5 %  $\text{CO}_2$ -95 %  $\text{O}_2$ , une deuxième lecture est effectuée : c'est le temps 2 heures ( $t_2$ ). Ainsi le différentiel  $t_2 - t_0$  rend compte de l'activité métabolique cellulaire selon la quantité de résorufine formée : plus la fluorescence est élevée, plus le nombre de cellule est important et inversement (Figure 73).



**Figure 73. Etude de la viabilité cellulaire par le bleu alamar**

Quinze minutes avant l'ajout de bleu alamar sur les cellules cultivées en plaque 96 puits, certains puits sont traités par de la saponine à 0.25 % pour générer une mortalité rapide et sévère. La représentation graphique du différentiel  $t_2 - t_0$  montre des valeurs 3 fois plus faibles en présence de saponine 0.25 % ce qui signe un nombre moindre de cellules et donc valide l'utilisation du bleu alamar pour rendre compte de la viabilité cellulaire.

#### *b) Mesure du contenu cellulaire en ADN*

Le dosage du contenu cellulaire en ADN permet de tenir compte de la variabilité du nombre de cellules ensemencées dans les différents puits et d'un effet éventuel des composés testés sur la prolifération cellulaire. Le principe repose sur l'utilisation d'une sonde fluorescente spécifique de l'ADN double-brin. Après excitation à 485 nm, l'émission de fluorescence est enregistrée à une longueur d'onde de 520 nm. A cette longueur d'onde, les ADN simple-brin et les ARNs n'émettent pas ou très peu.

Expérimentalement, après 2 rinçages des cellules au PBS, les cellules sont incubées en présence de 50 µl de tampon de lyse contenant de la soude (NaOH) 0.1 N et du triton 0.1 % pendant 45 minutes à 4°C. 20 µl du lysat cellulaire est alors transféré dans une plaque noire à fond noir, et chaque mesure est répétée deux fois. La sonde, préparée extemporanément dans un tampon Tris-EDTA (10 mM/1 mM), est ajoutée sur les lysats à hauteur de 100 µl et la lecture a lieu immédiatement dans un lecteur de plaque Envision Xcite (Perkin Elmer).

Enfin, le contenu en ADN est quantifié grâce à l'établissement d'une gamme étalon avec de l'ADN de sperme de saumon.

#### ***4) Protocole général du test cellulaire robotisé (TCR)***

De par la faible dynamique de réponse observée sur l'activité de la GLuc en réponse au SVF, la mise en place d'un criblage conventionnel avec l'établissement d'un facteur Z prime n'a pas été possible. Pour s'affranchir de cette difficulté à obtenir un facteur statistique suffisant (facteur Z prime) pour un criblage à haut débit, notre stratégie a été de mettre en place un test permettant une validation statistique à posteriori et le terme de « test cellulaire robotisé ou TCR » sera préférentiellement utilisé.

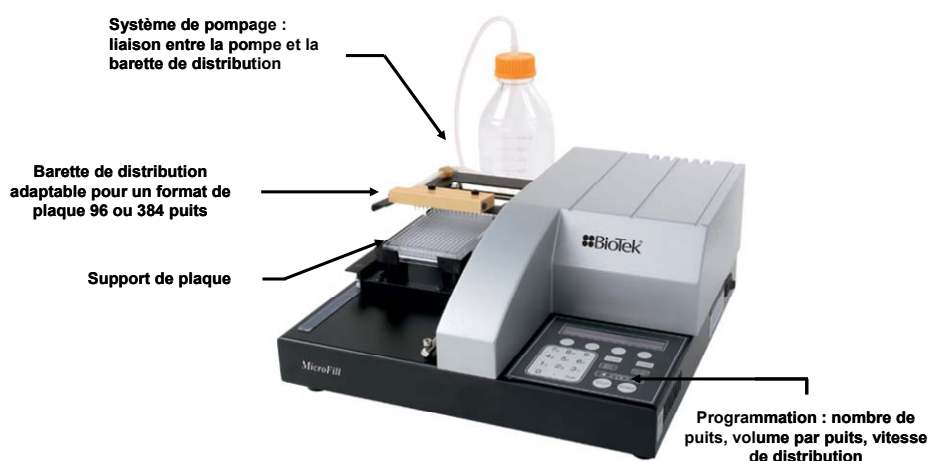
L'approche reste la même puisque le test a été miniaturisé avec une culture cellulaire en plaque 96 puits et une lecture de l'activité de la GLuc en plaque 384 puits, mais néanmoins il ne permet pas une utilisation à haut débit.

### a) Mise en culture des cellules

Les cellules H9c2 sontensemencées dans des plaques 96 puits à une concentration cellulaire de 2000 cellules par puits dans un volume de 100  $\mu$ l. Après 24 heures de sédimentation des cellules dans un milieu de culture complet, les cellules sont mises en différenciation pendant 6 à 7 jours dans du milieu de différenciation 1% HS. Le milieu de différenciation est changé tous les 2 jours.

En vue du TCR, 4 plaques sontensemencées pour une lecture ultérieure de la luminescence en quadruplicate afin de réaliser une validation statistique. Trois plaques de type p96 transparentes sontensemencées, tandis que la quatrième plaque correspond à une plaque noire à fond transparent (Corning Incorporated 3603) pour limiter l'extinction de la fluorescence lors de la mise en place du test de viabilité au bleu alamar.

Enfin pour un ensemencement homogène entre les 4 plaques, la distribution des cellules est réalisée à l'aide d'un microfill (BioTek instrument) (Figure 74). L'intégralité du système de pompage et de distribution étant amovible, chacune des pièces est autoclavable pour assurer au préalable la stérilité du matériel avant ensemencement. Avant chaque série d'ensemencement, l'appareillage est rincé 3 fois avec de l'eau stérile, puis une fois avec de l'air. L'ensemencement peut alors démarrer après un amorçage avec les cellules à hauteur d'un volume de 15 ml qui constitue le volume mort. Ainsi, pour un ensemencement de 4 plaques, à raison de 10 ml par plaque, il est nécessaire de prévoir un volume de suspension cellulaire initial de 55 ml.



**Figure 74. Système de distribution cellulaire : le microfill**

Cet appareillage permet la distribution de cellules en format de plaque 96 ou 384 puits, avec une variabilité inférieure à 1 % ce qui permet d'atteindre un ensemencement homogène d'une plaque à l'autre.

### *b) Stimulation des cellules*

Une fois différenciées vers un phénotype plus cardiaque que musculaire, les cellules sont privées de SVF pendant 24 heures par remplacement du milieu de différenciation par un milieu dépourvu de SVF.

Avant toute stimulation, le milieu est à nouveau changé par un milieu sans SVF mais supplémenté de 0.1 % de BSA qui est indispensable au maintien de l'activité de la GLuc. Après 9 heures de traitement, les surnageants de culture des 4 plaques sont prélevés et transférés dans de nouvelles plaques 96 puits (Greiner bio-one 651201) de manière indépendante, chaque plaque constituant un réplicat. La plaque noire est immédiatement utilisée pour le test de viabilité au bleu alamar et les 3 autres plaques sont rincées 2 fois avec du PBS avant congélation à -20°C pour les expérimentations ultérieures.

### *c) Composés sélectionnés pour un criblage de première intention*

Afin de valider la pertinence du test dans la recherche de nouveaux activateurs de PGC-1 $\alpha$  dans un modèle de type cardiaque, une plaque de 80 composés a été « établie ». Soixante-huit de ces composés ont été sélectionnés dans la chimiothèque LIGENDO (Greenpharma). Cette dernière est composée de 420 ligands humains endogènes et représentent une large diversité moléculaire couvrant ainsi l'ensemble des voies métaboliques connues. Ces molécules, dissoutes dans du DMSO à une concentration de 1 mg/ml à hauteur de 200  $\mu$ l par puits, sont conditionnées en format de plaque 96 puits à raison de 80 composés par plaque. Ces plaques mères sont dans un premier temps diluées pour obtenir des plaques filles à 0.04 mg/ml (4 % de DMSO). Enfin, selon la concentration désirée pour la stimulation des cellules à savoir 10  $\mu$ M, la plaque de destination dite « biologiste » ou plaque cellulaire est stimulée à une concentration par puits de 4.7  $\mu$ g/ml (0.23 % de DMSO).

La concentration choisie de 10  $\mu$ M est une concentration médiane qui dépend du poids moléculaire médian de la plaque. En effet, chaque composé ayant une masse moléculaire différente, pour une même concentration massique dans la plaque biologiste, la concentration molaire finale sera différente soit  $\pm$  10  $\mu$ M selon le composé considéré (Figure 75).



	Plaque mère	Plaque fille	Plaque biologiste ou cellulaire
	1 mg/ml 100% DMSO 200 µl	0.04 mg/ml 4% DMSO 100 µl	4.7 µg/ml 0.23% DMSO 120 µl
Facteur de dilution	1	25	17.7
	PM median = 225.7	4.43 mM	0.177 mM
			10 µM

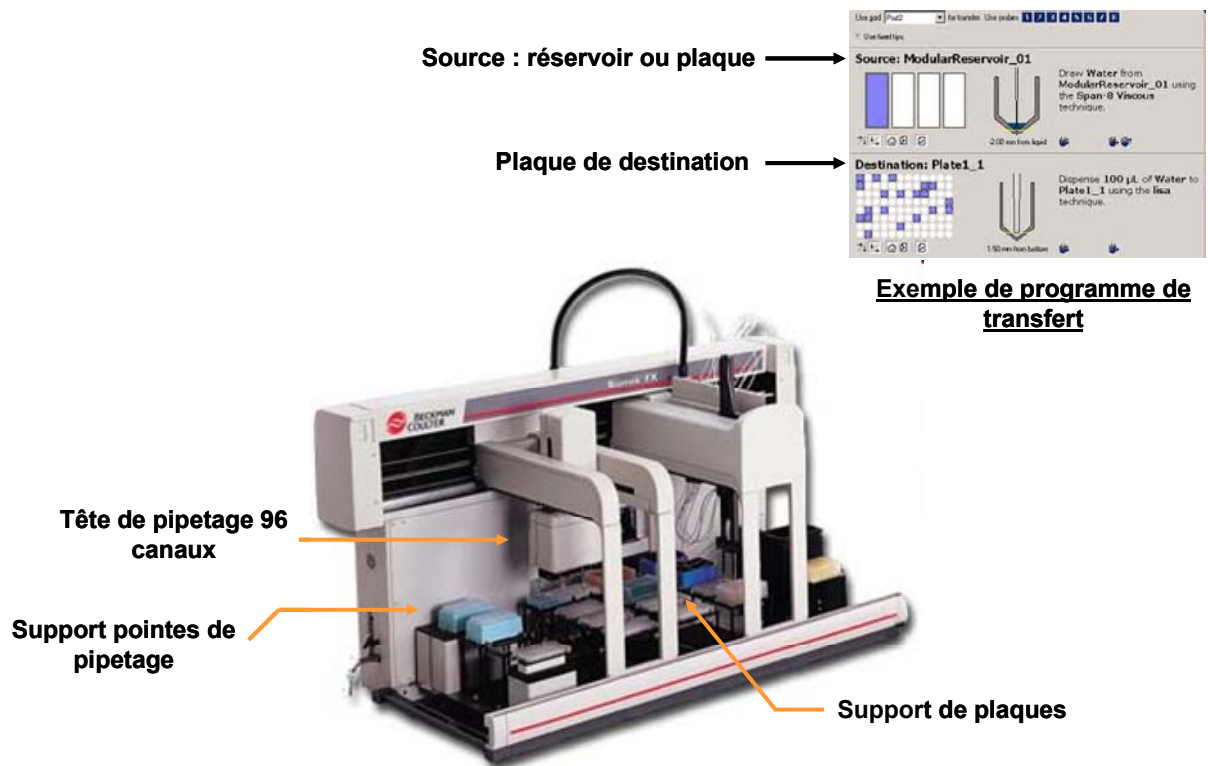
**Figure 75. Préparation des plaques de composés**

La plaque mère correspond à la plaque des composés initialement fournie. La plaque fille est une plaque intermédiaire utilisée pour le criblage. La plaque biologiste correspond à la plaque cellulaire pour la stimulation. Les plaques filles sont préparées de façon à permettre une stimulation des cellules par une concentration médiane de 10 µM pour chacun des composés.

La plaque de 68 composés a été complétée par 12 autres composés de façon à obtenir une plaque conventionnelle de 80 composés au niveau central. En effet, il est usuel de conserver la colonne de gauche pour les contrôles négatifs (ici solvant DMSO à 0.23 %, N = 8/ plaque) et la colonne de droite pour les contrôles positifs (ici SFV 0.05 %, N = 8/ plaque). La liste des 80 composés sélectionnés ainsi que leurs caractéristiques sont disponibles dans les « supplémentals data » de la publication n°1.

#### *d) Transfert des réactifs*

Chaque transfert de liquide, à savoir ajout des composés à tester, prélèvements des surnageants de culture, répartition des surnageants sur plaque 384 puits, ajout du mélange substrat et stabilisateur, est réalisé à l'aide d'une plateforme robotique de type Biomek FX (Beckman Coulter) à l'aide d'une tête de pipetage à 96 canaux. La planification des différents transferts se fait via l'utilisation du logiciel SAMI (*SAGIAN Automated Method Interface*) qui permet à la fois la programmation des différents protocoles et le contrôle simultané des appareils périphériques (Figure 76).



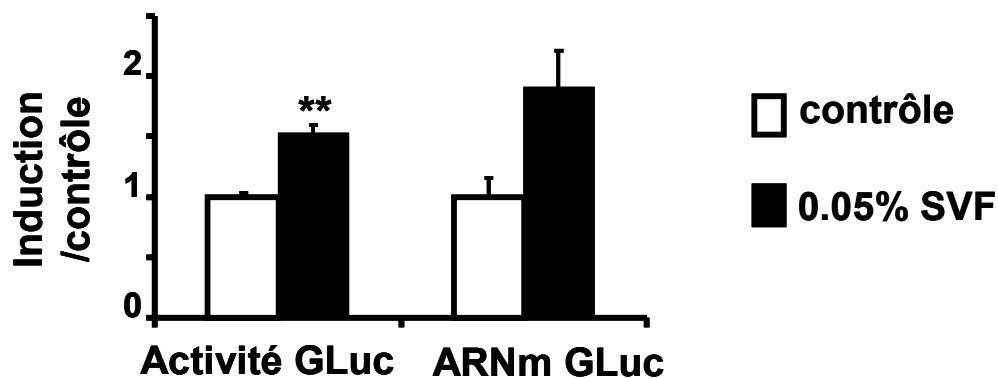
**Figure 76. Automatisation des transferts de liquide**

Le Robot Biomek FX relié à une interface de type SAMI (*SAGIAN Automated Method Interface*) permet d'automatiser chaque étape de transfert de volume d'une plaque à l'autre.

### e) Exploitation des résultats

La définition d'une touche (hit) à savoir un activateur potentiel de l'expression de PGC-1 $\alpha$ , repose sur la dualité du test cellulaire qui correspond à la mesure de l'activité de la GLuc et de son expression génique endogène.

L'activité GLuc est mesurée en quadruplicate ce qui permet de réaliser un test statistique non paramétrique : le test Mann and Withney. L'expression en ARNm de la GLuc est mesurée en simple. Pour chaque condition, les valeurs sont exprimées par rapport au contrôle. Ainsi pour qu'une molécule soit considérée comme un hit, les mesures d'activité de la GLuc doivent être statistiquement différentes des valeurs contrôles, et l'augmentation de l'expression génique endogène de GLuc doit être supérieure à une valeur seuil fixée à 1.3 (Figure 77).



**Figure 77. Définition d'un hit, exemple du SVF**

Une molécule est définie comme un hit ou activateur de PGC-1 $\alpha$  si et seulement si, l'activité GLuc est statistiquement différente du contrôle et son expression en ARNm supérieure à une induction de 1.3

*f) Validation secondaire des hits*

Pour valider un composé en tant que hit, les molécules sélectionnées sont préparées à partir de poudres commerciales à différentes concentrations. La stratégie employée est la même que pour le TCR initial avec un nombre réduit de molécules mais à plusieurs concentrations.

Cette démarche permet d'une part de valider le composé présent dans la chimiothèque initiale et d'autre part de sélectionner une dose optimale pour la validation ultérieure sur cardiomyocytes de rats adultes.

g) Schéma récapitulatif des étapes du TCR

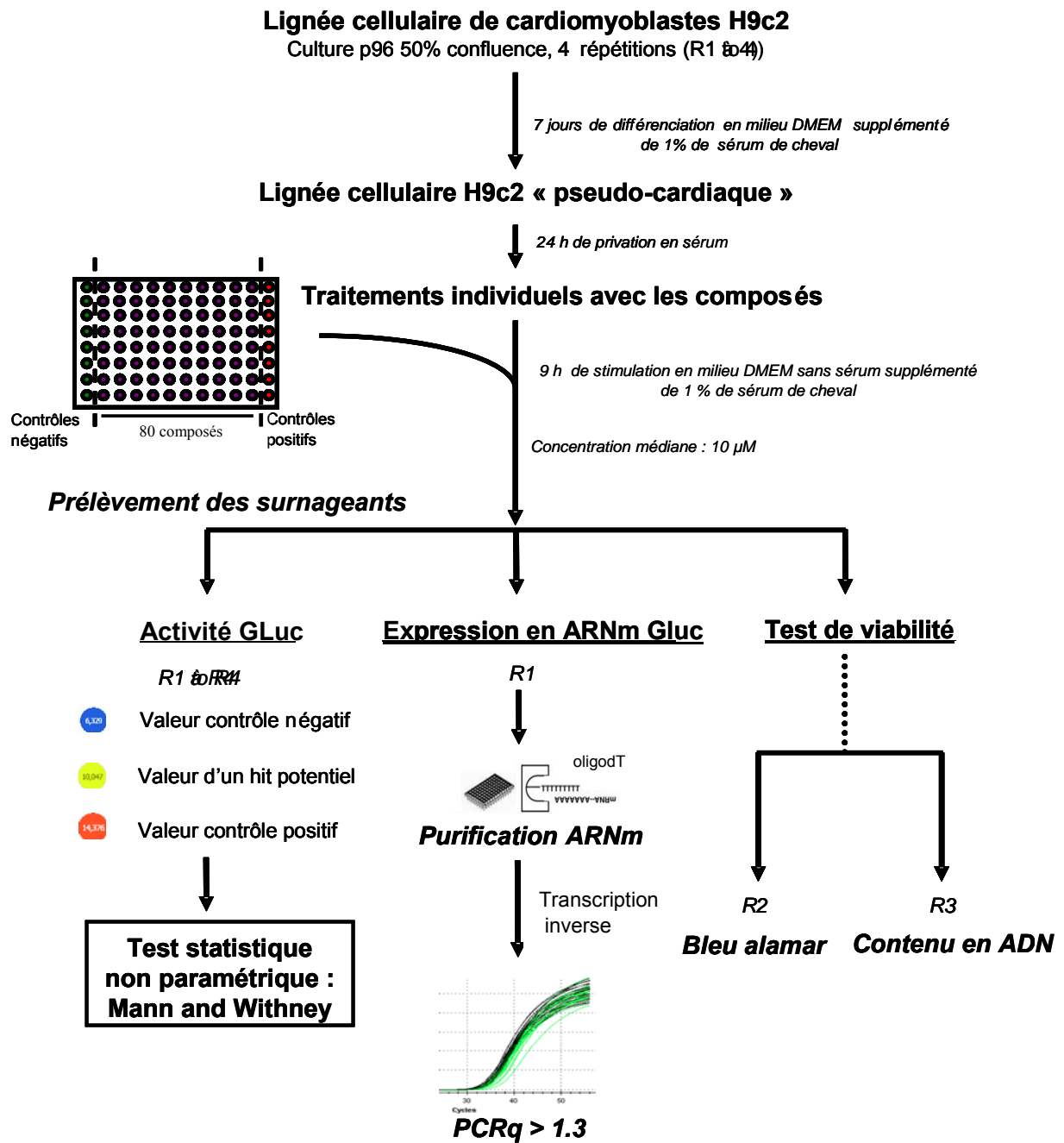


Figure 78. Etapes clés du test cellulaire robotisé (TCR)

Ce schéma récapitule l'enchaînement des étapes faisant partie intégrante du TCR.

## **IV) Etude de l'expression des gènes par PCR quantitative en temps réel**

### ***1) Stimulation des cellules***

#### ***a) Cardiomyocytes de rats adultes***

Après environ 16 heures de privation en SVF, les cellules sont stimulées avec les différents composés sélectionnés parmi les hits, à la dose optimale choisie lors de la validation secondaire. Les cultures contrôles sont traitées avec le solvant utilisé pour solubiliser les composés, le DMSO, de façon à avoir un pourcentage équivalent pour chaque condition. Chaque condition est répétée sur 4 à 5 cultures indépendantes.

Après 9 heures ou 24 heures de stimulation, les surnageants de culture sont prélevés et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  en vue des mesures de toxicité. Les cellules sont alors rincées deux fois dans du PBS, placé au préalable à  $37^{\circ}\text{C}$ , avant leur conservation à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### ***b) Cellules musculaires lisses de rat adulte***

Après 24 heures de privation en SVF, les CML sont préincubées pendant 1 heure avec du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à  $100\ \mu\text{M}$  pour induire un stress oxydant puis incubées en présence ou non de resvératrol à  $20\ \mu\text{M}$  pendant 24 heures supplémentaires, toujours en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A la fin du traitement et après 2 rinçages avec du PBS à  $37^{\circ}\text{C}$ , les cellules sont conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### ***2) Extraction des ARN totaux : méthode au Trizol/chloroforme***

#### ***a) Lyse des cellules***

Une solution de TRIzol monophasique (phénol + guanidine isothiocyanate, Molecular Research Center) est répartie dans chacune des boîtes à raison de 1 ml par boîte. Après grattage des cellules dans le TRIzol, la suspension obtenue est transférée dans un tube conique contenant des billes en céramique (MoBio) pour un broyage dans un microbroyeur Precellys 24 (Bertin) de 2 fois 5 secondes avec 5 secondes de pause intermédiaire.

Cette étape permet de favoriser la destruction des membranes, la libération des composés intracellulaires sans altération des acides nucléiques et la dissociation des complexes nucléoprotéiques.

Concernant l'extraction d'ARN total à partir des anneaux aortiques qui ont été conservés lors du sacrifice des rats Dahl, le principe est le même à raison de 1 ml de Trizol pour environ 20 mg de tissu.

#### *b) Séparation ARN/ADN/protéines*

L'homogénat obtenu est transféré dans un tube « eppendorf » de 2 ml auquel est ajouté 200 µl de chloroforme par ml de TRIZOL. Après une agitation brève mais vigoureuse et une incubation de 5 minutes à température ambiante, les échantillons sont centrifugés pendant 15 minutes à 10 400 rpm à 4°C.

Cette centrifugation a pour but la séparation des phases suivantes : une phase organique plus lourde rose claire correspondant au phénol-chloroforme contenant les protéines, un anneau interphasique blanchâtre correspondant à l'ADN génomique et une phase aqueuse supérieure contenant exclusivement les ARNs.

#### *c) Précipitation des ARNs*

La phase aqueuse est alors transférée dans un tube eppendorf transparent, et celle-ci est complétée par 500 µl d'alcool isopropylique. Après agitation par retournement des tubes, les échantillons sont conservés une nuit à -20°C pour faciliter la précipitation des ARNs et augmenter le rendement.

La précipitation est suivie d'une centrifugation à 4°C à une vitesse de rotation de 11 400 rpm pendant 15 minutes. L'apparition d'un petit culot blanchâtre signe la présence des ARNs.

Les culots sont alors rincés deux fois dans de l'éthanol à 75 % (respectivement par 200 puis 150 µl) de façon à éliminer toute trace de contamination notamment par les sels et l'alcool isopropylique résiduel. Chaque étape de lavage est séparée par une centrifugation de 5 minutes à 11 400 rpm à 4°C.

Après le dernier lavage, afin d'éliminer l'éthanol, les culots sont séchés pendant environ 15 minutes (jusqu'à ce que le culot devienne transparent) pour une évaporation totale

des traces résiduelles d'alcool. Les culots sont alors resuspendus dans 15 µl d'eau « DNase-RNase free » puis incubés pendant 1 heure à 4°C avec agitation régulière pour une bonne homogénéisation. Les ARNs ainsi obtenus sont conservés à -80°C.

### **3) Analyse qualitative et quantitative des ARNs**

Les acides nucléiques absorbant à une longueur d'onde de 260 nm, une analyse quantitative est possible par spectrophotométrie. Ainsi il a été établi que 1 unité d'absorbance (UA) à 260 nm équivaut à 40 µg/ml d'ARNs. En effet, 1 mole de nucléotides équivalant à 309 mg/ml et le coefficient d'extinction molaire à 260 nm étant de  $7700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 1 UA est égale à  $309/7700$  soit 40 µg/ml.

Par ailleurs, il est possible d'avoir en parallèle une valeur d'absorbance pour une longueur d'onde à 280 nm correspondant au spectre d'absorption des protéines. Ainsi, la qualité de la préparation d'ARNs peut être évaluée par le calcul du ratio A260/A280. Une préparation d'ARNs est considérée comme pure pour un ratio compris entre 1.8 et 2. Un ratio inférieur à 1.8 signe une contamination protéique, par le phénol et/ou une mauvaise solubilisation des ARNs, tandis qu'un ratio supérieur à 2 peut traduire une contamination par d'autres acides nucléiques conduisant ainsi à une surestimation de la concentration en ARN.

Expérimentalement, deux systèmes de mesure ont été utilisés :

- Un spectrophotomètre de type BioPhotometer (Eppendorf). Dans ce cas de Figure, les ARN sont au préalable dilués au 100<sup>ème</sup> à raison de 1µl d'ARN dans 100 µl d'eau.
- Un spectrophotomètre de type Biomate 3 (Thermo Fisher Scientific). Cet appareillage possède l'avantage de pouvoir travailler sur un échantillon non dilué de par la présence d'une cellule d'enregistrement ultrasensible.

### **4) Transcription inverse**

Les ARNs étant simple brin et peu stable, il est plus commode de travailler à partir d'ADNc obtenu par transcription inverse. De plus, la méthode d'extraction utilisée permet la purification de l'ensemble des ARNs. Or, les ARNm ne représentant que 3% de l'ensemble des ARN, il est important de purifier spécifiquement les ARNm. Ainsi les techniques

classiques de réverse transcription sont couplées à la sélection des ARNm par ajout notamment d'oligonucléotides poly-dT.

*a) Kit Superscript 2 (Invitrogen)*

L'enzyme fournie avec le kit est une version optimisée de la transcriptase inverse du M-MLV pour un fonctionnement optimal à 42°C. L'initiation de la réaction est basée sur la présence notamment d'oligonucléotides poly-dT permettant la sélection des ARNm, seuls ARNs possédant une queue polyA, et ainsi d'initier la synthèse de l'ADNc.

La réaction se déroule dans un volume réactionnel de 20 µl à partir de 1 à 5 µg d'ARN pendant 1 heure à 42°C en présence d'un inhibiteur des RNase : le RNaseOUT.

*b) Kit IScript (BioRad)*

La méthodologie est la même que celle décrite précédemment pour la réverse transcription sur plaque utilisée lors du TCR mais avec addition d'oligonucléotides poly-dT.

## **5) PCR quantitative selon la technologie « SYBR Green »**

*a) Principe*

La technologie de la PCR quantitative en temps réel repose sur la même méthodologie que décrite précédemment pour la PCR conventionnelle, mais offre l'avantage de pouvoir suivre en temps réel l'amplification d'un gène cible.

La quantification dépend de l'utilisation d'un agent intercalent fluorescent : le SYBR Green qui s'incorpore entre les bases des ADN double brins. Son incorporation se traduit par une émission de fluorescence. Ainsi pour chaque nouvelle molécule d'ADN formée le signal de fluorescence augmente. Le niveau de fluorescence est donc directement proportionnel au nombre de molécules d'ADN formées et reflète le niveau d'expression initial en ARNm.

L'amplification spécifique dépend des amorces utilisées, chaque amorce étant complémentaire de petites régions de part et d'autre du produit à amplifier. Ces amorces sont choisies comme pour la PCR conventionnelle, de manière à encadrer un intron, autrement dit chaque amorce se situant dans un exon différent. Ce choix permet de s'affranchir d'une contamination éventuelle par de l'ADN génomique lors de l'amplification.



b) Couples d'amorces utilisés

Gènes	N° d'accèsion GeneBank	Amorce sens (5'→3') Amorce anti-sens (5'→3')	Taille de l'amplicon (pb)	Température d'hybridation (°C)
<b>Gènes de référence</b>				
Rplp32	NM_013226	GCT GCT GAT GTG CAA CAA A GGG ATT GGT GAC TCT GAT GG	115	60
TBP	NM_001004198	CGG TTT GCT GCA GTC ATC AT GTG CAC ACC ATT TTC CCA GA	132	60
YWHAZ	NM_013011	AGA CGG AAG GTG CTG AGA AA GAA GCA TTG GGG ATC AAG AA	127	60
<b>Phénotypage H9c2</b>				
Troponine T	NM_012676	AGG CTC ACT TCG AGA ACA GG TGG ACA GAG CCT TCT TCT TCC	219	60
Cacna1c	NM_012517	CAT CAT CAT CTT CTC CCT CCT G CAT CAC CGA ATT CCA GTC CT	154	60
<b>Test cellulaire robotisé</b>				
GLuc	AY_015993.1	CAC GCC CAA GAT GAA GAA GT TTG TGC AGT CCA CAC ACA GA		60
<b>Biogenèse mitochondriale</b>				
PGC-1 $\alpha$	NM_031347	CAC CAA ACC CAC AGA GAA CAG GCA GTT CCA GAG AGT TCC ACA	210	58
PGC-1 $\beta$	NM_133249	TGG AAA GCC CCT GTG AGA GT TTG TAT GGA GGT GTG GTG GG	202	60
NRF2	XM_344002	CAC CAC ACT CAA CAT TTC GG CCT TGG GGA CCT TTG AAC TT	244	58
ERR $\alpha$	NM_001008511	TCA AGG AGG GTG TGC GTC TG CTT GGC CCA GCT GAT GGT GA	196	65
Tfam	NM_031326	GAA AGC ACA AAT CAA GAG GAG CTG CTT TTC ATC ATG AGA CAG	175	60
COXI	NC_001665	AGC AGG AAT AGT AGG GAC AGC TGA GAG AAG TAG TAG GAC GGC	520	60
COXIV	NM_017202	TGG GAG TGT TGT GAA GAG TGA GCA GTG AAG CCG ATG AAG AAC	273	58
<b>Utilisation des acides gras</b>				
PPAR $\alpha$	NM_013196	ATG AGT CCC CTG GCA AT GGC ATT CTT CCA AAA CCG	259	58
PDK4	NM_053551	CCT TCA CAC CTT CAC CAC AT AAA GAG GCG GTC AGT AAT CC	189	60
MCAD	NM_016986	CCG TTC CCT CTC ATC AAA AG ACA CCC ATA CGC CAA CTC TT	129	60
<b>Stress oxydant</b>				
Sod2	NM_017051.2	AGGAGCAAGGTCGCTTACAG GTAGTAAGCGTGCTCCACA	110	60
GPX1	NM_030826.3	GTTTCCCGTGCAATCAGTTC TCACTTCGCACTTCTCAACA	129	60

**Tableau 4. Caractéristiques des amorces utilisées et conditions de PCR en temps réel**

RPL32 : Ribosomal protein L32, TBP : TATA box Binding protein, YWHAZ : 14-3-3 protein zeta/delta, Cacna1c : calcium channel  $\alpha$ 1c, GLuc : Gaussia Luciferase, PGC-1 $\alpha,\beta$  : ppar $\alpha$ 1  $\alpha,\beta$ , NRF2 : nuclear respiratory factor 2, ERR $\alpha$  : estrogene related receptor  $\alpha$ , Tfam : transcription factor mitochondrial, COXI et IV : cytochrome c oxidase I et IV, PPAR $\alpha$  : peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$ , PDK4 : pyruvate dehydrogenase

kinase 4, MCAD : medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase, Sod2 : superoxide dismutase 2, GPX1 : glutathion peroxidase 1.

### *c) Protocoles*

Les protocoles d'amplification dépendant étroitement du couple d'amorces choisi ainsi que de l'enzyme polymérase utilisée, ces 2 éléments conditionneront strictement le protocole de PCR à mettre en place.

Dans tout les cas, la réaction de PCR est réalisée dans un volume de 15 µl en capillaires ou sur plaque 96 puits pour une quantité de matrice (ADNc) de 12.5 ng.

Deux kits de PCR quantitative ont été utilisés : un kit permettant une amplification classique en 3 étapes et adapté à un appareillage de type LightCycler 2.0 en capillaires (Roche Diagnostics), l'autre étant optimisé pour une amplification en 2 étapes sur un appareillage de type CFX96 en plaque 96 puits (Biorad).

#### *i. Amplification en 3 étapes*

- Mélange réactionnel

Le mix fourni avec le kit contient les éléments nécessaires à la réaction de PCR à savoir : un mix réactionnel 10 X composé d'un mélange de dNTPs, d'une Taq polymérase thermo-résistante, de SYBR Green I et de MgCl<sub>2</sub>. La réaction de PCR a lieu en capillaires dans un volume total de 15 µl contenant 5 µl de matrice d'ADNc à 12.5 ng, 1.5 µl de tampon réactionnel, 0.5µM de chaque amorce, QSP 15µl d'H<sub>2</sub>O. Les capillaires sont alors placés dans un thermocycleur de type Light cycler 2.0 (Roche Diagnostics) (Tableau 5).

- Protocole d'amplification

La Taq polymérase utilisée est une enzyme de type « fast start » qui nécessite une étape initiale à 95°C pendant 10 minutes permettant son activation. De plus, sa vitesse d'élongation étant de 25 paires de base par seconde, le temps d'élongation choisi dépendra strictement de la taille du fragment à amplifier. La durée de l'étape d'hybridation est fixée à la moitié du temps nécessaire à l'élongation avec un minimum de 5 secondes (Tableau 5).

De façon à vérifier la spécificité du produit de PCR amplifié, les produits de PCR sont soumis à une analyse par établissement d'une courbe de fusion. Le déroulement de cette phase

repose sur une dénaturation rapide de l'ensemble des produits suivie d'une descente rapide à une température de +10°C par rapport à la température d'hybridation (maximum à 65°C), puis une lente remontée en température jusqu'à 95°C à raison de 0.1°C par seconde. Toute chute brutale de la fluorescence indique la température de fusion (température à laquelle 50% des doubles brins sont séparés) d'un produit amplifié donné. Le profil de la courbe de fusion, peut ainsi renseigner sur la spécificité du produit amplifié.

<b>A. Mélange réactionnel PCR/essai</b>			<b>B. Programmation thermocycleur</b>
	Concentration initiale	Concentration finale	Dénaturation initiale, 94°C, 10 minutes
<b>Tampon réactionnel</b>	10 X	1 X	Dénaturation, 94°C, 10 secondes Hybridation, 60°C, 4 secondes Elongation, 72°C, 8 secondes <b>45 cycles</b>
<b>Amorce sens</b>	10 µM	0.5 µM	95°C, 10 secondes
<b>Amorce anti-sens</b>	10 µM	0.5 µM	65°C, 60 secondes
<b>ADNc</b>	-	12.5 ng	0.1°C 65°C → 95°C, 1 secondes par incrément
<b>H<sub>2</sub>O QSP 15 µl</b>			

**Tableau 5. Protocole de PCRq avec le Light Cycler**

- A. Conditions de préparation du mix de PCR
- B. Programme d'amplification dans le thermocycleur avec pour exemple un amplicon de 200 pb et une température d'hybridation à 60°C.

### *ii. Amplification en 2 étapes*

La différence essentielle avec le kit précédemment décrit, repose sur l'enzyme utilisée ici, la Sso7d-fusion polymérase, qui est inactivée par la présence d'un anticorps justifiant une étape initiale à 95°C mais d'une durée raccourcie à 30 secondes. Par ailleurs, cette enzyme a été optimisée de façon à avoir une vitesse d'élongation nettement supérieure aux polymérases classiques (100 pb/s vs 25 pb/s) et être active à une température inférieure à

72°C. Cela favorise ainsi une amplification en 2 étapes, l'étape d'élongation étant couplée à l'étape d'hybridation.

Les conditions de préparations du mélange réactionnel et d'amplification étant différentes, celles-ci sont résumées dans le tableau 6.

<b>A. Mélange réactionnel PCR/essai</b>			<b>B. Programmation thermocycleur</b>
	Concentration initiale	Concentration finale	
<b>Tampon réactionnel</b>	2X	1 X	Dénaturation initiale, 95°C, 30 secondes
<b>Amorce sens</b>	10 µM	0.5 µM	Dénaturation, 95°C, 2 secondes Hybridation/Elongation, 60°C, 5 secondes <hr/> <b>45 cycles</b> <hr/> 95°C, 10 secondes 65°C, 5 secondes 0.5°C 65°C → 95°C, 5 secondes par incrément
<b>Amorce anti-sens</b>	10 µM	0.5 µM	
<b>ADNc</b>	-	12.5 ng	
<b>H2O QSP 15 µl</b>			

**Tableau 6. Protocole de PCRq pour le CFX96**

C. Conditions de préparation du mix de PCR

Programme d'amplification dans le thermocycleur avec pour exemples un amplicon de 200 pb et une température d'hybridation à 60°C.

*d) Analyse des résultats*

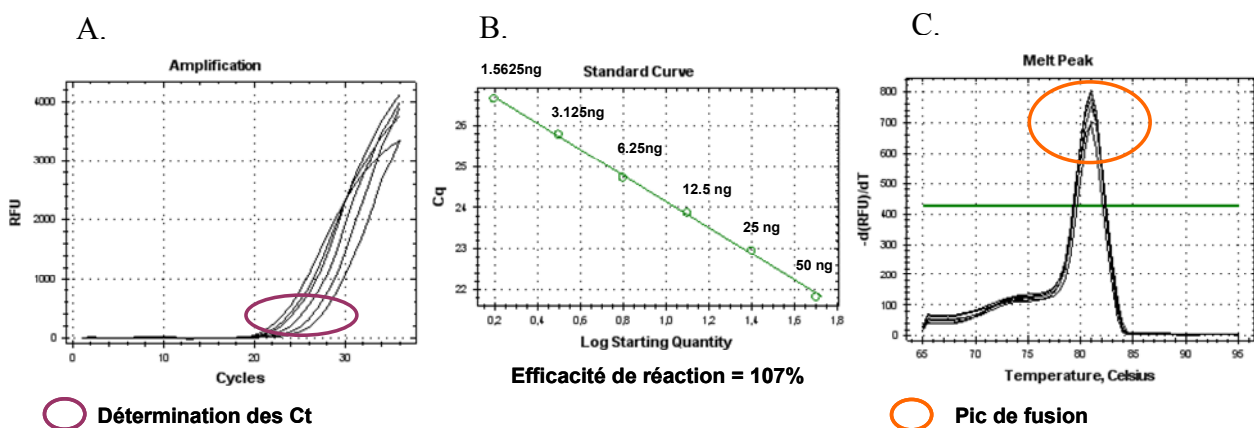
De manière générale, la quantification de l'ADNc est basée sur la détermination du nombre de cycle à partir duquel la fluorescence apparaît supérieure à une valeur seuil ou bruit de fond. Le cycle à partir duquel le signal devient détectable est appelé Ct (Cycle threshold ou cycle seuil) et dépend strictement de la quantité initiale de l'ADNc et donc de l'ARNm en question. Plus le niveau d'expression initial est élevé, plus le Ct sera petit et inversement. Il existe donc une relation linéaire inverse entre le Ct et le log de la quantité de matrice initiale.

De façon à intégrer les variabilités dues aux erreurs de manipulation et/ou d'efficacité de la reverse transcriptase, l'analyse des résultats tient compte de l'amplification d'un gène de référence ou gène de ménage dont l'expression ne doit pas varier en fonction des conditions expérimentales.

Deux méthodes de quantification sont classiquement utilisées : utilisation d'une courbe d'étalonnage ou par le calcul de la différence des Ct.

### *i. Quantification par la courbe d'étalonnage*

Pour chaque gène utilisé, un échantillon de concentration connue, est utilisé pour établir une gamme étalon. Généralement, la quantité de matrice de l'échantillon à quantifier est initialement fixée à 12,5 ng et ceci pour chaque échantillon. Ainsi, la gamme étalon est préparée de façon à encadrer cette valeur, usuellement de 50 ng à 1.5625 ng avec des dilutions intermédiaires au demi. De fait, les concentrations en ARNm de chaque échantillon seront calculées en fonction de leur Ct et de la courbe linéaire standard obtenue (Figure 79) puis normalisée à l'expression du gène de référence choisi en tant que contrôle endogène.



**Figure 79. Quantification du gène de référence YWHAZ en utilisant une gamme étalon**

- Courbe d'amplification de la gamme étalon. Chaque courbe correspond à une quantité de matrice ADNc initiale connue, de 50 ng à 1.5625 ng, et qui est associée à un Ct. Pour un facteur 2 de dilution, une variation d'un cycle est constatée entre chaque courbe (si l'efficacité de réaction de PCR est de 100 %), le Ct le plus faible correspondant à la quantité la plus importante.
- Courbe d'étalonnage  $Ct = f(\log \text{ quantité de matrice})$ .
- Courbe de fusion. Un seul pic de fusion apparaît signifiant ainsi la spécificité de la PCR.

## ***ii. Quantification par la méthode du delta-delta Ct***

Cette méthode de calcul a essentiellement été utilisée pour l'analyse de l'expression de la GLuc lors du TCR. Cette méthode tient compte à la fois de l'expression du gène cible, de celui du gène de référence et de l'expression d'un calibrateur ou contrôle. Tout d'abord, le delta Ct est calculé séparément pour l'échantillon d'intérêt ainsi que pour le contrôle de la manière suivante :

- $\Delta Ct \text{ échantillon} = Ct \text{ cible (échantillon)} - Ct \text{ référence (échantillon)}$
- $\Delta Ct \text{ contrôle} = Ct \text{ cible (contrôle)} - Ct \text{ référence (contrôle)}$

Le delta delta Ct correspond donc à la soustraction entre le  $\Delta Ct$  de l'échantillon et le  $\Delta Ct$  du contrôle ce qui permet de calculer le rapport d'expression normalisé selon la formule :  $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ , E correspondant à l'efficacité de la PCR (E = 100 %  $\rightarrow$  1, E = 90 %  $\rightarrow$  0.9).

Cependant cette méthode de calcul suppose une efficacité de réaction de PCR de 100%, autrement dit reflétant le doublement de la quantité d'ADN à chaque cycle.

## ***iii. Normalisation des résultats***

Dans la plupart des cas, plusieurs gènes de référence sont utilisés pour la normalisation des résultats de PCR. Pour ce faire, il existe un logiciel proposant un algorithme permettant de sélectionner les gènes de référence les plus stables : GeNorm. Cet algorithme est basé sur le calcul de la moyenne géométrique des valeurs des gènes de référence apparaissant comme les plus stables et fourni pour chacun des échantillons un facteur de normalisation.

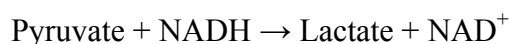
## **V) Etude de la viabilité des cardiomyocytes**

### ***1) Principe du dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) totale***

La toxicité éventuelle des composés testés sur cardiomyocytes de rat adulte est évaluée par le dosage de la LDH. La LDH est une enzyme cytosolique qui est impliquée dans le métabolisme du glucose et lors d'une mortalité cellulaire, celle-ci se retrouve dans le surnageant de culture. L'activité de la LDH dans le milieu de culture est donc un marqueur de la mortalité cellulaire.

Après stimulation et avant congélation des cellules, les surnageants de culture sont prélevés et utilisés pour le dosage de la LDH à 30°C.

D'un point de vue biochimique, la LDH catalyse la transformation du pyruvate en lactate selon la réaction suivante :



Ce test repose donc sur la capacité du NADH à absorber à une longueur d'onde de 340 nm. De ce fait, la disparition du NADH reflète l'activité de la LDH et une augmentation de l'activité LDH dans le milieu de culture est associée à une augmentation de la mortalité cellulaire (Tableau 7 pour la composition des réactifs).

#### A. Préparation du tampon d'activité totale de la LDH

Produits	Poids moléculaire	Concentration finale
<i>Tampon réactionnel</i>		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	228.2	34.1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	7.35 mM
Pyruvate de Na	110	0.63 mM
KCl 10 N pour ajustement du pH à 7.5		
<i>Préparation extemporanée dans 1 ml total</i>		
NADHNa <sub>2</sub>	754.4	12.4 mM
NaHCO <sub>3</sub>	84.01	12 mM

#### B. Composition de la réaction par cuve

Produits	préparation
Tampon réactionnel	3 ml
NADH/NAHCO <sub>3</sub>	50 µl
Echantillon	20 µl

**Tableau 7. Préparation des réactifs pour le dosage de la LDH**

## 2) Interprétation des mesures de spectrophotométrie

L'analyse des résultats issus d'un dosage spectrophotométrique repose sur la loi de Beer-Lambert selon laquelle l'évolution de la densité optique ( $\Delta DO$ ) au cours du temps ( $\Delta t$ ) est proportionnelle à l'apparition d'un produit ou la disparition d'un substrat. Ainsi, l'activité enzymatique est représentée par la formule mathématique suivante où  $\epsilon_x$  est le coefficient d'extinction molaire du substrat ou du produit détecté (6220 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> pour le NADH), L est la longueur de la cuve (1 cm) et D le coefficient de dilution de l'échantillon :

$$(\Delta DO / \epsilon_x \cdot L) \times (1 / \Delta t) \times D$$

## VI) Etude de l'expression des protéines

### 1) *Extraction des protéines*

Le tampon de lyse utilisé pour extraire les protéines en perturbant les systèmes membranaires dépend étroitement du contexte d'utilisation de protéines par la suite, à savoir pour un dosage enzymatique ou pour un western-blot (WB). Les protéines étant fragiles et facilement dégradables, il est primordial d'utiliser un tampon contenant des anti-protéases ainsi que des anti-phosphatases dans le cas d'une détection de formes phosphorylées.

L'homogénéisation des échantillons se fait dans un volume de 1 ml pour 50 mg de tissus, 100-200  $\mu$ l pour 200000 cellules environ dans un tampon spécifique dont la composition est détaillée dans le Tableau 8. Les extraits protéiques obtenus sont aliquotés et conservés à -80°C.

#### *A. Solutions mères*

<b>Produits</b>	<b>Poids moléculaire</b>	<b>Concentration finale (M)</b>
DTT	154.2	1
NaF	41.99	1
PMSF (Ethanol)	174.2	0.1
Orthovanadate	183.9	0.1
NaPPi	446.1	0.25

Précautions pour la préparation de l'orthovanadate : Soluble dans l'eau, mais pH à ajuster à 10. La solution devient jaune et la solution est chauffée à 100°C jusqu'à décoloration complète. Chaque produit est aliquoté et conservé à -20°C.

#### *B. Tampon de lyse 5 X*

<b>Produits</b>	<b>Poids moléculaire</b>	<b>Concentration finale (mM)</b>
Hepes	238.3	50
Kcl	74.75	50
EDTA	292.2	1
EGTA	380.35	1
B-glycero-phosphate	306.11	5
Triton 100X		0.10%

Préparé extemporanément à 1 X et supplémenté d'anti-protéases et d'anti-phosphatases.



### C. Tampon WB

Produits	Concentration finale (mM)
Orthovanadate	1
DTT	1
NaF	50
NaPPi	5
PMSF	0.2
Cocktail antiprotéase	Kit fourni par calbiochem

Préparation sur glace

#### **Tableau 8. Préparation du tampon d'extraction des protéines pour western blot**

DTT : dithiothréitol (agent réducteur), NaF : nafamostat mesilate (inhibiteur de protéases), PMSF : phenylmethanesulfonyl fluorure (inhibiteur de protéases), Orthovanadate (inhibiteur de phosphatases), NaPPi : sodium pyrophosphate inorganic tetrabasic

### **2) Dosage des protéines par la méthode BCA (bicinchoninic acid)**

La quantité de protéines par échantillon est estimée par un dosage colorimétrique. Ce dosage repose sur la réduction des ions  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  en milieu alcalin par les protéines. En milieu alcalin, le BCA forme un complexe avec les ions  $\text{Cu}^+$  de couleur pourpre avec une absorbance optique maximale à 560 nm. La quantité de protéines dans l'échantillon est ainsi proportionnelle à l'absorbance émise à 560 nm.

La concentration protéique dans chaque échantillon est calculée à l'aide d'une gamme étalon de BSA réalisée en parallèle selon la même réaction. Ces données sont indispensables pour la séparation des protéines en électrophorèse puisqu'elle est réalisée à quantité constante de protéines pour chacun des échantillons.

### **3) *Semi-quantification de l'expression de protéines spécifiques par western blot***

#### ***a) Séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE***

##### ***i. Principe***

Chaque protéine possède un poids moléculaire et un point isoélectrique qui lui sont spécifiques. De façon à séparer les protéines uniquement selon leur poids moléculaire, ces dernières doivent être dénaturées, autrement dit l'électrophorèse réalisée doit être en conditions dénaturantes.

Ces conditions dénaturantes sont obtenues par la présence dans le gel d'électrophorèse de SDS d'où l'appellation SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrilamide Gel Electrophoresis). Ce composé possède une queue hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement. Ainsi, en se fixant sur les régions hydrophobes des protéines à raison d'une molécule de SDS pour 2 acides aminés, les protéines ne peuvent pas se replier et acquièrent une charge globale négative.

La séparation des protéines selon leur taille dépend aussi du maillage du gel. En effet, le pourcentage d'acrylamide détermine le degré de réticulation du gel. Plus le pourcentage est élevé, plus le maillage est dense à faveur d'une migration des petites protéines. A l'inverse, plus le pourcentage est faible, plus le maillage est lâche en faveur d'une séparation des grosses protéines.

Toutefois pour une séparation homogène des protéines, celle-ci se fait en deux temps :

- Au travers d'un gel de concentration constituant la phase supérieure usuellement utilisé à 5%, qui permet de concentrer les protéines à l'interface entre les 2 gels (Tableau 9),
- Puis au travers d'un gel de séparation constituant la phase inférieure, dont le maillage dépend étroitement de la taille de la protéine à révéler à la suite de l'électrotransfert (Tableau 9).

<b>Gel de séparation (10%)</b>	<b>Vf 10 ml</b>	<b>Gel de concentration (5%)</b>	<b>Vf 3 ml</b>
H <sub>2</sub> O	4.8 ml	H <sub>2</sub> O	2.18 ml
Acryl/BisAcryl 40%	2.5 ml	Acryl/BisAcryl 40%	375 µl
Tris 1.5M pH 8.8	2.5 ml	Tris 1M pH 6.8	380 µl
SDS 10 %	0.1 ml	SDS 10 %	30 µl
APS 10 %	0.1 ml	APS 10 %	30 µl
Temed	6 µl	Temed	3 µl

**Tableau 9. Préparation des gels d'électrophorèse SDS-PAGE**

Exemple pour un gel de séparation à 10 % permettant une bonne séparation des protéines entre 25 et 250 kDa.

Acryl/BisAcryl 40 % : Acrylamide 38.67 % /Bis Acrylamide 1.33 %, SDS : Sodium dodecyl sulfate, APS : Ammonium persulfate, Temed : Tetramethylethylenediamine, les deux derniers composés servant de catalyseurs rapides à la réaction de polymérisation de l'acrylamide.

### *ii. Préparation des échantillons et migration*

Le dépôt des échantillons dans le gel de concentration se faisant à quantité égale pour chaque échantillon, classiquement entre 25 et 50 µg de protéines, les échantillons sont dilués avec le tampon ayant servi à leur extraction. A cette dilution est rajouté un tampon de charge composé notamment de SDS, de DTT, de glycérol pour alourdir les échantillons et faciliter leur dépôt sur gel et de bleu de bromophénol pour suivre visuellement la migration. La dénaturation des protéines est facilitée par chauffage à 95°C pendant 5 minutes.

Après dépôt des échantillons, la migration se fait à 120 Volts (V) pendant 1h 30, jusqu'à la sortie du front de migration dans le tampon de migration (Tris-SDS-Glycine).

### *b) Electrotransfert*

Cette étape permet de transférer les protéines du gel d'électrophorèse sur membrane et permettre l'immunorévélation spécifique des protéines d'intérêt. Le transfert se fait sur membrane de nitrocellulose, préalablement traitée par du méthanol.

Expérimentalement, le gel est placé face à la membrane, entre deux couches de papier absorbant *Whatman* et deux éponges. Ce système appelé par analogie « sandwich » est positionné dans une cassette de transfert reliée à deux électrodes positionnées de façon à ce que les protéines du gel chargées négativement migrent vers la borne positive sur la membrane (Figure 65). Le transfert se fait pendant 1h30 à 150V et à 4°C dans un tampon de transfert (Tris-Glycine 25-40 mM, 20% de méthanol).

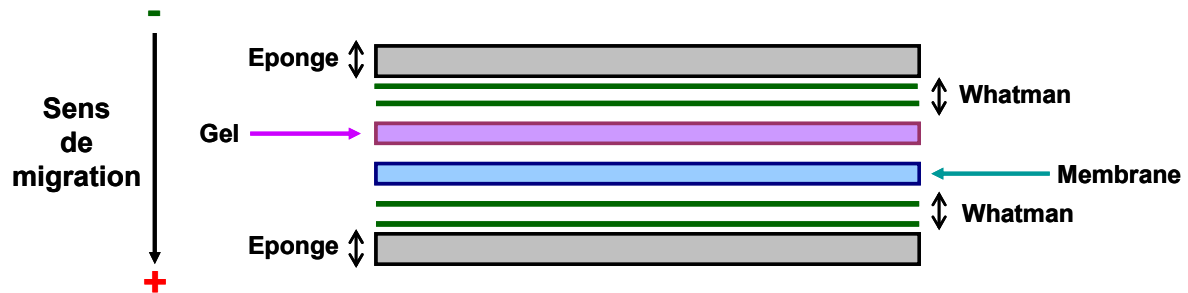


Figure 80. Schéma du montage pour le transfert des protéines

### c) Immunorévélation

#### i. *Saturation des sites non spécifiques*

Après transfert, la membrane de nitrocellulose est disposée dans une solution de saturation. En effet, ce type de membrane fixe de manière non spécifique tout type de protéines. Ainsi, pour limiter une fixation non spécifique des anticorps (Ac) utilisés pour l'immunorévélation, les sites non spécifiques sont saturés soit par de la BSA soit par des protéines de lait à hauteur de 5% (5g/100 ml) dans du PBS-Tween. La saturation est réalisée à température ambiante pendant 1 heure ou à 4°C pendant 24 heures.

#### ii. *Détection spécifique des protéines*

La détection repose sur l'utilisation successive de deux Ac. Le premier Ac ou Ac primaire utilisé reconnaît un épitope spécifique de la protéine d'intérêt et doit être dirigé contre l'espèce d'où est extraite la protéine en question, et préparée dans une espèce différente

(exemple : anticorps de chèvre anti souris). La liaison Ac-antigène est favorisée soit par une incubation sur la nuit entière à 4°C soit par une incubation de 1 heure à 37°C dans une solution PBS-Tween BSA 5%, sous agitation lente.

Après 3 lavages successifs de 10 minutes sous agitation rapide dans du PBS-tween pour éliminer l'excès d'Ac non fixé (favorisé par le tween qui est un détergent doux), un deuxième anticorps anti-Ac primaire est ajouté pendant 1 heure à température ambiante sous agitation lente : c'est l'Ac secondaire. Cet Ac dilué extemporanément dans du PBS-lait 5%, est conjugué à une peroxydase pour une détection ultérieure de type HRP (HorseRadish Peroxidase). Ainsi après 3 rinçages consécutifs de 10 minutes sous agitation rapide par du PBS-Tween, la présence de la protéine peut être détectée par chimioluminescence. En effet, l'ajout d'un réactif de révélation ECL (Enhanced Chemiluminescence), pendant 5 minutes, permet la formation d'un ester d'acridinium, dont la dégradation permet l'émission de photons. La quantité de lumière émise est donc directement proportionnelle à la quantité d'Ac fixé et donc de protéines reconnues.

#### 4) *Anticorps utilisés*

Pour chaque Ac utilisé, il est indispensable de vérifier la spécificité de ce dernier et de déterminer son facteur de dilution pour lequel la détection sera la plus fiable (Tableau 10).

<b>Ac Primaire</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>dilution</b>	<b>Espèce</b>	<b>Ac Secondaire</b>	<b>Dilution</b>	<b>Taille de la protéine kDa</b>
<i>Anti Phospho-CaMKII</i>	Cell signaling (3361)	<b>1000</b>	lapin	Anti-lapin HRP (chèvre)	<b>1000-3000</b>	<b>50</b>
<i>Anti CaMKII total</i>	Cell signaling (3362)	<b>500</b>	lapin	Anti-lapin HRP (chèvre)	<b>1000-3000</b>	<b>50</b>
<i>Anti PGC-1<math>\alpha</math></i>	H300 santacruz 13067	<b>500</b>	lapin	Anti-lapin HRP (chèvre)	<b>1000-3000</b>	<b>90</b>

**Tableau 10. Conditions d'utilisation des Anticorps**

Afin d'être comparatif la révélation de la forme phosphorylée et de la forme non phosphorylée d'une protéine doit se faire sur une même membrane. En effet, après révélation de la forme phosphorylée, il est possible de rompre les liaisons Ac-antigène afin de réutiliser la membrane pour la détection de la forme totale de la même protéine : c'est le « stripping » à chaud. Cette méthodologie repose sur l'utilisation d'une solution contenant du SDS à 2%, du Tris à 62.5 mM à pH 6.7 et du  $\beta$ -mercaptoéthanol à 10 mM. Les membranes sont incubées pendant 45 minutes à 50°C dans cette solution sous agitation. Après deux rinçages dans du PBS-Tween, la membrane est à nouveau mise en présence d'une solution de saturation, avant incubation avec les Ac primaires et secondaires.

Une autre méthode existe pour la révélation de deux protéines de taille différente mais par « stripping » à froid en utilisant un kit commercial « reblot » (millipore).

### **5) Analyse des résultats**

La détection de l'émission de ces photons est permise grâce à l'utilisation d'un appareillage de type « ChemiDoc MP Imaging system » (Biorad). L'image ainsi enregistrée peut ensuite être analysée avec le logiciel Quantity one qui permet de quantifier la densité des bandes ou spot et ainsi permettre une comparaison semi-quantitative entre les échantillons.

Pour chaque protéine analysée, il est indispensable de vérifier la quantité des dépôts, par la révélation de protéines de structure ou connues pour être insensible à un traitement donné. De ce fait, la quantification de cette protéine, dite « protéine de ménage », permet de normaliser la quantification de la protéine d'intérêt.

Le cas échéant, il est aussi possible de réaliser une coloration de la membrane au Bleu de Coomassie qui permet la détection de l'ensemble des protéines ayant migré et donne ainsi une indication sur la quantité des dépôts protéiques entre chaque puits.

## **VII) Etude de la fonction mitochondriale**

Un effet activateur sur la biogenèse mitochondriale des hits issus du TCR doit être associé à une augmentation de la respiration mitochondriale, autrement dit à une augmentation de la consommation en oxygène.

## 1) Principe

Pour réaliser cette validation fonctionnelle des hits obtenus lors du TCR, les cellules H9c2 différenciées sont stimulées pendant 72 heures en présence des composés sélectionnés dans un milieu DMEM supplémenté de 0.1% de BSA.

Les cellules sont alors détachées de la boîte à l'aide de la trypsine puis remises en suspension dans du milieu complet pour inhiber l'action de la trypsine qui pourrait avoir un effet délétère sur l'intégrité des membranes. Après une centrifugation à 1300 rpm pendant 5 minutes, et élimination du surnageant, les cellules sont perméabilisées par de la digitonine à 5µg/ml pour  $1.10^6$  de cellules. Les cellules sont remises en suspension dans 2 ml de solution dite de respiration ou R (Tableau 11) supplémentée de BSA à 2mg/ml et placées dans une chambre thermostatée à 37°C et sous agitation constante.

<b>Produits</b>	<b>Solution R (mM)</b>
<i>pH 7.1, Force ionique 160</i>	
CaK <sub>2</sub> EGTA	<b>2.77</b>
K <sub>2</sub> EGTA	<b>7.23</b>
MgCl <sub>2</sub>	<b>1.38</b>
Ca <sup>2+</sup> libre	<b>1.10<sup>-4</sup></b>
Mg <sup>2+</sup> libre	<b>1</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (3H <sub>2</sub> O)	<b>3</b>
Imidazole	<b>20</b>
Taurine	<b>20</b>
DTT	<b>0.5</b>
K méthanesulfonate	<b>90</b>
Na méthanesulfonate	<b>10</b>
Acide glutamique	<b>5</b>
Acide malique	<b>2</b>
BSA (extemporément)	<b>2 mg/ml</b>

**Tableau 11. Composition de la solution de respiration**

## ***2) Enregistrement et analyse des données***

La mesure de la consommation en oxygène est permise grâce à l'utilisation d'électrodes à oxygène ou électrodes de Clark reliées à un système d'acquisition « Oxygen Interface Model 928 » (Strahtkelvin Instruments) et enregistrée à l'aide du logiciel « Strahtkelvin 928 System ».

Pour une validation rapide, une simple analyse de la consommation en oxygène après 72 heures de stimulation est réalisée. Après ajout des cellules dans le milieu R, les vitesses de consommation de l'oxygène sont comparées entre les différentes conditions pour rendre compte ou non d'un effet global des composés sur la fonction mitochondriale.



## **Chapitre I. Recherche d'activateurs du co-activateur transcriptionnel PGC-1 $\alpha$ dans un contexte cardiaque spécifique**

**(Publication 1 sous presse)**

### **I) Présentation**

La mitochondrie joue un rôle essentiel dans la production énergétique et notamment dans les tissus hautement oxydatifs tels que le muscle squelettique ou bien le cœur. En ce qui concerne le muscle cardiaque, ce dernier adapte continuellement sa production énergétique en fonction de ses besoins, notion à l'origine du concept de travail à flux tendu. La principale source énergétique du myocarde est mitochondriale via la phosphorylation oxydative et son fonctionnement dépend étroitement de la biogenèse mitochondriale. De ce point de vue la connaissance des mécanismes contrôlant cette biogenèse et plus généralement la fonction mitochondriale est fondamentale.

La biogenèse mitochondriale repose en partie sur une synthèse des protéines mitochondriales finement régulée et coordonnée. Cette synthèse implique une coordination parfaite entre la synthèse et le transport de sous-unités protéiques d'origine nucléaire d'une part et leur assemblage avec les sous-unités protéiques codées par l'ADN mitochondrial d'autre part. Cette coordination de l'expression des deux génomes dépend d'un contrôle transcriptionnel très strict impliquant l'interaction de divers facteurs de transcription et notamment NRF-2 et ERR $\alpha$  sur des domaines de liaison spécifiques sur l'ADN nucléaire (Scarpulla, 2008) à l'origine notamment de la transcription du facteur de transcription mitochondrial Tfam.

En amont de cette cascade transcriptionnelle, un co-activateur transcriptionnel proposé comme chef d'orchestre du contrôle de la biogenèse mitochondriale a été identifié (Ventura-Clapier et al., 2008). Ce dernier a été caractérisé comme inductible en réponse à une augmentation de la demande énergétique mais de manière tissu-spécifique. Parmi les stimuli connus pour activer son expression, l'exposition au froid a été le premier identifié dans le tissu adipeux brun et par la suite comme extrapolable au muscle squelettique. Néanmoins, cette induction de PGC-1 $\alpha$  n'a été observée ni dans le cerveau, ni dans le cœur (Puigserver et al., 1998). Par ailleurs, en réponse à l'exercice physique, l'expression de ce dernier est induite dans le muscle squelettique, dans le tissu adipeux brun et dans le cerveau, mais ce n'est à

nouveau pas le cas dans le cœur (Garnier et al., 2005; Rimbaud et al., 2009). Ce constat est aussi applicable en réponse à un traitement par du resvératrol puisqu'en dépit de l'induction de PGC-1 $\alpha$  dans le muscle ou le tissu adipeux brun, celui-ci est inefficace dans le cœur et le foie (Lagouge et al., 2006). A l'heure actuelle, l'induction de PGC-1 $\alpha$  dans le cœur a seulement été observée en réponse à la restriction calorique chez la souris (Nisoli et al., 2005). L'ensemble de ces données suggère donc une tissu-spécificité de l'induction de PGC-1 $\alpha$ , ainsi que très probablement la mise en place de mécanismes de régulation distincts propres à chaque tissu.

La place centrale de PGC-1 $\alpha$  dans le cœur n'est cependant pas à exclure puisque de nombreuses évidences montrent un rôle clé de ce facteur dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale cardiaque tant d'un point de vue physiologique que physiopathologique. En effet, une surexpression de PGC-1 $\alpha$  cardiaque-spécifique conduit à une induction de la biogenèse mitochondriale (Russell et al., 2004). A l'opposé, lorsque l'expression de celui-ci est inactivée, la biogenèse mitochondriale et plus largement la fonction mitochondriale sont altérées (Leone et al., 2005; Arany et al., 2005; Lehman et al., 2008). En outre, son expression a été montrée comme diminuée dans de nombreux modèles expérimentaux d'IC (Garnier et al., 2003; Zoll et al., 2006; Faerber et al., 2011) ainsi que chez l'homme présentant une défaillance cardiaque (Sebastiani et al., 2007; Garnier et al., 2009). L'ensemble de ces résultats confortent le rôle central de PGC-1 $\alpha$  dans la physiologie cardiaque. Sa dérégulation étant fortement associée au développement de l'IC et celui-ci étant un acteur moléculaire central dans le contrôle du métabolisme énergétique, il apparait comme une cible thérapeutique de choix.

Afin de mieux connaître les régulations de PGC-1 $\alpha$  dans un contexte cardiaque spécifique et de pouvoir à plus long terme identifier des agents pharmacologiques capables d'activer PGC-1 $\alpha$ , un test cellulaire robotisé de criblage a été développé. Celui-ci repose sur l'expression de manière stable d'une luciférase sécrétée sous le contrôle strict du promoteur humain de PGC-1 $\alpha$  dans une lignée cellulaire cardiomyoblastique de rat : les H9c2.

## **II) Résultats et discussion**

Le promoteur humain de PGC-1 $\alpha$  (2.7Kb) a été cloné dans un vecteur plasmidique en amont de l'ADNc de la Gaussia luciférase (GLuc). La construction ainsi obtenue a été transfectée de manière stable dans les H9c2 et la mesure de l'activité de la GLuc permet de refléter l'activation du promoteur. Afin d'être dans un contexte phénotypique le plus proche de la cellule cardiaque, la lignée est mise en différenciation pendant 7 jours dans un milieu de culture supplémenté de sérum de cheval à 1 %. Suite à ce traitement, l'état de différenciation des cellules est évalué par mesure de l'expression endogène de certains marqueurs cardiaques tels que la troponine T ou encore la sous-unité du canal calcique de type L : Cacna1c. Dans de telles conditions, leur expression est augmentée respectivement par 5 et par 15, signe de l'acquisition d'un phénotype se rapprochant de celui de cellules cardiaques.

Afin de valider ce test comme pertinent pour mettre en avant les régulations de PGC-1 $\alpha$  dans un contexte cardiaque et de l'utiliser par la suite pour d'autres criblages, une sélection de 80 composés issus de la chimiothèque LIGENDO (Greenpharma) a été effectuée. Ces composés ont été testés en quadruplicate sur l'activité de la GLuc de façon à établir une validation statistique à posteriori. Par ailleurs, la sélection d'un hit ou molécule activatrice de PGC-1 $\alpha$  repose d'une part sur une augmentation de l'activité GLuc statistiquement différente des contrôles, mais également via la mesure de l'expression endogène de l'ARNm de la GLuc qui doit être supérieure à une valeur seuil fixée à 1,3. Cette étape de sélection a permis de sélectionner 25 hits qui par ailleurs ont été validés comme non toxiques sur les cellules.

L'étude des caractéristiques chimiques des hits a permis notamment l'identification de 3 familles à savoir : les hormones stéroïdiennes, les acides gras et les vitamines B. Ces composés ont été testés une seconde fois dans les mêmes conditions en réalisant une dose-réponse de façon à valider leur effet, mais également dans le but de sélectionner une concentration optimale pour les validations ultérieures sur les cardiomyocytes de rat adulte.

L'intérêt d'une validation sur cardiomyocytes de rat adulte est multiple. Tout d'abord, cette validation secondaire est indispensable pour valider la pertinence du test cellulaire robotisé. Par ailleurs, l'induction de PGC-1 $\alpha$  n'a d'intérêt que si elle est fonctionnelle et se répercute sur l'ensemble de la cascade transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale. Dans cette optique, deux représentants de chaque famille ont été testés : la progestérone 1 nM et le  $\beta$ -œstradiol 0.1 nM pour les hormones stéroïdiennes, l'acide linoléique 1  $\mu$ M et le palmitate 100 nM pour les acides gras et la cobalamine 30  $\mu$ M et la pyridoxine 100  $\mu$ M pour

les vitamines B. L'augmentation de l'expression en ARNm de PGC-1 $\alpha$  ainsi que de ces cibles, telles que NRF2, ERR $\alpha$ , Tfam, COXI et COXIV, permet de valider ces molécules comme activatrices sur l'expression de PGC-1 $\alpha$  et plus généralement sur la biogenèse mitochondriale.

De plus, cette induction de la biogenèse mitochondriale est associée avec une augmentation de la consommation mitochondriale en O<sub>2</sub> par les H9c2 traitées pendant 72 heures par la progestérone, la pyridoxine ou l'acide linoléique aux doses précédemment indiquées.

### **III) Conclusion**

L'ensemble de ces travaux permet donc de conclure quant à la pertinence du test cellulaire de criblage pour identifier des activateurs de PGC-1 $\alpha$  fonctionnels dans le cœur pour induire la biogenèse mitochondriale. D'autre part, l'identification de ces 3 familles ouvre sur d'intéressantes perspectives d'un point de vue physiologique pour décrypter les mécanismes cellulaires mis en jeu. A plus long terme, ces validations permettent de justifier de nouveaux criblages dans l'espoir d'identifier un composé pharmacologique capable d'augmenter l'expression de PGC-1 $\alpha$  et d'améliorer la fonction mitochondriale dans un contexte pathologique où celle-ci est déficiente, comme dans l'IC.

1 **A cardiac-specific robotized cellular assay identified families of human ligands as**  
2 **inducers of PGC-1 $\alpha$  expression and mitochondrial biogenesis**

3  
4 Short title: Screening for inducers of mitochondrial biogenesis

5  
6 Matthieu Ruiz<sup>1</sup>, Delphine Courilleau<sup>2</sup>, Jean-Christophe Jullian<sup>2,3</sup>, Dominique Fortin<sup>1</sup>, Renée  
7 Ventura-Clapier<sup>1</sup>, Jean-Paul Blondeau<sup>2</sup>, Anne Garnier<sup>1</sup>

8  
9 <sup>1</sup>INSERM, U-769, Univ Paris-Sud F-92296 Châtenay-Malabry, France;

10 <sup>2</sup>IFR141, CIBLOT platform, Univ Paris-Sud F-92296 Châtenay-Malabry, France;

11 <sup>3</sup>BIOCIS, UMR 8076, Univ Paris-Sud F-92296 Châtenay-Malabry, France.

12  
13 **Word count:** 7762

14 Address for correspondence: Dr Anne Garnier

15 U-769 INSERM

16 Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud

17 5 rue J-B Clément, 92296 Châtenay-Malabry

18 France

19 Tel.: (33-1) 46.83.52.49.

20 Fax: (33-1) 46.83.54.75.

21 E-mail: [anne.garnier@u-psud.fr](mailto:anne.garnier@u-psud.fr)

22 **Author contribution:** Conceived and designed the experiments: MR, DC, JCJ, RVC, JPB,  
23 AG. Performed the experiments: MR, DC, JCJ, DF, AG. Analyzed the data: MR, DC, DF,  
24 JPB, AG. Contributed reagents/materials/analysis tools: MR, DC, JCJ, RVC, JPB, AG. Wrote  
25 the paper: MR, RVC, AG.

26 **Abstract**

27 **Background:** Mitochondrial function is dramatically altered in heart failure (HF).  
28 This is associated with a decrease in the expression of the transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$ ,  
29 which plays a key role in the coordination of energy metabolism. Identification of compounds  
30 able to activate PGC-1 $\alpha$  transcription could be of future therapeutic significance.

31 **Methodology/Principal findings:** We thus developed a robotized cellular assay to  
32 screen molecules in order to identify new activators of PGC-1 $\alpha$  in a cardiac-like cell line.  
33 This screening assay was based on both the assessment of activity and gene expression of a  
34 secreted luciferase under the control of the human PGC-1 $\alpha$  promoter, stably expressed in  
35 H9c2 cells. We screened part of a library of human endogenous ligands and steroid hormones,  
36 B vitamins and fatty acids were identified as activators of PGC-1 $\alpha$  expression. The most  
37 responsive compounds of these families were then tested for PGC-1 $\alpha$  gene expression in adult  
38 rat cardiomyocytes. These data highly confirmed the primary screening, and the increase in  
39 PGC-1 $\alpha$  mRNA correlated with an increase in several downstream markers of mitochondrial  
40 biogenesis. Moreover, respiration rates of H9c2 cells treated with these compounds were  
41 increased evidencing their effectiveness on mitochondrial biogenesis.

42 **Conclusions/Significance:** Using our cellular reporter assay we could identify three  
43 original families, able to activate mitochondrial biogenesis both in cell line and adult  
44 cardiomyocytes. This first screening can be extended to chemical libraries in order to increase  
45 our knowledge on PGC-1 $\alpha$  regulation in the heart and to identify potential therapeutic  
46 compounds able to improve mitochondrial function in HF.

47

## 48 INTRODUCTION

49 In a highly oxidative tissue like the heart, mitochondria play an essential role to  
50 continuously adapt energy production to energy consumption for physiological functions.  
51 Muscle oxidative capacity and thus mitochondrial content largely depend on mitochondrial  
52 biogenesis and are linked to the activity of the transcriptional coactivator peroxisome  
53 proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) that is considered as the master  
54 regulator of energy metabolism [1]. In many tissues, an abnormal regulation of PGC-1 $\alpha$   
55 results in pathological consequences and we and others have shown that heart failure is tightly  
56 associated with a decrease in PGC-1 $\alpha$  mRNA and protein expression in different rodent  
57 models [2,3,4] or in humans [5,6] leading to energetic deficiency of the myocardium, while  
58 other studies pointed to a deficit of PGC-1 $\alpha$  coactivating targets involved in mitochondrial  
59 biogenesis and mitochondrial DNA replication both in humans [7,8] and animal models [8].  
60 These alterations are accompanied by a deregulation of several mitochondrial pathways  
61 including, fatty acid utilization, mitochondrial biogenesis, and detoxification pathways.  
62 Accordingly, positive modulators of PGC-1 $\alpha$  and its transcriptional cascade can be proposed  
63 as potential therapy [9,10] to globally improve mitochondrial function and energy  
64 metabolism.

65 The mitochondrial genetic program requires activation of both the nuclear and  
66 mitochondrial genomes. Nuclear gene expression is under the control of transcription factors  
67 like the nuclear respiratory factors (NRFs), inducing the expression of the mitochondrial  
68 transcription factor A (Tfam). Tfam controls the replication and the transcription of the  
69 mitochondrial DNA. The coordination of both nuclear and mitochondrial genomes is  
70 orchestrated by PGC-1 $\alpha$  which can stimulate the expression of nuclear-encoded transcription  
71 factors and co-activate them, thereby enhancing their transcriptional activity. PGC-1 $\alpha$   
72 expression and activity and mitochondrial biogenesis increase in different tissues in response

73 to physiological stimuli that induce an increase in mitochondrial energy demand: endurance  
74 exercise training [11,12], caloric restriction [13] or cold exposure [14]. These metabolic  
75 adaptations controlled by PGC-1 $\alpha$  have been largely described in skeletal muscle, in brown  
76 fat and liver but with different profiles [15]. Exercise capacity correlates with PGC-1 $\alpha$   
77 expression in human skeletal muscle [16] but exercise training does not induce a relative  
78 increase in PGC-1 $\alpha$  in the heart [17]. Cold exposure induces PGC-1 $\alpha$  both in skeletal muscle  
79 and brown fat but not in brain and heart [14]. Resveratrol leads to an increase in PGC-1 $\alpha$   
80 activity in skeletal muscle and brown adipose tissue but again not in the heart or the liver [18].  
81 Finally, calorie restriction increases PGC-1 $\alpha$  expression in all studied tissues including the  
82 heart [19]. Collectively, this highlights a tissue and stimulus-specific regulation of PGC-1 $\alpha$   
83 that precludes extrapolating our knowledge of PGC-1 $\alpha$  regulation from one tissue to the other.

84 In the heart, it is widely accepted that PGC-1 $\alpha$  controls energy state and mitochondrial  
85 biogenesis, and the knowledge acquired with gain and loss of function experiments comfort  
86 this link. PGC-1 $\alpha$  null mice exhibit a decrease in oxidative capacity accompanied by a switch  
87 in substrate utilization from fatty acid to glucose [20,21]. This mitochondrial dysfunction  
88 resulting from a decrease in mitochondrial biogenesis was associated with the development of  
89 a cardiomyopathy and with an increase in heart failure markers and a reduction in fractional  
90 shortening [22]. Identification of activators of PGC-1 $\alpha$  expression and mitochondrial  
91 biogenesis in adult cardiomyocyte is thus necessary to develop a new therapeutic strategy to  
92 counteract the metabolic failure of the failing heart.

93 Thus, to identify new inducers of PGC-1 $\alpha$  expression in a cardiac background, we  
94 developed a “cardiac like” cell line gene reporter assay based on the expression of a secreted  
95 luciferase under the control of the human promoter of PGC-1 $\alpha$ . We used this construction to  
96 screen a human ligand library with the following steps: a double primary screen based on  
97 luciferase activity and luciferase gene expression measurements, a dose-response validation, a



98 toxicity test, a secondary validation in adult rat cardiomyocytes based on the expression of the  
99 endogenous PGC-1 $\alpha$  and of its downstream targets, and finally a functional validation on  
100 mitochondrial respiration in treated H9c2 cells.

## 101 **RESULTS**

### 102 **Stable cell line development and characterization**

103 Establishing a cell-based screening assay in adult rat cardiomyocytes is not  
104 straightforward. Adult cardiomyocytes are difficult to work with because they do not divide,  
105 they cannot be used for more than 48 hours in culture, the yield of cell dissociation is not  
106 sufficient to pretend to a robotized assay and finally because these cells are not transfectable  
107 and need adenoviral infection [23]. In addition, the use of primary cells would necessitate a  
108 large number of animals that raises an ethical issue. A screening assay based on endogenous  
109 PGC-1 $\alpha$  mRNA expression was described for satellite skeletal muscle cells [24]. However  
110 such a strategy is not applicable due to the absence of satellite cells in cardiac muscle. We  
111 thus selected a myoblast cell line the H9c2 that is derived from embryonic BD1X rat heart  
112 tissue. This cell line was chosen because it is the only “ventricular-like” cell line that is  
113 suitable for a robotized assay. Moreover these cells are easily transfectable and allow the  
114 establishment of a stable cell line.

115 H9c2 cells were maintained in the proliferative state in the presence of 10% FBS and  
116 proliferation was stopped by reducing serum concentration. Differentiation in a “cardiac like”  
117 phenotype was induced either in low FBS culture medium supplemented with retinoic acid  
118 (RA) [25] or with low horse serum culture medium [26]. After 6-7 days in the differentiation  
119 media, the gene expression of cardiac phenotype markers like cardiac troponin T (TnT) and  
120 cardiac ( $\alpha_{1C}$ ) L-type Ca<sup>2+</sup> channel (Cacna1c) was measured. A 5- and 15-fold increase in the  
121 expression of TnT and Cacna1c respectively was observed in the two differentiation media  
122 (Figure 2A). This cell line presented however a very low endogenous PGC-1 $\alpha$  mRNA content  
123 compared to adult or even neonatal cardiomyocytes (Figure 2B). We thus developed a gene  
124 reporter cell line for PGC-1 $\alpha$  expression to get a more robust and specific assay.

125 For this purpose, the proximal 2.7 kb human promoter of PGC-1 $\alpha$  was amplified and  
126 cloned in a GLuc basic vector. This length of promoter was chosen according to the literature  
127 because it integrates all the responsive elements actually known to be involved in PGC-1 $\alpha$   
128 regulation in skeletal muscle or adipocytes [27,28]. Studies with the gene reporter technology  
129 classically use a vector coding for Renilla or Firefly Luciferase that necessitates a step of cell  
130 lysis before the measurement of the luminescence production. The originality of GLuc is  
131 based on the presence of a secretion signal sequence in the cDNA coding for GLuc [29]. This  
132 secretion allows to measure luciferase activity in the culture medium thus allowing cells to be  
133 kept alive for GLuc mRNA measurement or viability assay in the same well.

134 The stable cell line was established using Fugene HD technology and geneticin to achieve  
135 a selective pressure. After 15 days of selection, basal GLuc activity was maintained for  
136 several passages. To take into account chromatin modifications and to promote multiple sites  
137 of integration in H9c2 genome, we chose to work with a pool of selected cells instead of a  
138 stable clone.

139 In order to select a positive control, different known inducers of PGC-1 $\alpha$  expression in  
140 skeletal muscle cells or adipocytes as for example forskolin, were tested but failed to induce  
141 GLuc expression in our cardiac model. The functionality of our construction PGC-1 $\alpha$ /GLuc  
142 was thus validated with FBS which has emerged as a positive control because it contains a  
143 mixture of growth factors and hormones. A 0.05% FBS was chosen as it gave the maximal  
144 induction of G-Luc activity with the minimal FBS concentration. After differentiation, 0.05%  
145 FBS was able to induce an 80% increase in GLuc activity under the control of the PGC-1 $\alpha$   
146 promoter and a two fold induction of GLuc mRNA expression (Figure 2C). Taken together,  
147 these results show that we have established a functional stable “cardiac-like” cell line  
148 expressing a reporter gene under the control of the human PGC-1 $\alpha$  promoter.

149

## 150 **General results of the primary screening and identification of positive hits**

151 For the first screening assay, we used a robotized cellular assay (RCA) method to  
152 screen a selection of compounds from the LIGENDO library and of potential interest. This  
153 library is composed of large molecular diversity of metabolite-like compounds. Eighty  
154 compounds were thus tested in the first-round screen for GLuc activity (global results are  
155 presented in Table S1). Then the second-round screen was performed to measure GLuc  
156 mRNA expression. Molecules were defined as positive hits for PGC-1 $\alpha$  activation when  
157 GLuc activity was statistically different from that of controls and was associated with an  
158 increase in GLuc mRNA expression above a threshold of 1.3. The correlation between GLuc  
159 activity and mRNA expression (Figure 3) showed that among the 80 selected compounds, 25  
160 could be defined as activator hits ( $p < 0.01$ ) (Table S3). Eleven molecules belonged to three  
161 major families of compounds: B vitamins, steroid hormones and fatty acids, and presented a  
162 range of dynamic response from 1.13 to 1.72 for GLuc activity and from 1.52 to 4.58 for  
163 GLuc mRNA (Table 1). None of these molecules induced cellular toxicity. Figure 4 illustrates  
164 the response of representative human ligands of each family with a positive effect on GLuc  
165 activity and GLuc mRNA expression. On the figure are indicated the concentrations  
166 calculated from the amount and molecular weight of the compounds used in the first screen.

167 To validate these findings, a new plate containing some of these positive compounds  
168 from commercial provenance was generated and different doses was tested (Figure 5). For  
169 each compound and each dose, and based on either GLuc activity or gene expression, we  
170 confirmed 1 of 2 vitamins: pyridoxine at the dose of 100  $\mu$ M (Figure 5A), 1 of 4 steroid  
171 hormones: progesterone at 1 nM (Figure 5B) and 2 of 3 fatty acids: linoleic acid and palmitate  
172 at 1  $\mu$ M (Figure 5C) and 100 nM (Figure 5D) respectively. These four compounds were then  
173 chosen to perform experiments in adult rat cardiomyocytes at the indicated concentrations.

174

175 **Functional confirmation in H9c2 cells on cellular respiration**

176 To examine whether the activation of mitochondrial biogenesis genetic program by the  
177 selected compounds may lead to a physiological increase in oxidative phosphorylation, total  
178 respiration was measured (Figure 6A) in permeabilized cells. After a 3-day treatment with  
179 linoleic acid, pyridoxine or progesterone, cellular O<sub>2</sub> consumption was measured. Linoleic  
180 acid led to a significant 10% increase in total respiration, while progesterone and pyridoxine  
181 induced a 40% and 30% increase respectively.

182 To ensure that our positive hits were not able to induce growth or cell proliferation,  
183 total protein (Figure 6B) and DNA contents (Figure 6C) were measured after 9 or 72 hours  
184 treatment with linoleic acid, pyridoxine or progesterone. No significant difference was  
185 observed compared to non treated cells for total protein content as well as for DNA content.  
186 Thus, these results suggested that the effects of these positive hits on GLuc activity and  
187 mRNA expression in the first screen (9 hours treatment) or on cellular respiration (72 hours  
188 treatment) were not related to increase in cellular activity.

189

190 **Secondary validation in adult rat cardiomyocytes: mRNA expression of endogenous**  
191 **PGC-1 $\alpha$  and its downstream targets**

192 To ascertain the relevance in adult cardiomyocytes of the selected hits, obtained using  
193 the reporter gene for PGC-1 $\alpha$  expression in the “cardiac-like” cell line, their effectiveness was  
194 assessed on the endogenous PGC-1 $\alpha$  mRNA expression of adult rat cardiomyocytes treated  
195 for 9 or 24 hours. As  $\beta$ -estradiol is known to be an activator of PGC-1 $\alpha$  [30] and deficiencies  
196 in cobalamine (B-vitamin) are associated with a decrease in mitochondrial mRNA content  
197 suggesting a link between cobalamine and mitochondrial biogenesis [31], we included beta-  
198 estradiol and cobalamine in this validation test. Endogenous PGC-1 $\alpha$  transcription was  
199 increased with all selected molecules (Figures 7, 8 and 9). To check whether this

200 transcriptional effect led to an increase in PGC-1 $\alpha$  activity, mRNA expression of its  
201 downstream targets was measured. ERR $\alpha$  and NRF2, two factors activated and co-activated  
202 by PGC-1 $\alpha$  and classically used as markers of PGC-1 $\alpha$  activation were increased. This  
203 activation induced the downward expression of Tfam and of COXI and COXIV, two subunits  
204 of the complex IV of the mitochondrial respiratory chain encoded respectively by the  
205 mitochondrial and the nuclear genomes, evidencing a global increase in mitochondrial  
206 biogenesis.

207 Steroid hormones led to a rapid but transient activation of PGC-1 $\alpha$  and its downstream  
208 targets (Figures 7A and 7B respectively for progesterone and beta-estradiol). Fatty acids, and  
209 notably linoleic acid, exhibited the strongest effect that was maintained at 24 hours (Figures  
210 8A and 8B). B vitamins effect appeared delayed as PGC-1 $\alpha$  was induced after 9 hours  
211 stimulation but totally returned to control at 24 hours stimulation, whereas mitochondrial  
212 biogenesis markers were activated between 9 and 24 hours (Figures 9A and 9B). Because  
213 PPAR $\alpha$  is known to be activated by PGC-1 $\alpha$  and fatty acids, its expression was also  
214 measured. Linoleic acid induced a huge increase in PPAR $\alpha$  and its known targets like  
215 ACADM and PDK4 (Figure 8A). In all conditions, LDH activity measured in the supernatant  
216 confirmed the non-toxicity in cardiomyocytes (data not shown).

217 Taken together, these data indicate that treating cells with these ligands induces a gene  
218 program involved in mitochondrial biogenesis and that the results obtained with our reporter  
219 assay in H9c2 cell line could be extrapolated to adult cardiomyocytes. Moreover the 2.7 kb  
220 promoter fragment appears to have a sufficient length to recapitulate endogenous gene  
221 activation.

222

223 **Effect on PGC-1 $\beta$  transcription**

224           Because PGC-1 $\beta$ , the second member of the PGC-1 family, appears to have a large  
225 overlapping role with PGC-1 $\alpha$  expression and because its expression is also decreased in  
226 heart failure [10,32], we tested whether compounds able to activate the  $\alpha$  isoform will be also  
227 effective on the  $\beta$  isoform. Among steroid hormones, only  $\beta$ -estradiol presented a delayed  
228 positive effect on PGC-1 $\beta$  expression at 24 hours while PGC-1 $\alpha$  expression was already  
229 increased at 9 hours and maintained at 24 hours (Figure 7B). On the contrary, progesterone  
230 did not induce PGC-1 $\beta$  expression and thus appeared to be PGC-1 $\alpha$  specific (Figure 7A).  
231 Only linoleic acid activated both PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\beta$  expression (Figures 8A).

232 **DISCUSSION**

233 In this study we developed a cellular reporter gene assay to find specific activators of  
234 PGC-1 $\alpha$  in a cardiac background. This screening assay allowed preselecting a set of hits able  
235 to induce GLuc activity and mRNA expression in response to activation of the human PGC-  
236 1 $\alpha$  promoter. With the ability of GLuc to be secreted, in the same test we could perform  
237 viability assay to select compounds with low toxicity. This strategy was largely validated by  
238 its effective transposition in adult rat cardiomyocytes. Being able to select potential cardiac  
239 activators of PGC-1 $\alpha$  offers great possibilities, in particular to get insights into the  
240 physiological modulation of PGC-1 $\alpha$  in adult heart and in a long term strategy to be able to  
241 select drugs with potential pharmaceutical action in a clinical perspective.

242 The H9c2 cell line, by its ability to acquire a “cardiac like” phenotype allows assessing  
243 the specificity of PGC-1 $\alpha$  regulation in the heart. However this robotized cellular assay is not  
244 really suitable for high throughput screening due to the need of quadruplicate of GLuc activity  
245 measurements for statistical robustness. Indeed, due to the weak dynamic range of induction,  
246 it was not possible to establish an acceptable Z' factor, we thus adapted the test with a post-  
247 hoc statistical analysis on four repeated measurements. Coupling GLuc mRNA expression to  
248 its activity allowed strengthening the reliability of the test. The strategy was finally validated  
249 in adult rat cardiomyocytes where all selected compounds led to PGC-1 $\alpha$  activation, the  
250 induction of its downstream targets, and upregulation of mitochondrial biogenesis. For  
251 example, the increased expression of a nuclear encoded subunit of complex IV of the  
252 respiratory chain, COXIV and of the mitochondrial transcription factor Tfam, was linked to  
253 NRF2 and ERR $\alpha$  induction, while the mitochondria-encoded COXI subunit was linked to  
254 Tfam induction [33].



255 We chose at first to screen a selection of compounds from a human ligand library to  
256 validate our strategy and to identify physiologically relevant activators of PGC-1 $\alpha$  expression  
257 in a cardiac background. From this first screening, three families could be identified.

258 Among fatty acids, linoleic acid appeared as an effective inducer of all mitochondrial  
259 biogenesis markers by activating both ERR $\alpha$  and NRF2 expression. In addition a strong  
260 activation of PPAR $\alpha$  expression leading to the induction of its target genes like ACADM and  
261 PDK4 was observed. Palmitate was less efficient than linoleic acid in activating mitochondrial  
262 biogenesis. This family led to the rapid induction of mitochondrial biogenesis after 9 hours of  
263 stimulation. Interestingly, the expression of PGC-1 $\beta$  was also notably increased by linoleic  
264 acid. Long chain fatty acids are the preferential agonists of the nuclear receptor PPAR $\alpha$  [34].  
265 They increase PPAR $\alpha$  expression, and that of its target genes involved in the binding,  
266 transport and oxidation of fatty acid as well as mitochondrial biogenesis [35,36]. In addition, a  
267 recent study described a link between fatty acid content, PPAR $\alpha$  activation and up-regulation  
268 of PGC-1 $\alpha$  and  $\beta$ , leading to mitochondrial biogenesis in the heart [37] suggesting that  
269 PPAR $\alpha$  activation could be responsible for PGC-1 $\alpha$  and  $\beta$  induction. Interestingly, a  
270 cardioprotective effect of fatty acids is increasingly reported both in experimental models  
271 [38,39] of heart failure and human studies [40,41]. Moreover, we recently showed that the  
272 cardioprotective effect of resveratrol was associated with increased expression of the PPAR $\alpha$   
273 axis, increased fatty acid oxidation and mitochondrial respiration [42]. It can thus be proposed  
274 that the beneficial effects of fatty acids on mitochondrial biogenesis and function may take  
275 part in these cardioprotective effects.

276 Different steroid hormones were identified as potential activators of PGC-1 $\alpha$   
277 expression and mitochondrial biogenesis in the heart. Interestingly, the expression of PGC-1 $\beta$   
278 was also increased by  $\beta$ -estradiol but later than PGC-1 $\alpha$ . Progesterone failed to induce PGC-  
279 1 $\beta$  expression, proposing this molecule as the only compound specific for PGC-1 $\alpha$  in this

280 study. These results suggest a differential regulation of the two co-activators depending on the  
281 stimulus. These last years, a concept of sex and gender difference in the outcome of  
282 cardiovascular diseases highlighted the protective effect of female hormone impregnation.  
283 Indeed, women are better protected against the development of myocardial failure than men  
284 and notably under pressure overload [43,44]. Interestingly, in a model of heart failure in mice,  
285 a higher expression of a panel of genes controlling mitochondrial function including PGC-1 $\alpha$   
286 was observed in females than males and a binding site for ER $\alpha$  was identified in the PGC-1 $\alpha$   
287 promoter [30]. Administration of 17 $\beta$ -oestradiol after trauma-hemorrhage restores depressed  
288 cardiac function by an ER-mediated up-regulation of PGC-1 $\alpha$  [45], suggesting that ER $\beta$ -  
289 dependent PGC-1 $\alpha$ -activation is involved in cardioprotection [46]. The possible involvement  
290 of progesterone in mitochondrial biogenesis is poorly documented. Progesterone was shown  
291 to regulate some genes of oxidative metabolism in brain and brown adipose tissues [47].

292 The third identified family was B vitamins, for which we observed a global increase in  
293 mitochondrial biogenesis markers, primarily linked to PGC-1 $\alpha$  stimulation. Moreover,  
294 activation of Tfam and COXI seemed to be linked to ERR $\alpha$  expression. The present result  
295 showing a positive effect of B vitamins on mitochondrial biogenesis appears to be an original  
296 finding as nothing is known in the literature. However, it can be speculated that B vitamins  
297 like cobalamine or pyridoxine being methyl donors they are needed for the remethylation of  
298 homocysteine into methionine. A deficiency in B vitamins has been associated with a  
299 decrease in methionine conversion in favor of homocysteine accumulation called  
300 hyperhomocysteinemia (HHCY) [48,49]. In cardiovascular diseases, HHCY represents a new  
301 recognized risk marker because its increase is associated with heart failure severity [50,51]. B  
302 vitamin deficiency can induce mitochondrial disorders [31]. Hepatic cobalamine deficiency  
303 leads to accumulation of polycistronic mitochondrial RNAs and decreased mitochondrial  
304 mRNA content [52]. In a cellular model of Parkinson, treatment with high doses of B

305 vitamins inhibits the toxicity induced by rotenone, an inhibitor of complex I of the respiratory  
306 chain. The amelioration of mitochondrial dysfunction is associated with an increase in PGC-  
307 1 $\alpha$  expression [53]. Finally, in a model of cardiomyopathy induced by methyl donor  
308 deficiency, an imbalance in methylation/acetylation of PGC-1 $\alpha$  leads to a decrease in its  
309 activity [54]. Therefore, B vitamins supplementation would improve cardiac function through  
310 mitochondrial function depending on PGC-1 $\alpha$  activation.

311 We have thus identified three families of compounds able to activate PGC-1 $\alpha$   
312 expression in a cardiac-like cell line that were validated in adult cardiomyocytes. Interestingly  
313 these activators were able to activate the transcriptional cascade of mitochondrial biogenesis  
314 among which ERR $\alpha$  that was also identified to play a pivotal role in the pathophysiology of  
315 heart failure [7,8]. Finally, because H9c2 cells or adult cardiac myocytes produce/consume far  
316 less high energy as *in vivo*, and because of the interference with other cell types and organs,  
317 these targets should be further validated *in vivo* under physiological condition and heart  
318 failure.

319 We describe here the effectiveness of a cardiac background robotized cellular assay  
320 for PGC-1 $\alpha$  expression. By screening a human ligand library this assay allowed to identify  
321 new families of human ligands able to induce PGC-1 $\alpha$  gene expression and mitochondrial  
322 biogenesis. This assay can be used to screen chemical libraries to find compounds able to  
323 improve mitochondrial function in heart failure. This offers new perspectives to identify new  
324 pathways involved in mitochondrial biogenesis regulation in the heart and in the future to  
325 identify a potential metabolic therapy of heart failure.

## 326 **METHODS**

### 327 **Ethics Statement**

328 All experiments were performed in conformity with the European Community guiding  
329 principles in the care and use of animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament).  
330 Authorizations to conduct animal experiments were obtained from the French “Ministère de  
331 l’Agriculture, de la Pêche et de l’Alimentation” (no. 92-284, June 27, 2007).

332

### 333 **PGC-1 $\alpha$ promoter cloning and plasmid construction**

334 A 2.7 kb fragment of the human PGC-1 $\alpha$  promoter was amplified by PCR using  
335 human genomic DNA (Clontech). PCR primers were designed from the PGC-1 $\alpha$  promoter  
336 sequence (Gen Bank Accession number BD 103728; sense: 5’- GAG TTG ACG AAG GGG  
337 TGA AA - 3’, antisense: 5’ - CAA CCA GCC CCT TAC TGA GA - 3’). This PCR fragment  
338 was first ligated into the pCR-XL-TOPO vector and then subcloned into the *EcoRV*- and *BHI*-  
339 digested sites of the pGLuc-basic vector containing the Gaussia Luciferase (GLuc) reporter  
340 gene (New England Biolabs). This fragment (p2665) contains 2649 base pairs 5’- and 16 base  
341 pairs 3’- relative to the transcription start site and was verified by sequencing.

342

### 343 **Cell culture and treatment**

344 The rat cardiomyocyte derived H9c2 cell line was obtained from ATCC (CRL-1446;  
345 passage 13) and grown in complete medium: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)  
346 with high glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (100  
347 units/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin (PS)) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. When cells  
348 reached 50% confluence, they were switched to the differentiation medium: DMEM  
349 containing 1% horse serum (HS) and antibiotics for 7 days. The medium was changed every 2

350 days to obtain a differentiated “cardiac like” cell line. The cell line was used between passage  
351 20 and 30.

352

### 353 **Transfection and selection of stably transfected cells**

354 Transfection of H9c2 cardiomyoblasts with the PGC-1 $\alpha$  promoter/GLuc DNA (PGC-  
355 1 $\alpha$ /Gluc) was performed using Fugene HD according to the manufacturer’s instructions  
356 (Roche Diagnostics). Cells were cultivated in DMEM supplemented with 10% FBS and  
357 genitacin at 500  $\mu$ g/ml. Geneticin-resistant colonies were selected 10–12 days after  
358 transfection and propagated. The obtained clones were grown in the same medium  
359 supplemented with genitacin at 200  $\mu$ g/ml to maintain sufficient selective pressure.

360

### 361 **General procedure of the robotized cellular assay (RCA)**

362 Before screening, cells were plated into 96-well plates at 2000 cells/well in  
363 quadruplicate with a microfill distributor (BioTek instrument) and cultivated in complete  
364 medium to obtain 50% confluence. After 7 days in differentiation medium, cells were  
365 deprived of serum for 24 hours. Stimulation was performed in DMEM without serum but  
366 supplemented with 0.1% BSA.

367 Six  $\mu$ l of each compound, were pin-transferred into each well to obtain a final median  
368 concentration of 10  $\mu$ mol/L using a Biomek FX (Beckman Coulter) equipped with a 96-pin  
369 array. Each well was treated individually with one molecule. The left column was filled with  
370 DMSO as negative control. Nine hours later, the culture media from the four plates were  
371 transferred into a 384-well plate to measure GLuc activity for the first round screen. These 4  
372 repeats of the experiments allowed to statistically validating our results with the non  
373 parametric Mann and Withney test. One plate was used for the secondary round screen  
374 consisting of mRNA extraction and qPCR measurement of GLuc expression. This double

375 screening assay based on GLuc activity coupled to GLuc mRNA measurement allowed to  
376 define potential hits *i.e.*, PGC-1 $\alpha$  activators. Two other plates were used to evaluate the  
377 toxicity of the molecules using the Alamar blue assay normalized to the DNA content.

378 A flow chart of our strategy is presented in Figure 1.

379

### 380 **Gaussia Luciferase reporter assay**

381 Under the activation of the PGC-1 $\alpha$  promoter upstream of the GLuc gene, this  
382 luciferase was produced and secreted and GLuc activity was directly measured in the cell  
383 culture medium using the Bioluminescence Assay kit (New England Biolabs) according to  
384 the manufacturer procedure in a plate reader (Envision Xcite, Perkin Elmer). In the absence of  
385 bovine serum albumin (BSA) supplementation, a fast degradation of the GLuc was observed.  
386 Thus, all stimulations were performed in the culture medium without FBS and supplemented  
387 with 0.1% BSA.

388

### 389 **RT qPCR measurement**

390 The H9c2 cells were washed twice with PBS and then lysed in 50  $\mu$ l lysis buffer  
391 (QIAGEN). After 5 minutes incubation at room temperature, 40  $\mu$ l cell lysate were transferred  
392 into a 96-well oligo(dT)-coated plate (QIAGEN) and incubated for 60 minutes at room  
393 temperature with constant stirring (100 rpm). The plate was then washed three times with the  
394 washing buffer and reverse transcription was performed in the same wells according to  
395 manufacturer's instructions (BioRad) in 25  $\mu$ l total volume. Five  $\mu$ l of this solution was  
396 transferred to a 96-well qPCR plate (BioRad) and 10  $\mu$ l of buffer mix containing SYBR  
397 Green (BioRad) and PCR primers were added. For adult cardiomyocytes, standard procedures  
398 were used for total RNA extraction (Trizol reagent) and reverse transcription (iScript).  
399 Quantitative real-time PCR was performed by using a CFX96 PCR detection system

400 (BioRad). The qPCR data were analyzed using the standard curve method for adult  
401 cardiomyocytes and the  $\Delta\Delta\text{CT}$  method for GLuc mRNA expression and all other  
402 measurements. Data were normalized using geNorm for cell line comparison and to TBP for  
403 other measurements. The different primers used are listed in Table S2.

404

#### 405 **DNA content measurement**

406 The DNA content was determined as an index of the cell number in each well. Cells  
407 were lysed in 50 $\mu$ l 0.1 N NaOH, 0.1% triton buffer for 45 minutes at 4°C. Twenty  $\mu$ l of each  
408 lysate was transferred to a black 96-plate in duplicate. To quantify double-strand DNA  
409 (Invitrogen), the DNA staining PicoGreen was diluted with Tris-EDTA (10/1 mM) and 100  $\mu$ l  
410 of this solution were added in each well. Fluorescence of PicoGreen was detected using a  
411 Fluorometer (Envision Xcite, Perkin Elmer), with excitation at 485 nm and emission at 520  
412 nm. DNA quantification was performed using a standard curve of salmon sperm DNA at  
413 known concentrations.

414

#### 415 **Alamar blue viability assay**

416 The non-fluorescent dye resazurin also identified as Alamar blue reagent (Sigma), is  
417 converted to red fluorescent resorufin via reduction reactions by metabolically active cells.  
418 The reagent was prepared in DMEM medium without FBS at a concentration of 1  $\mu$ M and  
419 was directly added to the cells for 2 hours incubation. The fluorescence of each well was  
420 quantified in a plate reader (Envision Xcite, Perkin Elmer) with an excitation wavelength of  
421 545 nm and an emission wavelength of 590 nm. Fluorescence was measured immediately  
422 after the addition of the reagent and after the 2 hours incubation. The resulting difference  
423 between these two fluorescence values was calculated.

424

## 425 **Library**

426 A first screen was performed using the Human Endogenous Ligand Library  
427 (LIGENDO, Greenpharma, France) that presents a large molecular diversity of compounds  
428 defined as metabolite-like. Compounds were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at a  
429 concentration of 0.04 mg/ml. In first intention, we screened a selection of 68 compounds from  
430 this library. This library is composed of human ligands that are all believed to be biologically  
431 active. As this was a first trial aimed at validating the strategy, from our knowledge and data  
432 in the literature, we selected in this library compounds that could potentially be active on  
433 energy metabolism. These 68 compounds were chosen among the 420 compounds to avoid  
434 redundancy of molecular types and to ensure a large representation of potentially relevant  
435 metabolic pathways. To design a plate containing 80 compounds, we added 12 other  
436 compounds of potential interest (Table S2). The final dilution was 4.7 µg/ml in each 100 µl  
437 well.

438

## 439 **Total respiration**

440 After 7 days of differentiation, H9c2 cells were treated with the selected molecules in  
441 a differentiation medium supplemented with 0.1% BSA for 3 days. H9c2 cellular respiration  
442 was measured by using an oxygen-sensing Clarke electrode in a respiration medium after 5  
443 minutes of digitonin permeabilization. This respiration medium contained (in mM): 2.77  
444 CaK<sub>2</sub> EGTA, 7.23 K<sub>2</sub>EGTA, 1.38 MgCl<sub>2</sub>, 3 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 imidazole, 20 taurine, 0.5 DTT, 90  
445 K-methanesulfonate, 10 Na-methanesulfonate, 10 glutamate and 4 malate. Values are  
446 normalized to the protein content in each chamber. Proteins are measured using the  
447 bicinchoninic acid protein assay kit (Sigma).

448

## 449 **Adult rat ventricular myocyte isolation**



450 Adult rat ventricular myocytes were isolated using retrograde perfusion of isolated  
451 heart with collagenase [23]. Freshly isolated cardiomyocytes were plated on laminin-coated  
452 culture dishes at a density of  $2 \cdot 10^5$  cells/dish in minimal essential medium (MEM from  
453 SIGMA) supplemented with 2.5% FBS with PS and 2% HEPES for 1 hour and then switched  
454 to serum-free medium for 15 hours. Cells were then treated with the selected compounds for 9  
455 and 24 hours.

456

#### 457 **LDH activity measurement**

458 The compound toxicity was evaluated by measuring lactate dehydrogenase activity in  
459 cardiomyocyte culture medium using a biochemical assay with NADH and pyruvate.  
460 Measurements were performed in duplicate and read at a wavelength of 340 nm with a  
461 spectrophotometer (Uvikon xs, Bioserv).

462

#### 463 **Statistics**

464 All data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. A non parametric Mann and Withney test  
465 was used in all experiments to determine differences between conditions with significance set  
466 at  $p < 0.05$ . For correlation, linear regression curve fit was used.

467

468 **Acknowledgments.** The authors would like to thank Claudine Deloménie (Transcriptomic  
469 platform of IFR141). We thank Rodolphe Fischmeister for continuous support. We are also  
470 grateful to Florence Lefebvre for helpful technical assistance.

471 **Sources of Funding:** This work was supported by grants from “Fondation de France”  
472 (FDF\_R08111LL), IFR 141 of Université Paris-Sud and LabEx LERMIT. Renée Ventura-  
473 Clapier is senior scientist at Centre National de la Recherche Scientifique.

474 **Competing Interests:** The authors have declared that no competing interest exists.

475 **REFERENCE LIST**

476

477 1. Patten IS, Arany Z (2011) PGC-1 coactivators in the cardiovascular system. Trends  
478 Endocrinol *Metab* 2: 90-97.

479 2. Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V et al. (2003) Depressed  
480 mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and  
481 skeletal muscles. *J Physiol* 551:491-501.

482 3. Zoll J, Monassier L, Garnier A, N'Guessan B, Mettauer B et al. (2006) ACE inhibition  
483 prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. *J*  
484 *Appl Physiol* 101:385-91.

485 4. Faerber G, Barreto-Perreia F, Schoepe M, Gilsbach R, Schrepper A et al. (2011)  
486 Induction of heart failure by minimally invasive aortic constriction in mice: reduced  
487 peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator levels and mitochondrial  
488 dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 141:492-500, 500.e1.

489 5. Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C, Borchi E et al. (2007) Induction of  
490 mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial  
491 cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol* 50:1362-9.

492 6. Garnier A, Zoll J, Fortin D, N'Guessan B, Lefebvre F et al. (2009) Control by  
493 circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a  
494 role for endothelin-1 and angiotensin II. *Circ Heart Fail* 2:342-50.

495 7. Karamanlidis G, Nascimben L, Couper GS, Shekar PS, del Monte F et al. (2010)  
496 Defective DNA replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts.  
497 *Circ Res* 106:1541-8.

498 8. Hu X, Xu X, Lu Z, Zhang P, Fassett J et al. (2011) AMP activated protein kinase-alpha2  
499 regulates expression of estrogen-related receptor-alpha, a metabolic transcription factor  
500 related to heart failure development. *Hypertension* 58:696-703.

501 9. Wu Z, Boss O (2007) Targeting PGC-1 alpha to control energy homeostasis. *Expert*  
502 *Opin Ther Targets* 11:1329-38.

503 10. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F (2011) Bioenergetics of the failing

- 504 heart. *Biochim Biophys Acta* 1813:1360-72.
- 505 11. Norrbom J, Sundberg CJ, Ameln H, Kraus WE, Jansson E et al. (2004) PGC-1alpha  
506 mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal  
507 muscle. *J Appl Physiol* 96:189-94.
- 508 12. Safdar A, Little JP, Stokl AJ, Hettinga BP, Akhtar M et al. (2011) Exercise increases  
509 mitochondrial PGC-1alpha content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to  
510 coordinate mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem* 286:10605-17.
- 511 13. Civitarese AE, Smith SR, Ravussin E (2007) Diet, energy metabolism and  
512 mitochondrial biogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:679-87.
- 513 14. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M et al. (1998) A cold-inducible  
514 coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92:829-39.
- 515 15. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J (2011) Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of  
516 mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr* 93:884S-90.
- 517 16. Garnier A, Fortin D, Zoll J, N'Guessan B, Mettauer B et al. (2005) Coordinated changes  
518 in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle.  
519 *FASEB J* 19:43-52.
- 520 17. Rimbaud S, Sanchez H, Garnier A, Fortin D, Bigard X et al. (2009) Stimulus specific  
521 changes of energy metabolism in hypertrophied heart. *J Mol Cell Cardiol* 46:952-9.
- 522 18. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C et al. (2006) Resveratrol  
523 improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating  
524 SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127:1109-22.
- 525 19. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R et al. (2005) Calorie restriction  
526 promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*  
527 310:314-7.
- 528 20. Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR et al. (2005) PGC-1alpha  
529 deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction,  
530 abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 3:e101.

- 531 21. Lehman JJ, Boudina S, Banke NH, Sambandam N, Han X et al. (2008) The  
532 transcriptional coactivator PGC-1alpha is essential for maximal and efficient cardiac  
533 mitochondrial fatty acid oxidation and lipid homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ*  
534 *Physiol* 295:H185-96.
- 535 22. Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C et al. (2005) Transcriptional coactivator  
536 PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell*  
537 *Metab* 1:259-71.
- 538 23. Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM (2011) Methods in cardiomyocyte isolation,  
539 culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 51:288-98.
- 540 24. Arany Z, Wagner BK, Ma Y, Chinsomboon J, Laznik D et al. (2008) Gene expression-  
541 based screening identifies microtubule inhibitors as inducers of PGC-1alpha and  
542 oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4721-6.
- 543 25. Menard C, Pupier S, Mornet D, Kitzmann M, Nargeot J et al. (1999) Modulation of L-  
544 type calcium channel expression during retinoic acid-induced differentiation of H9C2  
545 cardiac cells. *J Biol Chem* 274:29063-70.
- 546 26. Lau SL, Yuen ML, Kou CY, Au KW, Zhou J et al. (2012) Interferons induce the  
547 expression of IFITM1 and IFITM3 and suppress the proliferation of rat neonatal  
548 cardiomyocytes. *J Cell Biochem* 113:841-7.
- 549 27. Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM (2003) An autoregulatory loop  
550 controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha  
551 expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7111-6.
- 552 28. Irrcher I, Ljubcic V, Kirwan AF, Hood DA (2008) AMP-activated protein kinase-  
553 regulated activation of the PGC-1alpha promoter in skeletal muscle cells. *PLoS One*  
554 3:e3614.
- 555 29. Tannous BA (2009) Gaussia luciferase reporter assay for monitoring biological  
556 processes in culture and in vivo. *Nat Protoc* 4:582-91.
- 557 30. Witt H, Schubert C, Jaekel J, Fliegner D, Penkalla A et al. (2008) Sex-specific pathways  
558 in early cardiac response to pressure overload in mice. *J Mol Med (Berl)* 86:1013-24.

- 559 31. Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ (2006) Mitochondrial function  
560 and toxicity: role of B vitamins on the one-carbon transfer pathways. *Chem Biol Interact*  
561 163:113-32.
- 562 32. Rowe GC, Jiang A, Arany Z (2010) PGC-1 coactivators in cardiac development and  
563 disease. *Circ Res* 107:825-38.
- 564 33. Scarpulla RC (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis  
565 and function. *Physiol Rev* 88:611-38.
- 566 34. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG et al. (1999) Molecular  
567 recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell*  
568 3:397-403.
- 569 35. Garcia-Roves P, Huss JM, Han DH, Hancock CR, Iglesias-Gutierrez E et al. (2007)  
570 Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in  
571 skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10709-13.
- 572 36. Bionaz M, Thering BJ, Loor JJ (2012) Fine metabolic regulation in ruminants via  
573 nutrient-gene interactions: saturated long-chain fatty acids increase expression of genes  
574 involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR-alpha  
575 activation. *Br J Nutr* 107:179-91.
- 576 37. Haemmerle G, Moustafa T, Woelkart G, Buttner S, Schmidt A et al. (2011) ATGL-  
577 mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR-alpha and  
578 PGC-1. *Nat Med* 17:1076-85.
- 579 38. Duda MK, O'Shea KM, Lei B, Barrows BR, Azimzadeh AM et al. (2007) Dietary  
580 supplementation with omega-3 PUFA increases adiponectin and attenuates ventricular  
581 remodeling and dysfunction with pressure overload. *Cardiovasc Res* 76:303-10.
- 582 39. Galvao TF, Brown BH, Hecker PA, O'Connell KA, O'Shea KM et al. (2012) High  
583 intake of saturated fat, but not polyunsaturated fat, improves survival in heart failure  
584 despite persistent mitochondrial defects. *Cardiovasc Res* 93:24-32.
- 585 40. Harris WS, Mozaffarian D, Rimm E, Kris-Etherton P, Rudel LL et al. (2009) Omega-6  
586 fatty acids and risk for cardiovascular disease: a science advisory from the American

- 587 Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical  
588 Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on  
589 Epidemiology and Prevention. *Circulation* 119:902-7.
- 590 41. Stanley WC, Dabkowski ER, Ribeiro RF Jr, O'Connell KA (2012) Dietary fat and heart  
591 failure: moving from lipotoxicity to lipoprotection. *Circ Res* 110:764-76.
- 592 42. Rimbaud S, Ruiz M, Piquereau J, Mateo P, Fortin D et al. (2011) Resveratrol improves  
593 survival, hemodynamics and energetics in a rat model of hypertension leading to heart  
594 failure. *PLoS One* 6:e26391.
- 595 43. Carroll JD, Carroll EP, Feldman T, Ward DM, Lang RM et al. (1992) Sex-associated  
596 differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. *Circulation*  
597 86:1099-107.
- 598 44. Regitz-Zagrosek V (2006) Therapeutic implications of the gender-specific aspects of  
599 cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 5:425-38.
- 600 45. Hsieh YC, Yang S, Choudhry MA, Yu HP, Rue LW 3rd et al. (2005) PGC-1  
601 upregulation via estrogen receptors: a common mechanism of salutary effects of  
602 estrogen and flutamide on heart function after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Heart*  
603 *Circ Physiol* 289:H2665-72.
- 604 46. Hsieh YC, Choudhry MA, Yu HP, Shimizu T, Yang S et al. (2006) Inhibition of cardiac  
605 PGC-1 $\alpha$  expression abolishes ER $\beta$  agonist-mediated cardioprotection following  
606 trauma-hemorrhage. *FASEB J* 20:1109-17.
- 607 47. Rodriguez-Cuenca S, Monjo M, Gianotti M, Proenza AM, Roca P (2007) Expression of  
608 mitochondrial biogenesis-signaling factors in brown adipocytes is influenced  
609 specifically by 17 $\beta$ -estradiol, testosterone, and progesterone. *Am J Physiol*  
610 *Endocrinol Metab* 292:E340-6.
- 611 48. Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL et al.  
612 (2007) Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health.  
613 *Hum Reprod Update* 13:225-38.
- 614 49. Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH (2004) Role of hyperhomocysteinemia in

- 615 endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ* 11 Suppl  
616 1:S56-64.
- 617 50. Miche E, Herrmann G, Nowak M, Wirtz U, Tietz M et al. (2006) Effect of an exercise  
618 training program on endothelial dysfunction in diabetic and non-diabetic patients with  
619 severe chronic heart failure. *Clin Res Cardiol* 95 Suppl 1:i117-24.
- 620 51. Maurer M, Burri S, de Marchi S, Hullin R, Martinelli M et al. (2010) Plasma  
621 homocysteine and cardiovascular risk in heart failure with and without cardiorenal  
622 syndrome. *Int J Cardiol* 141:32-8.
- 623 52. Leeds FS, Brass EP (1994) Hepatic cobalamin deficiency induced by  
624 hydroxycobalamin[c-lactam] treatment in rats is associated with decreased  
625 mitochondrial mRNA contents and accumulation of polycistronic mitochondrial RNAs.  
626 *J Biol Chem* 269:3947-51.
- 627 53. Jia H, Liu Z, Li X, Feng Z, Hao J et al. (2010) Synergistic anti-Parkinsonism activity of  
628 high doses of B vitamins in a chronic cellular model. *Neurobiol Aging* 31:636-46.
- 629 54. Garcia MM, Gueant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM et al. (2011)  
630 Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered  
631 methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1. *J Pathol* 225: 324-335.

632

633

634

635

636



637 **FIGURE LEGENDS**

638 **Figure 1: Flow chart describing the Robotized Cellular Assay (RCA).**

639

640 **Figure 2: Characterization of H9c2 cell line.** Differentiation of H9c2 cells with 1% horse  
641 serum (HS) for 6 days induced an increase in cardiac marker expression. (A) mRNA levels of  
642 Cacna1c and cardiac Troponin T normalized to geNorm after differentiation for 7 days with  
643 10 nmol/L retinoic acid (RA) + 1% Fetal Bovine Serum (FBS, grey) or by 1% HS (black)  
644 compared to control cells (white). (N = 6 independent cultures). \*\*\*P<0.005 relative to  
645 proliferative medium condition (B) qPCR results expressed in  $\Delta\Delta CT$  normalized to TBP as  
646 internal control to compare PGC-1 $\alpha$  mRNA expression in different cell types: adult rat  
647 cardiomyocytes (CM), neonatal rat CM, H9c2 non differentiated cells (ND) or differentiated  
648 with RA or HS. (N = 5-7 independent cultures) (C). 0.05% FBS induced an increase in both  
649 Gaussia luciferase (GLuc) activity and GLuc mRNA expression in HS differentiated H9c2  
650 cell line stably transfected with PGC-1 $\alpha$  promoter/GLuc. (N = 6 independent cultures).  
651 \*P<0.05, \*\*P<0.01 relative to control.

652

653 **Figure 3: Correlation between Gaussia luciferase (GLuc) activity and gene expression**  
654 **for positive hits resulting from the primary screen.** Twenty five compounds were  
655 identified as positive hits (black squares). Control values (n=6) were expressed as mean  
656  $\pm$ SEM (white square).

657

658 **Figure 4: Principals selected hits families based on Gaussia luciferase (GLuc) activity**  
659 **and gene expression.** This screen identified three main families inducing PGC-1 $\alpha$  promoter  
660 activation: B vitamins, steroid hormones and fatty acids. (N = 4 for GLuc activity, 1 for

661 mRNA expression). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\* p<0.005 relative to control.

662

663 **Figure 5: Validation of the positive hits selected from the first screen.** GLuc activity (open  
664 bars, N = 4) and mRNA expression (black bars, N = 1) were measured following 9 hours of  
665 treatment with pyridoxine (Figure 5A), progesterone (Figure 5B), linoleic acid (Figure 5C)  
666 and palmitate (Figure 5D) at different concentrations. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005 relative to  
667 control.

668

669 **Figure 6: Functional validation of mitochondrial biogenesis by the measure of cellular**  
670 **respiration in treated-H9c2 cells.** Following 72 hours stimulation with linoleic acid (1  $\mu$ M,  
671 white), progesterone (1 nM, grey) and pyridoxine (100  $\mu$ M, black) respiration rate was  
672 significantly increased compared to non stimulated cells (Figure 6A). Results are normalized  
673 to total protein content and expressed in % of control (N=4 independent cultures). Figure 6B  
674 and 6C illustrated total protein and DNA contents respectively in H9c2 cells treated for 9  
675 hours or 72 hours with the three compounds. \*P<0.05, \*\*P<0.01 between treatment group and  
676 control (dotted line).

677

678 **Figure 7: Validation of steroid hormones in adult rat cardiomyocytes.** Nine (white  
679 columns) and 24 (black columns) hours stimulation with 1 nM progesterone (A) or 0.1 nM  
680 beta-estradiol (B) led to increased mRNA expression. RT-qPCR analysis of genes involved in  
681 mitochondrial biogenesis, normalized to TBP as internal control: PGC-1 $\alpha$  (top left), PGC-1 $\beta$   
682 (top right), transcription factors (bottom left): NRF2 (square), ERR $\alpha$  (triangle) and PPAR $\alpha$   
683 (circle) and downstream targets like Tfam, COXI and COXIV (bottom right). (N=4-5  
684 independent cultures). \*P<0.05, \*\*P<0.01 between treatment and control (dotted line) groups.

685

686 **Figure 8: Validation of fatty acids in adult rat cardiomyocytes.** Nine (white columns) and  
687 24 (black columns) hours stimulation with 1  $\mu$ M linoleic acid (A) or 100 nM palmitic acid  
688 (B). (N=4-5 independent cultures). Legend is as in Figure 7.

689

690 **Figure 9: Validation of B vitamins in adult rat cardiomyocytes.** Nine (white columns) and  
691 24 (black columns) hours stimulation with 100  $\mu$ M pyridoxine (A) or 30  $\mu$ M cobalamine (B).  
692 (N=4-5 independent cultures). Legend is as in Figure 6.

693

#### 694 **SUPPORTING INFORMATION**

695 **Table S1. List of the 62 compounds from Ligendo tested in first intention.** This table  
696 represents the 80 compounds tested with molecule name, structure, molecular weight, assay  
697 concentration, metabolic pathways and fold induction in GLuc activity with the significance.

698

699 **Table S2. List of primers used for qPCR.** TBP indicates TATA binding protein; PGC-1 $\alpha$ ,  
700 peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ; NRF-2, nuclear respiratory factor  
701 2; Tfam, mitochondrial transcription factor A; COX I and COX IV, cytochrome c oxidase  
702 subunits I and IV; ERR $\alpha$ , estrogen related receptor  $\alpha$ ; PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator-  
703 activated receptor  $\alpha$ ; MCAD, medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase; PDK4,  
704 pyruvate dehydrogenase kinase 4; PGC-1 $\beta$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$   
705 coactivator 1 $\beta$ .

706

707 **Table S3. List of the 25 compounds selected as “hits” positives both for GLuc activity**  
708 **and GLuc mRNA expression.** Results are expressed as fold induction both for GLuc activity  
709 (N=4) and Gluc mRNA expression. \*, p<0.05 and \*\*, p<0.01.

710 **Table 1. General results of the primary screening and validation**

<b>Family</b>	<b>N</b>	<b>GLuc activity</b>	<b>P value</b>	<b>GLuc mRNA</b>	<b>Toxicity</b>	<b>Confirmed positives</b>
<b>Vitamins</b>	2	1.60-1.72	<0.05	2.17-2.93	0 of 2	1 of 2
<b>Steroid hormones</b>	4	1.2-1.5	<0.05	1.52-2.52	0 of 4	1 of 4
<b>Fatty acids</b>	5	1.13-1.68	<0.05	1.52-4.58	0 of 5	2 of 3
<b>Others</b>	14	1.22-1.63	<0.05	1.34-5.96	0 of 16	
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>1.13-1.72</b>	<b>&lt;0.05</b>	<b>1.34-5.96</b>	<b>0 of 27</b>	<b>4 of 9</b>

711  
712 N indicates the number of positive hits in respective families. Gaussia Luciferase  
713 (GLuc) activity and gene expression were expressed as fold induction compared to the  
714 average signal of control wells. P value was based on luminescence assay for GLuc activity  
715 (n=4). Toxicity was evaluated by Alamar Blue assay and DNA content. The hit selection  
716 resulting from the primary screen was validated in a repeat of the screen including a dose-  
717 response (confirmed positives).

Figure 1

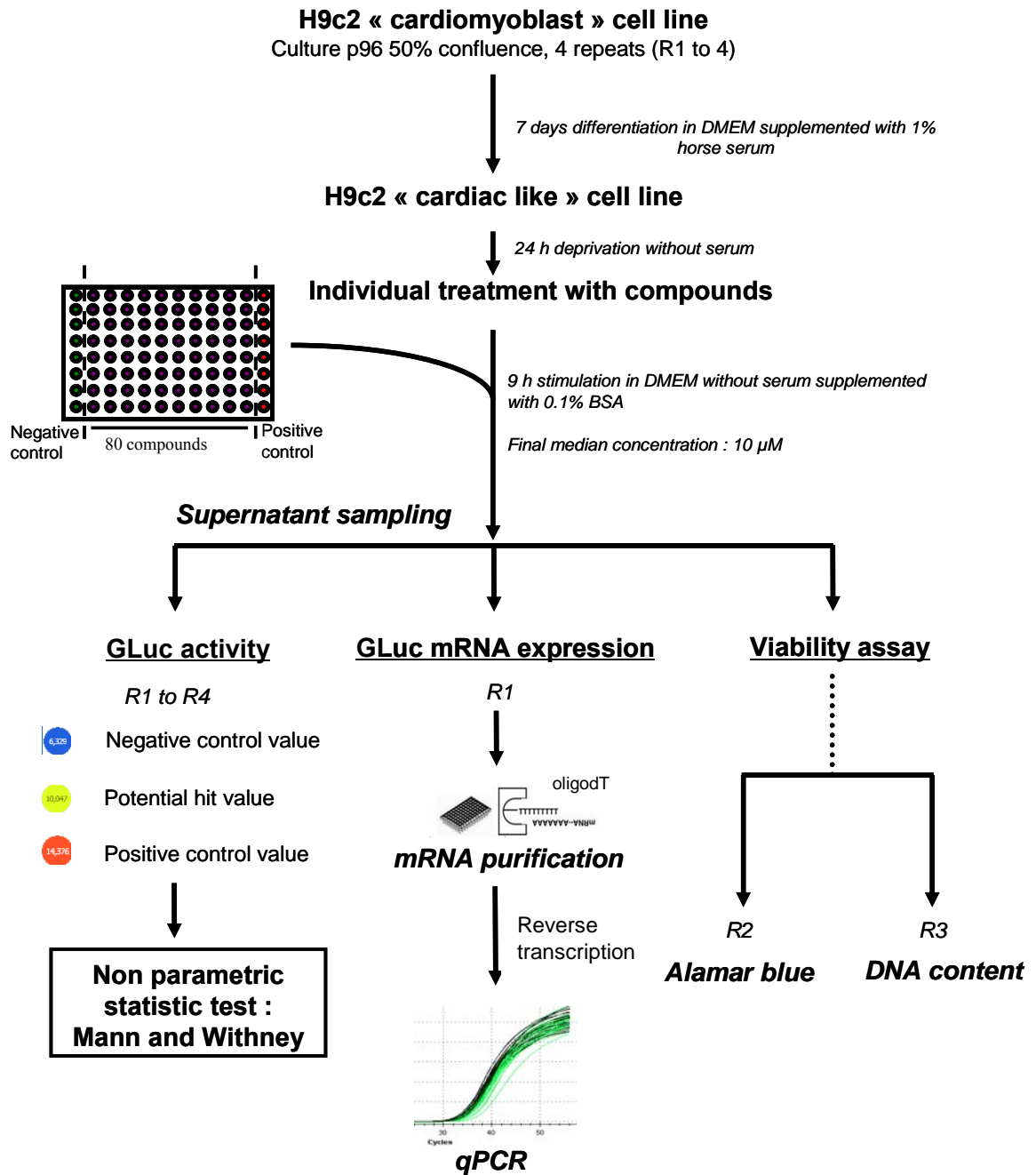


Figure 2

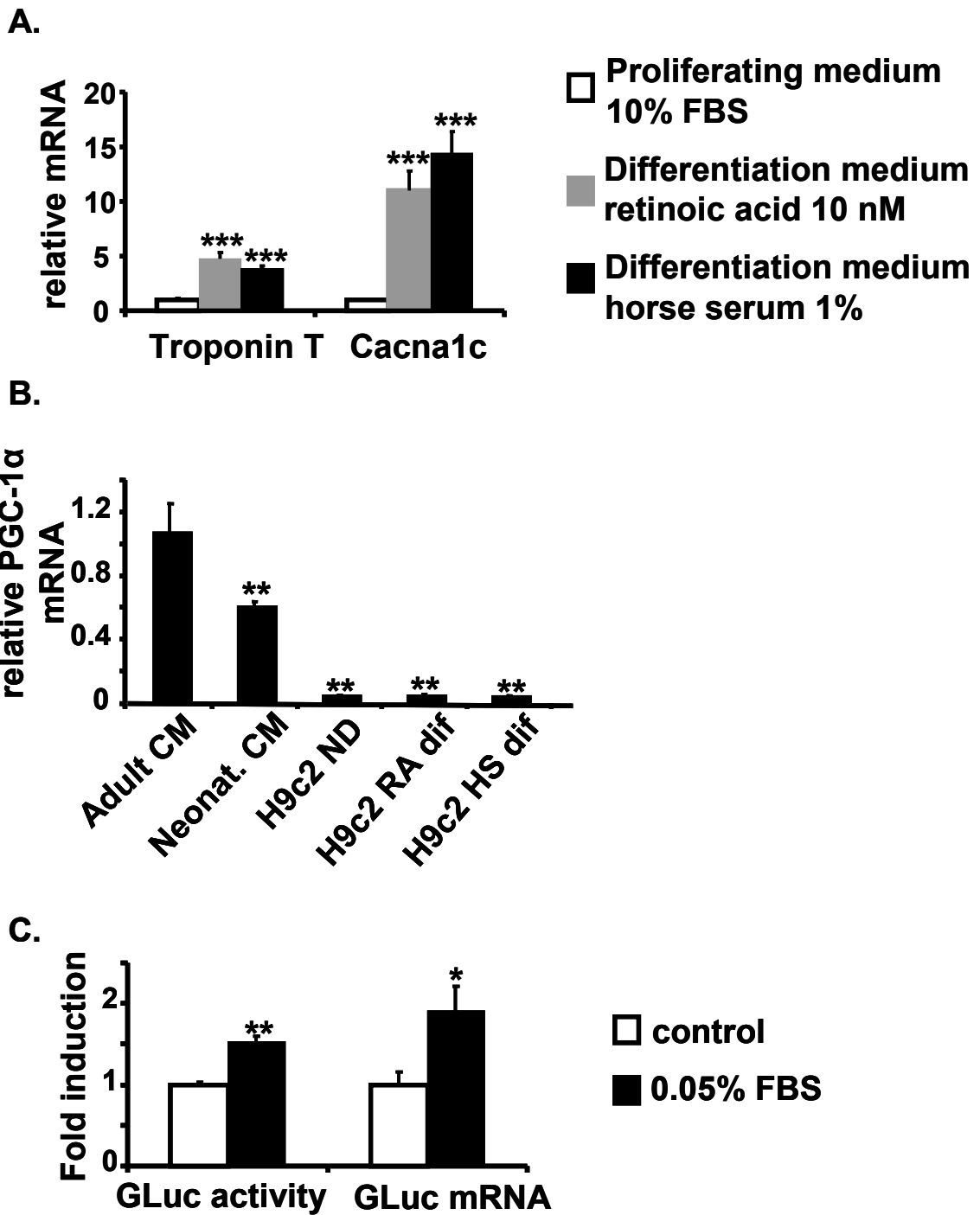


Figure 3

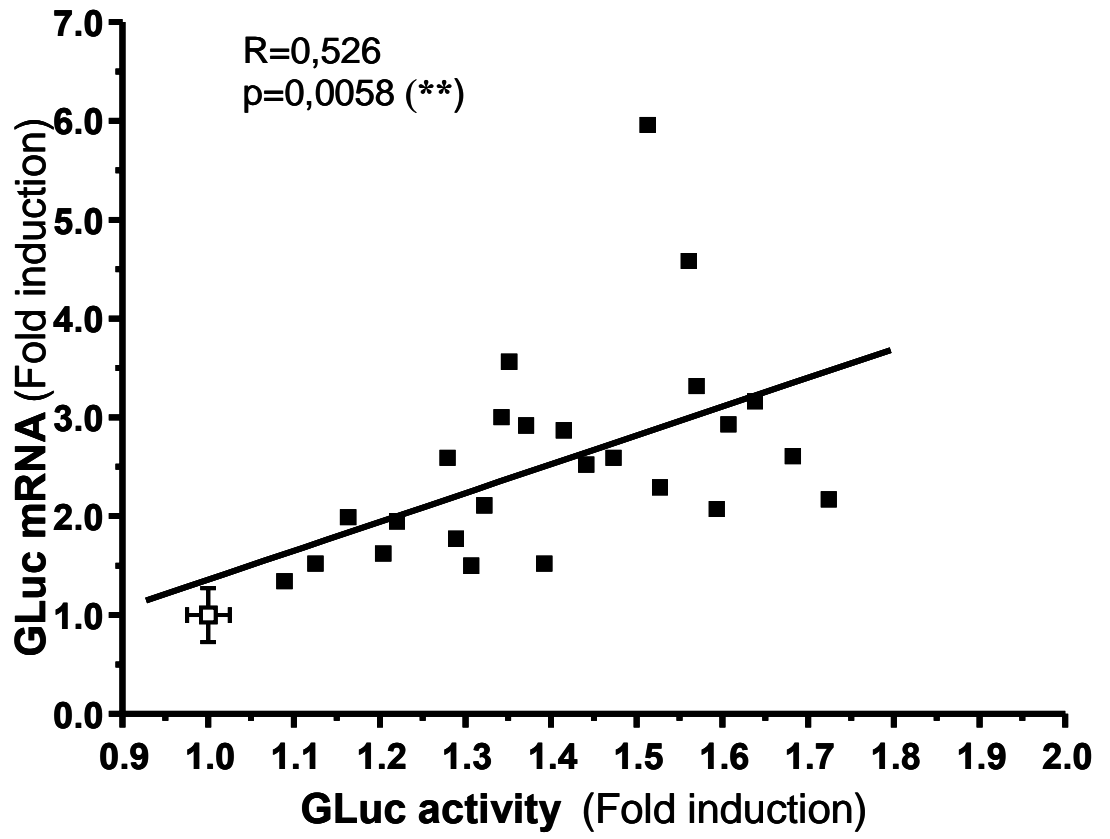


Figure 4

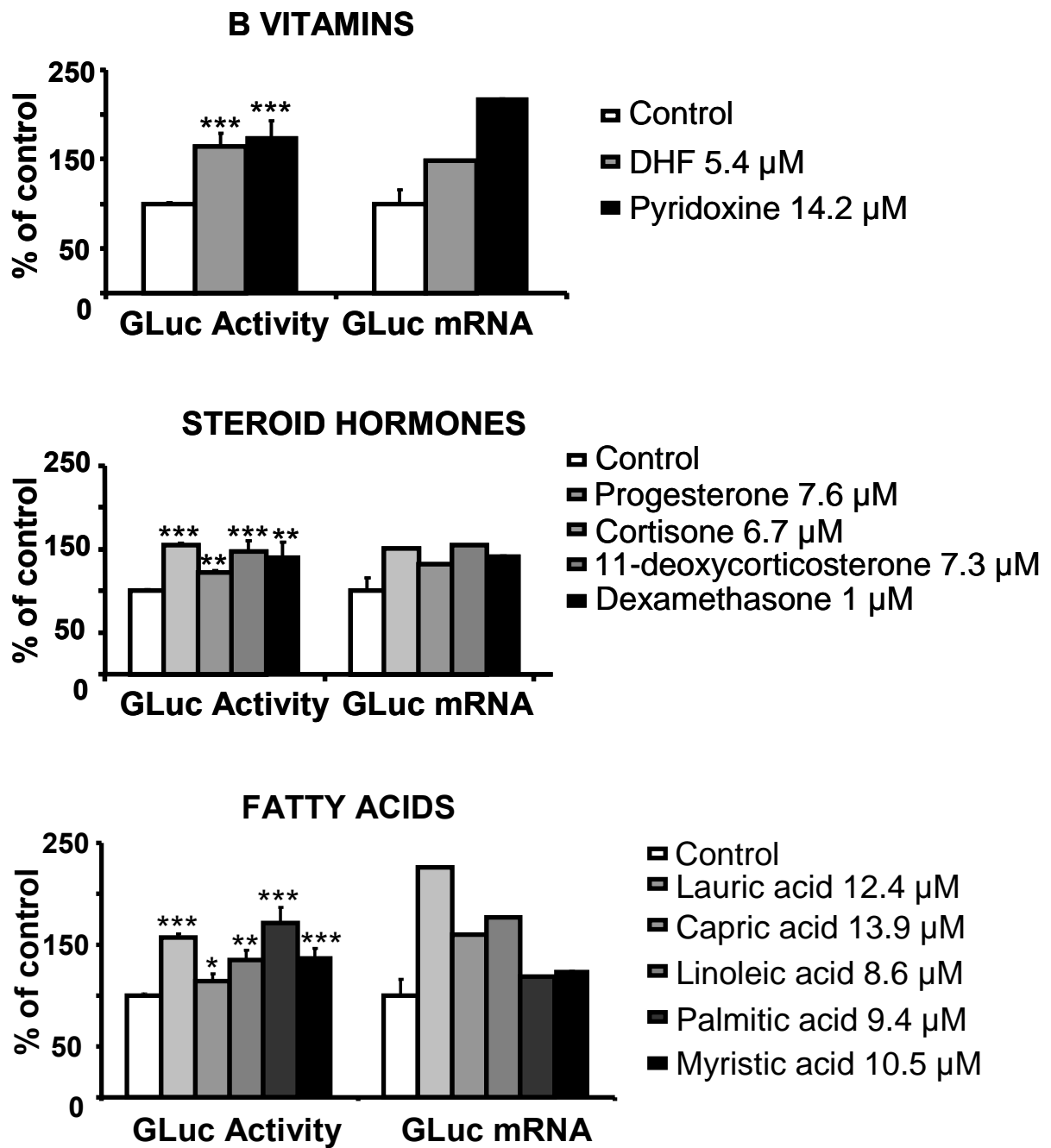
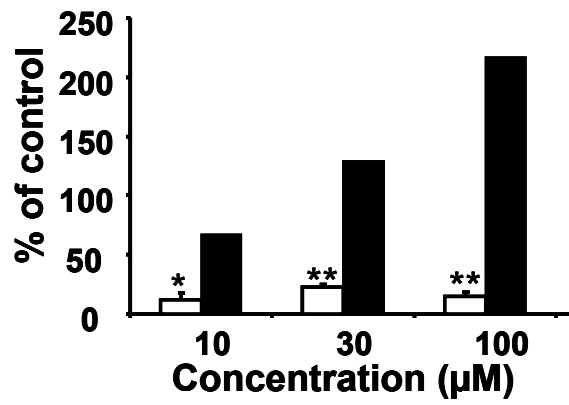


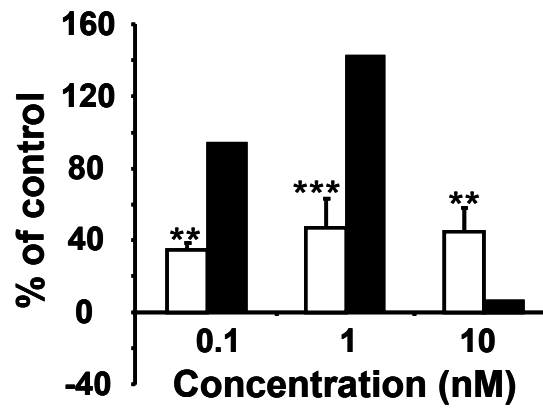


Figure 5

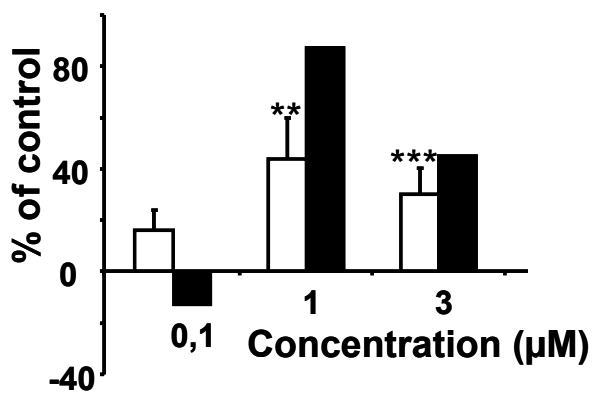
**A. Pyridoxine**



**B. Progesterone**



**C. Linoleic acid**



**D. Palmitate**

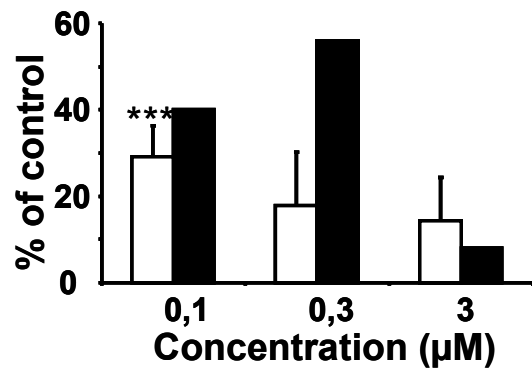


Figure 6

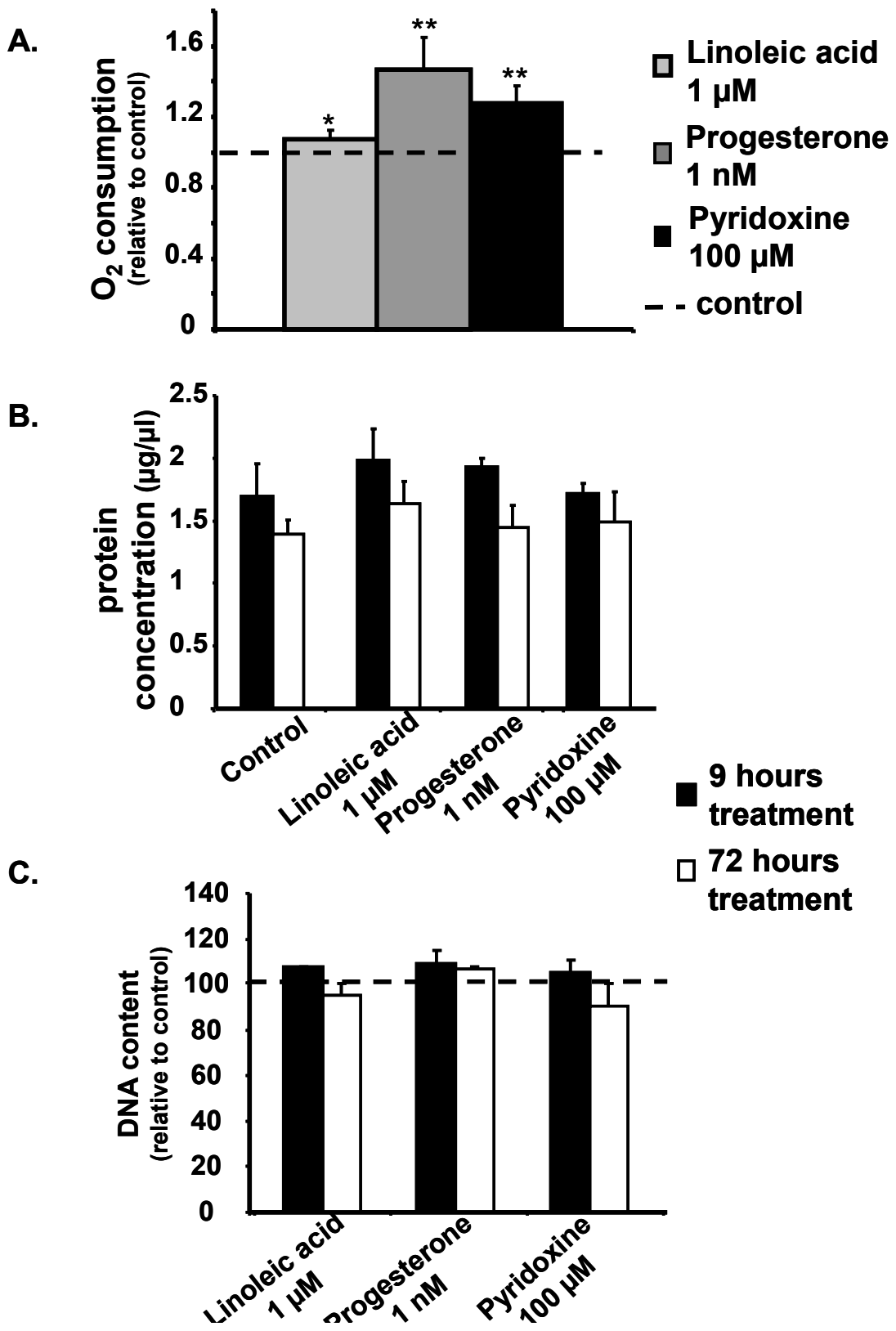


Figure 7

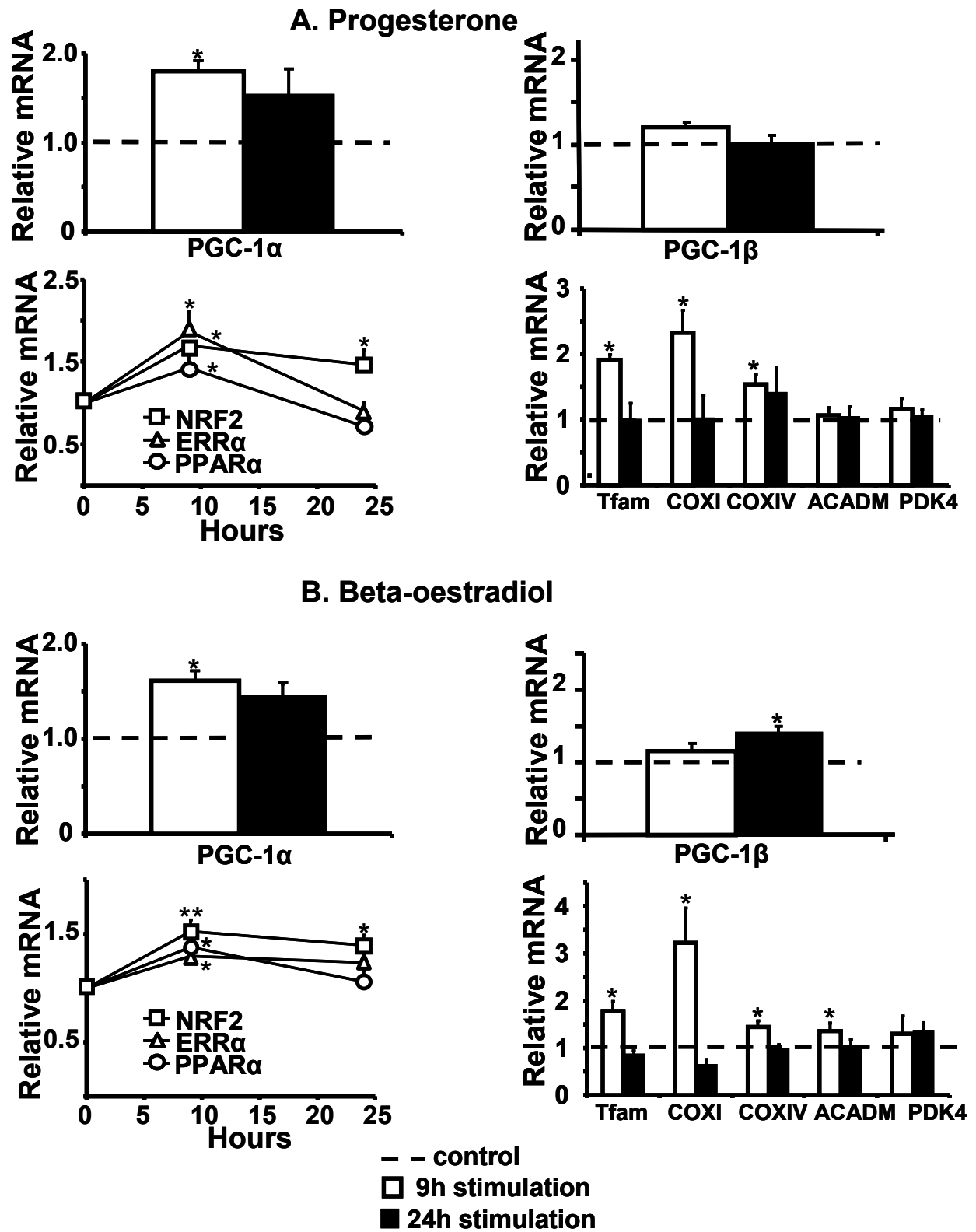
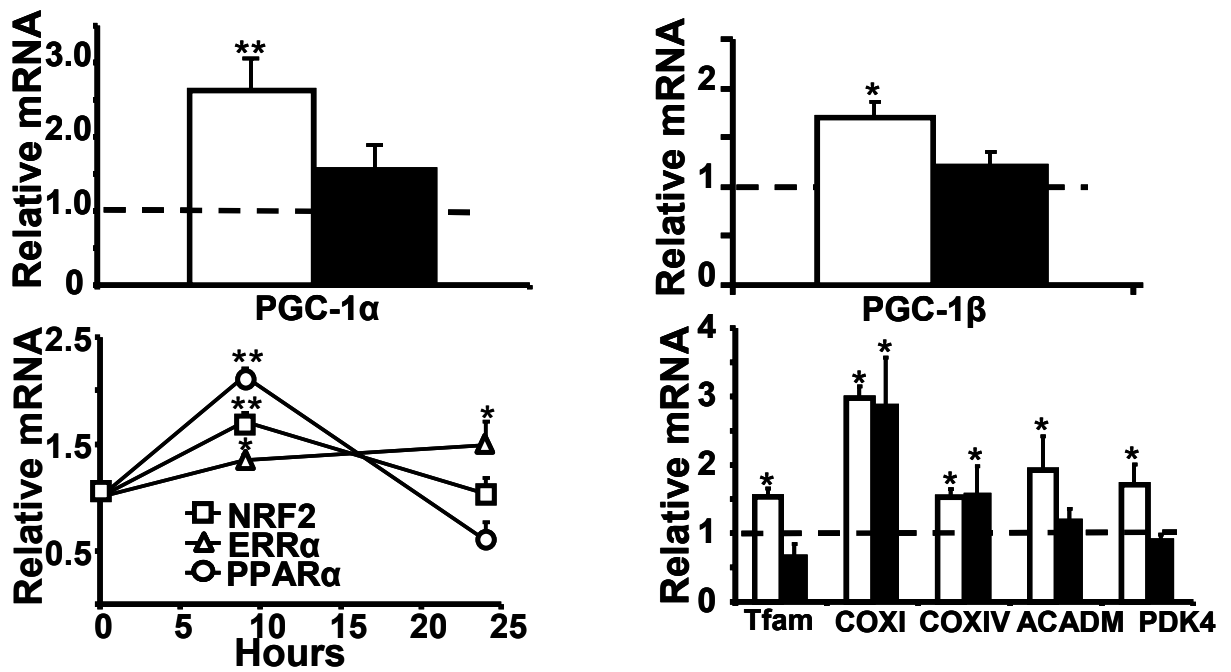


Figure 8

A. Linoleic acid



B. Palmitic acid

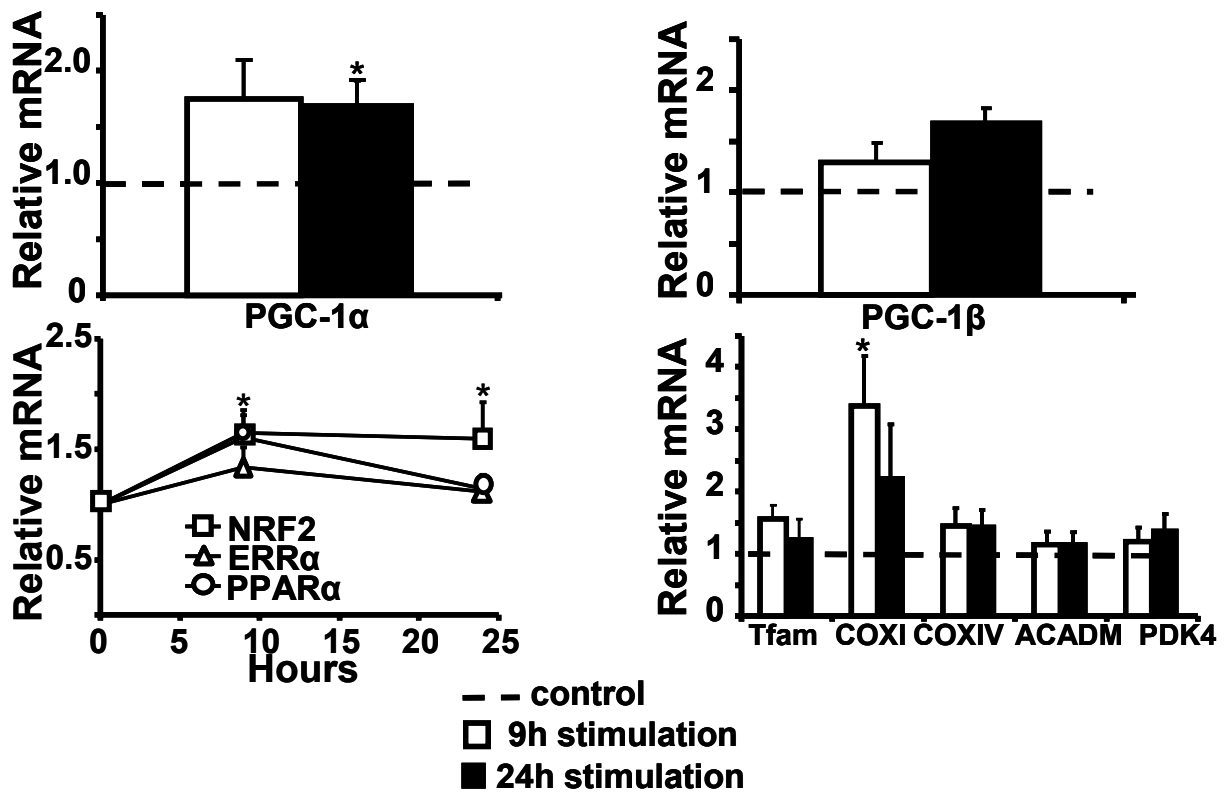
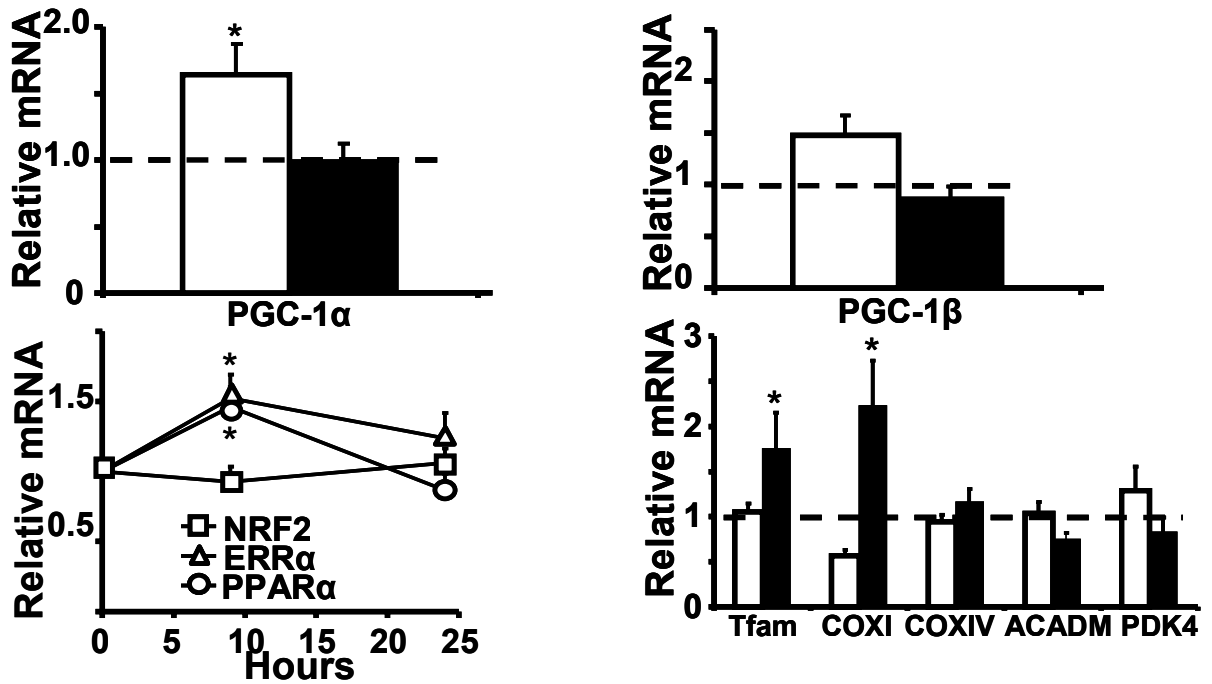
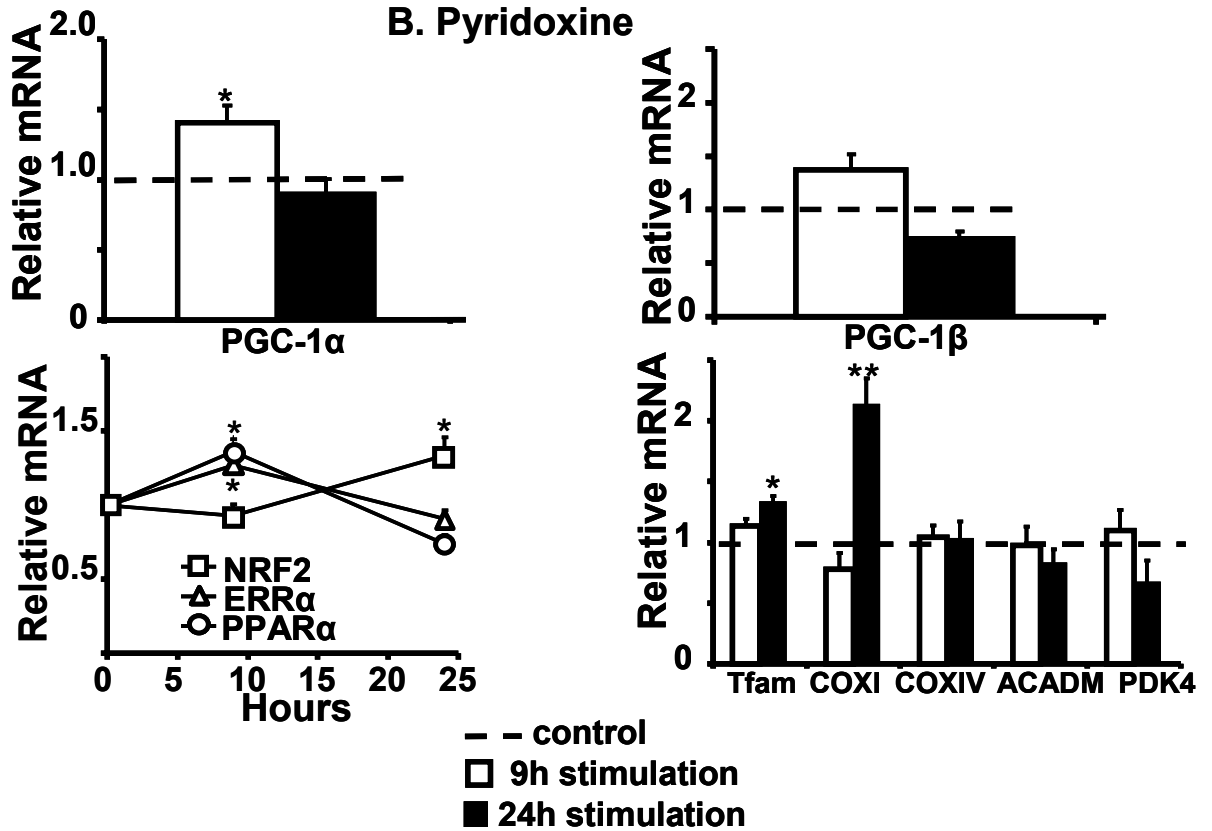


Figure 9

**A. Cobalamine**



**B. Pyridoxine**



-- control  
 □ 9h stimulation  
 ■ 24h stimulation

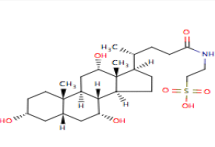
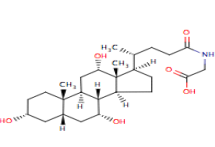
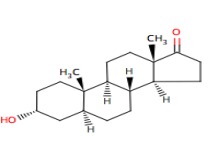
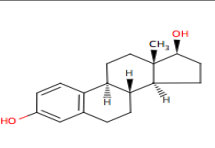
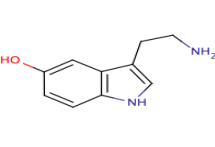

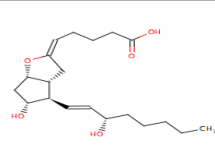
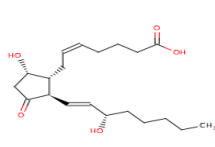
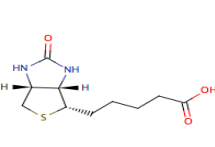
718  
719  
720  
721  
722  
723

## SUPPORTING INFORMATION

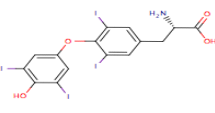
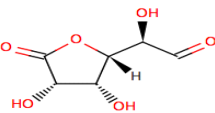
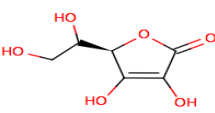
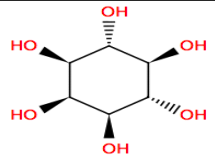
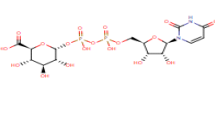
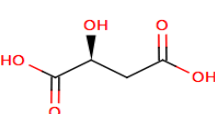
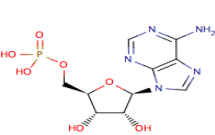
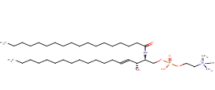
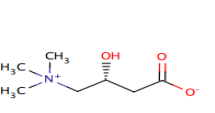
**Table S1. List of the 62 compounds from Ligendo tested in first intention**

name	Structure	Mw	C assay (μM)	metabolic pathway	Score Gluc activity >1, p<0.05
5'-Phosphoribosyl-5-amino-4-imidazolecarboxamide (AICAR)		338,21	7.1	PATH: MAP00230 Purine metabolism PATH: MAP00340 Histidine metabolism	1.03
all-trans-Retinal		284,44	8.4	PATH: MAP00830 Retinol metabolism	1.31, p<0.05
Dopamine		153,18	12.7	PATH: MAP00350 Tyrosine metabolism PATH: MAP00950 Alkaloid biosynthesis I	0.96
L-Noradrenaline		169,18	14.2	PATH: MAP00350 Tyrosine metabolism	1.05
L-Palmitoyl carnitine		399,61	5.5	PATH: MAP00071 Fatty acid metabolism	1.26, p<0.05
beta-Carotene (Vitamin D3)		536,87	4.5	PATH: MAP00100 Sterol biosynthesis	0.96
Aldosterone		360,44	6.7	PATH: MAP00140 C21-Steroid hormone metabolism	1.23
Progesterone		314,46	7.6	PATH: MAP00140 C21-Steroid hormone metabolism	1.53, p<0.05
Cortisone		360,44	6.7	PATH: MAP00140 C21-Steroid hormone metabolism	1,2, p<0,05

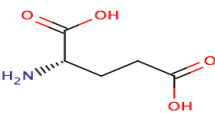
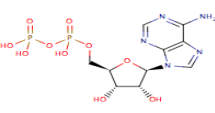
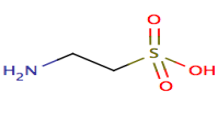
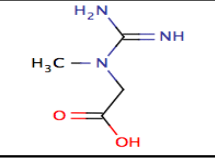
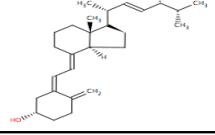
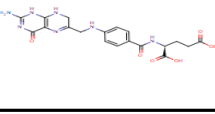
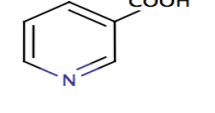
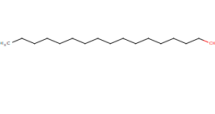
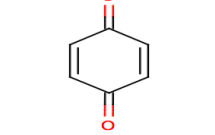
724

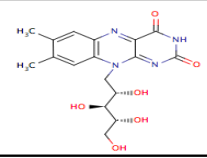
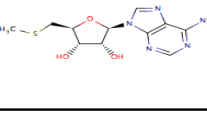
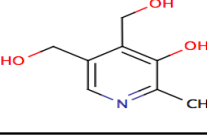
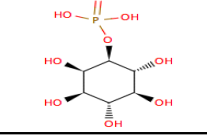
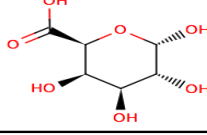
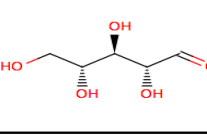
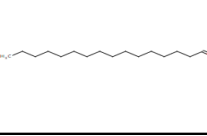
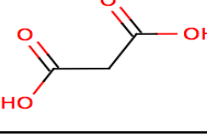
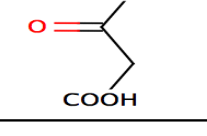
Taurocholic acid		515,70	4.5	PATH: MAP00120 Bile acid biosynthesis PATH: MAP00430 Taurine and hypotaurine metabolism	1.2
Glycocholic acid		465,62	5.2	PATH: MAP00120 Bile acid biosynthesis	0.86
3alpha-Hydroxy-5alpha-androstan-17-one (Androsterone)		290,44	8.3	PATH: MAP00150 Androgen and estrogen metabolism	1.27
17beta-Estradiol		272,38	8.8	PATH: MAP00150 Androgen and estrogen metabolism	1.2
Serotonin		176,22	11.3	PATH: MAP00380 Tryptophan metabolism	1
Eicosapentaenoic acid-(5,8,11,14,17)		302,45	7.9	Fatty acids metabolism	1.35, p<0.05
Prostaglandin I2		352,47	6.4	PATH: MAP00590 Prostaglandin and leukotriene metabolism	1.34, p<0.05
Prostaglandin D2		352,47	6.8	PATH: MAP00590 Prostaglandin and leukotriene metabolism	1.28, p<0.05
Biotin (Vitamin H)		244,31	9.8	PATH: MAP00780 Biotin metabolism	1.75, p<0.05

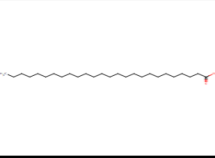
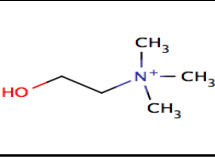
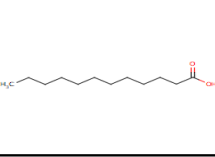
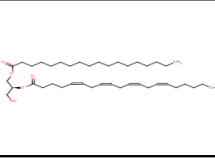
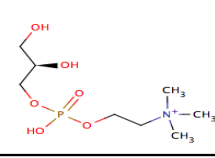
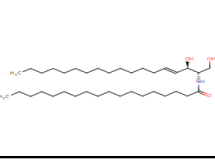
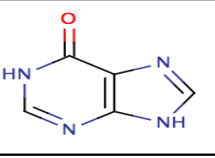
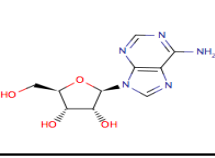
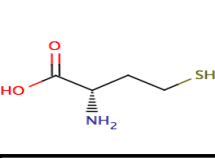
725  
726  
727  
728  
729

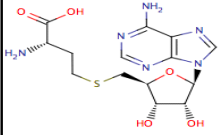
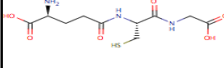
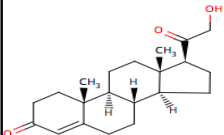
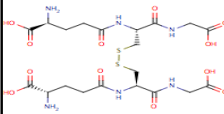
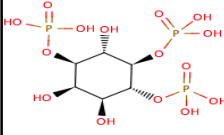
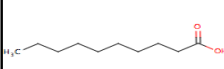
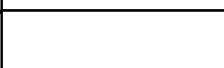
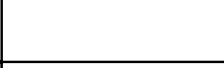
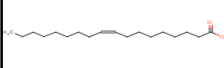
L-Thyroxine		776,87	3.1	PATH: ko00350 Tyrosine metabolism PATH: ko04080 Neuroactive ligand-receptor interaction PATH: ko05320 Autoimmune thyroid disease	0.98
D-Glucuronolactone		176,12	13.6	PATH: MAP00053 Ascorbate and aldarate metabolism	1.16, p<0.05
L-Ascorbic acid (Vitamin C)		176,12	13.6	PATH: MAP00053 Ascorbate and aldarate metabolism	
D-Myo-inositol		180,16	13.3	PATH: MAP00031 Inositol metabolism PATH: MAP00052 Galactose metabolism PATH: MAP00521 Streptomycin biosynthesis	0.97
UDP-D-glucuronic acid		580,29	3.7	PATH: MAP00040 Pentose and glucuronate interconversions PATH: MAP00500 Starch and sucrose metabolism PATH: MAP00520 Nucleotide sugars metabolism	1.29, p<0.05
L-Malic acid		134,09	17.9	PATH: MAP00020 Citrate cycle (TCA cycle) PATH: MAP00251 Glutamate metabolism PATH: MAP00252 Alanine and aspartate metabolism PATH: MAP00620 Pyruvate metabolism	1.8, p<0.05
Adenosine 5'-monophosphate (AMP)		347,22	6.1	PATH: MAP00230 Purine metabolism	1.35, p<0.05
Sphingomyelin		732,09	3.3	PATH: MAP00570 Sphingophospholipid biosynthesis	1.18, p<0.05
L-Carnitine		161,20	14.9	PATH: MAP00071 Fatty acid metabolism PATH: MAP00310 Lysine degradation	0.97

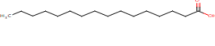
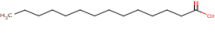
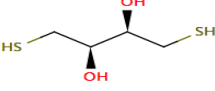
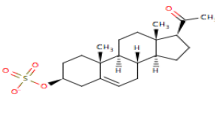
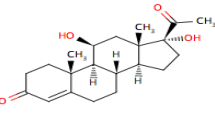


L-Glutamic acid		147,13	16.3	PATH: MAP00220 Urea cycle and metabolism of amino groups PATH: MAP00251 Glutamate metabolism PATH: MAP00330 Arginine and proline metabolism	1.22, p<0.05
Adenosine 5'-diphosphate (ADP)		427,20	5.6	PATH: MAP00190 Oxidative phosphorylation PATH: MAP00230 Purine metabolism PATH: MAP00195 Photosynthesis	1.42
Taurine		125,15	19.2	PATH: MAP00120 Bile acid biosynthesis PATH: MAP00430 Taurine and hypotaurine metabolism	0.95
Creatine		131,13	18.3	PATH: MAP00220 Urea cycle and metabolism of amino groups PATH: MAP00260 Glycine, serine and threonine metabolism PATH: MAP00330 Arginine	1.57, p<0.05
Ergocalciferol (Vitamin D2)		396,65	6.1	PATH: MAP00100 Sterol biosynthesis	1.39, p<0.05
7,8-Dihydrofolic acid (DHF)		443,41	5.4	PATH: MAP00670 One carbon pool by folate (homo sapiens) PATH: MAP00790 Folate biosynthesis	1.61, p<0.05
Nicotinic acid		123,11	19.5	PATH: MAP00660 C5-Branched dibasic acid metabolism PATH: MAP00760 Nicotinate and nicotinamide metabolism PATH: MAP00960 Alkaloid biosynthesis II	1.27, p<0.05
Palmityl alcohol		242,44	9.9	PATH: MAP00071 Fatty acid metabolism	0.81
Quinone		108,09	22.2	PATH: MAP00740 Riboflavin metabolism	1.25

Riboflavin (Vitamin B2)		376,36	6.4	PATH: MAP00740 Riboflavin metabolism	1.06, p<0.05
5'-Methylthioadenosine (Vitamin L2)		297,33	8.1	PATH: MAP00330 Arginine and proline metabolism	0.96
Pyridoxine		169,18	14.2	PATH: MAP00750 Vitamin B6 metabolism	1.72, p<0.05
Inositol 1-phosphate		260,14	7.1	PATH: MAP00562 Inositol phosphate metabolism PATH: MAP00521 Streptomycin biosynthesis	1.59, p<0.05
D-Galactopyranuronic acid		194,14	11.3	PATH: MAP00040 Pentose and glucuronate interconversions PATH: MAP00053 Ascorbate and aldarate metabolism PATH: MAP00500 Starch and sucrose metabolism	1.51, p<0.05
D-Ribose		150,13	16.00	PATH: MAP00030 Pentose phosphate pathway PATH: MAP00271 Methionine metabolism	1.15
Palmitaldehyde		240,42	10.00	PATH: MAP00071 Fatty acid metabolism PATH: MAP00600 Sphingoglycolipid metabolism	0.86
Malonic acid		104,06	23.1	PATH: MAP00240 Pyrimidine metabolism PATH: MAP00410 beta-Alanine metabolism	1.09, p<0.05
Oxaloacetic acid		132,07	18.2	PATH: MAP00020 Citrate cycle (TCA cycle) PATH: MAP00251 Glutamate metabolism PATH: MAP00252 Alanine and aspartate metabolism	1.22, p<0.05

Cerotic acid		396,69	6.1	PATH: MAP00071 Fatty acid metabolism	0.93
Choline		104,17	17.2	PATH: MAP00260 Glycine, serine and threonine metabolism PATH: MAP00561 Glycerolipid metabolism PATH: MAP00580 Phospholipid degradation	1.47, p<0.05
Lauric acid		200,32	12,00	PATH: MAP00071 Fatty acid metabolism PATH: MAP00561 Glycerolipid metabolism	1.56, p<0.05
1-Stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol		645,01	3.7	PATH: MAP00260 Glycine, serine and threonine metabolism PATH: MAP00561 Glycerolipid metabolism PATH: MAP00562 Inositol phosphate metabolism	1.54, p<0.05
sn-Glycerol 3-phosphocholine		258,23	5.4	PATH: MAP00580 Phospholipid degradation	1.29, p<0.05
N-Stearoylsphingosine (Ceramide C18)		565,95	4.2	PATH: MAP00570 Sphingophospholipid biosynthesis PATH: MAP00600 Sphingoglycolipid metabolism	0.98
Hypoxanthine		136,11	17.6	PATH: MAP00230 Purine metabolism	1.1
Adenosine		267,24	9,00	PATH: MAP00230 Purine metabolism	1.31, p<0.05
L-Homocysteine		135,18	17.8	PATH: MAP00271 Methionine metabolism PATH: MAP00920 Sulfur metabolism	1

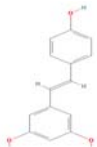
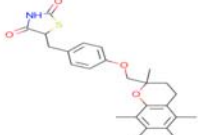
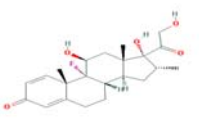

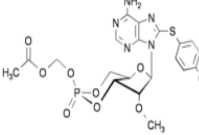
<b>S-(5'-Adenosyl)-L-homocysteine</b>		<b>384,41</b>	<b>6.2</b>	PATH: MAP00271 Methionine metabolism	<b>1.32, p&lt;0.05</b>
<b>Reduced Glutathione (GSH)</b>		<b>307,32</b>	<b>7.8</b>	PATH: MAP00251 Glutamate metabolism PATH: MAP00272 Cysteine metabolism PATH: MAP00480 Glutathione metabolism	<b>1.59, p&lt;0.05</b>
<b>11-Deoxycorticosterone</b>		<b>330,46</b>	<b>7.3</b>	PATH: MAP00140 C21-Steroid hormone metabolism	<b>1.44, p&lt;0.05</b>
<b>Oxidized Glutathione (GSSG)</b>		<b>612,63</b>	<b>3.9</b>	PATH: MAP00251 Glutamate metabolism PATH: MAP00480 Glutathione metabolism	<b>1.3, p&lt;0.05</b>
<b>Inositol 1,4,5-trisphosphate</b>		<b>420,10</b>	<b>4.3</b>	PATH: MAP00562 Inositol phosphate metabolism	<b>1.1</b>
<b>Capric acid</b>		<b>172,26</b>	<b>13.9</b>	PATH: MAP00071 Fatty acid metabolism	<b>1.13, p&lt;0.05</b>
<b>Linoleic acid</b>		<b>280,45</b>	<b>8.6</b>	PATH: MAP00071 Fatty acid metabolism PATH: MAP00561 Glycerolipid metabolism	<b>1.32, p&lt;0.05</b>
<b>Oleic acid (Z)</b>		<b>282,46</b>	<b>8.5</b>	PATH: MAP00071 Fatty acid metabolism PATH: MAP00561 Glycerolipid metabolism	<b>0.9</b>
<b>Stearic acid</b>		<b>284,48</b>	<b>8.4</b>	PATH: MAP00071 Fatty acid metabolism PATH: MAP00561 Glycerolipid metabolism	<b>1.55, p&lt;0.05</b>

<b>Palmitic acid</b>		<b>256,42</b>	<b>9.4</b>	PATH: MAP00071 Fatty acid metabolism PATH: MAP00561 Glycerolipid metabolism PATH: MAP00061 Fatty acid biosynthesis (path 1)	<b>1.68, p&lt;0.05</b>
<b>Myristic acid</b>		<b>228,37</b>	<b>10.5</b>	PATH: MAP00071 Fatty acid metabolism PATH: MAP00561 Glycerolipid metabolism	<b>1.37, p&lt;0.05</b>
<b>Dithiothreitol</b>		<b>154,25</b>	<b>15.6</b>	PATH: MAP00100 Sterol biosynthesis PATH: MAP00271 Methionine metabolism PATH: MAP00472 D-Arginine and D-ornithine metabolism	<b>1.1, p&lt;0.05</b>
<b>pregnenolone sulfate</b>		<b>395,53</b>	<b>5.7</b>	PATH: ko00150 Androgen and estrogen metabolism	<b>1.02</b>
<b>21-Deoxycortisol</b>		<b>346,46</b>	<b>6.9</b>	PATH: MAP00140 C21-Steroid hormone metabolism	<b>1.2</b>

Median concentration

10 µM

735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763

Resveratrol		228.24	20 μM	polyphenol	1.13
Troglitazone		441.54	10 μM	PPAR gamma agonist	0.63
Dexamethasone		392.46	1 μM	synthetic glucocorticoid	1.39, p<0.05
GW1516		453.49	1 μM	PPAR delta agonist	1.42, p<0.05
8-CPT-2'-O-Me-cAMP		507.80	1 μM	EPAC activator	1.24, p<0.05
EGF	C <sub>257</sub> H <sub>381</sub> N <sub>73</sub> O <sub>83</sub> S <sub>7</sub>	6045.67	100 ng/ml	growth factor	1.41, p<0.05
Angiotensine 2			1 μM	hormone	1.41, p<0.05
TNFα			26 ng/ml	cytokine	1.34, p<0.05
Insuline			10 μg/ml	hormone	1.27, p<0.05

765  
766

767 This table represents the 80 compounds tested with molecule name, structure, molecular  
768 weight, assay concentration, metabolic pathways and fold induction in GLuc activity with the  
769 significance.

770 **Table S2. List of primers used for qPCR**

771

Target name	Forward primer Reverse primer (5' → 3')	Annealing temperature (° C)
TBP	AAA GAC CAT TGC ACT TCG TG GCT CCT GTG CAC ACC ATT TT	60
Gaussia Luciferase	CAC GCC CAA GAT GAA GAA GT TTG TGC AGT CCA CAC ACA GA	60
PGC-1 $\alpha$	CAC CAA ACC CAC AGA GAA CAG GCA GTT CCA GAG AGT TCC ACA	58
NRF2 $\alpha$	CAC CAC ACT CAA CAT TTC GG CCT TGG GGA CCT TTG AAC TT	58
Tfam	GAA AGC ACA AAT CAA GAG GAG CTG CTT TTC ATC ATG AGA CAG	60
COXI	AGC AGG AAT AGT AGG GAC AGC TGA GAG AAG TAG TAG GAC GGC	60
COXIV	TGG GAG TGT TGT GAA GAG TGA GCA GTG AAG CCG ATG AAG AAC	58
ERR $\alpha$	TCA AGG AGG GTG TGC GTC TG CTT GGC CCA GCT GAT GGT GA	65
PPAR $\alpha$	ATG AGT CCC CTG GCA ATG GGC ATT CTT CCA AAA CGG	58
MCAD	CCG TTC CCT CTC ATC AAA AG ACA CCC ATA CGC CAA CTC TT	60
PDK4	CCT TCA CAC CTT CAC CAC AT AAA GAG GCG GTC AGT AAT CC	60
PGC-1 $\beta$	TGG AAA GCC CCT GTG AGA GT TTG TAT GGA GGT GTG GTG GG	60

772

773

774

775

776

777

778

TBP indicates TATA binding protein; PGC-1 $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ; NRF-2, nuclear respiratory factor 2; Tfam, mitochondrial transcription factor A; COX I and COX IV, cytochrome c oxidase subunits I and IV; ERR $\alpha$ , estrogen related receptor  $\alpha$  ; PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; MCAD, medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase ; PDK4, pyruvate dehydrogenase kinase 4; PGC-1 $\beta$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\beta$ .

779 **Table S3. List of the 25 compounds selected as “hits” positives both for GLuc activity**  
 780 **and GLuc mRNA expression**

781

	GLuc activity	p	Gluc mRNA expression
Control	1,00		1,00
Progesterone	1,527	**	2,29
Cortisone	1,204	*	1,62
Prostaglandine D2	1,279	**	2,59
D-Glucuronolactone	1,163	*	1,99
glucuronic UDP-D-acid	1,289	**	1,77
AMP	1,351	**	3,56
glutamic acid	1,220	**	1,95
créatine	1,570	**	3,32
DHF	1,607	**	2,93
pyridoxine	1,724	**	2,17
galactopyranuronic D-acid	1,513	**	5,96
malonic acid	1,089	*	1,34
choline	1,473	**	2,59
lauric acid	1,561	**	4,58
adenosine	1,307	**	1,50
GSH	1,593	**	2,07
11-Deoxycorticosterone	1,441	**	2,52
capric acid	1,125	*	1,52
linoleic acid	1,322	**	2,11
palmitic acid	1,682	**	2,61
myristic acid	1,371	**	2,92
TNF $\alpha$	1,342	**	3,00
Dexamethasone	1,392	*	1,52
GW1516	1,415	*	2,87
IL6	1,638	**	3,16

*, p<0.05
** , p<0.01

782

783

784

Results are expressed as fold induction both for GLuc activity (N=4) and GLuc

785

mRNA expression. \*, p<0.05



## **Chapitre II. Etude de la régulation de la biogenèse mitochondriale dans le muscle lisse lors de l'hypertension artérielle et effet du Resvératrol**

**(Publication 2 en écriture)**

### **I) Contexte de l'étude**

En dépit des avancées récentes en terme de thérapeutique de l'IC, le taux de morbimortalité de l'IC reste encore très élevé dans les pays industrialisés et la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques est à ce jour un enjeu majeur. Nous avons vu précédemment le rôle déterminant de l'altération de la fonction mitochondriale dans le développement de la physiopathologie du myocarde (Ventura-Clapier et al., 2004; Neubauer, 2007). Etant donné le rôle central de PGC-1 $\alpha$  dans le contrôle de la fonction mitochondriale et sa prédisposition en tant que cible thérapeutique de choix, une étude à laquelle j'ai pu participer, a été menée au sein du laboratoire dans le but de valider de manière générale la preuve de concept d'une thérapie métabolique de l'IC.

Pour mener à bien cet objectif, le resvératrol (RSV) a été choisi comme molécule pharmacologique d'intérêt. En effet, ce polyphénol présent entre autres dans le raisin, a été récemment montré comme activateur de différentes cibles du métabolisme cellulaire. Tout d'abord, celui-ci a été proposé comme activateur de la SIRT1 à l'origine d'une augmentation de l'activité de PGC-1 $\alpha$  par déacétylation. Ainsi, dans ces conditions, est observée une induction de la biogenèse mitochondriale (Rodgers et al., 2005; Lagouge et al., 2006). D'autre part, le RSV est capable d'activer l'AMPK (Um et al., 2010, Price et al., 2012; Tillu et al., 2012) senseur métabolique de l'état énergétique cellulaire. Le RSV a également été montré comme activateur des PPARs, à savoir l'isoforme  $\gamma$  (Ulrich et al., 2006; Zhang et al., 2010) ainsi que l'isoforme  $\alpha$  (Inoue et al., 2003; Cheng et al., 2009; Planavila et al., 2011), chacune de ces cibles étant impliquée dans le métabolisme mitochondrial.

Ces données suggèrent donc un rôle bénéfique potentiel du RSV en tant que molécule activatrice du métabolisme énergétique par divers mécanismes. Ainsi, pour valider ses effets métaboliques bénéfiques sur la fonction cardiaque, un modèle expérimental de dysfonction ventriculaire a été mis en place. Les rats Dahl sensibles au sel ont été choisis car ils

développent rapidement une hypertension accompagnée d'une hypertrophie évoluant vers une dysfonction ventriculaire suite à un régime hypersodé. Après 3 semaines de traitement par un régime salé à 8 % de NaCl (HS-NT), ces animaux développent une hypertension importante ( $152 \pm 4$  mmHg) ainsi qu'une hypertrophie ventriculaire (+14 %) en comparaison au groupe de rat soumis à un régime pauvre en sel (0.3 % NaCl). Après 8 semaines de traitement plus ou moins supplémenté de RSV à la dose de 18 mg/kg/jour (HS-RSV), la survie, les paramètres hémodynamiques, la fonction mitochondriale ainsi que la fonction endothéliale ont été étudiés.

De manière spectaculaire, le RSV permet une augmentation de la survie des animaux à hauteur de 63 % comparés aux animaux HS-NT présentant une survie seulement de 14 %. En outre, l'augmentation de la survie est associée à une préservation de la fonction cardiaque, puisque la fraction d'éjection diminuée de 34 % chez les animaux HS-NT est totalement préservée par le RSV. Par ailleurs, l'étude de la fonction mitochondriale sur fibres perméabilisées met en évidence une altération de la respiration mitochondriale, une diminution de l'utilisation des substrats et une défaillance des transferts énergétiques. Globalement, l'ensemble de ces paramètres est amélioré par traitement au RSV.

D'autre part, ces résultats sont confortés par des études moléculaires et biochimiques qui montrent une altération de l'expression des acteurs de la biogenèse mitochondriale ainsi qu'une diminution de l'activité de la CS et des isoformes de la CK. Le RSV permet à nouveau une amélioration de ces paramètres. Cependant, malgré une tendance à l'amélioration de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale, aucune amélioration n'a été observée concernant l'expression de PGC-1 $\alpha$ . Toutefois, le RSV prévient parfaitement les altérations concernant l'utilisation des acides gras et ce en accord avec une restauration de l'expression de PPAR $\alpha$  et de ses gènes cibles.

Ces résultats prometteurs permettent donc de mettre en avant le bénéfice d'une thérapie métabolique dans le traitement de l'IC expérimentale. De plus, le RSV constitue une molécule de choix bénéfique pour la fonction cardiaque par amélioration des différentes composantes du métabolisme.

Ce modèle animal est caractérisé par une hypertension associée à une dysfonction endothéliale. Nous avons mis en évidence que cette forte dysfonction endothéliale, caractérisée par une diminution de la relaxation aortique, était parfaitement restaurée par le traitement au RSV. De plus, cette amélioration est en partie due à une augmentation de l'expression de la NO synthase et donc d'une libération accrue de NO à l'origine de la relaxation aortique. Ces travaux ont ainsi fait l'objet d'une publication (Rimbaud et al., 2011)

présentée à la suite de cette introduction. Néanmoins, peu d'études ont été menées concernant la biogenèse mitochondriale dans le muscle lisse en réponse à l'hypertension ainsi que sur les effets potentiels du RSV dans ce contexte.

## **II) Présentation**

Les cellules musculaires lisses font partie des cellules les plus plastiques en terme de réponse à différents stimuli. En effet, de nombreux facteurs de croissance autocrines et paracrines ont été identifiés comme impliqués dans le remodelage vasculaire et plus généralement dans la prolifération de ces cellules (Berk, 2001). Il est admis que l'ensemble des voies de signalisation impliquées converge vers l'activation de la kinase ERK impliquant notamment la voie des MAPK (Lawrence et al., 2008) et favorisant la division cellulaire. Plus récemment, des évidences suggèrent l'implication des EROs dans le contrôle de la prolifération des cellules musculaires lisses (Taniyama et Griendling, 2003).

D'autre part, de nombreux résultats abondent dans le sens d'un rôle majeur du stress oxydant dans l'initiation et le développement de pathologies cardiovasculaire telles que l'athérosclérose (Chang et al., 2010), l'insuffisance cardiaque (Ide et al., 2001) ou encore l'hypertension (Lassegue et Griendling, 2004). Par définition, le stress oxydant est un état non physiologique où les défenses anti-oxydantes, impliquant notamment les SOD ou les GPx, ne peuvent plus assurer leur fonction pour réduire la production massive d'EROs.

Cette production est conditionnée par diverses sources impliquant la NOX (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) reduced form oxydase), la NO synthase, la xanthine oxydoréductase, les enzymes cytochromes p450 ou encore la mitochondrie (Puddu et al., 2008). Cette dernière est considérée comme une source majeure de génération d'EROs par une réduction incomplète de l'O<sub>2</sub> au niveau de la chaîne respiratoire. Par ailleurs, une augmentation du stress oxydant est délétère non seulement sur les protéines et les lipides mais également sur l'ADNmt (Van Remmen et Richardson, 2001). Une accumulation de mutations au sein de l'ADNmt conditionne alors la synthèse de protéines défectueuses au niveau de la chaîne respiratoire. Ces synthèses défectueuses sont à l'origine d'une défaillance de la chaîne respiratoire accentuant la production d'EROs évoluant ainsi vers un cercle vicieux (Wei et al., 1998).

L'ensemble de ces travaux suggère donc un rôle non négligeable de la mitochondrie

dans la cellule musculaire lisse. Néanmoins, peu de données sont répertoriées dans la littérature concernant la biogenèse mitochondriale dans le muscle lisse vasculaire. Nous pouvons cependant supposer qu'elle joue un rôle clé dans la signalisation EROs-dépendante et plus généralement dans la modulation du stress oxydant et inversement. En effet, de récents travaux ont mis en évidence une induction de PGC-1 $\alpha$  EROs-dépendante conduisant à la mise en place de la biogenèse mitochondriale (St-Pierre et al., 2006; Chen et al., 2011). Cette réponse adaptative tend à contrebalancer l'installation d'un stress oxydant par l'augmentation de l'expression des enzymes anti-oxydantes (Valle et al., 2005).

Cependant, la régulation de la biogenèse mitochondriale dans le muscle lisse hypertendu ainsi que les mécanismes cellulaires impliqués lors de l'hypertension restent obscurs. Afin de mieux comprendre cette régulation, la cascade transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale dans l'aorte a été étudiée en situation d'hypertension, associée à un stress oxydant ou après traitement par une molécule capable de diminuer la production d'EROs : le RSV. L'étude a été menée dans un premier temps sur le modèle de rats Dahl-sensibles au sel développé décrit précédemment puis complétée en utilisant un modèle *in vitro* de culture primaire de cellules musculaires lisses (CML) aortiques.

### **III) Résultats et discussion**

L'analyse par RT-PCR de l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale dans les aortes des rats HS-NT montre une augmentation massive de l'expression de PGC-1 $\alpha$ , qui est corrélée positivement à celle de ses cibles en aval, NRF2 et Tfam. Ceci suggère une activation de la biogenèse mitochondriale dans l'aorte lors de l'hypertension expérimentale. D'autre part, cette induction est associée à une augmentation de l'expression de SOD2, marqueur du stress oxydant, ainsi qu'à l'augmentation de l'oxydation des protéines totales proposant un lien potentiel entre stress oxydant et biogenèse mitochondriale. Au niveau moléculaire, il a été observé une augmentation accrue de la phosphorylation de la CaMKII par western blot dans les aortes des rats HS-NT. Les animaux traités au RSV (HS-RSV) présentent un profil d'expression génique paradoxal puisque globalement l'expression de l'ensemble des marqueurs de la biogenèse mitochondriale est partiellement diminuée en comparaison avec le groupe HS-NT. De plus, ces résultats sont associés à une diminution de l'expression de SOD2 et du niveau d'oxydation des protéines

totales ainsi que de la phosphorylation de la CaMKII.

Cette étude préliminaire sur un modèle *in vivo* suggère une régulation de la biogenèse mitochondriale en réponse à l'hypertension et pouvant mettre en jeu les EROs. A l'inverse, l'utilisation d'un anti-oxydant prévient l'induction de la biogenèse mitochondriale. Il semblerait par ailleurs, que la CaMKII soit un élément central dans cette régulation. Pour valider le bien-fondé de ces observations, des expériences complémentaires ont été menées sur un modèle *in vitro*.

Pour induire un stress oxydant, les CML sont cultivées en présence de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pendant 24 heures en présence ou non de RSV. L'analyse de l'expression en ARNm et en protéine de PGC-1 $\alpha$  permet de valider son induction en réponse au stress oxydant. Cette induction est corrélée à une augmentation de l'expression de Tfam et de la CS, marqueur de la masse mitochondriale, indiquant une activation de la biogenèse mitochondriale EROs-dépendante dans le muscle lisse. Bien que le resvératrol soit capable d'augmenter la biogenèse mitochondriale dans la cellule musculaire lisse en condition basale, celui-ci prévient de l'activation de la biogenèse mitochondriale EROs-dépendante par son effet anti-oxydant. De manière opposée, une diminution du stress oxydant, observée après culture des CML en présence d'une faible concentration en SVF, conduit à une diminution de la biogenèse mitochondriale. Ces résultats mettent en avant une régulation de la biogenèse mitochondriale dans les cellules musculaires lisses vasculaires par modulation du stress oxydant. Enfin, la phosphorylation de la CaMKII est inhibée par le RSV ce qui conforte le rôle de cette kinase dans la réponse mitochondriale au stress oxydant.

#### **IV) Conclusion**

En conclusion, dans un contexte d'hypertension *in vivo* et lors de l'induction d'un stress oxydant *in vitro*, l'expression de PGC-1 $\alpha$  est induite, ce qui conduit à l'augmentation de l'expression des marqueurs de la biogenèse mitochondriale, une augmentation du niveau global de stress oxydant et la mise en place de défenses anti-oxydantes. L'utilisation du resvératrol, molécule ayant des propriétés anti-oxydantes, permet de prévenir cette induction parallèlement à la diminution du stress oxydant et ceci prédomine par rapport à ses effets métaboliques connus en condition basale.

Par ailleurs, la CaMKII semble jouer un rôle central dans la régulation de la biogenèse mitochondriale et apparaît comme un senseur du stress oxydant, son activité augmentant en présence d'EROs. Enfin, la CaMKII apparaît comme une cible nouvelle du resvératrol. De ce fait, diminuer le stress oxydant pour diminuer l'activité de la CaMKII ou inhiber directement son activité apparaît comme une stratégie intéressante pour améliorer la fonction vasculaire dans l'hypertension.

# Resveratrol Improves Survival, Hemodynamics and Energetics in a Rat Model of Hypertension Leading to Heart Failure

Stéphanie Rimbaud<sup>1,2</sup>, Matthieu Ruiz<sup>1,2</sup>, Jérôme Piquereau<sup>1,2</sup>, Philippe Mateo<sup>1,2</sup>, Dominique Fortin<sup>1,2</sup>, Vladimir Veksler<sup>1,2</sup>, Anne Garnier<sup>1,2</sup>, Renée Ventura-Clapier<sup>1,2\*</sup>

**1** UMR-S 769 Inserm, Univ Paris-Sud Châtenay-Malabry, Châtenay-Malabry, France, **2** Univ Paris-Sud, IFR 141, Châtenay-Malabry, France

## Abstract

Heart failure (HF) is characterized by contractile dysfunction associated with altered energy metabolism. This study was aimed at determining whether resveratrol, a polyphenol known to activate energy metabolism, could be beneficial as a metabolic therapy of HF. Survival, ventricular and vascular function as well as cardiac and skeletal muscle energy metabolism were assessed in a hypertensive model of HF, the Dahl salt-sensitive rat fed with a high-salt diet (HS-NT). Resveratrol (18 mg/kg/day; HS-RSV) was given for 8 weeks after hypertension and cardiac hypertrophy were established (which occurred 3 weeks after salt addition). Resveratrol treatment improved survival (64% in HS-RSV versus 15% in HS-NT,  $p < 0.001$ ), and prevented the 25% reduction in body weight in HS-NT ( $P < 0.001$ ). Moreover, RSV counteracted the development of cardiac dysfunction (fractional shortening  $-34\%$  in HS-NT) as evaluated by echocardiography, which occurred without regression of hypertension or hypertrophy. Moreover, aortic endothelial dysfunction present in HS-NT was prevented in resveratrol-treated rats. Resveratrol treatment tended to preserve mitochondrial mass and biogenesis and completely protected mitochondrial fatty acid oxidation and PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ) expression. We conclude that resveratrol treatment exerts beneficial protective effects on survival, endothelium-dependent smooth muscle relaxation and cardiac contractile and mitochondrial function, suggesting that resveratrol or metabolic activators could be a relevant therapy in hypertension-induced HF.

**Citation:** Rimbaud S, Ruiz M, Piquereau J, Mateo P, Fortin D, et al. (2011) Resveratrol Improves Survival, Hemodynamics and Energetics in a Rat Model of Hypertension Leading to Heart Failure. PLoS ONE 6(10): e26391. doi:10.1371/journal.pone.0026391

**Editor:** Leon J. de Windt, Cardiovascular Research Institute Maastricht, Maastricht University, Netherlands

**Received:** July 20, 2011; **Accepted:** September 26, 2011; **Published:** October 18, 2011

**Copyright:** © 2011 Rimbaud et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from Fondation de France (FDF\_R08111LL), the European Union contract (LSHM-CT-2005-018833/EUGeneHeart) and Bonus Qualité Recherche Université Paris-Sud. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Renée Ventura-Clapier is senior scientist at Centre National de la Recherche Scientifique.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: renee.ventura@u-psud.fr

## Introduction

Heart failure (HF) is a complex and multicausal chronic syndrome characterized by profound myocardial dysfunction resulting in the inability of the cardiac pump to meet the requirements of the body. Alterations in energy metabolism are increasingly proposed as key events in the progression of the pathology [1–3] with effects also in peripheral muscles, thus suggesting a generalized metabolic myopathy in HF [4–6]. In addition, the phosphocreatine (PCr) to ATP ratio, a marker of energy metabolism of the myocardium has prognostic value in dilated cardiomyopathy [7]. These energetic alterations mainly originate from a down-regulation of genes involved in mitochondrial biogenesis and substrate utilization, the up-stream peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma co-activator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) and its downstream transcription factors and nuclear receptors [8,9] (for review see [10]). Moreover, the decreased expression of PPAR $\alpha$  in the failing heart leads to a marked reduction in fatty acid (FA) utilization [11]. It is thus largely accepted that a defective PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  axis plays a pivotal role in the pathogenesis of HF [12]. The generalized deficiency in energy metabolism, affecting substrate utilization, energy produc-

tion, transfer and utilization in HF, thus paves the way for a metabolic therapy targeting energy starvation [2,4].

Resveratrol, a polyphenol with antioxidant, anti-apoptotic, anti-inflammatory and metabolic properties was recently identified as an activator of energy metabolism. Enhanced SIRT1 activity decreases plasma glucose levels, improves insulin sensitivity, increases mitochondrial number and function, decreases adiposity, improves exercise tolerance and potentially lowers body weight [13]. Resveratrol can induce mitochondrial biogenesis and improve fatty acid oxidation (FAO) in many tissues via a mechanism involving sirtuins and AMP-activated protein kinase (AMPK) [14,15]. In the heart, resveratrol decreases pressure overload-induced hypertrophy and contractile dysfunction [16–20]. A diet rich in polyphenols has been shown to reduce cardiovascular risk and induce vascular protection [21] and may exert anti-hypertensive and antiatherogenic effects [22]. Moreover resveratrol-rich extracts upregulate PGC-1 $\alpha$  and PPAR $\alpha$  cardiac expression and/or activity [23]. Because of its positive effects on vascular function and energy metabolism, we hypothesized that resveratrol could also have beneficial effects in HF. Therefore we examined in an experimental model, the Dahl-salt sensitive (DSS) rat, whether resveratrol is protective against the development of HF and associated metabolic dysfunction.

## Results

### Resveratrol improves survival and prevents body mass loss

HS-NT animals had a low survival rate (7/48 of HS-NT rats, i.e. 14.6%), but this was largely increased with resveratrol treatment (9/14 of HS-RSV rats, i.e. 64.3%) (Figure 1A). Thus resveratrol treatment was strongly protective. At sacrifice, the body weight of HS-NT rats was 25% lower than that of both LS controls and HS-RSV rats (Figure 1B). Heart weight (absolute and normalized to tibia length) was significantly increased (by 33% and 35% respectively) in HS-NT animals ( $p < 0.001$ ) relative to LS animals and did not change with resveratrol treatment (Table 1). In HS-NT lung weight was increased and decreased by resveratrol only when related to body mass. The increase in kidney weight in HS-NT was moderately prevented by resveratrol treatment (Table 1). Total cholesterol, HDL and LDL were significantly increased in HS-NT compared to LS animals and tended to decrease with RSV treatment. No significant change in blood triglycerides and glucose was observed whatever the groups (Table S1).

### Resveratrol improves cardiac function and remodeling without changing blood pressure

At 3 weeks, HS rat hearts had increased wall thickness (Table S2) and calculated ventricular mass compared with LS hearts (Figure 2B) with unaltered fractional shortening (FS, Figure 2C). Eight weeks later, ventricular mass was further increased both in HS-NT (+47%), and HS-RSV (+33%) compared to LS, with no significant difference between the two groups. HS-NT rats showed systolic dysfunction, with a 34% reduction in fractional shortening (FS, Figure 3C), 62% increase in end-systolic left ventricle (LV) diameter and 23% decrease in cardiac output, as well as diastolic dysfunction assessed by Doppler tissue imaging [24] (Table 1) whereas end-diastolic LV diameter was the same as in low salt controls (Figure 2D). No major change in intrinsic mechanical properties could be observed with the exception of the hill coefficient of calcium sensitivity (Table S3). Remarkably, both diastolic and systolic dysfunction was prevented by resveratrol treatment. Resting, maximal and mean blood pressure (BP) was already increased in HS compared with LS animals at 3 weeks (from  $152 \pm 4$  mmHg versus  $116 \pm 9$  mmHg, respectively), with no further increase occurring at 11 weeks in either HS-NT or HS-RSV groups (Figure 2E, Table S2). Thus resveratrol prevented cardiac dysfunction without affecting blood pressure and cardiac mass.

Expression of atrial natriuretic factor (ANF), brain natriuretic peptide (BNP) and myosin heavy chain  $\beta$  ( $\beta$ -MHC) mRNA, all markers of cardiac remodeling, was highly up-regulated in HS-NT animals, whereas in resveratrol-treated animals the increase in ANF was attenuated (Figure 2F). Similarly, in HS-NT animals there was a great decrease in mitochondrial and cytosolic creatine kinases (miCK and MM-CK) activities, markers of metabolic disturbances in HF, whereas mi-CK activity was maintained at the level of controls in HS-RSV animals (Figure 2G). The protein content of calcium metabolic markers like SERCA and calsequestrin did not significantly differ between these groups (Table S3).

### Resveratrol protects endothelial function

Carbachol-dependent relaxation of aorta after contraction induced by prostaglandin F $2\alpha$  was impaired in HS-NT animals compared with LS animals (Figure 3A). This impairment was completely prevented by resveratrol treatment. When nitric oxide (NO) was directly provided by S-nitrosothiol-N-acetyl-penicillamine (SNAP), a significant rightward shift was observed ( $p < 0.001$ ) in HS-NT rats that was not corrected by resveratrol (Figure 3B), suggesting an endothelium- and NO-dependent protective effect of

resveratrol. Indeed, eNOS protein content was decreased in HS-NT and preserved by resveratrol treatment (Figure 3C).

### Resveratrol improves mitochondrial respiration, biogenesis and substrate utilization

Both maximal cardiac fiber oxidative capacity and citrate synthase (CS) activity were reduced in HS-NT rats but were preserved in HS-RSV rats compared with LS controls (Figure 4A and B), while COX activity was similar in all three groups. Expression levels of genes involved in energy metabolism are presented in Figure S1. There was a modest decrease in the expression of PGC-1 $\alpha$  and its transcriptional cascade, key modulators of mitochondrial biogenesis, which were not prevented by resveratrol treatment (Figure 4C). Interestingly, expression of proteins involved in mitochondrial fusion was decreased in HS-NT animals, two of which (Mfn1 and OPA1) were restored in HS-RSV rats (Figure 4D).

Sarcoplasmic reticulum (SR) calcium uptake capacity with all substrates was not changed (Table S3), whereas the ability of mitochondria to supply energy to the SR-ATPase was decreased in HS-NT versus LS animals and was completely preserved in HS-RSV animals (Figure 4E). No significant change was observed in energy supply by CK. This suggests that the close contacts between SR and mitochondria, necessary for efficient energy transfer, are preserved by resveratrol.

Decreased FAO is an early event in the failing heart. Addition of palmitoyl CoA+carnitine, palmitoylcarnitine, pyruvate, and glutamate resulted in lower respiration rates in HS-NT compared to LS rats, and this was completely prevented with resveratrol treatment (Figure 5A). Moreover, when respiration was normalized to the maximal respiration rate in the presence of all substrates (Figure 5B), the results clearly showed a selective decrease in mitochondrial FAO in HS-NT rats, which was prevented with resveratrol treatment. Accordingly, expression of the nuclear transcription factor controlling FAO, PPAR $\alpha$ , as well as its target genes involved in FA transport (CPT-1b) and oxidation (MCAD, LCAD), or carbohydrate utilization (PDK4), was decreased in the heart of HS-NT. Expression level of PPAR $\alpha$ , CPT-1b and MCAD was preserved in HS-RSV animals compared with LS animals (Figure 5C).

Skeletal muscles also suffer from energy starvation in HF. In soleus muscle as in cardiac muscle, the decrease in oxidative capacity was preserved by resveratrol (Figure 5D) as was the specific decrease in mitochondrial fatty acid oxidation (Figure 5E).

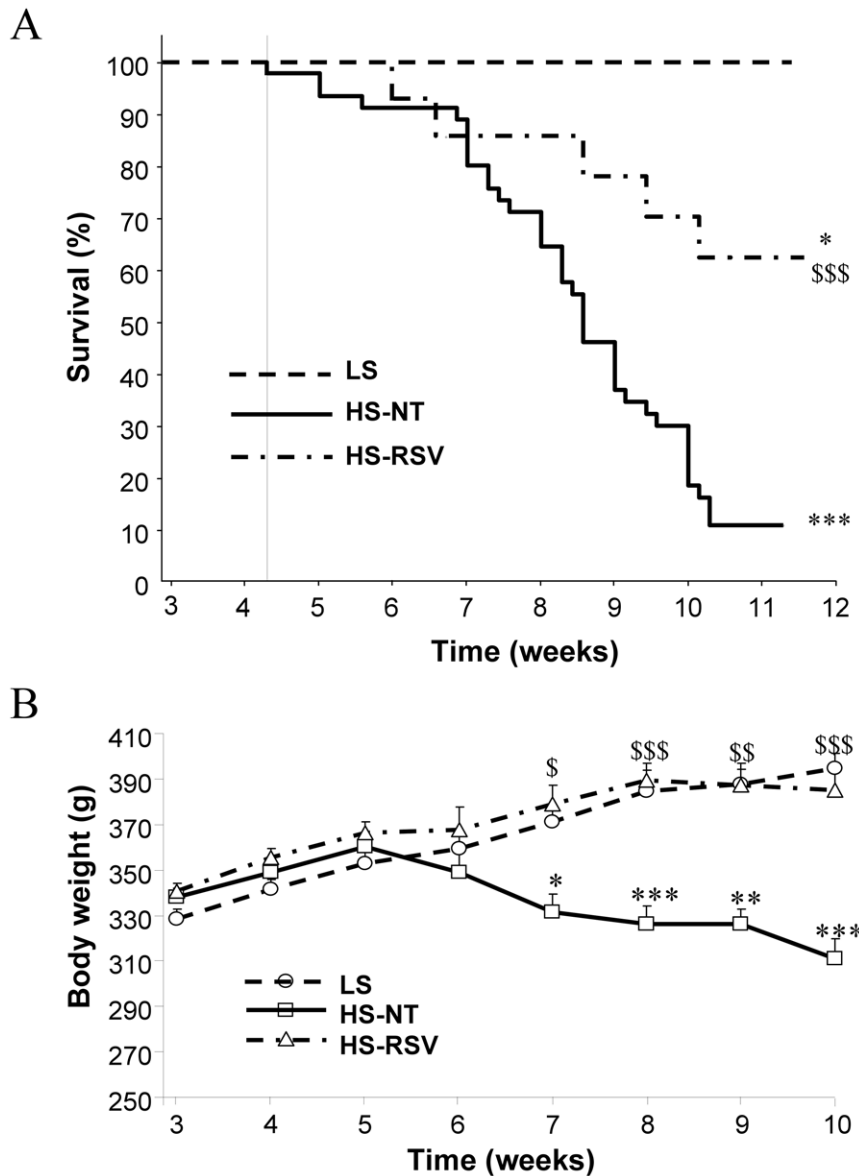
### Signaling pathways potentially involved in beneficial effects of resveratrol

AMPK protein content and phosphorylation as well as phosphorylation of ACC, its main target, did not differ between groups at the end of experiments (Figure 6A). However AMPK activity showed an early increase after 48 hours in RSV-treated cardiomyocytes (Figure 6B). Calcineurin transcriptional activity was estimated by measuring the expression of MCIP1, a known target of NFAT [25]. MCIP1 expression was increased in HS-NT and not influenced by resveratrol (Figure 6C), in accordance with the maintained hypertrophy. Neither expression nor activity of SIRT1 was changed (Figure 6C).

## Discussion

The main purpose of this study was to investigate the use of resveratrol as a potential metabolic therapy for hypertension-induced HF. Resveratrol treatment resulted in 1) an increase in survival rate by more than 50%; 2) complete preservation of myocardial function; 3) prevention of endothelial dysfunction; and 4) preservation of





**Figure 1. Resveratrol treatment increases survival and prevents body wasting in HS rats.** (A) Kaplan-Meier survival analyses for low salt (LS, N=9), high salt (HS, N=48) and high salt treated with resveratrol (HS-RSV, N=14) groups showed decreased survival of HS-NT compared to LS groups (log-rank:  $\chi^2=35.29$ ,  $***P<0.00001$ ). Survival in HS-RSV rats was decreased compared to LS rats (log-rank:  $\chi^2=4.75$ ,  $*P=0.041$ ) but was significantly higher than HS-NT rats (log-rank:  $\chi^2=39.78$ ,  $***P=0.0007$ ). (B) The HS-NT group showed continuous weight loss from the fifth week of salt intake compared to LS. Resveratrol completely prevented HF-induced weight loss.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$  vs LS;  $^{\$}P<0.05$ ,  $^{\$\$}P<0.01$ ,  $^{\$ \$ \$}P<0.001$  vs HS-NT.

doi:10.1371/journal.pone.0026391.g001

cardiac and skeletal muscle mitochondrial respiration, energy supply and FA utilization, as well as cardiac energy transfer. These beneficial effects of resveratrol occurred despite the continued presence of cardiac hypertrophy and hypertension in this model.

#### DSS rats present signs of heart failure

The high salt diet rapidly induced severe hypertension followed by ventricular hypertrophy and LV dysfunction without dilatation, hypercholesterolemia and a high mortality rate. In parallel, markers of cardiac remodeling were sharply upregulated; metabolic markers of HF such as CK isoenzymes and CS were decreased while calcium metabolism markers were not significantly altered. However, there was no clear sign of pulmonary

edema and no ascites. Severe body wasting, which is associated with poor prognosis in HF [26], started at five weeks and was associated with increased mortality rate. DSS rats thus developed ventricular dysfunction with early signs of HF.

#### Resveratrol treatment improves survival and cardiac function

Treatment of HS rats with resveratrol improved cardiac function, concomitant with a remarkable increase in survival rate. The high mortality rate of DSS rats is due *inter alia* to stroke, renal failure and HF. As already reported [27], resveratrol blunted the up-regulation of stress markers, suggesting attenuation of the stress response of the myocardium. These results match those obtained in SHR and

**Table 1.** Structural and, functional parameters from LS, HS and RSV-treated rats.

	LS	HS-NT	HS-RSV
<b>Anatomy</b>	<b>(N = 9)</b>	<b>(N = 7)</b>	<b>(N = 9)</b>
Body weight (BW, g)	400±5	295±27***	393±14 <sup>SSS</sup>
Tibia length (TL, cm)	4.49±0.02	4.39±0.05*	4.5±0.01 <sup>§</sup>
Heart weight (HW, g)	1.35±0.03	1.79±0.11***	1.78±0.05***
HW/BW (mg/g)	3.4±0.1	6.3±0.6***	4.6±0.3 <sup>§§</sup>
HW/TL (mg/cm)	301±7	406±23***	396±12***
Lung W/TL (mg/cm)	421±4	493±59	482±19
LW/BW (mg/g)	4.7±0.1	7.7±1.3*	5.6±0.4 <sup>§</sup>
Kidney W/TL (mg/cm)	307±7	596±27***	501±33***,§
KW/BW (mg/g)	3.4±0.1	9.2±0.7***	5.9±0.6 <sup>**SSS</sup>
<b>Echocardiography</b>	<b>(N = 8)</b>	<b>(N = 8)</b>	<b>(N = 9)</b>
IVSd (mm)	1.61±0.10	2.06±0.12*	1.93±0.07*
PWTd (mm)	1.84±0.09	1.96±0.15	2.12±0.09
Telediastolic volume (ml)	0.91±0.04	1.23±0.16	0.99±0.08
Telesystolic volume (ml)	0.08±0.01	0.34±0.06***	0.14±0.04 <sup>SS</sup>
Ejection fraction (%)	91.7±0.8	73.7±3.3***	87.4±2.2 <sup>SSS</sup>
Cardiac output (ml/min)	311±13	241±26*	301±12 <sup>§</sup>
<b>Doppler analysis</b>	<b>(N = 5)</b>	<b>(N = 6)</b>	<b>(N = 9)</b>
Eann (m/s)	0.082±0.01	0.046±0.003***	0.067±0.003***,§§
E/Eann	14.2±1.9	22.0±3.2*	17.1±1.2

HW: heart weight; IVSd: interventricular septum in diastole; PWTd: posterior wall in diastole; TL: tibia length.

\*P<0.05,

\*\*\*P<0.001 vs LS;

§P<0.05,

§§P<0.01,

§§§P<0.001 vs HS-NT.

doi:10.1371/journal.pone.0026391.t001

infarcted rats where cardiac function was preserved by resveratrol without affecting BP [17,18,27]. In DSS rats, the renal hypertrophy is mainly the result of fibrosis induced by activated inflammatory or immune processes, which, in turn, depend on oxidative stress [28], while aldosterone seems to play a role on glomerulosclerosis, podocyte [29] non-related to the hypertension. This effect could result from local anti-oxidant activity of RSV.

Interestingly, in line with the maintained elevated BP, improvement of cardiac function and survival in DSS rats was not accompanied by a prevention of ventricular wall thickening and hypertrophy. The anti-hypertrophic effects of resveratrol was reported in animal models [30] associated with the circulating renin-angiotensin system (RAS) activation. This system may be blunted by RSV treatment [22,31] thus reducing the cardiac hypertrophy. In contrast, in DSS rats, circulating RAS is rather inhibited [32] and hypertension is mostly linked to blood volume expansion [33] so that potential anti-RAS activity of RSV does not reduce hypertension. This suggests that resveratrol may have separate, beneficial effects on hypertension and cardiac hypertrophy, and thus the benefits of resveratrol may depend on the etiology of HF. Interestingly, stimulation of carbohydrate metabolism by activation of pyruvate kinase induced similar beneficial effects without reducing BP and hypertrophy [34].

### Resveratrol prevents endothelial dysfunction

Another pathological event in HF is endothelial dysfunction resulting in increased peripheral resistances and increased load to

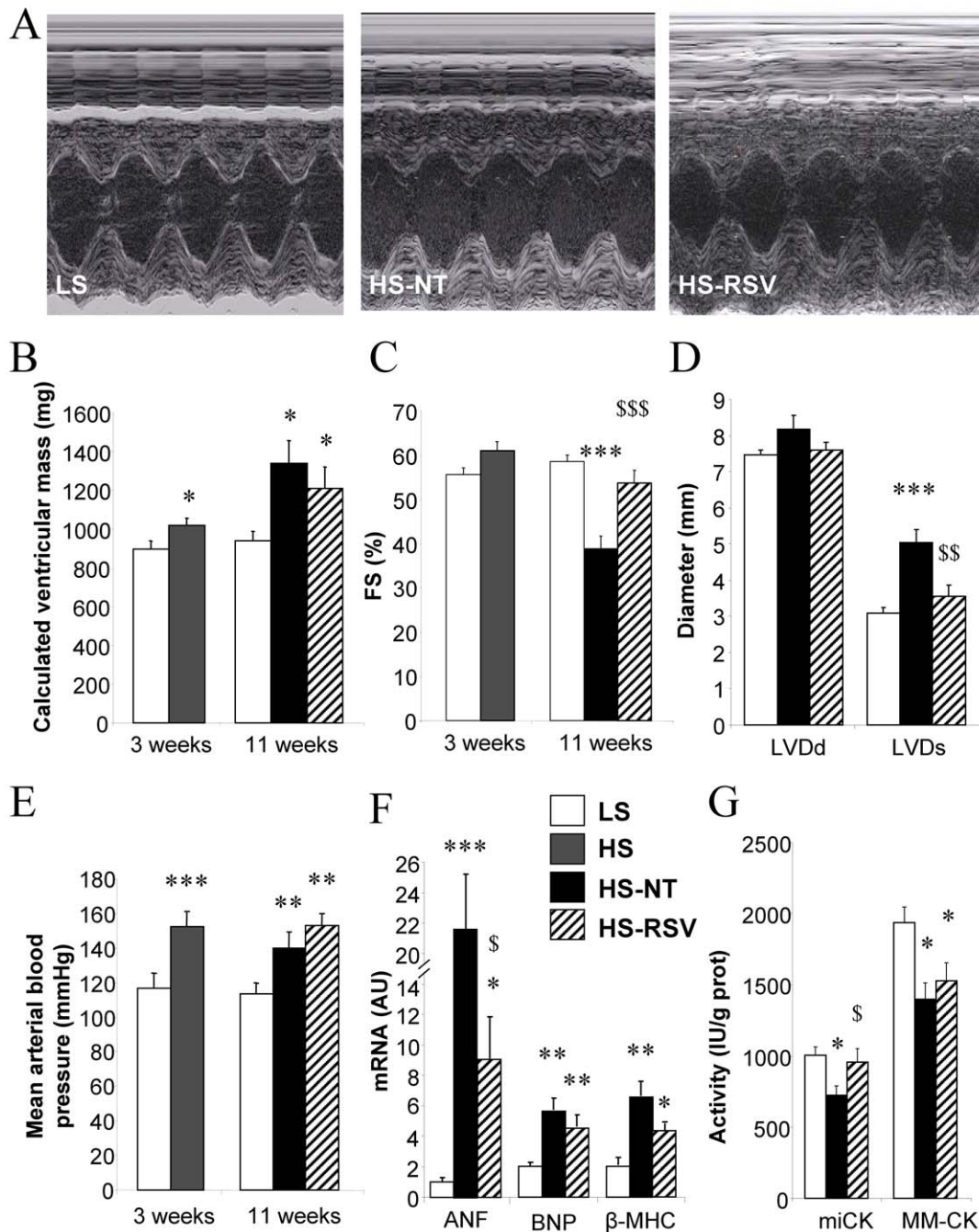
the myocardium. This endothelial dysfunction is due to a decrease in NO production resulting in impaired smooth muscle relaxation. In HS-NT animals, the impaired vasodilatation could be attributed to the sharp decrease in eNOS protein content inducing a decrease in NO production. The moderate decrease in the sensitivity of vascular relaxation to NO may also play a role in the reduced response to carbachol.

DSS rats also demonstrate high level of vascular fibrosis found in aortic tunica media and tunica adventitia [35], which increases the vascular rigidity thus contributing to the hypertension. Probably, such rigidity was not corrected by RSV and this explains why improved endothelial function in aorta did not lead to an attenuation of the hypertension. Further studies on small arteries need to be conducted in order to elucidate this question.

Polyphenols are known to exert positive effects on endothelial function and cardiac function in obesity [36]. The remarkable improvement of endothelial function by resveratrol in HS animals treated with RSV could be achieved through up-regulation of eNOS expression that normalizes vasodilatation.

### Resveratrol improves mitochondrial function, fatty acid utilization and energy transfer

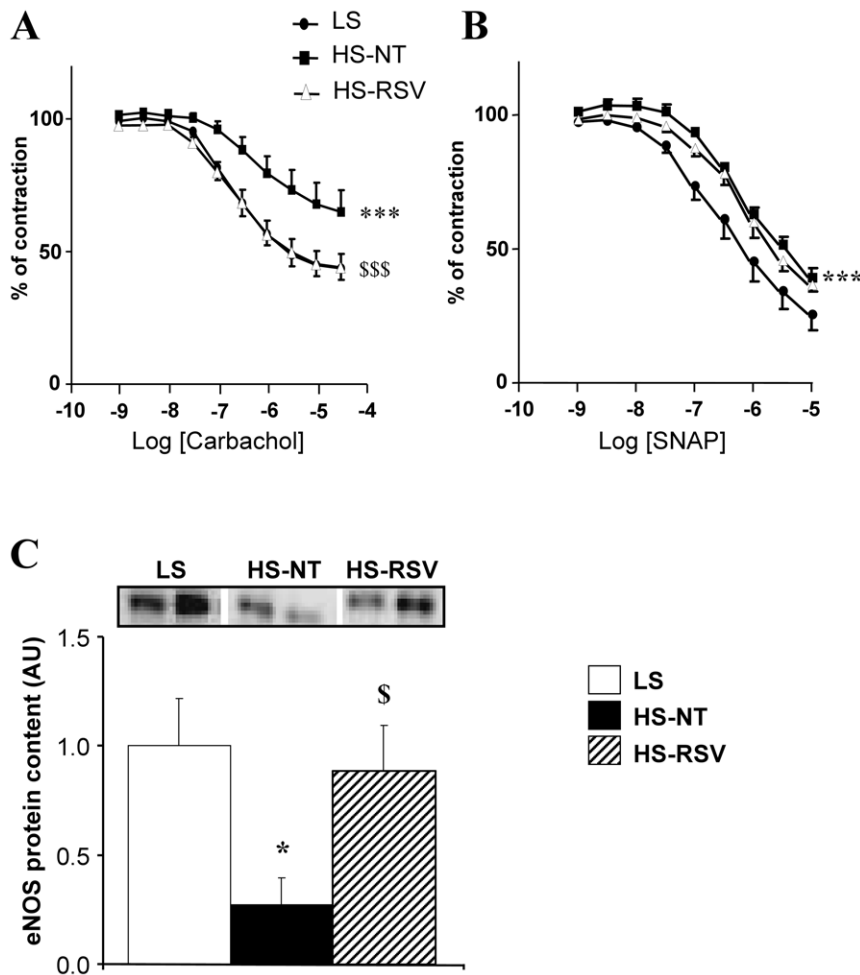
Altered energy metabolism, particularly mitochondrial dysfunction, is hallmark of HF that affects both cardiac and skeletal muscles [5,6,37,38]. HS-NT rats presented signs of myocardial metabolic disorders with reduced oxidative capacity, CS activity and miCK content, and a global downregulation of genes



**Figure 2. Resveratrol preserves cardiac function, with no effect on hypertrophy or hypertension.** Cardiac morphology and function were assessed by echocardiography. (A) Representative M-mode images of the LV in LS, HS-NT and HS-RSV groups after 11 weeks of conditioning. (B) Calculated left ventricular mass and (C) fractional shortening (FS) at 3 and 11 weeks. (D) End-diastolic and end-systolic left ventricle diameter (LVDd and LVDs, respectively) at 11 weeks. (E) Mean arterial blood pressure. (F) Markers of remodeling: ANF (atrial natriuretic factor), BNP (brain natriuretic protein)  $\beta$ -MHC ( $\beta$  myosin heavy chain) and (G) energy metabolism miCK and MM-CK (mitochondrial and myofibrillar creatine kinase). Between 6 and 9 animals per group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs LS;  $^{\$}P < 0.05$ ,  $^{\$\$}P < 0.01$ ,  $^{\$ \$ \$}P < 0.001$  vs HS-NT. doi:10.1371/journal.pone.0026391.g002

involved in mitochondrial biogenesis such as PGC-1 $\alpha$ , ERR $\alpha$  and their downstream target genes, similar to numerous HF models including DSS rats [8–10,12,34,34,39,40]. Resveratrol preserved cardiac and skeletal muscle oxidative capacity and mitochondrial enzyme activities, with no major changes in expression of the mitochondrial biogenesis transcription cascade.

In HS-NT rats, the specific reduction in mitochondrial FAO capacity was accompanied by down-regulation of genes controlling FAO, PPAR $\alpha$  and its downstream targets. Remarkably, these alterations were prevented by resveratrol treatment, independently of changes in triglyceridemia. These results are consistent with the beneficial effects of grape extracts on PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  observed in DSS rats [23] and the PPAR $\alpha$ -dependent beneficial effect of



**Figure 3. Endothelial function is preserved in aorta from resveratrol-treated rats.** (A) Carbachol-induced relaxation of aortic rings precontracted with prostaglandin-F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ). (B) Endothelium-independent vasodilatation assessed using a NO donor (SNAP, S-nitrosothiol-N-acetyl-penicillamine) on PGF<sub>2</sub> $\alpha$ -precontracted aorta rings. Between 6–8 experiments per group. (C) Western blot analysis of eNOS expression of LS (N=4), HS-NT (N=5) and HS-RSV (N=7) aortas. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 vs LS; <sup>S</sup>P<0.05, <sup>SSS</sup>P<0.001 HS-RSV vs HS-NT. doi:10.1371/journal.pone.0026391.g003

resveratrol on isoprenaline-induced cardiac dysfunction [41]. Interestingly, our results indicate that FAO activation can be associated with improved cardiac function, provided that a concomitant increase in mitochondrial capacity ensures proper FA utilization.

Decreased energy transfer by the CK system is also a hallmark of HF [37], characterized by a decrease in total and miCK activity, the latter being completely normalized by resveratrol treatment. This suggests that maintaining energy metabolism can help preserve cardiac contractile function and survival.

Mitochondria are involved in permanent fusion and fission events. Fission requires the dynamin-related protein 1 (Drp1), whereas fusion is mediated by two dynamin-related proteins involved in outer membrane fusion, mitofusins (Mfn1 and Mfn2), and OPA1 (Optic atrophic type 1 protein) which is localized at the inner membrane (for review see [42]). In HS-NT rats, expression of fusion proteins was decreased, suggesting a shift towards increased fragmentation of the mitochondrial network. Again, resveratrol treatment prevented Mfn1 and OPA1 changes thus tending to normalize the fusion/fission balance.

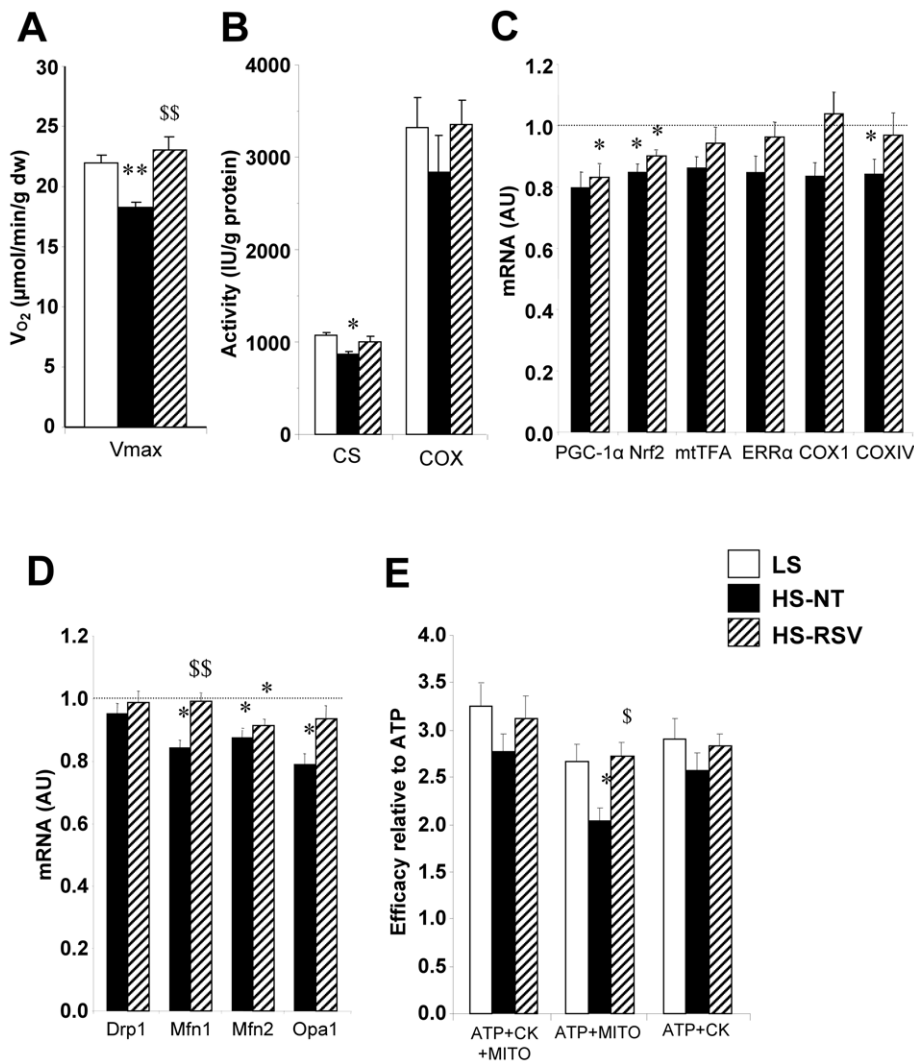
Finally, resveratrol beneficial effects on mitochondrial biogenesis and dynamics may explain the conservation of energetic coupling between mitochondria and the SR-ATPase. Direct energy cross talk

between mitochondria and energy consuming sites [43] is driven by restricted diffusion of adenine nucleotides and is facilitated by the juxtaposition of sites that produce and consume energy. HF is characterized by impaired intracellular organization and a decrease in SR calcium storage capacity, which is directly linked to a local decrease in ATP/ADP ratio [44]. Such a defect in mitochondria/SR-ATPase interaction was also evident in the HS-NT group, and was again prevented by resveratrol treatment. This reveals a novel effect of resveratrol on energy transfer and supply.

Importantly, these resveratrol-mediated effects are not a consequence of reduced hypertension or cardiac hypertrophy.

#### Mode of action of resveratrol

In view of the pleiotropic effects of RSV, it is likely that the beneficial effects of resveratrol in HF are multifactorial and involve multiple signaling pathways acting on a variety of cellular targets (Figure 7). The major effect of resveratrol was to abolish the down-regulation of PPAR $\alpha$  and modestly prevent PGC-1 $\alpha$  transcription cascade and mitochondrial lipid oxidation decrease. Interestingly, the cardioprotective and neuroprotective effects of resveratrol (and grapes) were shown to depend on PPAR $\alpha$  and to involve improved lipid metabolism and inflammation [23,41,45]. Resveratrol effects



**Figure 4. Cardiac mitochondrial function and biogenesis.** (A) Maximal mitochondrial respiration of skinned fibers with 2 mM ADP, 4 mM malate, 0.1 mM palmitoylCoA, 0.15 mM palmitoylcarnitine, 1 mM pyruvate and 10 mM glutamate. (B) Citrate synthase (CS) and cytochrome oxidase (COX) activities, markers of mitochondrial mass. (C) mRNA levels of PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$ ), Nrf2 (nuclear respiratory factor 2), mtTFA (mitochondrial transcription factor A), ERR $\alpha$  (estrogen-related receptor  $\alpha$ ), COX1 and IV (cytochrome c oxidase I and IV subunits). (D) mRNA levels of the fission protein Drp1 (dynamin-related protein 1) and the fusion proteins Mfn (mitofusin) 1 and 2 and OPA1 (optic atrophy 1). (E) Energetic coupling efficiency between sarcoplasmic reticulum ATPase and mitochondria or bound creatine kinases (CK) assessed by the ratio of calcium uptake under different energetic conditions (ATP+MITO+CK, ATP+MITO, ATP+CK, see Methods S1) to the uptake with ATP only. mRNA levels are normalized to LS group taken as 1. Between 6 and 9 animals per group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs LS; \$ $P < 0.05$ , \$\$ $P < 0.01$  vs HS-NT.

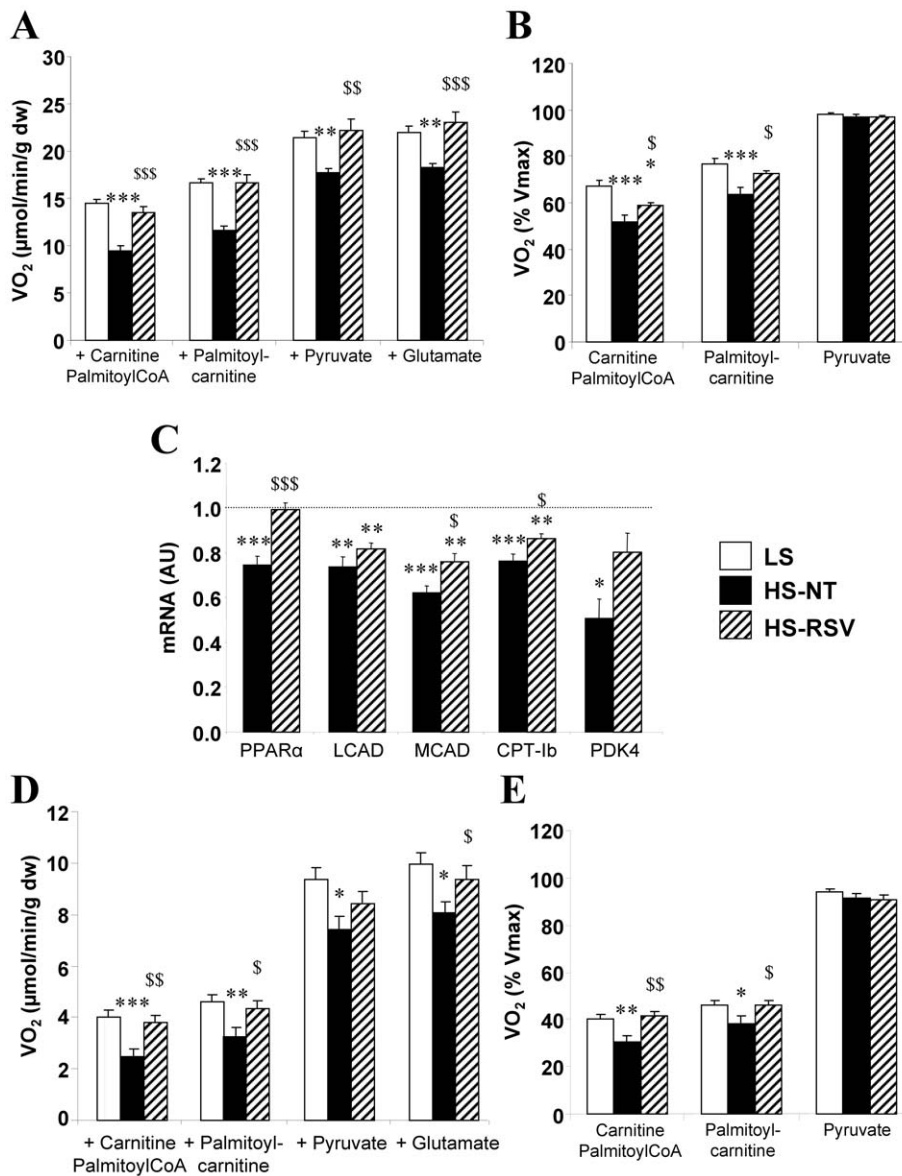
doi:10.1371/journal.pone.0026391.g004

could in part be mediated by activation of PGC-1 $\alpha$  via SIRT1-dependent deacetylation as seen in skeletal muscle [46] but cardiac SIRT1 expression and activity were not altered in HS-NT and HS-RSV groups. However, lack of effect of resveratrol on PGC-1 $\alpha$  acetylation in heart, was already reported in resveratrol-treated mice [14]. AMPK, is a central target for the metabolic effects of resveratrol and an important player in modulating energy metabolism [15]. Although activated for short term resveratrol treatment of cardiomyocytes, AMPK activation was unchanged in HS-NT and resveratrol-treated rats at the end of treatment. The increased calcineurin transcriptional activity in HS-NT rats was not prevented by resveratrol, consistent with the maintained hypertrophy. Moreover it should be noted that resveratrol may also indirectly improve cardiac energy metabolism through its vasorelaxing effect, which

could ameliorate perfusion and enhance oxygen and substrate delivery to the heart and the periphery. Finally, the beneficial cardiovascular and metabolic effects of resveratrol could also result from its phytoestrogenic properties [47,48].

## Conclusions

The present study was aimed at investigating the relevance of a metabolic therapy of HF using resveratrol. Our data show multiple beneficial effects of resveratrol in hypertension-induced HF, with increased survival, reduced body wasting and improved cardiac and endothelial function in particular. The major metabolic effect of resveratrol in both cardiac and skeletal muscles was to restore the expression of PPAR $\alpha$  and attenuate PGC-1 $\alpha$  transcription cascade down-regulation and mitochondrial lipid oxidation



**Figure 5. Resveratrol improves cardiac and soleus muscle fatty acid utilization.** (A) Mitochondrial substrate utilization assessed by respiration of permeabilized cardiac fibers using cumulative addition of 2 mM ADP 4 mM malate, 1 mM carnitine and 0.1 mM palmitoylCoA, 0.15 mM palmitoylcarnitine, 1 mM pyruvate and 10 mM glutamate. (B) Respiration normalized to the maximal respiration rate and measured in the presence of all of the substrates revealed decreased fatty acid oxidation. (C) mRNA levels of PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ), LCAD (long-chain acylCoA dehydrogenase), MCAD (middle-chain acylCoA dehydrogenase), CPT-1b (carnitine palmitoyltransferase 1b), PDK4 (pyruvate dehydrogenase kinase 4). (D) Mitochondrial substrate utilization of permeabilized soleus fibers. (E) Normalized respiration, indicating decreased fatty acid oxidation by soleus mitochondria. Between 7 and 9 animals per group. mRNA levels were normalized to LS group taken as 1. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs LS;  $\$P < 0.05$ ,  $\$\$P < 0.01$ ,  $\$\$\$P < 0.001$  vs HS-NT. doi:10.1371/journal.pone.0026391.g005

decrease. Interestingly, the cardioprotective and neuroprotective effects of resveratrol (and grapes) were shown to depend on PPAR $\alpha$  and to involve improved lipid metabolism and inflammation [23,41,45]. Indeed, resveratrol completely prevented cardiac FA utilization reduction and improved mitochondria-driven energy supply while preserving expression of mitochondrial fusion protein. This suggests that amelioration of energy metabolism may contribute to the regression of HF independent of cardiac hypertrophy. Interestingly, a recent study describing the metabolic remodeling of the failing heart showed that activation of carbohydrate metabolism with dichloroacetic acid provided a similar improvement in cardiac function and survival [34].

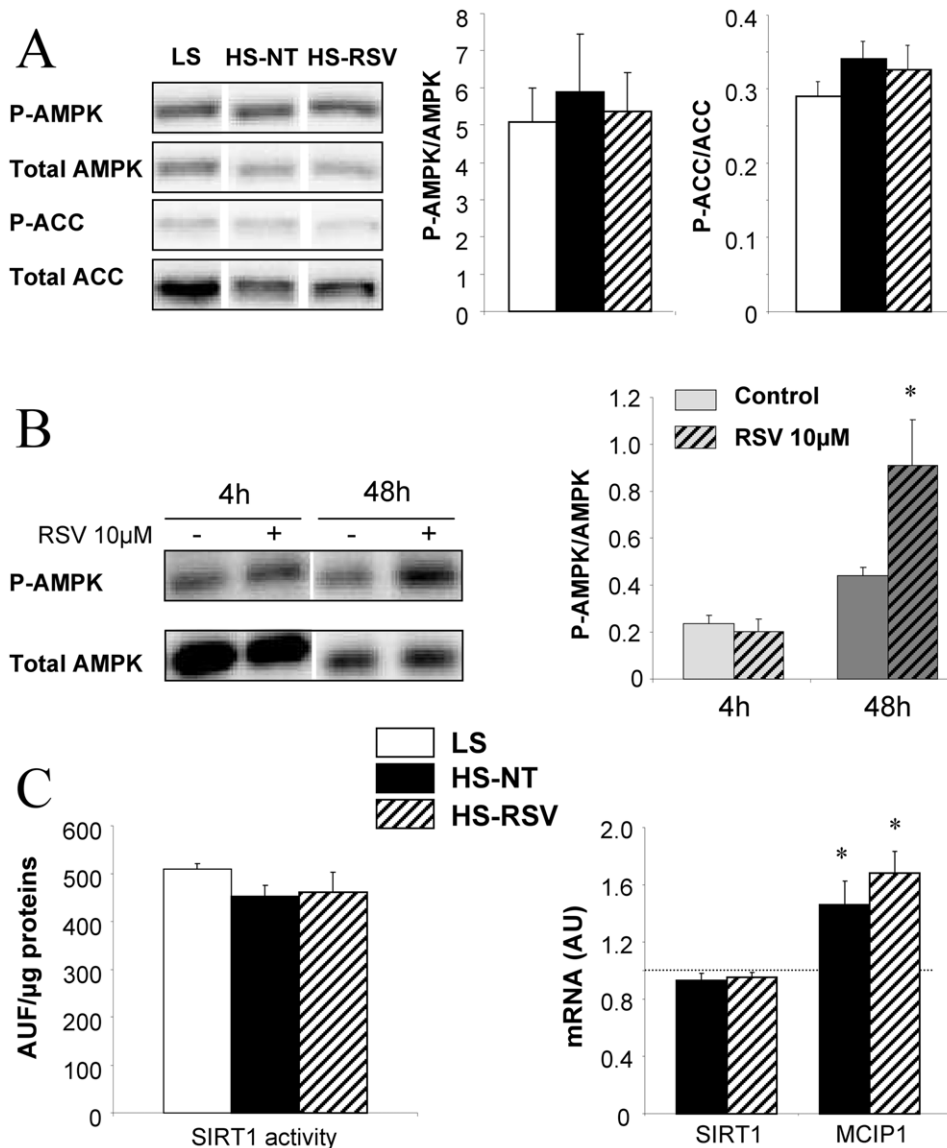
Altogether this highlights the relevance of metabolic therapy in HF. Resveratrol and other metabolic activators are thus interesting candidates for preventive metabolic therapy in HF.

## Methods

Detailed Methods are presented in the supplemental file (Methods S1).

## Ethics Statements

All experiments were performed in conformity with the European Community guiding principles in the care and use of



**Figure 6. Resveratrol and signaling pathways.** (A) Total and phosphorylated AMPK (AMP-activated kinase) and ACC (acylCoA carboxylase) were unchanged in ventricles from LS (n=7), HS-NT (n=6) and HS-RSV (n=7) groups. (B) AMPK activation induced in adult rat ventricular myocytes after 48 h of resveratrol treatment (n=6). (C) SIRT1 activity and expression were unchanged, and calcineurin transcriptional activity assessed by measuring the expression of its target gene MCIP1 was increased in HS-NT rats but not affected by resveratrol treatment. mRNA levels normalized to LS group taken as 1. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs LS or control.

doi:10.1371/journal.pone.0026391.g006

animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament). Authorizations to conduct animal experiments were obtained from the French Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation (no. 92-284, June 27, 2007).

#### Animals conditioning

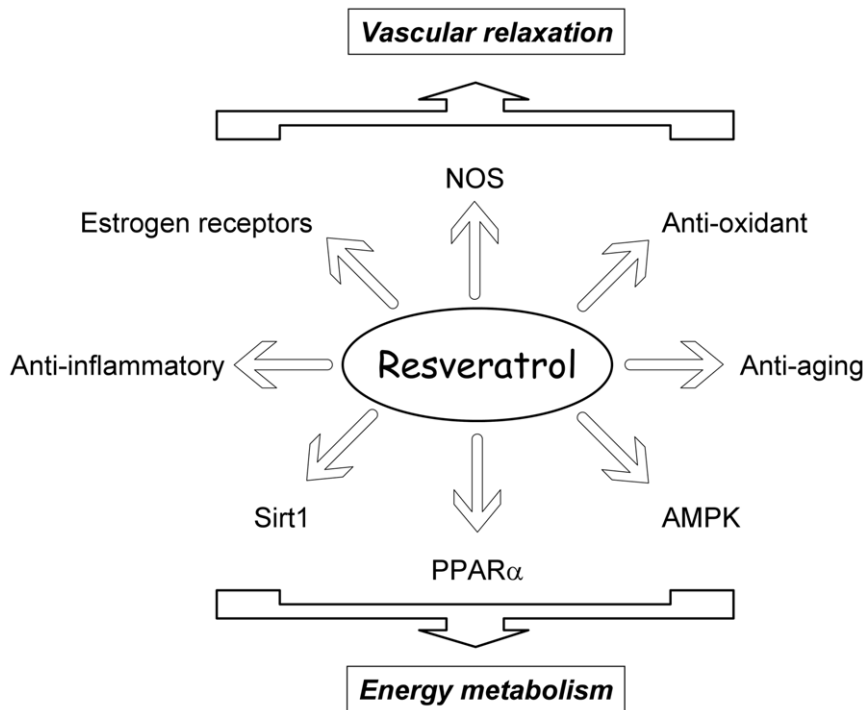
The Dahl salt-sensitive rats (DSS) were chosen as a model of hypertension. Seven week-old male DSS rats (Charles River France) were randomly divided in two groups: 9 rats were fed a low-salt diet (0.3% NaCl) for 11 weeks as controls (LS rats) and 62 rats were fed a high-salt diet (8% NaCl) for 3 weeks (HS rats). The HS group was then subdivided into two groups for 8 weeks: a non-treated group (HS-NT; n=48) and a resveratrol-treated group (HS-RSV; n=14; 18 mg/kg/day in the diet). Diets were manufactured by UPAE-INRA (INRA, Jouy-en-Josas, France)

and composition is given in Table S4. The animals were housed 1 per cage in a temperature-controlled room (22°C), with a 12/12 h light/dark cycle, and were provided food and water ad libitum.

Diets were manufactured by UPAE-INRA (INRA, Jouy-en-Josas, France) and composition is given in Table S1. The dose of resveratrol of  $\approx 20$  mg/kg/d proved to be efficient in preventing pulmonary hypertension [49] and in vasoprotection [50] and to have no toxicity [51].

#### Echocardiography and blood pressure measurements

Echocardiography was performed at 3 and 11 weeks of diet treatment using a 12 MHz transducer (Vivid 7, General Electric Healthcare) under 2.5% isoflurane gas anesthesia. Two-dimensional-guided (2D) M-mode echocardiography was used to determine wall thickness and left ventricular chamber diameter



**Figure 7. Summary of possible modes of action of resveratrol.**  
doi:10.1371/journal.pone.0026391.g007

at systole and diastole, and contractile parameters such as fractional shortening (FS) or ejection fraction (EF%). Left ventricular mass was calculated according to the Penn formula home-adapted for the rat heart:  $(LVM = 1.04 \times [(Dtd + SIV + PP)^3 - (Dtd)^3])$ . Doppler at the mitral valve was used to measure E and A waves when possible and Doppler tissue imaging was used to assess early diastolic lateral mitral annulus velocity as an estimate of left ventricle diastolic function [24].

Arterial blood pressure was measured in conscious, restrained rats using a tail-cuff system (CODA™ 2 system, EMKA Technologies France) in a dark temperature-controlled room (22°C) in the morning. Rats were subjected to 15 acclimation measurements in restraint holder then blood pressure was calculated from the average of 10 measurement cycles.

#### Blood assays and sacrifices

At the end of the conditioning period, all non-fasted rats were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (200 mg/kg) at 10 am. Depth of anesthesia was checked by toe pinch before the start of surgery. Whole blood was sampled for lipid and glucose profile analysis using a clinical Cholestech LDX blood analyzer (Cholestech LDX system, GaiaMed). The heart was then quickly removed for euthanasia then soleus muscles and aorta were collected. Part of tissue was immediately used for functional experiments, and another part was rapidly frozen and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further investigations.

#### Aortic reactivity

Vascular function was studied on aorta rings with preserved endothelium mounted in a myograph under optimal and stabilized resting tension. After a 60 min equilibration period in Krebs solution [52], contractile capacity of arteries was evaluated using Krebs solution containing 80 mM of KCl. A submaximal concentration of prostaglandin F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) was applied to

produce a pre-contraction of 80%. Endothelium-dependent relaxation was then assessed by the addition of increasing amounts of carbachol ( $10^{-9}$  to  $3 \times 10^{-5}$  M) while endothelium-independent relaxation was assessed directly using the nitric oxide (NO) donor S-nitrosothiol-N-acetyl-penicillamine (SNAP,  $10^{-9}$  to  $10^{-5}$  M).

#### Mitochondrial function

Oxygen consumption was measured on saponin-permeabilized cardiac and soleus fibers [53]. Maximal respiration rates and sensitivity of mitochondrial respiration to carbohydrates and fatty acids were evaluated using an adapted protocol [54]. Oxygen consumption was followed in the presence of 2 mM ADP and 4 mM malate, by successive additions of substrates: palmitoylCoA 0.1 mM plus carnitine 1 mM, palmitoylcarnitine 0.15 mM, pyruvate 1 mM and glutamate 10 mM. Maximal respiration was measured in the presence of all these mitochondrial substrates. Rates of respiration are given in  $\mu\text{moles O}_2/\text{min/g}$  dry weight (dw). Two to three experiments were performed for each muscle and each protocol.

#### Energy supply on SERCA activity

Local energy control of the sarcoplasmic reticulum (SR) ATPase was assessed using saponin-skinned fibers from papillary muscle mounted on a stainless-steel hook with a force transducer (AE 801, Microelectronics, Horton, Norway) as previously described [43]. Fibers were immersed in 2.5 ml chambers placed into a temperature-controlled bath at 22°C. Briefly, SR calcium loading was initiated at pCa 6.5 in the presence of exogenous ATP, with or without endogenous mitochondrial ATP production and/or creatine kinase system activation. Azide (2 mM) was used to block mitochondrial ATP production, and solutions lacking phosphocreatine (PCr used at 12 mM) were used to block creatine kinase activity. SR calcium release was elicited with 5 mM caffeine, and was detected by measuring the resulting contractile force transient.



At the end of each experiment pCa-tension relationship was assessed by stepwise increasing the calcium concentration in the presence of caffeine and was used as an endogenous calibration of calcium concentration around the fibers. [Calcium]-time integral was calculated to estimate calcium uptake occurring before caffeine challenge. Results are expressed as absolute value for MITO+PCr or relative to the load with ATP alone. pCa-tension relationship allowed to calculate resting and maximal developed force. Force was normalized to cross sectional fiber area and expressed as  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ . Data were analyzed using a linearization of the Hill equation  $F$  (relative force) =  $[\text{Ca}^{\text{NH}}/(\text{K}+[\text{Ca}])]$ . The Hill coefficient (nH) and the pCa for half maximal activation  $\text{pCa}_{50} = (-\log_{10} \text{K})/\text{nH}$  were computed.

### Real-time quantitative PCR analysis

Real-time PCR was performed using TaqMan Low Density Array (TLDA) technology. TLDA were designed to amplify 48 cDNA for each sample as follows: 43 target genes involved in energy metabolism and mitochondrial function and 5 housekeeping genes (Table S5). For more details see Methods S1 available in the online supporting information.

### Immunoblotting

SERCA2, calsequestrin and eNOS expression, and AMPK phosphorylation were assessed on proteins extracts from hearts or aorta and/or resveratrol-treated adult rat ventricular myocytes by immunoblotting as detailed in Methods S1.

### Biochemical studies

Frozen tissue samples were weighed, homogenized (Bertin Precellys 24) in ice-cold buffer (50 mg/ml) containing (mM) 5 HEPES (pH 8.7), 1 EGTA, 1 DTT and 0.1% Triton X-100. Citrate synthase (CS), cytochrome oxidase (COX) and total creatine kinase (CK) as well as CK isoforms activities were determined in homogenized ventricles as previously described [37].

SIRT1 activity was assessed in ventricles using a SIRT1 fluorimetric assay kit (BIOMOL, EnzoLifeSciences) following an adapted procedure. Briefly, 25  $\mu\text{g}$  of total protein were incubated with 15  $\mu\text{l}$  of Fluor de Lys-Sirt1 substrate (100  $\mu\text{M}$ ) and  $\text{NAD}^+$  (100  $\mu\text{M}$ ) at 37°C for 30 min. The reaction was stopped by the addition of 50  $\mu\text{l}$  of developer reagent containing nicotinamide (2 mM) and the fluorescence was subsequently monitored for 45 min at 360 nm (excitation) and 460 nm (emission). The change in fluorescence (arbitrary fluorescence units, AFU) per minute was normalized to the amount of total protein in the sample.

### Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. The survival of the animals was analyzed by the Kaplan-Meier method with a log-rank test. Other data were analyzed by ANOVA followed by Student–Newman–Keuls post hoc test. For aortic relaxation, curves have been analyzed using repeated measure ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Statistical significance between groups was defined as  $p < 0.05$ .

### References

1. Taegtmeyer H (2004) Cardiac metabolism as a target for the treatment of heart failure. *Circulation* 110: 894–896.
2. Neubauer S (2007) The failing heart - an engine out of fuel. *N Engl J Med* 356: 1140–1151.
3. Ingwall JS (2009) Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc Res* 81: 412–419.
4. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V (2004) Energy metabolism in heart failure. *J Physiol* 555: 1–13.

### Supporting Information

**Figure S1 mRNA expression of mitochondrial and energy metabolism selected proteins.** This figure includes total results of TLDA experiments. \* $P < 0.05$  vs LS;  $^{\$}P < 0.05$  vs HS-NT. (TIF)

**Table S1 Lipid and glucose profile in blood samples.** Total cholesterol, HDL and LDL were significantly increased in HS-NT compared to LS animals and tended to decrease with RSV treatment. No significant change in blood triglycerides and glucose was observed whatever the groups. (DOC)

**Table S2 Echocardiography and blood pressure measurements.** Table shows all echocardiographic analysis and blood pressure data performed at 3 weeks and 11 weeks. As HS-NT and HS-RSV groups showed no difference at 3 weeks, data were pooled (HS group). At 11 weeks, systolic and diastolic dysfunction was evident in HS-NT animals and could be largely prevented by resveratrol treatment. Resting, maximal and mean blood pressures were increased in HS-NT animals but were not improved by resveratrol treatment. (DOC)

**Table S3 Mechanical parameters and calcium homeostasis.** No major change in force and calcium sensitivity was observed in HS-NT rats except a decrease in the Hill coefficient that was not prevented by resveratrol. The tendency to decrease of the maximal SR calcium content (with optimal substrate ATP+MITO+PCr) and of SERCA2 protein content in HS-NT rats was prevented by resveratrol but these results did not reach significance. (DOC)

**Table S4 Composition of the diet.** (DOC)

**Table S5 Design of TaqMan Low Density Arrays.** (DOC)

**Methods S1 Supplementary Methods and Results.** (DOC)

### Acknowledgments

We thank Valérie Domergue-Dupont (Animal facility of IFR141), Delphine Rousseau (UMR-INRA), Claudine Deloménie (Transcriptomic platform of IFR141) Eric Jacquet and Romain Barbet (Platform Imagif, CNRS Gif/Yvette). The authors would also like to thank Florence Lefebvre for helpful technical assistance and Rodolphe Fischmeister, Bertrand Crozatier and Véronique Leblais for fruitful discussions. We gratefully thank James Wilding for improving the manuscript.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SR MR VV AG RVC. Performed the experiments: SR MR JP PM DF AG. Analyzed the data: SR MR JP PM DF AG RVC. Contributed reagents/materials/analysis tools: SR MR PM DF AG. Wrote the paper: SR VV AG RVC.

8. Garnier A, Fortin D, Delomenic C, Momken I, Veksler V, et al. (2003) Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* 551: 491–501.
9. Garnier A, Zoll J, Fortin D, N'Guessan B, Lefebvre F, et al. (2009) Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II. *Circ Heart Fail* 2: 342–350.
10. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V (2008) Transcriptional control of mitochondrial biogenesis. The central role of PGC-1 $\alpha$ . *Cardiovasc Res* 79: 208–217.
11. Tian Q, Barger PM (2006) Deranged energy substrate metabolism in the failing heart. *Curr Hypertens Rep* 8: 465–471.
12. Duncan JG, Finck BN (2008) The PPAR $\alpha$ -PGC-1 $\alpha$  Axis Controls Cardiac Energy Metabolism in Healthy and Diseased Myocardium. *PPAR Res* 253817.
13. Elliott PJ, Jirousek M (2008) Sirtuins: novel targets for metabolic disease. *Curr Opin Investig Drugs* 9: 371–378.
14. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, et al. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* 127: 1109–1122.
15. Um JH, Park SJ, Kang H, Yang S, Foretz M, et al. (2010) AMP-Activated Protein Kinase-Deficient Mice Are Resistant to the Metabolic Effects of Resveratrol. *Diabetes* 59: 554–563.
16. Chan AY, Dolinsky VW, Soltys CL, Viollet B, Baksh S, et al. (2008) Resveratrol inhibits cardiac hypertrophy via AMP-activated protein kinase and Akt. *J Biol Chem* 283: 24194–24201.
17. Thandapilly SJ, Wojcickowski P, Behbahani J, Louis XL, Yu L, et al. (2010) Resveratrol prevents the development of pathological cardiac hypertrophy and contractile dysfunction in the SHR without lowering blood pressure. *Am J Hypertens* 23: 192–196.
18. Dolinsky VW, Chan AY, Robillard Frayne I, Light PE, Des Rosiers C, et al. (2009) Resveratrol prevents the prohypertrophic effects of oxidative stress on LKB1. *Circulation* 119: 1643–1652.
19. Wojcickowski P, Juric D, Louis XL, Thandapilly SJ, Yu L, et al. (2010) Resveratrol arrests and regresses the development of pressure overload- but not volume overload-induced cardiac hypertrophy in rats. *J Nutr* 140: 962–968.
20. Juric D, Wojcickowski P, Das DK, Netticadan T (2007) Prevention of concentric hypertrophy and diastolic impairment in aortic-banded rats treated with resveratrol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2138–H2143.
21. Seymour EM, Singer AA, Bennink MR, Parikh RV, Kirakosyan A, et al. (2008) Chronic intake of a phytochemical-enriched diet reduces cardiac fibrosis and diastolic dysfunction caused by prolonged salt-sensitive hypertension. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63: 1034–1042.
22. Miyazaki R, Ichiki T, Hashimoto T, Inanaga K, Imayama I, et al. (2008) SIRT1, a longevity gene, downregulates angiotensin II type 1 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1263–1269.
23. Seymour EM, Bennink MR, Watts SW, Bolling SF (2010) Whole grape intake impacts cardiac peroxisome proliferator-activated receptor and nuclear factor kappaB activity and cytokine expression in rats with diastolic dysfunction. *Hypertension* 55: 1179–1185.
24. Prunier F, Gaertner R, Louedec L, Michel JB, Mercadier JJ, et al. (2002) Doppler echocardiographic estimation of left ventricular end-diastolic pressure after MI in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H346–H352.
25. Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, et al. (2000) Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res* 87: E61–E68.
26. von Haehling S, Lainscak M, Springer J, Anker SD (2009) Cardiac cachexia: a systematic overview. *Pharmacol Ther* 121: 227–252.
27. Lin JF, Lin SM, Chih CL, Nien MW, Su HH, et al. (2008) Resveratrol reduces infarct size and improves ventricular function after myocardial ischemia in rats. *Life Sci* 83: 313–317.
28. Bledsoe G, Shen B, Yao Y, Zhang JJ, Chao L, et al. (2006) Reversal of renal fibrosis, inflammation, and glomerular hypertrophy by kallikrein gene delivery. *Hum Gene Ther* 17: 545–555.
29. Nagase M, Shibata S, Yoshida S, Nagase T, Gotoda T, et al. (2006) Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. *Hypertension* 47: 1084–93.
30. Biala A, Tauriainen E, Siltanen A, Shi J, Merasto S, et al. (2010) Resveratrol induces mitochondrial biogenesis and ameliorates Ang II-induced cardiac remodeling in transgenic rats harboring human renin and angiotensinogen genes. *Blood Press* 19: 196–205.
31. Liu Z, Song Y, Zhang X, Liu Z, Zhang W, et al. (2005) Effects of trans-resveratrol on hypertension-induced cardiac hypertrophy using the partially nephrectomized rat model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 1049–1054.
32. Takeda Y, Zhu A, Yoneda T, Usukura M, Takata H, et al. (2007) Effects of aldosterone and angiotensin II receptor blockade on cardiac angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme 2 expression in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Am J Hypertens* 20: 1119–1124.
33. Manger WM, Simchon S, Stokes MB, Reidy JJ, Kumar AR, et al. (2009) Renal functional, not morphological, abnormalities account for salt sensitivity in Dahl rats. *J Hypertens* 27: 587–598.
34. Kato T, Niizuma S, Inuzuka Y, Kawashima T, Okuda J, et al. (2010) Analysis of Metabolic Remodeling in Compensated Left Ventricular Hypertrophy and Heart Failure. *Circ Heart Fail* 3: 420–430.
35. Liang B, Leenen FH (2007) Prevention of salt induced hypertension and fibrosis by angiotensin converting enzyme inhibitors in Dahl S rats. *Br J Pharmacol* 152: 903–914.
36. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Mostefai HA, Tesse A, Mulder P, et al. (2009) Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa). *PLoS One* 4: e5557.
37. De Sousa E, Veksler V, Minajeva A, Kaasik A, Mateo P, et al. (1999) Subcellular creatine kinase alterations - Implications in heart failure. *Circ Res* 85: 68–76.
38. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F (2011) Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta* 1813: 1360–72.
39. Rimbaud S, Garnier A, Ventura-Clapier R (2009) Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. *Pharmacol Rep* 61: 131–138.
40. Sihag S, Cresci S, Li AY, Sucharov CC, Lehman JJ (2008) PGC-1 $\alpha$  and ERR $\alpha$  target gene downregulation is a signature of the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 46: 201–212.
41. Planavila A, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F (2010) Sirt1 acts in association with PPAR $\alpha$  to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovasc Res* 90: 276–284.
42. Chan DC (2006) Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 79–99.
43. Kaasik A, Veksler V, Boehm E, Novotova M, Minajeva A, et al. (2001) Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circ Res* 89: 153–159.
44. Joubert F, Wilding JR, Fortin D, Domergue-Dupont V, Novotova M, et al. (2008) Local energetic regulation of sarcolemmal and myosin ATPase is differently impaired in rats with heart failure. *J Physiol* 586: 5181–5192.
45. Inoue H, Jiang XF, Katayama T, Osada S, Umesono K, et al. (2003) Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice. *Neurosci Lett* 352: 203–206.
46. Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, et al. (2007) Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 $\alpha$ . *EMBO J* 26: 1913–1923.
47. Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS (2004) Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and ER $\beta$  in human cells. *Toxicol Sci* 80: 14–25.
48. Klinge CM, Wickramasinghe NS, Ivanova MM, Dougherty SM (2008) Resveratrol stimulates nitric oxide production by increasing estrogen receptor alpha-Src-caveolin-1 interaction and phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* 22: 2185–2197.
49. Csizsar A, Labinsky N, Olson S, Pinto JT, Gupte S, et al. (2009) Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hypertension* 54: 668–675.
50. Ungvari Z, Orosz Z, Labinsky N, Rivera A, Xiangmin Z, et al. (2007) Increased mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production promotes endothelial NF- $\kappa$ B activation in aged rat arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H37–47.
51. Edwards JA, Beck M, Riegger C, Bausch J (2011) Safety of resveratrol with examples for high purity, trans-resveratrol, resVida<sup>®</sup>. *Ann N Y Acad Sci* 1215: 131–137.
52. Leblais V, Delannoy E, Fresquet F, Begueret H, Bellance N, et al. (2008) beta-adrenergic relaxation in pulmonary arteries: preservation of the endothelial nitric oxide-dependent beta2 component in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 77: 202–10.
53. Veksler VI, Kuznetsov AV, Anfous K, Mateo P, van Deursen J, et al. (1995) Muscle creatine kinase-deficient mice.2. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. *J Biol Chem* 270: 19921–19929.
54. Bahi L, Garnier A, Fortin D, Serrurier B, Veksler V, et al. (2005) Differential effects of thyroid hormones on energy metabolism of rat slow- and fast-twitch muscles. *J Cell Physiol* 203: 589–598.

**ORIGINAL RESEARCH COMMUNICATION**

**Resveratrol prevents hypertension-induced oxidative stress, CaMKII phosphorylation  
and mitochondrial biogenesis in aorta**

Matthieu Ruiz<sup>1,2</sup>, Stéphanie Rimbaud<sup>1,2</sup>, Giada Zurlo<sup>1,2</sup>, Dominique Fortin<sup>1,2</sup>, Fabien Hubert<sup>1,2</sup>,  
Vladimir Veksler<sup>1,2</sup>, Renée Ventura-Clapier<sup>1,2</sup>, Anne Garnier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U-769, Univ Paris-Sud F-92296 Châtenay-Malabry, France;

<sup>2</sup>Univ Paris-Sud, IFR 141, Châtenay-Malabry, France

Running title: Vascular mitochondrial biogenesis in hypertension

Address for correspondence: Dr Anne Garnier

U-769 INSERM

Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud

5 rue J-B Clément, 92296 Châtenay-Malabry

France

Tel.: (33-1) 46.83.52.49.

Fax: (33-1) 46.83.54.75.

E-mail: [anne.garnier@u-psud.fr](mailto:anne.garnier@u-psud.fr)

**Word count: 3858**

**Reference number: 35**

**Number of grayscale illustrations: 6**

**Number of table: 1**

## SUMMARY

**Aim:** Hypertension is commonly accompanied by ROS production leading to a high oxidative stress in blood vessels. ROS are known to activate PGC-1 $\alpha$ , a master regulator of mitochondrial biogenesis. However, how mitochondrial biogenesis is controlled in response to oxidative stress in vascular smooth muscle cells remains unknown. The aim of this study was to investigate the regulation of mitochondrial biogenesis in hypertension and in response to oxidative stress, as well as the mechanisms of the protective effect of resveratrol known to have metabolic and anti-oxidant properties.

**Results:** Hypertension led to a large increase in oxidative stress and mitochondrial biogenesis in aorta of Dahl salt-sensitive rats. This increase was mimicked *in vitro* in rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, an oxidative stressor. These effects were associated with CaMKII activation both in *in vivo* and *in vitro* studies. Reducing oxidative stress by resveratrol treatment in our animal model (20 mg/kg/d) or in VSMCs (20 $\mu$ M) decreased oxidative stress, mitochondrial biogenesis induction and CaMKII phosphorylation. Moreover, the inhibition of CaMKII by KN93 (10  $\mu$ M) in VSMCs blunted the oxidative stress-induced mitochondrial biogenesis, suggesting a key role of CaMKII in the ROS regulation of vascular mitochondrial biogenesis.

**Innovation and conclusion:** We provide first evidence that hypertension leads to an increase in vascular mitochondrial biogenesis mediated by oxidative stress-dependent CaMKII activation. Resveratrol, by its anti-oxidant properties, reduces CaMKII phosphorylation and consequently vascular mitochondrial biogenesis. Reducing ROS level or CaMKII activity could be a promising therapeutic approach to improve vascular function in hypertension.

**Word count: 248**

## INTRODUCTION

Increased blood pressure during hypertension induces a pathological vascular wall remodeling that involves hypertrophy, proliferation and migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs) (1). Hypertension is also associated with an increased production of reactive oxygen species (ROS) in the vascular wall that can result from increased production and/or decreased degradation (16).

Mitochondria play pivotal roles in a myriad of cellular processes including cell proliferation, ROS production and detoxification and apoptosis (7,9). Excessive production of reactive oxygen species (ROS) have been found to play a major role in the development of several cardiovascular diseases including atherosclerosis (5), and hypertension (24). Evidences for vascular oxidative stress in the development of hypertension have been obtained in experimental models and in humans (14,18,25).

Resveratrol (RSV), a polyphenol with anti-oxidant, anti-apoptotic, and anti-inflammatory properties has been shown to be protective in cardiovascular diseases by a number of actions. The protective effect involves increased anti-oxidant defenses (28), activation of the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) (34), of the deacetylase sirtuine 1 (SIRT1) (17), or estrogen-receptor  $\alpha$  (11). In hypertensive Dahl-salt sensitive rats we have recently shown that resveratrol was able to prevent endothelial dysfunction and eNOS down-regulation (21).

On the other hand, it has been largely documented that RSV can induce mitochondrial biogenesis and improve fatty acid oxidation (FAO) in many tissues via mechanisms involving SIRT1 and AMPK (15,27). The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  co-activator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) is a master regulator of mitochondrial biogenesis (31), which can co-activate numerous transcription factors among which the estrogen-related receptor alpha (ERR $\alpha$ ) and the nuclear respiratory factors (NRFs) leading to increased expression of nuclear and

mitochondria-encoded proteins. RSV increases both the expression of PGC-1 $\alpha$  as well as its transcriptional activity (27) in some tissues (19). In hypertensive rats, RSV treatment was able to preserve cardiac mitochondrial function and fatty acid utilization and to improve cardiac hemodynamics and survival (21). On the other hand, PGC-1 $\alpha$  is upregulated under oxidative stress (6) and this induction is required for the activation of several ROS-detoxifying proteins (29,23) suggesting a central role of PGC-1 $\alpha$  in cellular protection against oxidative damages. In this setting, by its antioxidant properties RSV could lead to decreased PGC-1 $\alpha$  activity and mitochondrial biogenesis. At present nothing is known of the possible metabolic effects of RSV on blood vessels. Molecular mechanisms controlling mitochondrial biogenesis in the vasculature during hypertension and upon oxidative stress remain unclear and the antioxidant versus metabolic effects in the RSV-induced vasoprotection remains to be established. ROS are known to activate several signaling pathways among which Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) (4) that was also found to activate mitochondrial biogenesis (33).

It is thus reasonable to suggest that mitochondria could contribute to aortic smooth muscle remodeling in hypertension. The main objectives of this present study were to investigate 1) whether mitochondrial biogenesis is altered in aorta of hypertensive animals, 2) how RSV treatment affects mitochondrial biogenesis and 3) what is the cellular link between oxidative stress and mitochondrial biogenesis in aorta. Experiments were realized *in vivo* in a model of hypertension, the Dahl salt-sensitive rats or *in vitro* on primary aortic smooth muscle cells. The Dahl salt-sensitive rats develop a severe hypertension after high salt treatment with signs of oxidative stress characterized by an increase in superoxide production and cellular damages (14,18). Our results show that hypertension induces oxidative stress and a robust activation of mitochondrial biogenesis, together with activation of the oxidative stress sensitive CaMKII. Resveratrol was able to prevent CaMKII phosphorylation and to reduce hypertension-induced mitochondrial biogenesis.

## RESULTS

### **Hypertension induces PGC-1 $\alpha$ expression and mitochondrial biogenesis in aorta.**

After eleven weeks of 8% NaCl treatment, the Dahl salt-sensitive rats (HS-NT group) exhibited an increase in mean arterial blood pressure from  $113\pm 6$  to  $140\pm 9$  mmHg ( $P<0.01$ ) compared to control group (LS group). This was not corrected by RSV treatment (HS-RSV group) as previously described (21). To investigate whether mitochondrial biogenesis was changed by hypertension, expression of the two main co-activators PGC-1 $\alpha$  and  $\beta$  and their downstream targets was examined in isolated aortas. The results showed a three-fold increase in PGC-1 $\alpha$  expression while PGC-1 $\beta$  was not induced (Figure 1A). The increase in PGC-1 $\alpha$  expression led to a three-fold increase in NRF2 and ERR $\alpha$  mRNA expression and a two-fold increase in Tfam and the nuclear-encoded subunit of cytochrome oxidase COXIV. This evidenced a significant activation of vascular mitochondrial biogenesis in hypertension (Figure 1B). Markers of fatty-acid utilization like PPAR $\alpha$  and MCAD (medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase) were also both strongly increased (Figure 1C). Moreover, we showed in aorta of HS-NT rats a five-fold increase in the gene expression of the mitochondrial manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) (Figure 1D) and a 50% increase in total amount of oxidized proteins (Figure 2A). These results highlight that, in addition to increasing oxidative stress, hypertension activates mitochondrial biogenesis in the vascular wall.

### **Resveratrol partially blunts the activation of mitochondrial biogenesis in aortas from hypertensive rats.**

Resveratrol is a polyphenol with pleiotropic effects among which anti-oxidant effect and activation of mitochondrial biogenesis that proved to be protective in vascular diseases. Surprisingly, in RSV treated hypertensive animals, the upregulation of mitochondrial

biogenesis genes including PGC-1 $\alpha$ , NRF2, ERR $\alpha$ , Tfam and COXIV was partially reversed (Figure 1A and B), as well as for the expression of SOD2, a marker of oxidative stress (Figure 1D) and the level of oxidized proteins (Figure 2A). These data show that resveratrol can prevent the hypertension-induced increase in mitochondrial biogenesis possibly by blunting oxidative stress.

### **CaMKII is involved in mitochondrial biogenesis modulation by oxidative stress.**

To understand the molecular mechanisms involved in the regulation of mitochondrial biogenesis in a ROS dependent manner, we identified CaMKII as a possible molecular link between oxidative stress and mitochondrial biogenesis. We investigated whether CaMKII phosphorylation was activated in the hypertensive group and whether RSV can prevent CaMKII phosphorylation. Using immunoblotting, we showed a nine-fold increase in CaMKII phosphorylation in the HS-NT group compared to the LS group (Figure 2B). Moreover, RSV-treatment was able to reverse this increase (Figure 2B).

Altogether these results suggest that hypertension leading to oxidative stress can up-regulate vascular mitochondrial biogenesis potentially through CaMKII activation. In addition, resveratrol can prevent CaMKII activation leading to a decrease in mitochondrial biogenesis.

### **Mitochondrial biogenesis regulation follows the modulation of oxidative stress in aortic smooth muscle cells.**

In order to confirm the hypothesis that modulating oxidative stress can regulate mitochondrial biogenesis in smooth muscle, an *in vitro* model of aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs) was used. Oxidative stress was induced during 24 hours with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at the concentration of 100  $\mu$ M. As expected, both SOD2 and GPx1 mRNA



expression, two antioxidant defense enzymes were upregulated by approximately 50% (Figure 3A). In addition, upon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, PGC-1 $\alpha$  mRNA (Figure 3B) and protein content (Figure 3C) were also increased by about 2 fold. This is associated with a slight increase in the mitochondrial transcription factor Tfam and the citric acid cycle enzyme citrate synthase (CS) mRNA content (Figure 3B). As expected, CaMKII phosphorylation was increased upon oxidative stress (Figure 4). Thus oxidative stress is able to induce mitochondrial biogenesis and CaMKII phosphorylation in smooth muscle cells.

To test whether CaMKII is required for the regulation of mitochondrial biogenesis upon oxidative stress, we investigate the effect of a pharmacological inhibition of CaMKII phosphorylation by KN93 in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Interestingly, while PGC-1 $\alpha$  was induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, this induction was lost in presence of KN93 (Figure 5). These results suggest a key role of CaMKII in oxidative stress-induced mitochondrial biogenesis.

Conversely, we attempted to decrease oxidative stress by reducing VSMCs proliferation with a lower concentration of FCS in culture medium. Figure 6A illustrated the inhibition of VSMCs proliferation after 72h in presence of 0.5% FCS culture medium. In these conditions, mRNA expression of the two anti-oxidant enzymes GPx1 and SOD2 was decreased respectively by 70 % and 20 % compared to 10 % FCS (Figure 6B). This is associated with a 20-30 % decrease in gene expression of PGC-1 $\alpha$ , NRF2 and Tfam (Figure 6C) evidencing a reduction in mitochondrial biogenesis. Moreover, PGC-1 $\alpha$  protein expression was clearly decreased as early as 24 hours after treatment with 0.5 % FCS (Figure 6D). It can be concluded that oxidative stress can modulate mitochondrial biogenesis in smooth muscle cells.

**Resveratrol inhibits oxidative stress-induced mitochondrial biogenesis and decreases CaMKII phosphorylation.**

To assess the role of RSV we first analyzed whether RSV alone was able to activate mitochondrial biogenesis in VSMCs. The results showed an activation of mitochondrial biogenesis in VSMCs with different concentrations of resveratrol (Figure 3D). We then studied the effects of RSV in the presence of oxidative stress. For this, VSMCs were incubated with RSV 20  $\mu$ M and 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 hours. In these conditions, RSV prevented the increase in PGC-1 $\alpha$  mRNA (Figure 3B) and protein expression (Figure 3C) as well as the increase in anti-oxidant enzyme gene expression (Figure 3A). This inhibition was reflected in the downstream targets of PGC-1 $\alpha$  like Tfam (Figure 3B). Interestingly, CaMKII total protein content and phosphorylation were also decreased after RSV treatment (Figure 4).

These results reveal that RSV alone activates mitochondrial biogenesis in VSMCs. However, when oxidative stress is present, RSV blunts CaMKII phosphorylation and mitochondrial biogenesis by a mechanism most possibly involving its antioxidant properties.

## DISCUSSION

In this study, we explored the regulation of mitochondrial biogenesis in response to hypertension in smooth muscle. The results show that 1) in the aorta of hypertensive animals, PGC-1 $\alpha$  and markers of mitochondrial biogenesis like NRF2, ERR $\alpha$  and Tfam were upregulated together with an increase in oxidative stress and activation of CaMKII. 2) Oxidative stress activates mitochondrial biogenesis and CaMKII in VSMCs and inhibition of CaMKII blunts the increase in mitochondrial biogenesis upon oxidative stress 3) RSV treatment decreases oxidative stress, CaMKII activation and mitochondrial biogenesis both in hypertensive animals and in VSMCs. These results suggest that hypertension induces mitochondrial biogenesis at least in part through oxidative stress and CaMKII activation and that RSV partly prevents the upregulation of mitochondrial biogenesis most probably through its anti-oxidant effects.

Under physiological conditions, VSMCs are quiescent, contractile, and non migratory, and display a differentiated phenotype. In response to external stimuli like increased blood pressure, a pathological vascular wall remodeling occurs that involves structural and functional modifications, hypertrophy, proliferation of resident medial VSMCs, and cell migration (1). The main and original result of this study is that in a model of hypertension induced by salt in Dahl rats, a robust increase in mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation pathway was evidenced in aorta by the increase in the expression of the master regulator of mitochondrial biogenesis PGC-1 $\alpha$  and the activation of its downstream targets. Mitochondrial biogenesis is generally activated in response to an increase in energy requirements. Two main reasons can be invoked. Hypertension per se exerts mechanical constraints on the vessel that may increase the energy needs for contraction. In addition cell proliferation also involves increased energy requirements and mitochondrial biogenesis. It was recently suggested that PGC-1 $\alpha$  activates mitochondrial biogenesis and proliferation of

pulmonary artery vascular smooth muscle cells in response to hypoxia (20). Similarly, bronchial smooth muscles in asthmatic patients exhibit an increase in mitochondrial biogenesis, which, in turn, enhances cell proliferation, leading to airway remodeling (26). It can thus be proposed that the remodeling of arterial smooth muscle cells that occurs in hypertension is accompanied by an increase in the mitochondrial content to meet the energy requirement of these processes.

Hypertension is also associated with an increased production of reactive oxygen species and frequently an impairment of endogenous antio-oxidant defenses (16). The ROS abundance in hypertension can result from increased production and/or decreased degradation. In accordance with the ability of PGC-1 $\alpha$  to control a broad program of mitochondrial gene expression, several studies have reported that the expression of mitochondrial anti-oxidant protein like SOD2 increases with the activation of mitochondrial biogenesis (23). Moreover, PGC-1 $\alpha$  gene expression is induced under oxidative stress conditions (6) and this induction is required for the activation of several ROS-detoxifying proteins (29) suggesting a central role of PGC-1 $\alpha$  in cellular protection against oxidative damages. Indeed, we show here that modulating oxidative stress impacts on mitochondrial biogenesis in VSMCs. This induction happens when ROS level is increased in hypertension or after oxidative stressor treatment. It thus appears that the increased mitochondrial biogenesis in hypertension seems to be induced in response to oxidative stress.

Hypertension in aortas of Dahl rats and oxidative stress in VSMCs were accompanied by a strong increase in CaMKII phosphorylation. CaMKII activation has been shown to be involved in endothelial dysfunction (3), thrombin-induced cytoskeletal reorganization (2) and vascular smooth muscle proliferation (4). CaMKII is instrumental in the ROS-mediated activation of growth-promoting, proliferative, and hypertrophic signaling pathways in vascular smooth muscle cells (4). ROS can directly activate CaMKII by methionine oxidation

(8) and by inducing its autophosphorylation (22,32). On the other hand, CaMK is able to induce PGC-1 $\alpha$  and mitochondrial biogenesis in cardiac and skeletal muscle (13,30,33). Similar activation of mitochondrial biogenesis by CaMK was also demonstrated in bronchic smooth muscle cells (26). The present results provide a new insight in CaMKII ROS-dependent signaling pathway by showing that in hypertension too, oxidative stress may increase the phosphorylation of CaMKII, and activate PGC-1 $\alpha$  and mitochondrial biogenesis.

We have shown previously that resveratrol was able to prevent endothelial dysfunction in hypertension by restoring eNOS expression (21). We show here that treatment with resveratrol, prevented excessive oxidative stress, CaMKII activation and mitochondrial biogenesis in aortas of hypertensive animals as well as in VSMCs. Different mechanisms could be involved. Resveratrol protects endothelium from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress (10) suggesting a protective role against endothelium dysfunction by decreasing ROS production. In a model of diabetes, resveratrol was proposed as a protective compound against diabetes-induced retinal neuronal death by inhibiting CaMKII activity (12). Neuroprotective effects of curcumin, another polyphenol with resveratrol-like physiological properties including anti-oxidant effect, was also associated in part with a decrease in CaMKII phosphorylation (35). On the other hand, resveratrol is also known to induce mitochondrial biogenesis in different tissues but nothing was known of the effects of resveratrol on smooth muscle cells. We show here that RSV alone indeed is able to active mitochondrial biogenesis in VSMCs. However, following oxidative stress, the anti-oxidant effect of RSV is predominant and leads to a resultant downregulation of mitochondrial biogenesis. Altogether, these results suggest that the anti-oxidant rather than metabolic properties are involved in the vasoprotective effects of RSV.

Our results provide a novel insight in the control of mitochondrial biogenesis and oxidative stress level in hypertension. Hypertension induces oxidative stress that may lead to

RUIZ *et al.*

activation of mitochondrial biogenesis through a CaMKII dependent mechanism in vascular smooth muscle cells. Reducing ROS level to inhibit CaMKII activity or directly inhibiting its activity could be a promising therapeutic approach in hypertension.

**INNOVATION:**

Oxidative stress is involved in the physiopathology of hypertension and ROS are known to activate PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. At present, nothing is known about the regulation of mitochondrial biogenesis in response to oxidative stress in vascular smooth muscle cells. In this manuscript, we provide first evidence that hypertension leads to an increase in vascular mitochondrial biogenesis mediated by an oxidative stress-dependent CaMKII activation, and that resveratrol, by its anti-oxidant properties, is able to reverse the activation of CaMKII and consequently mitochondrial biogenesis.

## **MATERIAL AND METHODS**

All animals were housed in a temperature-controlled room (22°C), with a 12/12 h light/dark cycle, and were provided food and water *ad libitum*. All experiments were performed in conformity with the European Community guiding principles in the care and use of animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament). Authorizations to conduct animal experiments were obtained from the French Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation (no. 92-284, June 27, 2007).

### **Animal model**

Dahl salt-sensitive rats (Charles River, Maastricht, the Netherlands) were chosen as a model of hypertension as previously described (21). Briefly, animals were first divided in two groups: the low salt (LS) group (0.3 % NaCl) as control and the high salt (HS) group (8 % NaCl). Hypertension was induced for three weeks, and then the HS group was subdivided in two other groups: the HS-non treated (HS-NT) group and the HS-resveratrol (HS-RSV) group (20 mg/kg/d) for 8 additional weeks.

At the end of the conditioning period, animals were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (200 mg/kg) and hearts were quickly removed for euthanasia. Thoracic aorta were collected and immediately frozen and kept at -80°C before experiment.

### **Primary vascular smooth muscle cell (VSMC) isolation**

For isolation of vascular smooth muscle cells (VSMCs), male Wistar rats of 225-250 g were euthanized by intraperitoneal injection of pentobarbital (200 mg/kg). Briefly, aortas from three Wistar rats were isolated and endothelium was eliminated by scrapping. During dissociation and culture, cells were maintained at 37°C in an incubator with 95% O<sub>2</sub> and 5%



CO<sub>2</sub>. To remove adventitia, aorta were incubated during 45 minutes in medium A (DMEM, Invitrogen, Illkirch, France) supplemented with antibiotic/antimycotic and collagenase (150 U/ml, Worthington, Lakewood, US) and the adventitia was peeled off using small tweezers. Then, to dissociate smooth muscle cells, pieces of aorta were transferred in medium A supplemented with collagenase and elastase (1.5 mg/ml, MP biomedical, Illkirsh, France) in a shaking water bath at 37°C for 30 min. Supernatant was centrifuged at 1300 rpm at room temperature for 3 minutes to pellet residual endothelial cells and fibroblasts. Supernatant was reintroduced with the pieces of aortas, incubated for 30 minutes and centrifuged to pellet VSMC. This procedure was repeated three times. All pellets containing isolated cells were pooled in medium B (medium A supplemented with 20 % Fetal calf serum, FCS). This pool was centrifuged again and the pellet resuspended in 5 ml of medium B before plating in a T25 flask corresponding to the passage p0. Forty-eight hours later to favor adhesion in medium B, the medium was changed. Cells were maintained in medium A supplemented with 10 % FCS to favor proliferation. All experiments were performed between p1 and p6.

### **VSMCs culture and treatments**

Two methods were used to modulate oxidative stress. First, after 24 hours starvation, cells were preincubated for one hour with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma, St Quentin Fallaviers, France) at 100 µM for gene expression analysis or 200 µM for protein expression assay to induce oxidative stress. Then, oxidative stress was maintained during 24 hours in the presence or not of 20 µM resveratrol (Sequoia Research, Pangbourne, UK) or 10 µM KN93 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), a CaMKII specific inhibitor. Secondly, oxidative stress was decreased by reducing FCS concentration from 10 to 0.5 % during 24 or 72 hours.

At the end of treatments, cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and immediately frozen and kept at -80°C.

### **mRNA extraction**

Frozen tissue samples were weighed and homogenized using Precellys 24 tissue homogenizer/grinder (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) in ice-cold buffer. Adherent cells were scrapped and homogenized in the same conditions. Total RNA extraction was performed using standard procedure with TRI reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, USA). RNA quality was measured using a spectrophotometer (Bio-Photometer, Eppendorf) and cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using iSCRIPT cDNA synthesized (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) for VSMC, and SuperscriptII cDNA synthesized (Invitrogen) for aorta, according to the manufacturer protocols. Then, cDNA were diluted to 2.5 ng/µl. Negative controls were performed without the reverse transcriptase to check for the presence or not of genomic contamination.

### **Real-time qPCR**

Gene quantification was performed using the SYBR<sup>®</sup>-Green method on a CFX96 real-time PCR detection system (Biorad). Reactions were carried out in 5 µl of diluted cDNA and 10 µl of SYBR-Green master mix completed at the time of experiment by 10 µM sense and anti-sense primers. No template was used as a control to check for exogenous contamination. The cycling condition corresponded to the following steps: a first step at 95°C for 30 second, following by 40 cycles with one step at 95°C for 2 seconds and another step between 58-65°C depending on the primers, for 5 seconds (see Table 1). Melting curve analysis was ensured to verify that each primer couple (list in Table 1) amplified a single product corresponding to a single peak in the melting curve.

For each target gene, a standard curve was constructed from the analysis of serial dilution of cDNA and was used to calculate sample concentration and to determine

amplification efficiency. TBP (Tata Box Binding Protein), RPLP2 (Ribosomal Protein Large P2) and RPL32 (Ribosomal protein L32) were used as housekeeping genes. A GeNorm calculated factor or TBP was used for normalization.

### **Protein extraction**

Frozen tissue samples or VSMC were homogenized in a lysis buffer containing 10 mM hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (Hepes), 10 mM KCl, 0.2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.2 mM ethyleneglycoltetraacetic acid (EGTA), 1 mM  $\beta$ -glycero-phosphate, 0.02% Triton 100 X, 1 mM orthovanadate, 1 mM dithiothreitol (DTT), 50 mM NaF, 5 mM NaPPi, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and antiprotease cocktail (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). To assess oxidation of proteins, 50 mM DTT was added in the extract. Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Sigma).

### **Immunoblotting**

Total or phosphorylated protein levels were measured from aorta or VSMC protein extracts loaded onto 10 % SDS-polyacrylamide gel (40 or 50  $\mu$ g per lane). Proteins were blotted on nitrocellulose membrane, blocked at room temperature for 1 hour in PBS-Tween (PBS-T)-5 % milk and subsequently incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Antibodies against phospho-CaMKII (Thr 286), and total CaMKII were purchased from Cell Signalling (Danvers, US) and against PGC-1 $\alpha$  from Santa Cruz (Heidelberg, Germany). Anti-rabbit IgG peroxidase linked antibody (Cell Signalling) was used as secondary antibody. To detect  $\beta$ -actin expression, a primary antibody directly coupled to peroxidase (Santa Cruz) and incubated during 2 hours was used.  $\beta$ -actin expression or protein loading evidenced by

coomassie blue coloration were used as loading controls. Qualitative analysis of oxidized proteins was performed using OxyBlot kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

Protein levels were revealed using an enhanced chemiluminescent substrate (SuperSignal West femto, Thermo Scientific) and quantified using a chemiluminescent detection system (ChemiDoc XRS, Bio-Rad) and image-analysis software (Quantity One, Bio-Rad).

### **Cell proliferation assay**

Cell proliferation was evaluated by the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Euromedex, Mundolsheim, France). Briefly, VSMCs were seeded in 96-well plates. Proliferation was maintained by 10% FCS or cells were made quiescent by their incubation in serum-reduced DMEM (0.5% FBS) for 24 h or 72 h.

Cells were then incubated with MTT (0.5 mg/ml, 200  $\mu$ l/well) for 3.5 h at 37°C. The culture medium was removed, and the formazan crystals were dissolved in dimethyl sulfoxide (150  $\mu$ l/well) for 30 minutes at 37°C. Finally, the formazan absorbance was determined on a TECAN plate reader at 570 nm.

### **Statistics**

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. To compare effects of agents between groups, statistical analysis was carried out using ANOVA followed by the non parametric Mann and Whitney test or Kruskal-Wallis test. Statistical significance between groups was defined as  $p < 0.05$ .

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Valérie Domergue-Dupont (Animal facility of IFR141) and Claudine Deloménie (Transcriptomic platform of IFR141). The authors would also like to thank Rodolphe Fischmeister for continuous support. RVC is senior scientist at the Centre National de la Recherche Scientifique. This work was supported by grants from Fondation de France (FDF\_R08111LL), the European Union contract (LSHM-CT-2005-018833/EUGeneHeart).

## **AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT**

Authors have no competing interest.

## REFERENCES

1. Berk BC. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 81:999-1030, 2001.
2. Borbiev T, Verin AD, Birukova A, Liu F, Crow MT et al. Role of CaM kinase II and ERK activation in thrombin-induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L43-54, 2003.
3. Borbiev T, Verin AD, Shi S, Liu F, Garcia JG. Regulation of endothelial cell barrier function by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L983-90, 2001.
4. Bouallegue A, Pandey NR, Srivastava AK. CaMKII knockdown attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced phosphorylation of ERK1/2, PKB/Akt, and IGF-1R in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 47:858-66, 2009.
5. Chang JC, Kou SJ, Lin WT, Liu CS. Regulatory role of mitochondria in oxidative stress and atherosclerosis. *World J Cardiol* 2:150-9, 2010.
6. Chen SD, Yang DI, Lin TK, Shaw FZ, Liou CW et al. Roles of Oxidative Stress, Apoptosis, PGC-1alpha and Mitochondrial Biogenesis in Cerebral Ischemia. *Int J Mol Sci* 12:7199-215, 2011.
7. Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury. *Mol Cell Biochem* 184:379-91, 1998.
8. Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J et al. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133:462-74, 2008.

9. Holmuhamedov E, Lewis L, Bienengraeber M, Holmuhamedova M, Jahangir A et al. Suppression of human tumor cell proliferation through mitochondrial targeting. *FASEB J* 16:1010-6, 2002.
10. Kao CL, Chen LK, Chang YL, Yung MC, Hsu CC et al. Resveratrol Protects Human Endothelium from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress and Senescence via SirT1 Activation. *J Atheroscler Thromb* 17(9):970-9, 2010.
11. Khandelwal AR, Hebert VY, Dugas TR. Essential role of ER- $\alpha$ -dependent NO production in resveratrol-mediated inhibition of restenosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H1451-8, 2010.
12. Kim YH, Kim YS, Kang SS, Cho GJ, Choi WS. Resveratrol inhibits neuronal apoptosis and elevated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II activity in diabetic mouse retina. *Diabetes* 59:1825-35, 2010.
13. Koulmann N, Bigard AX. Interaction between signalling pathways involved in skeletal muscle responses to endurance exercise. *Pflugers Arch* 452:125-39, 2006.
14. Kushiro T, Fujita H, Hisaki R, Asai T, Ichiyama I et al. Oxidative stress in the Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens* 27:9-15, 2005.
15. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* 127:1109-22, 2006.
16. Lassegue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens* 17:852-60, 2004.
17. Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA et al. SIRT1 promotes

- endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14855-60, 2007.
18. Meng S, Cason GW, Gannon AW, Racusen LC, Manning RD Jr. Oxidative stress in Dahl salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 41:1346-52, 2003.
  19. Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A et al. SIRT1 Is Required for AMPK Activation and the Beneficial Effects of Resveratrol on Mitochondrial Function. *Cell Metab* 15:675-90, 2012.
  20. Rao J, Li J, Liu Y, Lu P, Sun X et al. The key role of PGC-1alpha in mitochondrial biogenesis and the proliferation of pulmonary artery vascular smooth muscle cells at an early stage of hypoxic exposure. *Mol Cell Biochem* 367(1-2):9-18, 2012.
  21. Rimbaud S, Ruiz M, Piquereau J, Mateo P, Fortin D et al. Resveratrol improves survival, hemodynamics and energetics in a rat model of hypertension leading to heart failure. *PLoS One* 6:e26391, 2011.
  22. Song YH, Choi E, Park SH, Lee SH, Cho H et al. Sustained CaMKII activity mediates transient oxidative stress-induced long-term facilitation of L-type Ca(2+) current in cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med* 51:1708-16, 2011.
  23. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127:397-408, 2006.
  24. Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res* 34:5-14, 2011.
  25. Touyz RM, Schiffrin EL. Increased generation of superoxide by angiotensin II in



- smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens* 19:1245-54, 2001.
26. Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet PO et al. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 204:3173-81, 2007.
27. Um JH, Park SJ, Kang H, Yang S, Foretz M et al. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes* 59:554-63, 2010.
28. Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, Recchia FA, Sonntag WE et al. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H18-24, 2010.
29. Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M. PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 66:562-73, 2005.
30. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res* 79:208-17, 2008.
31. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta* 1813:1360-72, 2011.
32. Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T et al. Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase IIdelta is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circ Res* 108:555-65, 2011.

33. Wu H, Kanatous SB, Thurmond FA, Gallardo T, Isotani E et al. Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296:349-52, 2002.
34. Xu Q, Hao X, Yang Q, Si L. Resveratrol prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 388:389-94, 2009.
35. Xu Y, Lin D, Li S, Li G, Shyamala SG et al. Curcumin reverses impaired cognition and neuronal plasticity induced by chronic stress. *Neuropharmacology* 57:463-71, 2009.

**TABLE 1**

Primers pairs used in RT-PCR to quantify gene expression

<b>Target</b>	<b>Accession number</b>	<b>Primers F 5'→3' R 5'→3'</b>	<b>Annealing temperature °C</b>
<b>COXIV</b>	<b>NM_017202</b>	TGG GAG TGT TGT GAA GAG TGA GCA GTG AAG CCG ATG AAG AAC	<b>58</b>
<b>ERR<math>\alpha</math></b>	<b>NM_001008511</b>	TCA AGG AGG GTG TGC GTC TG CTT GGC CCA GCT GAT GGT GA	<b>65</b>
<b>GPx1</b>	<b>NM_030826.3</b>	GTTTCCCGTGCAATCAGTTC TCACTTCGCACTTCTCAAACA	<b>60</b>
<b>MCAD</b>	<b>NM_000016</b>	CCG TTC CCT CTC ATC AAA AG ACA CCC ATA CGC CAA CTC	<b>60</b>
<b>NRF2</b>	<b>XM_344002</b>	CAC CAC ACT CAA CAT TTC GG CCT TGG GGA CCT TTG AAC TT	<b>58</b>
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	<b>NM_031347</b>	CAC CAA ACC CAC AGA GAA CAG GCA GTT CCA GAG AGT TCC ACA	<b>58</b>
<b>PGC-1<math>\beta</math></b>	<b>NM_133249</b>	TGG AAA GCC CCT GTG AGA GT TTG TAT GGA GGT GTG GTG GG	<b>60</b>
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	<b>NM_013196</b>	ATG AGT CCC CTG GCA ATG GGC ATT CTT CCA AAA CGG	<b>58</b>
<b>RPLP2</b>	<b>NM_001030021</b>	GCT GTG GCT GTT TCT GCT TC ATG TCG TCA TCC GAC TCC TC	<b>62</b>
<b>RPL32</b>	<b>NM_013226</b>	GCT GCT GAT GTG CAA CAA A GGG ATT GGT GAC TCT GAT GG	<b>60</b>
<b>SOD2</b>	<b>NM_017051.2</b>	AGGAGCAAGGTCGCTTACAG GTAGTAAGCGTGCTCCCACA	<b>60</b>
<b>TBP</b>	<b>NM_001004198</b>	CGG TTT GCT GCA GTC ATC AT GTG CAC ACC ATT TTC CCA GA	<b>60</b>
<b>Tfam</b>	<b>NM_031326</b>	GAA AGC ACA AAT CAA GAG GAG CTG CTT TTC ATC ATG AGA CAG	<b>60</b>

COX IV, cytochrome c oxidase subunits IV; ERR $\alpha$ , estrogen related receptor  $\alpha$  ; GPx1, Glutathion Peroxidase 1; MCAD, medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase ; NRF-2, nuclear respiratory factor 2; PGC-1 $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ; PGC-1 $\beta$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\beta$ ; PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; RPLP2, ribosomal protein large P2; RPL32,

RUIZ *et al.*

ribosomal protein l32; SOD2, superoxide dismutase 2; TBP, TATA box binding protein and Tfam, mitochondrial transcription factor A.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. RT-qPCR analysis of PGC-1 $\alpha$  expression, its downstream targets and mitochondrial anti-oxidant enzyme in aorta of dahl salt-sensitive rats.** (A) Co-activators PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\beta$  mRNA expression. (B) Mitochondrial biogenesis markers mRNA expression: NRF2, ERR $\alpha$ , Tfam and COXIV. (C) mRNA expression of others downstream targets of PGC-1 $\alpha$  associated to fatty acid metabolism : PPAR $\alpha$  and MCAD. (D) mRNA expression of an anti-oxidant enzyme : SOD2.

Data are normalized to GeNorm factor and results expressed as fold increase over LS group.

LS group in white (N = 7), HS-NT group in black (N = 5), HS-RSV group in grey (N = 8).

\*P<0.05, \*\*P<0.01 compared to LS group.

<sup>§</sup>P<0.05 compared to HS-NT group.

**Figure 2. Oxyblot and P-CaMKII immunoblot in aorta of dahl salt-sensitive rats.**

(A) Relative level of oxidized proteins in LS group (N = 3), HS-NT group (N = 6) and HS-RSV group (N = 3).

(B) Relative protein expression of P-CaMKII in LS group (white, N = 4), HS-NT group (black, N = 4) and HS-RSV group (grey, N = 6) in fold increase compared to LS group.

\*P<0.05, \*\*p<0.01 compared to LS group.

<sup>§</sup>P<0.05, <sup>§§</sup>P<0.01 compared to HS-NT group.

**Figure 3. RT-qPCR analysis of mitochondrial biogenesis and oxidative stress markers in vascular smooth muscle cells (VSMCs).**

(A) mRNA expression of oxidative stress markers : SOD2 and GPx1 in non treated cells (white, N = 4), cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM (black, N = 5) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM with resveratrol at 20 μM (grey, N = 5).

(B) mRNA expression of PGC-1α, Tfam and citrate synthase (CS) in non treated cells (white, N = 4), cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM (black, N = 7) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM with resveratrol at 20 μM (grey, N = 5).

(C) PGC-1α protein expression after treatment by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM alone (black, N = 3) or with resveratrol 20 μM (grey, N = 4) compared to control (dotted line).

(D) Effect of RSV in absence of oxidative stressor on mitochondrial biogenesis markers (N = 5). Each N represents independent culture.

\*P<0.05, \*\*p<0.01 compared to control.

<sup>§</sup>p<0.05 compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.

#### **Figure 4. P-CaMKII immunoblot in VSMCs.**

Phosphorylated and total CaMKII protein expression after treatment by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM alone (black, N = 3) or with resveratrol 20 μM (grey, N = 4) compared to control (dotted line, N = 3). Each N represents independent culture.

\*p<0.05 compared to control.

<sup>§</sup>P<0.05 compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.

#### **Figure 5. RT-qPCR analysis of PGC-1α mRNA expression under oxidative stress and CaMKII inhibition by KN93.**

mRNA expression of PGC-1α in non treated cells (white, N = 4), cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM (black, N = 7) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM with KN93 at 10 μM (grey, N = 4). Each N represents independent culture.

\*p<0.05 compared to control.

\$p<0.05 compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated cells.

**Figure 6. RT-qPCR analysis of mitochondrial biogenesis and oxidative stress markers in VSMCs in proliferative or quiescent state.**

(A) MTT assay to measure cell proliferation with 10 % FCS (black) or 0.5% FCS (white).

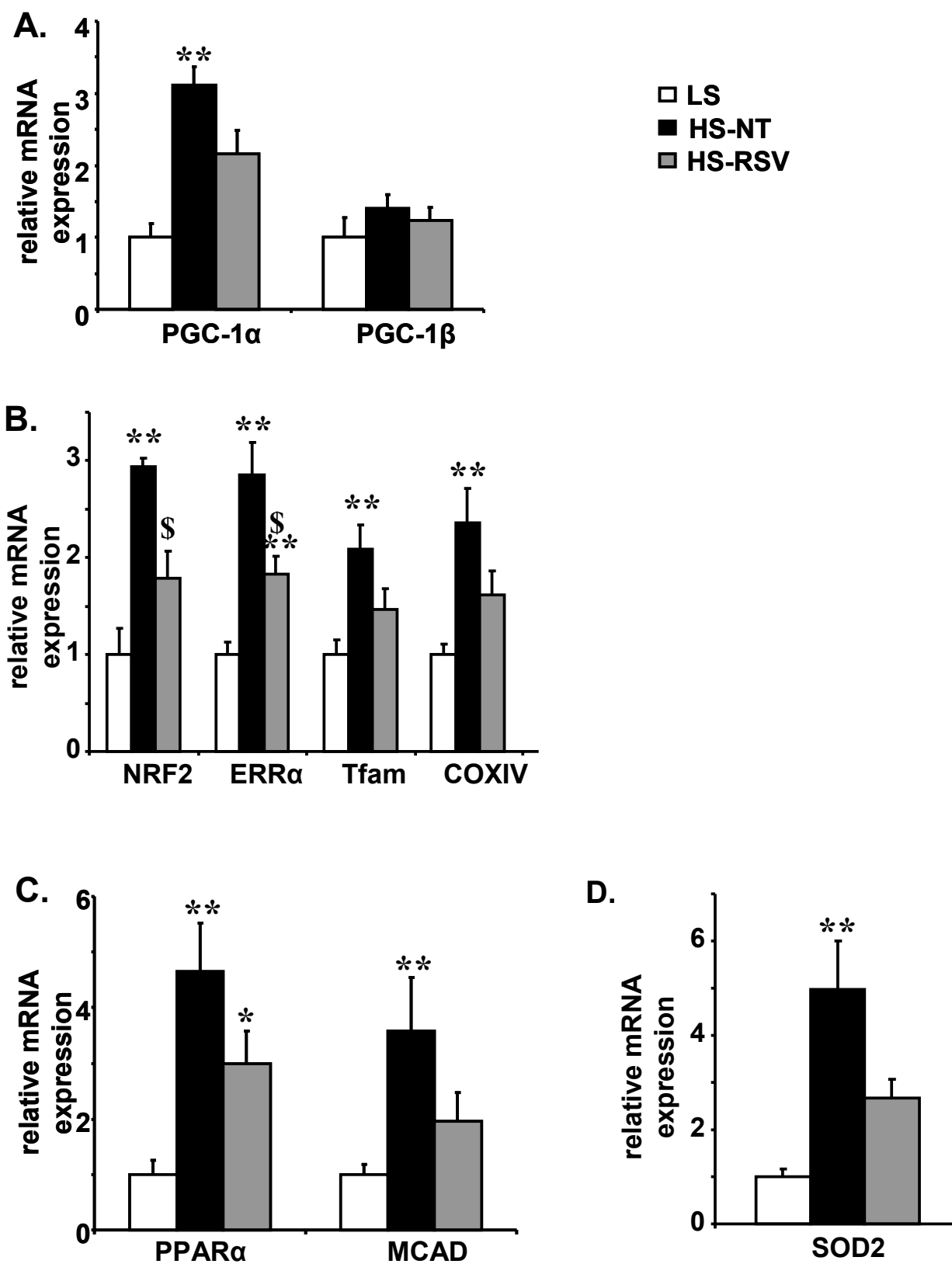
(B) GPx1 and SOD2 mRNA expression in VSMCs cultivated with 10 % FCS (black, N = 6-8) or after 72h of privation with 0.5 % FCS (white, N = 6-8).

(C) PGC-1 $\alpha$ , NRF2 and Tfam mRNA expression in VSMCs cultivated with 10 % FCS (black, N = 6-8) or after 72h of privation with 0.5 % FCS (white, N = 6-8). Each N represents independent culture.

(D) PGC-1 $\alpha$  protein expression after 24 h treatment with 0.5% FCS (black, N = 4) compared to 10% FCS (white, N = 4).

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 compared to 10% FCS.

Figure 1.





**Figure 2.**

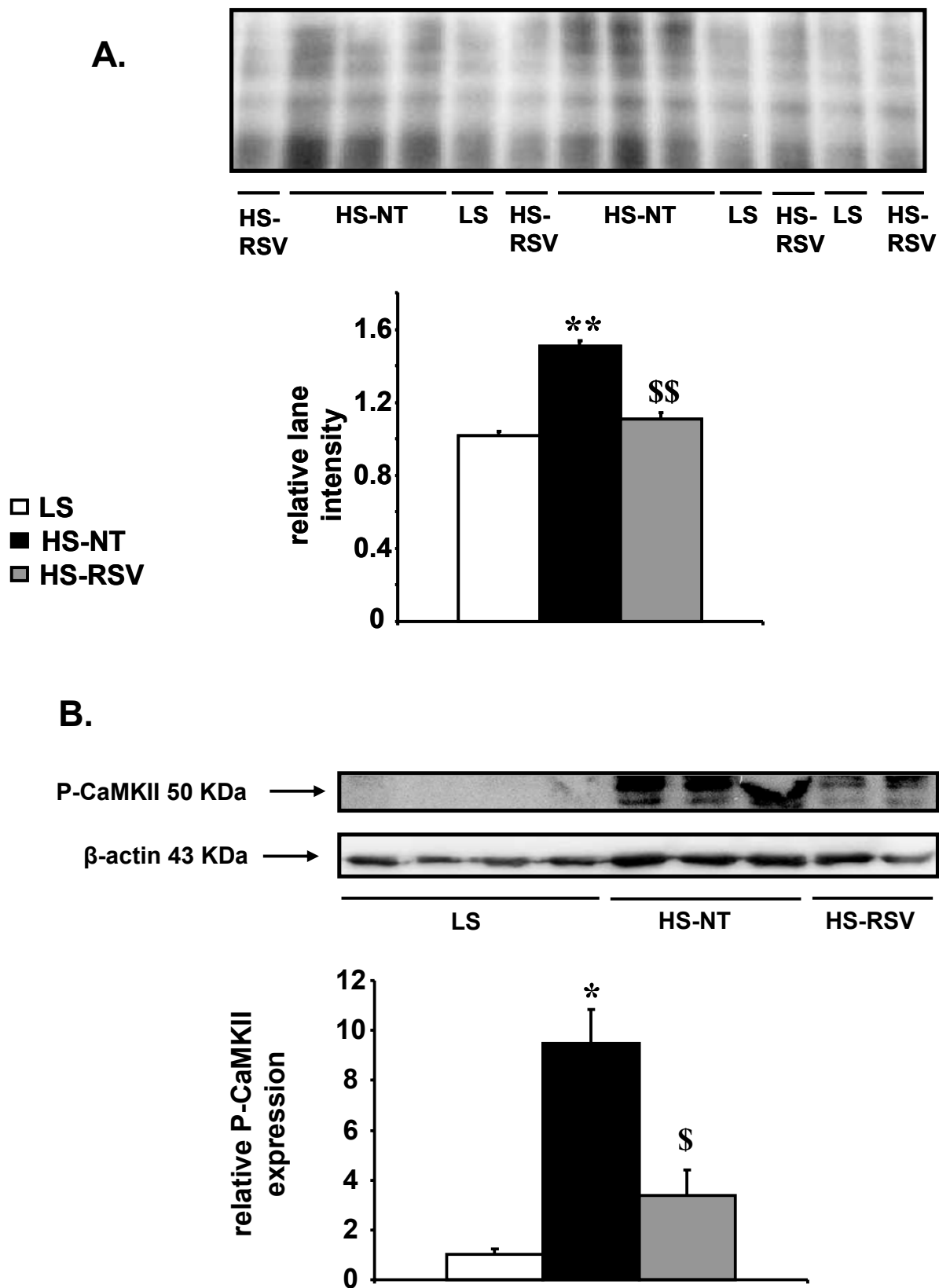


Figure 3.

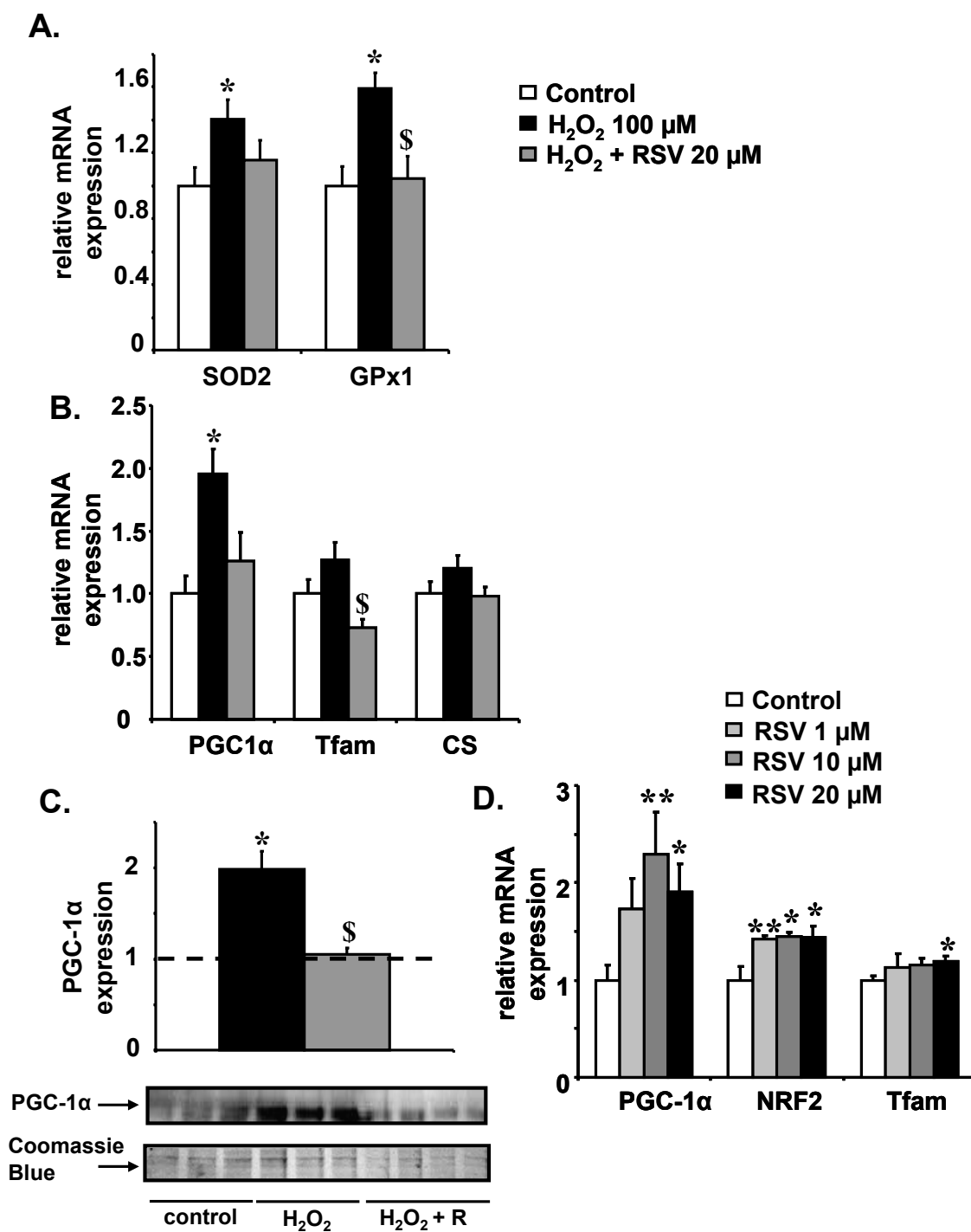


Figure 4.

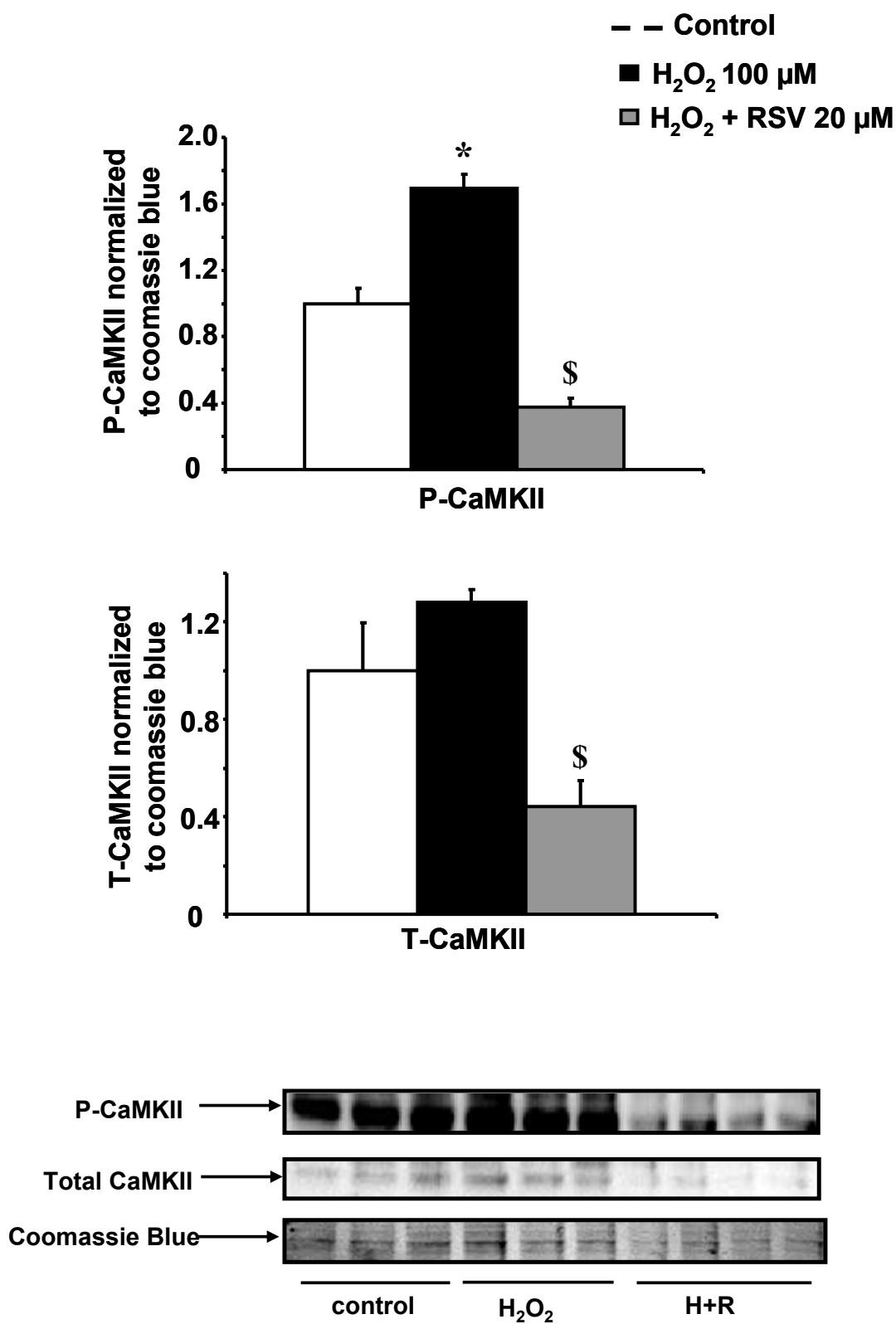


Figure 5.

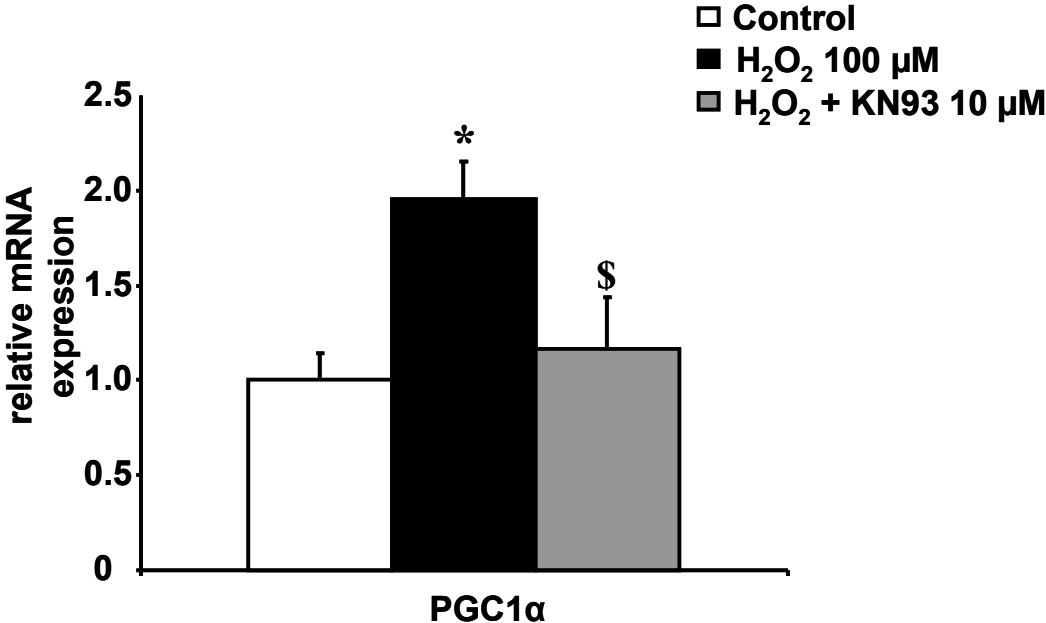
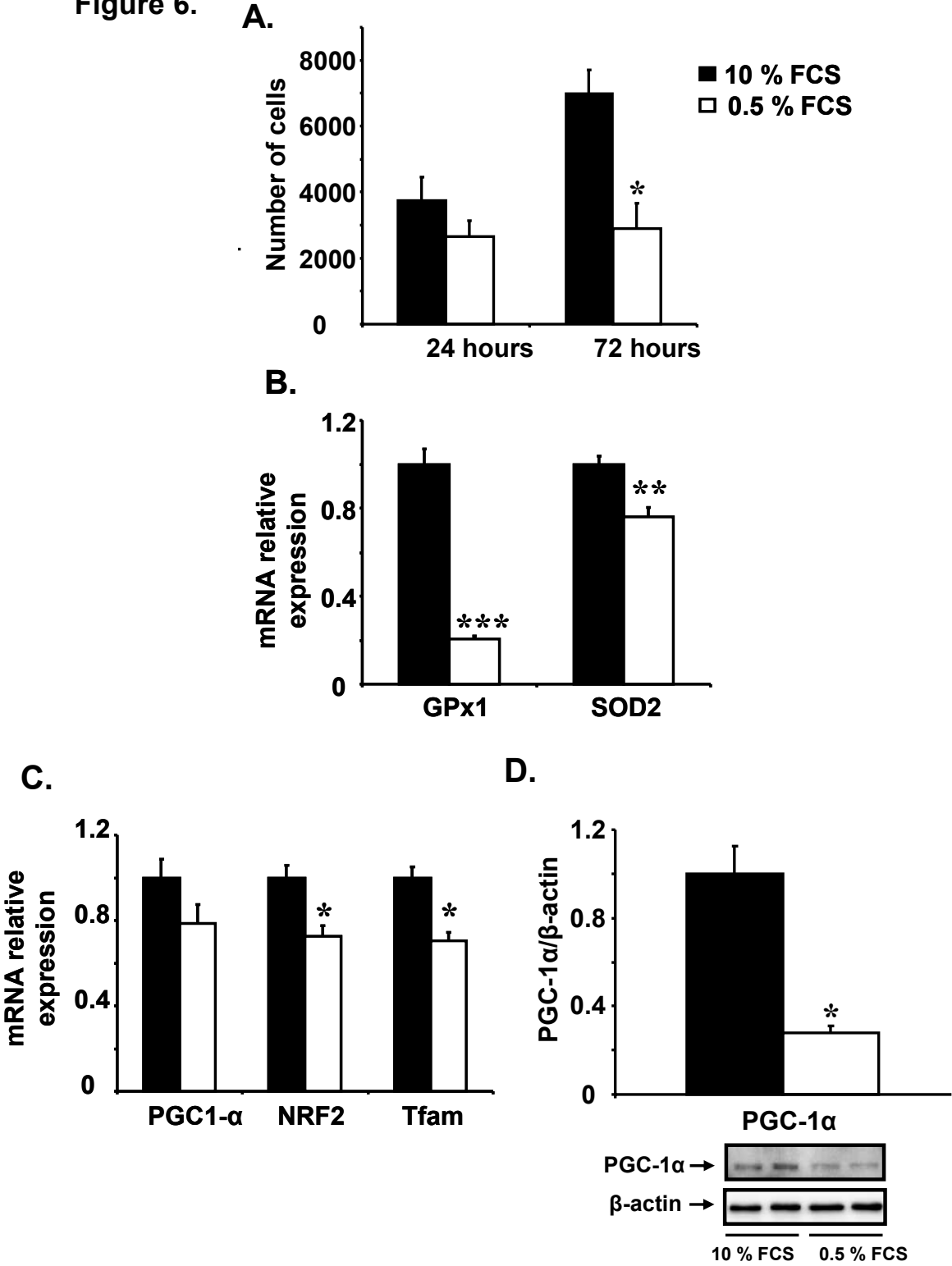


Figure 6.



### Chapitre I. Identification de nouveaux activateurs de PGC-1 $\alpha$ dans le coeur

#### I) Choix du test cellulaire développé

##### 1) *Choix du type cellulaire*

Idéalement, et afin de respecter un contexte cardiaque réel, il aurait été préférable de choisir un modèle de cardiomyocytes de rat adulte. Cependant, ce modèle pose de nombreuses difficultés incompatibles avec la mise en place d'un criblage ou test cellulaire miniaturisé et robotisé. Tout d'abord, la mise en culture primaire de ces cellules ne permet pas l'obtention d'un rendement suffisant pour prétendre à un criblage à haut débit. D'autre part, ce rendement n'est pas toujours fixe d'une dissociation à l'autre. En outre, ces cellules ne peuvent pas se maintenir plus de 48-72 heures en culture sans altération du phénotype et augmentation de la mortalité. Enfin, ces cellules ne sont pas transfectables et nécessitent l'utilisation d'adénovirus et donc des conditions d'expérimentation adaptées pour faire de la transgénèse.

A ne pas écarter non plus, d'un point de vue éthique cela demanderait un sacrifice important d'animaux, qui autant que faire ce peu, doit être évité lorsqu'une alternative est envisageable. En effet, dans notre cas, la mise à disposition de lignées cellulaires de type cardiaque reste une solution avantageuse.

Il existe principalement deux lignées cellulaires dérivées de cellules cardiaques : les cellules HL-1 et les cellules H9c2. Les cellules HL-1 sont dérivées de cardiomyocytes atriaux de souris. Bien que ces dernières puissent être maintenues en culture tout en conservant un phénotype cardiaque, elles sont issues de cellules atriales et non ventriculaires ce qui peut notamment influencer sur les propriétés électrophysiologiques et énergétiques de la cellule (Vannier et al., 1996; Claycomb et al., 1998).

De ce fait, notre choix s'est naturellement porté sur les cellules H9c2. Ces dernières sont des cellules de coeur embryonnaire de rat (souche BDX1) (Kimes et Brandt, 1976) qui, maintenues en culture dans un milieu nutritif complet, présentent des caractéristiques du muscle squelettique. Cependant, en remplaçant ce milieu par un milieu de différenciation avec une faible concentration en SVF supplémenté d'acide rétinoïque, ou avec un sérum plus

pauvre en facteurs de croissance : le sérum de cheval, ces cellules acquièrent certaines caractéristiques de la cellule ventriculaire cardiaque et notamment l'expression de marqueurs telles que la sous-unité du canal calcique de type L, la troponine T ou encore la myosin chaîne légère 2v de la myosine (MLC-2v) (Menard et al., 1999). Après différenciation, ces cellules présentent un métabolisme plus oxydatif en accord avec une augmentation de la biogenèse mitochondriale, de la masse mitochondriale et de la phosphorylation oxydative (Comelli et al., 2011). De plus, ces cellules sont facilement transfectables et il est donc plus aisé de mettre en place une lignée stable exprimant continuellement un transgène d'intérêt.

Ainsi ces cellules, après différenciation, peuvent constituer un modèle de choix pour permettre la mise en place d'une lignée stable, qui se maintient au cours du temps, est facile à cultiver et conserve un potentiel prolifératif permettant d'obtenir un nombre de cellules non limitant.

## ***2) Avantages du TCR développé***

Pour rappel, la lignée stable mise en place repose sur l'expression d'une luciférase sécrétée : la GLuc est sous la dépendance de la modulation du promoteur humain de PGC-1 $\alpha$ . Ainsi, toute activation du promoteur se répercute par une augmentation de production de GLuc et donc de photons lors de l'ajout de son substrat, ce qui fait de ce système un modèle de sélection simple et efficace. De plus, cette sécrétion de la luciférase nous permet de s'affranchir d'une étape de lyse cellulaire, limitant le nombre d'étapes ainsi que la variabilité de mesure dépendant de la lyse cellulaire.

Le fait que ce soit une protéine sécrétée offre par ailleurs l'avantage de pouvoir coupler à ce test d'activité un test secondaire. En effet, en parallèle, il peut être réalisé un test de toxicité ou une validation complémentaire par mesure de l'expression en ARNm de la GLuc.

En effet, la mesure en quadruplicate de l'activité GLuc, outre l'apport statistique en terme de validation, nous permet de coupler à ce TCR les tests précédemment cités. La mesure de l'expression endogène en ARNm de GLuc permet par ailleurs de renforcer la sélection des hits grâce à l'établissement d'une corrélation entre l'activité et l'expression de la GLuc. Enfin, la mesure de toxicité permet d'affiner la sélection en ne conservant que les hits non toxiques.

D'un point de vue pratique, le fait que ces cellules puissent être maintenues en culture au cours du temps permet une amplification importante de ces cellules et donc l'automatisation de la mise en culture par le « microfill » qui nécessite un volume mort important de suspension cellulaire. Par la suite, l'utilisation du robot pour les stimulations ainsi que les transferts de liquide apporte un contrôle qualité supplémentaire en diminuant toute variabilité d'un puits à l'autre.

L'ensemble des résultats validés positivement sur l'expression endogène de PGC-1 $\alpha$  dans des cardiomyocytes de rat adulte confirment la pertinence du test tant sur le choix de la lignée cellulaire que sur la taille du promoteur qui semble suffisamment représentative du promoteur endogène.

### **3) Inconvénients du TCR développé**

L'inconvénient majeur de ce test repose sur la faible dynamique de réponse concernant l'activité de la GLuc, puisque celle-ci atteint difficilement un facteur 2 pour l'induction sous stimulation. Cette limitation dans la réponse ne nous a donc pas permis de mettre en place un criblage conventionnel reposant sur l'établissement d'un test statistique en amont : le facteur Z prime. En effet, celui-ci permet d'une part de définir la robustesse du test et d'autre part sa validation lorsque ce facteur dépasse 0,5. C'est pourquoi le terme de criblage est peu employé et le terme TCR préférentiellement utilisé. En effet, de façon à contourner ce problème, la mise en place du TCR diffère sensiblement puisque chaque campagne de stimulation doit être réalisée en quadruplicate pour une validation statistique à postériori et couplée à une mesure de l'expression en ARNm de la GLuc pour affiner la sélection. La mesure de l'expression en ARNm de GLuc a été choisie plutôt que l'expression endogène de PGC-1 $\alpha$ , cette dernière étant difficilement détectable par PCR dans les H9c2. Malgré ce problème de dynamique de réponse, la question de la pertinence d'une forte activation reste ouverte. En effet, le calcul du facteur Z prime repose sur la formule suivante :

$$Z' = 1-F$$

$F = 3 \times (\text{ET valeur haute} + \text{ET valeur basse}) / (\text{moyenne valeur haute} - \text{moyenne valeur basse})$ , ET étant l'écart type, valeur haute = valeur sous stimulation par un contrôle positif, valeur basse = valeur en absence de stimulation



De ce fait, pour que celui-ci soit valide, la moyenne haute correspondant aux valeurs après induction doit être suffisamment forte et les ET le plus bas possible. Or, des évidences dans la littérature montrent que l'induction de PGC-1 $\alpha$  dans le cardiomyocyte est loin d'être excessive. Par exemple, sous stimulation par de l'aldostérone ou de l'isoprénaline, l'expression de PGC-1 $\alpha$  est augmentée respectivement de 60 et 20 % dans le cardiomyocyte de rats adultes (Garnier et al., 2009). De plus une induction excessive de PGC-1 $\alpha$  et donc de la biogenèse mitochondriale peut conduire à des effets néfastes. En effet, il a été montré qu'une surexpression massive de PGC-1 $\alpha$  dans le cœur adulte pouvait conduire à une prolifération anarchique de mitochondries conduisant au développement d'une cardiomyopathie (Russell et al., 2004).

Au vu de ces études, le TCR reste donc une alternative largement acceptable puisque malgré les faibles dynamiques d'induction, ces dernières reflètent visiblement une réalité physiologique. Cependant, dans ces conditions le haut débit n'est pas envisageable. Cela nécessite donc un travail en amont dans la présélection de composés à partir de chimiothèques plus larges et dans la réalisation de petites banques de molécules.

## **II) Discussion autour des activateurs sélectionnés**

Cette présente discussion sera axée sur les 3 familles identifiées lors du TCR, à savoir les hormones stéroïdiennes ( $\beta$ -œstradiol et progestérone), les vitamines B (pyridoxine et cobalamine) et les acides gras (acide linoléique et palmitate). Elle s'articulera selon les points suivants :

- un état de la littérature concernant nos connaissances actuelles sur les molécules identifiées en lien avec la fonction mitochondriale,
- leurs implications en physiopathologie cardiaque,
- la valeur ajoutée issue de notre étude et les perspectives qui en découlent.

## **1) Les hormones stéroïdiennes : $\beta$ -œstradiol et progestérone**

### **a) Contrôle de la fonction mitochondriale par les hormones stéroïdiennes**

De nombreuses études montrent une implication certaine des hormones stéroïdiennes féminines dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale et plus généralement dans la fonction mitochondriale. Cependant, ces études font état des lieux essentiellement d'un contrôle œstrogénique impliquant le 17  $\beta$ -œstradiol (E2), mais l'implication des progestatifs et notamment le rôle de la progestérone reste à définir.

#### **i. Rôle du $\beta$ -œstradiol**

Ces dernières années, de nombreuses évidences abondent dans le sens d'une régulation de la transcription de l'ADN mitochondrial par les hormones stéroïdiennes féminines et plus particulièrement l'E2. Cette régulation participerait activement à la synthèse des sous-unités protéiques des complexes de la chaîne respiratoire en impliquant les récepteurs nucléaires aux œstrogènes (ER) (Chen et al., 2005).

En effet, sont maintenant bien connus les effets génomiques nucléaires via les récepteurs nucléaires ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Leitman et al., 2010) et ceux non génomiques et rapides impliquant les ER membranaires (Levin, 2002) conduisant notamment au contrôle de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et du cycle cellulaire. Récemment, un effet génomique mitochondrial des œstrogènes contrôlant la fonction et la biogenèse de la mitochondrie a été supposé puis démontré (Klinge, 2008).

Cette spécificité d'action mitochondriale est rendue possible grâce à une localisation mitochondriale des ER $\alpha$  et  $\beta$ . De plus, une tissu-spécificité de la localisation mitochondriale des 2 isoformes est mentionnée. En effet, bien que les 2 isoformes soient présentes au sein de la mitochondrie dans certains types cellulaires et notamment les cellules hépatiques (Chen et Yager, 2004), seule l'isoforme  $\beta$  serait présente dans la mitochondrie de la majorité des types cellulaires incluant les neurones primaires, ainsi que les cardiomyocytes primaires (Yang et al., 2004). De ce point de vue, les effets directs sur la transcription de l'ADN mitochondrial E2/ER-dépendants impliqueraient donc majoritairement ER $\beta$  dans le cœur.

Plus récemment, le  $\beta$ -oestradiol a été décrit comme jouant un rôle dans la régulation de la biogenèse mitochondriale (Chen et al., 2009).

**Ces travaux mettent en évidence outre une action génomique nucléaire un mécanisme d'action génomique via l'ADN mitochondrial.**

- Activité transcriptionnelle

Le  $\beta$ -œstradiol a été décrite comme stimulant l'expression en ARNm de certains gènes de l'ADNmt codant pour les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire, incluant l'expression de la sous-unité mitochondriale COXI du complexe IV dans les vaisseaux sanguins cérébraux. De plus, ces résultats sont en accord avec l'augmentation de l'activité du complexe IV. En outre, cette même étude montre une diminution du stress oxydant après traitement par E2 en lien avec une augmentation de l'expression de la SOD mitochondriale, SOD2 (Stirone et al., 2005). Cet effet a été retrouvé dans la cellule musculaire lisse vasculaire (Strehlow et al., 2003). D'autre part, il a aussi été observé dans des cellules neuronales, une augmentation de l'expression en ARNm et en protéine et de l'activité de COX I, II et III ainsi qu'une augmentation de la respiration mitochondriale après traitement avec l'E2 (Nilsen et al., 2007). Par ailleurs, la stimulation par E2 de cellules épithéliales mammaires ne contenant que l'isoforme ER $\beta$  reproduit les effets précédemment décrits, et sont abolis par l'inactivation de ER $\beta$  (Chen et al., 2007).

**L'ensemble de ces résultats suggèrent donc un effet de l'E2 sur le contrôle de la transcription de l'ADN mitochondrial ainsi que sur l'activité de la chaîne respiratoire notamment via un mécanisme ER $\beta$ -dépendant.**

- Action sur la biogenèse mitochondriale

D'un point de vue moléculaire, le mécanisme d'action le plus décrit dépend de l'action génomique nucléaire et implique les facteurs de transcription NRFs. En effet, le traitement avec E2 de rats femelles ovariectomisées conduit à une augmentation de l'expression de NRF1 dans le tissu vasculaire cérébral (Stirone et al., 2005). Par ailleurs, dans des cellules cardiaques de rats mâles, le traitement par de l'E2 conduit à une induction de l'expression de

NRF2 (Hsieh et al., 2005). Cette induction des NRFs de manière E2 dépendante apparaît comme fonctionnelle puisqu'elle conduit à l'augmentation de l'expression de Tfam ainsi qu'à la transcription de gènes mitochondriaux, l'ensemble étant corrélé à une augmentation de la biogenèse mitochondriale et du nombre de copie de l'ADNmt. De plus, ces résultats sont confortés par la perte des effets de l'E2 sur la biogenèse mitochondriale après extinction de l'expression de NRF1 dans des lignées cellulaires de type H1793 (cellules d'adénocarcinome pulmonaire) ou MCF-7 (cellules épithéliales de glande mammaire) (Mattingly et al., 2008).

D'autre part, l'induction de cette cascade transcriptionnelle sous imprégnation œstrogénique, dépend de l'induction de PGC-1 $\alpha$  ; l'utilisation d'un ARN interférent ciblant ce co-activateur inhibant les effets de l'E2 ER $\beta$ -dépendants (Hsieh et al., 2006). En sus, la diminution de l'expression de PGC-1 $\alpha$  dans le cœur après un choc hémorragique est totalement normalisée par ajout d'E2, de même que l'ensemble de la cascade transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale, le niveau d'expression des complexes de la chaîne respiratoire et le niveau d'ATP produit (Hsieh et al., 2005).

**L'ensemble de ces données suggèrent donc une régulation de la biogenèse mitochondriale par le  $\beta$ -œstradiol et de manière ER $\beta$ -dépendante et qui met en jeu l'axe PGC-1 $\alpha$ /NRF.**

Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature, et nous montrons qu'outre une implication de NRF2, ERR $\alpha$  étant induit, ce dernier pourrait être impliqué dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale après stimulation par le  $\beta$ -œstradiol. De plus, non seulement l'expression de PGC-1 $\alpha$ , mais aussi celle de PGC-1 $\beta$  est induite, suggérant une régulation impliquant les 2 co-activateurs. Il se peut cependant que les mécanismes cellulaires à l'origine de l'induction de ces 2 isoformes diffèrent puisque l'induction de PGC-1 $\alpha$  apparaît plus précocement que celle de PGC-1 $\beta$  dans le cardiomyocyte de rat adulte.

Récemment, il a été montré que l'axe E2/ER $\alpha$  pourrait aussi être impliqué dans l'induction de PGC-1 $\alpha$ . En effet, des expériences de contransfection d'un plasmide luciférase sous le contrôle du promoteur de PGC-1 $\alpha$  avec un plasmide codant pour ER $\alpha$  dans des cellules AC16 (lignée cellulaire ventriculaire cardiaque humaine) mettent en évidence une forte induction de l'activité luciférase, ce qui suggère qu'ER $\alpha$  peut également être impliqué dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale via PGC-1 $\alpha$  (Witt et al., 2008). De plus, PGC-1 $\alpha$  lui-même est capable de lier ER $\alpha$  et  $\beta$  favorisant ainsi la médiation des effets génomiques dépendant de l'activation de ces récepteurs (Bourdoncle et al., 2005).

En revanche, malgré le peu de connaissances concernant l'induction de PGC-1 $\beta$  en réponse aux œstrogènes, celui-ci a tout de même été identifié comme un co-activateur spécifique d'ER $\alpha$  contrairement à PGC-1 $\alpha$  qui est un co-activateur à la fois de  $\alpha$  et  $\beta$ . Lors de sa découverte, PGC-1 $\beta$  a d'ailleurs été nommé PERC (PGC-1 related Estrogen Receptor Coactivator) pour sa capacité à lier de manière hautement spécifique ER $\alpha$  ce qui suggère une régulation plutôt PGC-1 $\beta$  ER $\alpha$ -dépendant. En effet, l'induction de PGC-1 $\beta$  sous stimulation E2 est prévenue par une mutation inactivant ER $\alpha$  (Kressler et al., 2002b).

**Ainsi la spécificité apparente de chacun des co-activateurs dans la médiation des effets œstrogéniques via ER $\alpha$  et/ou  $\beta$  pourrait expliquer en partie la différence de cinétique de stimulation sur l'expression de PGC-1 $\alpha$  et  $\beta$  dans les cardiomyocytes de rats adultes. Il serait donc intéressant à court terme de vérifier la contribution relative de chacune des isoformes de ER dans le contrôle de l'expression de PGC-1 $\alpha$  et de PGC-1 $\beta$  par l'utilisation d'antagonistes et/ou de siRNA spécifiques de ER $\alpha$  ou de ER $\beta$ .**

## ***ii. La progestérone, des indices en faveur d'un contrôle de la fonction mitochondriale***

Les données de la littérature concernant la régulation de la biogenèse mitochondriale et de la fonction mitochondriale par la progestérone sont beaucoup plus restreintes. Certaines études suggèrent cependant un rôle potentiel de la progestérone dans ce contrôle. Une étude réalisée sur des chattes ovariectomisées puis placées sous imprégnation de progestérone seule ou après prétraitement par des œstrogènes, a montré que la progestérone seule n'est pas capable de stimuler la respiration mitochondriale. Néanmoins, elle potentialise les effets des œstrogènes sur l'activité de la chaîne respiratoire dans le cerveau (Bayliss et al., 1990).

Par ailleurs, une étude plus récente met en évidence dans le tissu adipeux brun après traitement par la progestérone, une induction des marqueurs de la biogenèse mitochondriale, incluant NRF2 et Tfam mais sans induction significative de PGC-1 $\alpha$  (Rodriguez-Cuenca et al., 2007). De la même manière, une étude sur des rats femelles ovariectomisées puis traitées pendant 24 heures par de la progestérone révèle un effet inducteur sur la respiration mitochondriale indépendamment de l'action de E2 dans le cerveau. Ces résultats sont par ailleurs en accord avec une augmentation de l'expression et de l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire (Irwin et al., 2008).

**Bien que les évidences soient peu nombreuses, la progestérone semble tout de même pouvoir exercer un contrôle positif sur la fonction mitochondriale, soit seule, soit de manière additive à l'effet du  $\beta$ -œstradiol en fonction de la nature du tissu.**

Au travers de notre étude, nous montrons dans les cardiomyocytes de rat adulte que la progestérone est bien capable d'induire l'expression de PGC-1 $\alpha$ , et que cette induction se répercute sur l'ensemble de la cascade transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale de la même manière que pour le  $\beta$ -œstradiol. D'autre part, la stimulation pendant 72 heures des cellules H9c2 différenciées par la progestérone conduit à une augmentation de la consommation en O<sub>2</sub> suggérant que l'induction de la biogenèse mitochondriale se traduit par une augmentation de la fonction mitochondriale.

De manière intéressante, c'est la seule molécule de cette famille qui dans nos conditions expérimentales induit une biogenèse mitochondriale via PGC-1 $\alpha$  uniquement. En effet, que ce soit après 9 heures ou 24 heures de stimulation, et contrairement au  $\beta$ -œstradiol, aucune augmentation de l'expression en ARNm de PGC-1 $\beta$  n'a été observée.

La progestérone génère ses effets agonistes principalement par le récepteur nucléaire PR (progesterone receptor). De la même manière que pour le  $\beta$ -œstradiol, la différence de régulation des 2 co-activateurs après traitement à la progestérone pourrait s'expliquer par une implication de récepteurs nucléaires spécifique à PGC-1 $\alpha$ . En effet, il a été montré que l'activité du PR était sensiblement augmentée par PGC-1 $\alpha$  mais non modulée par PGC-1 $\beta$  (Kressler et al., 2002a).

Dans la plupart des cas, PGC-1 $\alpha$  est à la fois co-activateur des récepteurs nucléaires mais favorise aussi leur transcription, ce qui est d'ailleurs le cas pour l'ER. Il n'est donc pas improbable qu'il en aille de même pour le PR. De ce fait, la spécificité d'action de la progestérone sur l'induction de PGC-1 $\alpha$  et non  $\beta$  peut supposer une implication de PR, celui-ci n'étant co-activer que par PGC-1 $\alpha$ .

**Ainsi, par la présente étude, la progestérone se place comme un activateur d'intérêt de l'expression endogène de PGC-1 $\alpha$  de manière spécifique et plus généralement de la biogenèse mitochondriale. Ces résultats nouveaux incitent donc à une étude plus approfondie quant au rôle de la progestérone dans le contrôle de la fonction mitochondriale. Dans ce contexte, vérifier la spécificité d'induction de PGC-1 $\alpha$  par rapport à PGC-1 $\beta$  par la même étude mais sur une cinétique de temps plus large et**

**à différentes concentrations de progestérone serait une priorité. Par la suite, et étant donné l'état des connaissances sur son rôle dans la fonction mitochondriale cardiaque, il serait intéressant d'étudier la respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées cardiaques de rats femelles ovariectomisées puis traitées à la progestérone. Ces études couplées à des études biochimiques mesurant l'activité des complexes de la chaîne respiratoire permettraient de valider le bénéfice de la progestérone sur la fonction mitochondriale. Enfin, d'un point de vue mécanistique, identifier les récepteurs nucléaires impliqués et en particulier le PR par l'utilisation de siRNA ou d'antagonistes de ce récepteur apporterait la connaissance des mécanismes impliqués dans ce contrôle.**

*b) Théorie du « sex-gender »*

L'incidence des pathologies cardiovasculaires apparaît comme plus faible chez la femme ou en tout cas comme apparaissant plus tardivement. Ce constat est surtout vrai avant la ménopause où les sécrétions ovariennes de progestérone et d'œstradiol suivent un cycle normal. De fait, l'augmentation de l'incidence des pathologies cardiovasculaires après ménopause est corrélée à la chute de production des hormones ovariennes. Ainsi la théorie du « sex-gender » tend à suggérer un rôle bénéfique et protecteur des hormones stéroïdiennes sur la fonction cardiaque. Selon cette théorie, une meilleure compréhension des différences liées au genre dans le développement des pathologies cardiovasculaires et une attention particulière portée sur les mécanismes impliquant les hormones sexuelles féminines dans la protection cardiaque apparaît comme indispensable pour optimiser les thérapies pharmacologiques futures (Regitz-Zagrosek, 2006).

Une des premières études confortant cette théorie a montré sur des patients présentant une dysfonction ventriculaire en réponse à une sténose aortique sévère, une moindre altération de la fonction cardiaque chez les femmes. En effet, les paramètres hémodynamiques et échocardiographiques incluant la fraction d'éjection, apparaissent plus altérés chez l'homme. Ces résultats attestent donc d'une différence de genre quant au développement d'une dysfonction cardiaque et ont été confirmés par des études similaires ultérieures (Carroll et al., 1992; Villari et al., 1995; Simon et al., 2001; Leinwand, 2003).

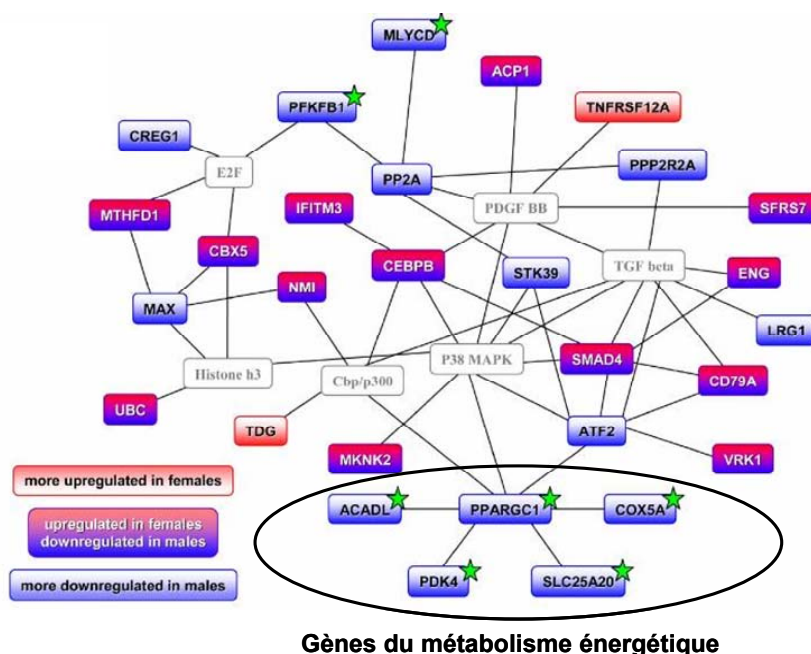
Ces nombreuses évidences ont guidé les recherches qui ont suivies vers des études comparatives hommes/femmes sur les mécanismes pouvant être impliqués dans ces différences de genre. Ces études ont été réalisées sur des modèles expérimentaux de

dysfonction ventriculaire où la différence de réponse en fonction du genre à aussi été observée sur la fonction du myocarde (Skavdahl et al., 2005). En outre, cette étude montre aussi un degré d'hypertrophie cardiaque et de fibrose bien plus marqué chez le mâle. Une étude comparative male/femelle réalisée chez la souris avec un modèle constriction de l'aorte transverse (TAC) induisant une hypertrophie cardiaque par surcharge de pression a récemment été réalisée par le groupe de Vera Regitz-Zagrosek. Cette étude confirme dans un premier temps la différence de morphologie cardiaque entre les 2 sexes après 6 semaines de TAC montrant une hypertrophie plus marquée chez les mâles. Une analyse génomique sur puces à ADN et confirmée par RT-PCR a permis l'identification de deux groupes majeurs de gènes régulés différemment entre les souris femelles et les souris mâles. En effet, un premier groupe de gènes impliqués dans le remodelage cellulaire et la fibrose apparaît comme plus induit chez le mâle soumis à la TAC. Un deuxième ensemble de gènes caractéristiques du métabolisme énergétique incluant PGC-1 $\alpha$  a été montré comme étant plus diminué chez les rats mâles (Figure 81) (Witt et al., 2008).

Ces résultats supportent le concept d'une protection contre la dysfonction cardiaque chez la femme, en relation avec le statut hormonal. D'autre part, l'expression de PGC-1 $\alpha$  étant moins altérée chez les souris femelles soumises à la TAC, et celui-ci répondant positivement aux hormones sexuelles ovariennes, une préservation de la fonction mitochondriale peut donc être suggérée comme jouant un rôle clé dans la protection de la fonction cardiaque chez la femme.

Par ailleurs, ces résultats sont confortés par une autre étude menée chez le rat soumis à un choc hémorragique. En effet, cette étude montre que l'altération de la fonction cardiaque, accompagnée d'une altération de l'expression de marqueurs de la fonction mitochondriale, est totalement récupérée après un traitement par de l'œstradiol. En outre, cette récupération est associée à une normalisation de l'expression de PGC-1 $\alpha$ , ainsi que de ses cibles en aval incluant Tfam et de l'expression de sous-unités protéiques des complexes de la chaîne respiratoire (Hsieh et al., 2005).





**Figure 81. Etude génomique comparative mâle/femelle dans un modèle d'hypertrophie du myocarde induite par surcharge de pression**

Un ensemble de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et regroupés autour de PGC-1 $\alpha$  (dans le cercle noir) apparaît comme plus sous-exprimés chez le mâle. ACADL : acyl-coenzyme A dehydrogenase long chain, COX5A : cytochrome c oxidase subunit V a, PDK4 : pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4, SLC25A20 : solute carrier family carnitine/acylcarnitine translocase. *D'après (Regitz-Zagrosek et al., 2010).*

### c) Conclusion

Etant donné le rôle majeur des hormones sexuelles féminines dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale, ainsi que dans la préservation de la fonction cardiaque soumise à un stress hémodynamique, ce champ de recherche constitue un domaine d'intérêt majeur dans la recherche appliquée et notamment pour l'amélioration des thérapies cardiaques.

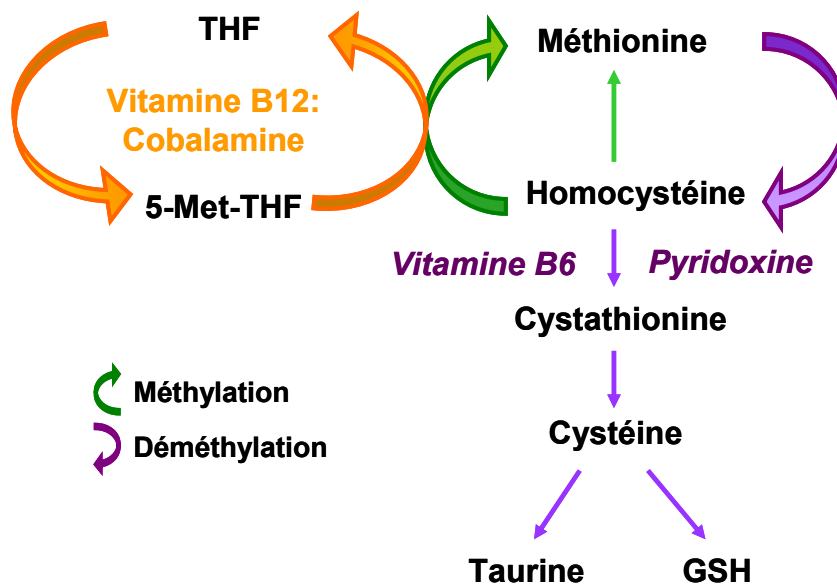
Basée sur les effets bénéfiques précédemment décrits des hormones stéroïdiennes ainsi que l'implication de PGC-1 $\alpha$  dans la préservation de la fonction mitochondriale et plus généralement de la fonction cardiaque, une recherche de nouveaux activateurs de

**PGC-1 $\alpha$  possédant des analogies de structures chimiques aux hormones stéroïdiennes est prévue à court terme. D'autre part, l'émergence de la recherche autour de molécules naturelles et notamment de composés qualifiés de phyto-œstrogènes car chimiquement proches des œstrogènes, tels que la génistéine ou le resvératrol, incite de la même manière à initier un criblage à partir d'une petite banque de composés phyto-œstrogéniques pour une application thérapeutique à plus long terme.**

## **2) *Les Vitamines B***

### *a. Rôle général*

Les vitamines B sont des cofacteurs indispensables à de nombreuses réactions vitales à la fonction cellulaire. Celles-ci sont réparties dans une même famille de par leur solubilité dans l'eau, les trois majoritairement étudiées étant la vitamine B6 ou pyridoxine, la vitamine B9 ou folate et la vitamine B12 ou cobalamine. Ces vitamines sont décrites comme majoritairement impliquées dans la méthylation de l'ADN et des protéines ainsi que dans la synthèse des nucléotides en conditionnant le bon fonctionnement du métabolisme monocarboné (one-carbon) (Figure 82).



**Figure 82. Schéma simplifié du métabolisme monocarboné et implication des vitamines B**

La vitamine B6 ou Pyridoxine est impliquée dans la métabolisation de l'homocystéine en Cystathionine par trans-sulfuration via la cystathionine-beta-synthétase. L'homocystéine peut être reméthylée pour former de la méthionine via la vitamine B12 cofacteur de la 5-méthyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransférase (MTR), le 5-Méthyl-tetrahydrofolate étant donneur de méthyl. GSH : glutathione, THF : tétrahydrofolate.

Le cycle précédemment décrit fait apparaître l'homocystéine (HCY) comme un élément central, la concentration en HCY dépendant ainsi essentiellement de la concentration en vitamines B et notamment B6 et B12. Lorsque le catabolisme de l'HCY est altéré et notamment lors d'une déficience en vitamines B, l'HCY s'accumule dans la cellule puis dans le plasma. On parle alors d'hyperhomocystéinémie qui traduit outre l'augmentation de l'HCY, une déficience nette en vitamines B (Austin et al., 2004).

### *b. Implication en physiopathologie cardiovasculaire*

De nombreuses études cliniques ont montré un lien étroit entre augmentation d'HCY plasmatique et développement de pathologies cardiovasculaires, suggérant ainsi l'hyperhomocystéinémie comme un marqueur de la dysfonction cardiaque. En 2003, une

étude sur des patients atteints d'IC congestive sans infarctus du myocarde préalable, a mis en évidence une corrélation entre l'élévation de la teneur plasmatique en HCY et l'incidence de développement de l'IC chronique (Vasan et al., 2003). De la même manière, une étude similaire chez des patients présentant un infarctus du myocarde aigu, montre à nouveau une relation étroite entre concentration plasmatique en HCY et incidence cumulative de l'apparition de l'IC congestive. En effet, sur 96 patients, un groupe de patients présentant un taux faible d'HCY plasmatique ( $8.2 \mu\text{M} \pm 0.3$ ) montre une incidence de l'ordre de 12.5% de l'apparition de l'IC congestive. A l'inverse, le deuxième groupe présente un taux plus élevé d'HCY ( $17.4 \mu\text{M} \pm 1.4$ ) et ceci est associé à une augmentation statistique de l'incidence de l'apparition de l'IC congestive à hauteur de 43.7% (Washio et al., 2011).

Enfin, l'HCY a été montrée comme étant corrélée avec l'augmentation du taux plasmatique de BNP et à la diminution de la fraction d'éjection (Maurer et al., 2010) proposant ainsi l'hyperhomocystéinémie comme un facteur de risque de l'incidence d'apparition de l'IC. Il semblerait d'autre part qu'il y ait une corrélation entre l'augmentation du taux plasmatique d'HCY et le degré de sévérité de l'IC caractérisé par le classement NYHA (Herrmann et al., 2005). Ces résultats sont par ailleurs confirmés dans diverses études (Gueant-Rodriguez et al., 2007; Agoston-Coldea et al., 2010; Agoston-Coldea et al., 2011).

**Ces données cliniques soulignent donc un lien étroit entre hyperhomocystéinémie et développement de l'IC. De manière indirecte, nous pouvons suggérer que cette corrélation dépend en partie d'une déficience en vitamines B expliquant l'élévation drastique d'HCY. En effet cette déficience en vitamines B a été observée chez des patients atteints d'IC (Keith et al., 2009). Par ailleurs, dans les pathologies coronariennes, l'hyperhomocystéinémie est inversement corrélée à la teneur en vitamines B (Robinson et al., 1995), et un traitement à la vitamine B6 permet de diminuer le taux d'HCY plasmatique (Franken et al., 1994; Robinson et al., 1995). Bien qu'à l'heure actuelle, il n'y ait pas d'évidences directes montrant un bénéfice d'une supplémentation en vitamine B sur la fonction cardiaque, ce bénéfice n'est cependant pas à exclure et reste à être démontré.**

### *c. Rôle des vitamines B dans la fonction mitochondriale*

Cette partie mettra l'accent essentiellement sur le rôle des vitamines B6 et B12 dans la fonction mitochondriale (Depeint et al., 2006), ces dernières ayant été identifiées dans notre étude comme inductrices de la biogenèse mitochondriale.

#### *i. Vitamine B6*

La mitochondrie, plus que les autres organelles, nécessite un niveau suffisant de vitamines B6 en tant que cofacteur enzymatique pour assurer un certain nombre de fonction. Tout d'abord, les vitamines B6 sont essentielles pour le bon déroulement des réactions de type aminotransférase (Lichtstein et al., 1945) et notamment dans le catabolisme mitochondrial des acides aminés par le cycle de l'urée (Katunuma et al., 1966) qui produit une enzyme clé du cycle de l'urée : la carbamyl-phosphate synthétase I (CPSI). De ce fait, le besoin en vitamines B6 augmente avec l'augmentation de la dégradation protéique. D'autre part, les transaminases participent à la navette malate/aspartate impliquée dans l'oxydation du NADH issu de la glycolyse. Le métabolisme des acides aminés peut par ailleurs être relié à la production énergétique puisque c'est une voie alternative pour la formation de pyruvate à partir notamment de l'alanine et d' $\alpha$ -cétoglutarate à partir de glutamate. Ces deux réactions de transformation impliquant des transaminases supposent donc un rôle des vitamines B6 en tant que cofacteur enzymatique (Depeint et al., 2006). Par ailleurs, les vitamines B6 sont aussi impliquées dans les réactions de décarboxylation et notamment pour l'aminolévulinate synthétase, localisée dans la matrice mitochondriale et qui catalyse l'étape initiale de synthèse de l'hème à partir de la glycine et du succinyl-CoA (Atamna, 2004).

Enfin, la pyridoxine est recommandée comme antidote (Lheureux et al., 2005) contre la toxicité mitochondriale rénale induite par l'éthylène glycol qui inhibe la chaîne respiratoire (McMartin et Wallace, 2005).

**Ces données suggèrent ainsi un rôle important de la vitamine B6 dans le métabolisme énergétique d'une part, ainsi que dans le transport de l'oxygène d'autre part puisqu'elle est indispensable à la synthèse de l'hème. Il est donc probable qu'une déficience en vitamines B6 peut conduire à une altération du métabolisme énergétique**

**tant sur les voies métaboliques mitochondriales, que sur l'apport en oxygène au niveau de la chaîne respiratoire.**

## *ii. Vitamine B12 : cobalamine*

Au sein de la mitochondrie, la cobalamine est nécessaire à la synthèse de succinyl-CoA à partir de la valine, de l'isoleucine et de la méthionine. Après formation de propionyl-CoA et conversion en L-méthylmalonyl-CoA, une réaction d'isomérisation dépendant à la fois de l'activité de la méthylmalonyl-CoA mutase (MMA) et de l'adénosylcobalamine permet l'obtention de succinyl-CoA, intermédiaire du cycle de Krebs. La vitamine B12 occupe une place centrale dans cette conversion puisque une déficience en vitamine B12 est corrélée à une inhibition du fonctionnement de la MMA conduisant à une accumulation d'acide méthyl-malonique (Shane et Stokstad, 1985; Herrmann et Obeid, 2012). Cette accumulation peut devenir gravement délétère au niveau cellulaire et notamment par atteinte sévère du fonctionnement de la chaîne respiratoire.

En effet, il a été suggéré qu'une accumulation de MMA pouvait affecter la respiration mitochondriale. De surcroît, une étude a montré une inhibition de l'activité du complexe I et III de la chaîne respiratoire par accumulation de MMA dans des mitochondries isolées de cerveaux de rats (Brusque et al., 2002) mais aussi du complexe II dans des cellules embryonnaires du striatum de rat (Okun et al., 2002). D'autre part, un excès de MMA entraîne l'inhibition de la carbamyl phosphate synthétase I et de la pyruvate carboxylase altérant ainsi le fonctionnement de la navette glutamate/malate (Tanpaiboon, 2005).

Enfin, une déficience en vitamines B12 est associée à l'apparition d'une anémie pernicieuse (Troilo et al., 2010) caractérisée par une diminution de la production des globules rouges (Hillman et al., 1968). Cette altération peut donc se traduire par une diminution de l'apport en O<sub>2</sub> au niveau cellulaire et contribuer à un déficit énergétique.

**De la même manière que pour les vitamines B6, cette revue de la littérature met en avant un rôle clé de la vitamine B12 dans la fonction mitochondriale, et principalement via un effet protecteur vis à vis de la toxicité MMA-dépendante sur la chaîne respiratoire. De plus, elle joue également un rôle dans l'hématopoïèse et donc dans le transport de l'O<sub>2</sub>.**

*d. Implication des vitamines B dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale*

Bien que le rôle des vitamines B pour la fonction mitochondriale soit essentiel, actuellement peu d'informations sont disponibles sur leur rôle éventuel dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale. Néanmoins, certaines indications tendent à supposer un lien entre vitamines B et biogenèse mitochondriale.

Une des premières évidences pouvant le suggérer est issue d'une étude sur le foie dans un modèle de rats déficients en cobalamine après traitement par de l'hydroxycobalamine c-lactame. Après traitement, il a été observé une diminution du contenu en ARNmt et notamment ceux codant pour la sous-unité COXII de la cytochrome c oxydase, la sous-unité 1 de la NADH déshydrogénase, ainsi que le cytochrome b. Ces travaux mettent également en évidence une accumulation d'ARN polycistroniques précurseurs au détriment d'ARNmt matures (Leeds et Brass, 1994).

**Ces résultats suggèrent donc qu'une déficience en cobalamine peut conduire à une altération de la transcription de l'ADNmt, supposant alors un lien éventuel avec la biogenèse mitochondriale.**

La seule évidence à ce jour d'une induction de la biogenèse mitochondriale par les vitamines B est issue d'un travail mené sur un modèle cellulaire de neuroblastomes. En effet, un traitement chronique de ces cellules par un mélange de vitamines B (B1, B2, B3, B5, B6, B7 et B11) conduit à une induction de l'expression de PGC-1 $\alpha$  corrélée à une augmentation de l'activité du complexe I ainsi que de la respiration mitochondriale (Jia et al., 2010).

**Bien que ces résultats mettent en avant une activation de la fonction mitochondriale par les vitamines B, ils ne permettent pas de discriminer la part de chacune des vitamines, et de plus, ce traitement n'a pas inclu la vitamine B12.**

Cependant, une étude récente a montré qu'une déficience en cobalamine, folate et choline induisait une cardiomyopathie chez des rats femelles gestantes. De manière intéressante, cette déficience est corrélée à une hyperhomocystéinémie d'une part et une diminution de l'activité des complexes I et II de la chaîne respiratoire d'autre part. Ces résultats sont associés à une augmentation de l'acétylation de PGC-1 $\alpha$  par une diminution de l'expression de SIRT1, ainsi qu'à une diminution de la méthylation de PGC-1 $\alpha$  par diminution de l'expression de PRMT-1 (proteine arginine méthyltransférase 1). En effet, la

méthylation de PGC-1 $\alpha$  par PRMT-1 favorise son activation (Teyssier et al., 2005). En conséquence, il apparaît une diminution de l'activité de PGC-1 $\alpha$  caractérisée par une acétylation plus importante et une méthylation moindre (Garcia et al., 2011).

**Par conséquent, ces travaux soulignent un effet délétère de l'hyperhomocystéinémie sur la fonction mitochondriale via une inhibition de l'activité de PGC-1 $\alpha$ . Ces résultats sont en partie explicables par une déficience en donneurs de méthyl, comme la vitamine B12, déficience associée au développement d'une cardiomyopathie. Cependant, il n'a pas été démontré une diminution de l'expression de PGC-1 $\alpha$ , ni de l'ensemble des marqueurs de la biogenèse mitochondriale. Toutefois, ces travaux sont associés à un modèle particulier, puisque réalisés chez des rats femelles gestantes et donc sous imprégnation hormonale forte. L'utilisation de rats femelles gestantes constitue donc un modèle animal bien spécifique qui permet difficilement d'extrapoler les résultats trouvés.**

#### *e. Conclusion*

Ainsi, au travers de notre étude, nous pouvons conclure quant à un effet significatif propre de la vitamine B6 et de la vitamine B12 de manière indépendante sur l'induction l'expression de PGC-1 $\alpha$  mais aussi de PGC-1 $\beta$  dans la cellule cardiaque, et cet effet est associé à une biogenèse mitochondriale augmentée. La dysfonction mitochondriale potentielle suite à une déficience en vitamines B pourrait donc être expliquée en partie par une défaillance de la biogenèse mitochondriale.

Etant donné le rôle délétère supposé d'une déficience en vitamine B sur la fonction mitochondriale et plus généralement la fonction cardiaque, une étude sur un modèle animal mâle déficient en vitamines B6 et/ou B12, tant du point de vue des paramètres hémodynamiques et échocardiographiques que sur le contrôle de la biogenèse mitochondriale, apparaît comme un champ de recherche réellement intéressant. Le modèle de rat mâle apparaît comme plus pertinent de manière à ne pas tenir compte de l'effet bénéfique potentiel des hormones sexuelles féminines. Pour valider cette étude, une supplémentation en vitamines B à posteriori serait indispensable pour vérifier leur capacité à restaurer une fonction



mitochondriale et cardiaque normale. Enfin une démarche similaire pourrait être appliquée dans des modèles expérimentaux d'IC.

### ***3) Les acides gras***

Etant donné l'apport de notre étude sur le contrôle de la biogenèse mitochondriale par les acides gras saturés à longue chaîne avec l'exemple du palmitate, et insaturés avec l'exemple de l'acide linoléique (oméga6), l'accent sera porté essentiellement autour de ces types d'acides gras. D'autre part, l'induction de la biogenèse mitochondriale dans notre modèle est associée à une augmentation de l'expression de PPAR $\alpha$ , ainsi que de certaines de ses cibles incluant MCAD et PDK4.

Un bilan sera donc apporté dans cette discussion sur les effets des acides gras sur la fonction mitochondriale via notamment le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ . Dans un deuxième temps, nous nous interrogerons sur les bénéfices pour la fonction cardiaque d'un traitement par des AG.

#### ***a. Acides gras et PPAR $\alpha$***

Il est désormais bien admis que les acides gras (AG) sont capables de fixer les PPARs en général mais avec une meilleure affinité pour l'isoforme  $\alpha$ . C'est le cas notamment pour le palmitate et l'acide linoléique ayant respectivement une affinité 20 et 6 fois supérieure que pour PPAR $\gamma$ , 5 et 10 fois supérieure que pour PPAR $\delta$  (Xu et al., 1999).

Par ailleurs, de nombreuses évidences montrent que l'activation de PPAR $\alpha$  conduit à la mise en place d'un programme génique spécifique de l'utilisation des acides gras, incluant en particulier leur transport et leur oxydation. Ces évidences sont issues d'expériences réalisées soit *in vitro* par stimulation de cellules cardiaques par des acides gras, soit *in vivo* après extinction ou surexpression de PPAR $\alpha$ .

#### ***i. Apports des expériences *in vitro****

Le traitement de cellules cardiaques néonatales par un mélange de palmitate et d'oléate conduit à un changement de phénotype métabolique caractérisé par une augmentation

de l'expression d'un ensemble de marqueurs impliqués dans le transport (FAT, FABP) et dans l'oxydation des AG (ACS, LCAD). Par ailleurs, l'utilisation d'un agoniste de PPAR $\alpha$ , le Wy-14643 induit le même type de réponse, ce qui n'est pas le cas après traitement par un agoniste de PPAR $\gamma$  : le ciglitazone. Ces résultats suggèrent l'hypothèse d'une induction de l'expression des gènes du métabolisme des AG par les AG saturés à longue chaîne, via un mécanisme PPAR $\alpha$  dépendant (van der Lee et al., 2000). En outre, ces données sont confortés par une étude antérieure dans le même type cellulaire qui montre une induction de CPT-1 PPAR $\alpha$ -dépendante en réponse à l'oléate (Brandt et al., 1998). De plus, une confirmation ultérieure dans les mêmes conditions de culture montre également une augmentation de l'oxydation du palmitate via PPAR $\alpha$ , mais aussi par PPAR $\delta$  (Gilde et al., 2003). En effet, il a été montré dans le muscle squelettique une stimulation de l'oxydation des acides gras après stimulation par un agoniste de PPAR  $\delta$  : le GW501516 (Tanaka et al., 2003).

Par ailleurs, l'induction d'un phénomène hypertrophique dans les cellules cardiaques néonatales par stimulation à la phényléphrine est associée à une diminution de l'expression de CPT1 et de l'oxydation des acides gras. Ces résultats sont confirmés sur des cœurs hypertrophiés de souris présentant une diminution de l'expression de PPAR $\alpha$  (Barger et al., 2000).

**Ces données montrent de manière intéressante l'implication de PPAR $\alpha$  dans la réponse cellulaire aux acides gras pour la mise en place d'un programme génique adapté tant pour leur transport que leur oxydation.**

## *ii. Inactivation de l'expression de PPAR $\alpha$*

Expérimentalement, les capacités cellulaires à oxyder les AG peuvent être induites en réponse à une privation calorique afin d'optimiser la production énergétique. Chez la souris inactivée pour le gène PPAR $\alpha$  et soumise à une diète de 24 ou 48 heures, l'adaptation à la restriction calorique est défailante dans le foie mais également dans le cœur (Leone et al., 1999), suggérant ainsi un rôle clé de PPAR $\alpha$  dans le contrôle de l'utilisation des AG. D'autre part, la diminution de l'oxydation des AG est associée à une augmentation de l'oxydation du glucose dans des cœurs de souris KO pour le gène PPAR $\alpha$  (Campbell et al., 2002). Une étude ultérieure corrobore ces résultats et montre par ailleurs une diminution de la fonction contractile cardiaque en absence de PPAR $\alpha$ . De plus, bien que l'oxydation du glucose

augmente, cela ne suffit pas à optimiser la synthèse d'ATP qui apparaît comme diminuée (Luptak et al., 2005).

**Ces données montrent à nouveau la place centrale de PPAR $\alpha$  dans le contrôle de l'utilisation des AG mais supposent également un lien avec la physiopathologie cardiaque. En effet, dans l'IC, l'oxydation des acides gras est fortement altérée en faveur d'une oxydation du glucose, mais qui ne suffit pas à améliorer la production énergétique. Les similitudes observées dans le cœur en absence de PPAR $\alpha$  peuvent suggérer un rôle clé de ce dernier dans la défaillance du métabolisme des AG du cœur insuffisant.**

### *iii. Surexpression de PPAR $\alpha$*

La surexpression cardiaque spécifique de PPAR $\alpha$  conduit à l'augmentation de l'expression de ses cibles, augmentation potentialisée par utilisation de son agoniste : le WY-14643. Cependant, il a aussi été rapporté un effet délétère sur la fonction cardiaque lors d'une surexpression trop massive (non observée pour une surexpression modérée), ainsi que certaines caractéristiques du cœur de patients diabétiques (Finck et al., 2003). En effet, cette altération de la fonction cardiaque est associée à une accumulation de triglycérides (TG) qui en excès induit une lipotoxicité (Finck et al., 2003). Ces effets délétères sont en outre associés à une diminution de l'oxydation du glucose ainsi qu'à l'apparition d'une insulino-résistance (Park et al., 2005).

**Ces résultats confirment le rôle majeur de PPAR $\alpha$  sur le métabolisme des acides gras. Néanmoins, il apparaît également qu'une induction trop massive de PPAR $\alpha$  est délétère pour la fonction cardiaque. Ainsi, bien que l'on puisse suggérer un intérêt dans l'activation de PPAR $\alpha$  pour améliorer le métabolisme des acides gras et la fonction cardiaque, les connaissances actuelles issues des animaux transgéniques ne permettent pas d'en apporter la certitude.**

Toutefois, dans l'étude initiée par Stéphanie Rimbaud (Rimbaud et al., 2011), le modèle de dysfonction ventriculaire mis en place est associé à une diminution de l'oxydation des AG, ainsi que de la respiration mitochondriale. Par ailleurs, cette altération est corrélée à une diminution de l'expression de PPAR $\alpha$  et de ses cibles. De manière spectaculaire, le resvératrol est capable de parfaitement prévenir de cette dysfonction ventriculaire et ceci est

lié au moins en partie à une amélioration de l'oxydation des AG associée à une augmentation de l'expression de PPAR $\alpha$ .

**Ainsi, grâce à cette étude, nous pouvons tout de même proposer qu'une réactivation de l'axe PPAR $\alpha$ , conduisant à une amélioration de l'oxydation des AG, est bénéfique pour la fonction cardiaque.**

### *b. Induction de la biogenèse mitochondriale PPAR $\alpha$ -dépendante*

Il a été supposé un rôle clé de PGC-1 $\alpha$  dans le contrôle transcriptionnel des gènes du métabolisme via PPAR $\alpha$ . En effet, dans des cellules adipocytaires de type 3T3-L1, l'activité de PPAR $\alpha$  nécessite d'une part une interaction avec RXR, mais d'autre part voit son activité potentialisée par PGC-1 $\alpha$ . Cette potentialisation se traduit par une augmentation de l'expression des transporteurs des acides gras, d'enzymes impliquées dans leur oxydation et d'une induction de l'oxydation du palmitate. Enfin, la liaison PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  est modestement détectable en absence de ligands de PPAR $\alpha$ , mais celle-ci est largement augmentée en présence d'un agoniste de PPAR $\alpha$  : le ligand ETYA (Vega et al., 2000).

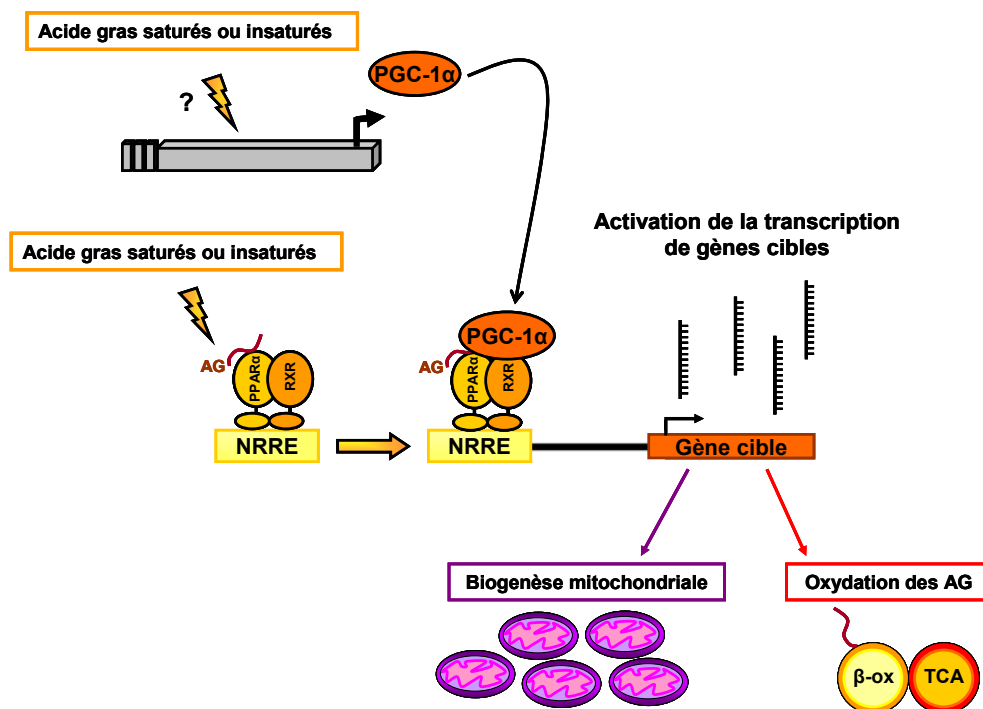
**Ces travaux mettent donc en avant le rôle de co-activation de PGC-1 $\alpha$  sur le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ .**

Par ailleurs, une étude de la respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées de ventricule gauche de souris PGC-1 $\alpha$  KO permet de mettre en évidence une diminution des capacités mitochondriales à utiliser les acides gras en lien avec une diminution de la synthèse d'ATP. De plus, les cœurs isolés et perfusés en mode travaillant des souris KO pour PGC-1 $\alpha$  montrent une diminution du travail cardiaque ainsi qu'une diminution de l'oxydation du palmitate. Enfin, ces résultats sont en accord avec une diminution de l'expression des marqueurs de l'oxydation des AG incluant CPT-1, LCAD et VLCAD. Ces résultats suggèrent donc un rôle essentiel de PGC-1 $\alpha$  pour une oxydation efficace et optimale des AG (Lehman et al., 2008).

Dans le muscle squelettique, il a été rapporté qu'une augmentation de la concentration plasmatique en AG était également capable d'augmenter la biogenèse mitochondriale associée à une augmentation de l'expression de PPAR $\alpha$  (Garcia-Roves et al., 2007). Par ailleurs, le traitement de cellules musculaires squelettiques par différents types d'AG et notamment des

AG insaturés dont l'acide linoléique, se traduit par une augmentation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  et de PGC-1 $\beta$  en association avec une augmentation de l'activité mitochondriale (Staiger et al., 2005). Cette observation est également vraie dans le tissu adipeux de souris, soumises à un régime riche en AG polyinsaturés, présentant une augmentation de l'expression des complexes de la chaîne respiratoire, de PGC-1 $\alpha$  et de l'oxydation des AG (Flachs et al., 2005). Une étude similaire menée sur des cellules rénales bovines traitées par des AG saturés suggère de la même manière une induction de la biogenèse mitochondriale et une augmentation du transport et de l'oxydation des AG dépendant de PPAR $\alpha$  (Bionaz et al., 2012). Enfin, le traitement de cellules pancréatiques de type RINm5F par de l'acide linoléique prévient l'apparition d'un stress oxydant et de l'apoptose massive causés par la streptozotocine. Cette prévention est par ailleurs accompagnée d'une induction de la biogenèse mitochondriale (Jeng et al., 2009).

Ces diverses observations sont en faveur d'un rôle clé de PGC-1 $\alpha$  dans le contrôle de l'utilisation des AG via PPAR $\alpha$  d'une part, et d'autre part soulignent l'induction de la biogenèse mitochondriale par les AG (Figure 83).



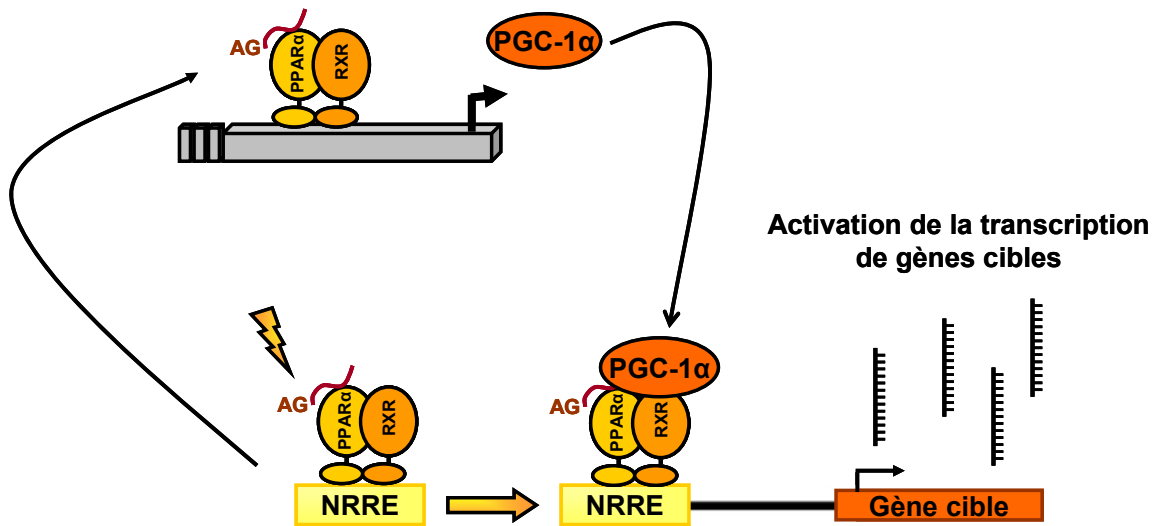
**Figure 83. Rôle de l'axe PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  dans le contrôle de l'utilisation des acides gras et de la biogenèse mitochondriale**

Un apport en AG conduit d'une part à l'activation de PPAR $\alpha$ , l'induction de l'expression de PGC-1 $\alpha$  et son recrutement sur PPAR $\alpha$  à l'origine de la transcription de gènes cibles impliqués dans l'utilisation des AG et la biogenèse mitochondriale.

Bien que les travaux présentés précédemment soient peu équivoques quant au rôle des acides gras dans l'activation de PPAR $\alpha$ , de l'induction de PGC-1 $\alpha$  et de son rôle clé dans les effets dépendant de PPAR $\alpha$ , les mécanismes à l'origine de l'induction de PGC-1 $\alpha$  via les AG sont beaucoup plus obscurs. Cependant, une étude très récente suggère un rôle de PPAR $\alpha$  lui-même dans le contrôle de l'expression de PGC-1 $\alpha$  en réponse aux AG.

En effet, une lipase nommée ATGL (adipose triglyceride lipase) a été supposée comme intervenant dans la lipolyse des triglycérides cellulaires avec une génération d'intermédiaires actifs impliqués dans la signalisation PPAR $\alpha$  dépendante. Ceci limiterait par ailleurs l'accumulation de triglycérides et donc l'apparition d'une lipotoxicité. De façon à confirmer cette hypothèse, une souris déficiente en ATGL a été générée. Un des résultats clés issu de cette étude, montre que cette déficience est associée à une défaillance de l'expression des gènes du métabolisme des AG mais également de l'expression de PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  et PGC-1 $\beta$  dans le cœur. Ces travaux montrent par ailleurs que ces souris présentent une dysfonction mitochondriale sévère ainsi qu'une diminution de la fonction cardiaque. Il a été également suggéré un rôle clé de PPAR $\alpha$  et de manière surprenante, le traitement des souris KO avec un agoniste de PPAR $\alpha$  : le Wy14643, prévient parfaitement la dysfonction mitochondriale et ventriculaire. Par ailleurs, ce traitement augmente la survie des animaux de manière spectaculaire. En outre, il a également été montré une normalisation de l'expression des gènes cibles de PPAR $\alpha$  mais aussi de PGC-1 $\alpha$  et de PGC-1 $\beta$  (Haemmerle et al., 2011).

**Ces travaux élégants mettent en évidence pour la première fois une implication potentielle de PPAR $\alpha$  dans la régulation de PGC-1 $\alpha$  (Figure 84). De plus, PPAR $\alpha$  apparait comme une cible de choix permettant d'une part de cibler le métabolisme des AG mais d'autre part d'induire l'expression de PGC-1 $\alpha$  et donc de participer au contrôle de la fonction mitochondriale. Autrement dit, l'axe PPAR $\alpha$ /PGC-1 $\alpha$  constitue un axe déterminant dans la recherche de nouvelles thérapies puisque cette stratégie suppose une amélioration de l'utilisation des substrats mais également de la production énergétique. En effet, il est nécessaire de conserver une cohérence entre augmentation de l'utilisation des substrats et capacité mitochondriale à assumer cette augmentation. La stratégie annoncée ici permettrait de maintenir cet équilibre indispensable dans la cellule cardiaque.**



**Figure 84. Induction de PGC-1 $\alpha$  via le dimère RXR/PPAR $\alpha$**

L'activation de PPAR $\alpha$  par fixation d'un AG exerce une action positive sur l'expression de PGC-1 $\alpha$ .

### *c. Bénéfice des acides gras sur la fonction cardiaque*

Une somme d'arguments issus d'études dans divers modèles expérimentaux d'IC conforte l'hypothèse d'un bénéfice des AG sur la fonction cardiaque. Tout d'abord, une étude sur des rats Dahl sensibles au sel, développant une hypertension par régime hypersodé, montre qu'une diète enrichie en AG saturés et insaturés (25 % palmitate, 33 % stéarate, 33 % oléate, 3 % linoléate, 1 % acide arachidique et 0.1 % linoléate) prévient l'apparition d'une hypertrophie cardiaque. De plus, bien qu'il n'y ait pas d'évidence d'une dysfonction ventriculaire dans cette étude lors d'un traitement uniquement au sel, la supplémentation d'AG augmente la force de contraction cardiaque (Okere et al., 2005). Une étude similaire réalisée sur des rats développant une dysfonction ventriculaire post-infarctus, montre qu'un traitement riche en AG saturés (25 % palmitate, 33 % stéarate, 33 % oléate) conduit à une amélioration de la phosphorylation oxydative mitochondriale associée à une augmentation de l'activité de la majorité des complexes, sans aggravation de la fonction cardiaque (Rennison et al., 2007).

**Bien que ces études ne montrent pas de réels bénéfices sur la fonction cardiaque, elles permettent tout de même de suggérer, que lors d'un régime riche en AG, il n'y a pas d'aggravation de la fonction cardiaque lorsque celle-ci est installée. Néanmoins, il**

**semblerait que ce régime améliore la fonction mitochondriale et prévient l'apparition d'une hypertrophie cardiaque dans certains modèles d'étude.**

De manière plus spectaculaire, une étude sur des rats Dahl soumis à un régime hypersodé pendant 12 semaines et présentant une diminution de la fraction d'éjection, montre qu'un régime riche en AG mais pauvre en hydrates de carbone prévient parfaitement cette altération de la fonction cardiaque. En outre, l'augmentation de marqueurs de l'hypertrophie tel que l'ANF est limitée par un régime riche en AG et pauvre en hydrates de carbone (Okere et al., 2006). Par ailleurs, chez des rats SHHR (spontaneously hypertensive hyperlipidemic rats) développant une IC, un traitement à l'huile de carthame riche en acide linoléique augmente la survie des animaux (Chicco et al., 2008). De la même manière, chez des rats développant une dysfonction ventriculaire, caractérisée par une diminution de la fraction d'éjection et de la fraction de raccourcissement, suite à un infarctus du myocarde, un régime riche en AG saturés (25 % palmitate, 33 % stérate, 33 % oléate) améliore la fonction ventriculaire (Rennison et al., 2009).

**Ces données issues de la littérature suggèrent donc un réel effet bénéfique des AG saturés ou insaturés sur la fonction cardiaque. De plus, ces résultats mettent en avant un bénéfice d'autant plus net lorsque le régime riche en AG est associé à un régime pauvre en hydrates de carbone.**

#### *d. Conclusion*

L'ensemble de ces données expérimentales conforte donc l'idée d'un effet protecteur des AG sur la fonction cardiaque. Il semble par ailleurs, que ce bénéfice soit effectif quel que soit le type d'AG utilisé, à savoir saturé ou insaturé. La confrontation des différents résultats permet également de suggérer que cet effet implique fortement le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  qui joue un rôle clé dans le contrôle du métabolisme des AG. Néanmoins, les études sur les modèles expérimentaux n'apportent pas de renseignements précis sur le niveau de régulation de la biogenèse mitochondriale. Toutefois, en sachant le rôle clé de PGC-1 $\alpha$  sur le contrôle de PPAR $\alpha$  et inversement, cette axe apparait comme un champ de recherche à privilégier. D'autre part, notre étude apporte la preuve d'un contrôle de la biogenèse mitochondriale impliquant PGC-



**1 $\alpha$  mais aussi PGC-1 $\beta$  dans le cardiomyocyte de rat adulte par les AG. Cette induction de la biogenèse mitochondriale pourrait donc constituer une piste sérieuse expliquant les effets bénéfiques des AG dans la pathologie cardiaque.**

**Nous avançons par ailleurs l'hypothèse d'une régulation de PGC-1 $\alpha$  via PPAR $\alpha$  dans le cœur, les deux étant induits sous stimulation à l'acide linoléique ou avec le palmitate. Bien que l'hypothèse soit séduisante et corroborée par l'étude de Hammerle (Haemmerle et al., 2011), une démonstration claire reste à apporter. Ainsi à court terme, la répétition de l'expérience dans un modèle cellulaire cardiaque inactivé pour le gène de PPAR $\alpha$  permettrait de valider l'hypothèse. De plus, à l'heure actuelle, l'identification du domaine de liaison sur le promoteur de PGC-1 $\alpha$  reste inconnue. Nous avons à notre disposition des promoteurs de tailles différentes de PGC-1 $\alpha$  couplés à la GLuc qui permettraient via des expériences de cotransfection avec un plasmide codant pour PPAR $\alpha$ , de mettre en évidence la région d'intérêt impliquée dans sa fixation. Une identification plus fine pourrait d'ailleurs être apportée par « Chip on chip » (Chromatin immunoprecipitation on chip). Après validation, une étude *in vivo* sur un modèle expérimental d'IC, traité ou non par un activateur spécifique de PPAR $\alpha$  ou avec l'acide linoléique, permettrait de vérifier la pertinence d'une activation de PPAR $\alpha$  pour améliorer la biogenèse mitochondriale, la fonction mitochondriale dans son ensemble et son impact sur l'amélioration de la fonction cardiaque et la survie des animaux.**

## **Chapitre II. Biogenèse mitochondriale dans l'hypertension artérielle et rôle du resvératrol**

### **I) Le resvératrol, molécule aux multiples facettes**

Le resvératrol (3,4',5-trihydroxy-stilbène) est un polyphénol de la classe des stilbènes présent dans une grande variété de fruits (le raisin, la mûre, la grenade, la canneberge ou encore la cacahuète). Cette substance est une phyto-alexine induite par divers stress environnementaux (UV, agressions fongiques...) et destinée à protéger le fruit d'une agression externe.

Ce composé est apparu ces dernières années comme une molécule présentant chez l'animal des effets pléiotropes. Ces effets incluent notamment: un allongement de la survie des animaux (Baur et al., 2006), une diminution du stress oxydant (Kao et al., 2010), un pouvoir anti-prolifératif (Olson et al., 2005), un effet anti-inflammatoire (Rahal et al., 2012), un effet anti-angiogénique (Igura et al., 2001) et un effet pro-apoptotique (Bhardwaj et al., 2007).

Par ailleurs, il a été également montré comme étant activateur d'un certain nombre de cibles métaboliques et notamment de 2 senseurs métaboliques de la cellule, à savoir l'AMPK (Um et al., 2010) et la SIRT1 (Price et al., 2012). De fait, celui-ci a fait l'objet d'études dans des modèles expérimentaux pathologiques mettant en avant ses effets bénéfiques sur la fonction cardiovasculaire (Dolinsky et Dyck, 2011) via des effets protecteurs sur la fonction vasculaire, sur la progression de l'IC et sur l'ischémie-reperfusion (pour revue : (Opie et Lecour, 2007)).

Ainsi cette molécule nous est apparue comme une molécule d'intérêt majeur pour renforcer le concept d'une thérapie métabolique de l'IC.

### **II) Effets bénéfiques du resvératrol sur la fonction cardiovasculaire**

A travers l'étude « Resveratrol improves survival, Hemodynamics and Energetic in a Rat Model of Hypertension leading to Heart failure » menée par Stéphanie Rimbaud (Rimbaud et al., 2011), le resvératrol est apparu comme une molécule phare dans le traitement de l'IC expérimentale induite par hypertension. En effet, nous avons montré une amélioration spectaculaire de la survie des animaux après traitement au resvératrol à 18 mg/kg/j pendant 8

semaines en comparaison aux animaux soumis à un régime hypersodé. Bien que l'on ne puisse pas au travers de cette étude démontrer les mécanismes à l'origine de cette amélioration de la survie, nous pouvons suggérer que les effets protecteurs observés sur la fonction cardiaque, mitochondriale et endothéliale contribuent grandement au bénéfice sur la survie.

En effet, le resvératrol préserve parfaitement de la dysfonction ventriculaire induite par l'hypertension et ceci est associé à une diminution du remodelage cardiaque, caractérisé notamment par une diminution de l'expression de l'ANF et une récupération de l'activité de la CK mitochondriale. Outre l'amélioration de la fonction ventriculaire, le resvératrol préserve grandement de la dysfonction mitochondriale et notamment en améliorant l'utilisation et l'oxydation des AG ainsi que les transferts énergétiques. Enfin, nous montrons également que le resvératrol prévient de la dysfonction endothéliale via une induction de la NOS et ainsi exerce un effet protecteur sur la fonction vasculaire.

**Cette étude met l'accent sur les propriétés métaboliques et bénéfiques du resvératrol sur la fonction mitochondriale cardiaque. L'amélioration de la fonction contractile cardiaque corrélée à une amélioration des composantes métaboliques renforce donc la pertinence de la mise en place d'une thérapie métabolique.**

**Au vu des effets bénéfiques du resvératrol sur la fonction vasculaire, nous nous sommes interrogés sur l'implication éventuelle de la biogenèse mitochondriale dans les effets protecteurs vasculaires du resvératrol. D'autre part, à l'heure actuelle, il n'y a aucune donnée de la littérature suggérant une défaillance du contrôle de la biogenèse mitochondriale vasculaire dans l'hypertension artérielle. Aussi, l'exploration de la biogenèse mitochondriale vasculaire dans l'hypertension et son contrôle par le resvératrol apparaît comme un champ de recherche totalement nouveau.**

### **III) Contrôle de la biogenèse mitochondriale dans l'hypertension artérielle et influence du resvératrol**

#### ***1) Comportement de la biogenèse mitochondriale des cellules musculaires lisses pathologiques***

Bien qu'à l'heure actuelle, cet aspect reste inexploré dans l'hypertension artérielle, deux études impliquant le muscle lisse respectivement dans l'asthme et dans l'hypertension pulmonaire mettent en avant un rôle clé de la biogenèse mitochondriale.

##### ***a. L'asthme***

Dans l'asthme, il a été montré que le remodelage du muscle lisse bronchique caractérisé notamment par une hyperprolifération, était associé à une augmentation de la masse mitochondriale. En outre, cette augmentation de la masse mitochondriale est corrélée à une augmentation de la biogenèse mitochondriale incluant PGC-1 $\alpha$ . D'autre part, ces observations sont limitées au muscle lisse bronchique puisque aucune différence n'est apparue dans les cellules endothéliales ou épithéliales (Triani et al., 2007).

**Au travers de cette étude, la biogenèse mitochondriale apparaît comme jouant un rôle clé dans la prolifération cellulaire et le remodelage pathologique du muscle lisse bronchique.**

##### ***b. Hypertension pulmonaire***

Une étude très récente met aussi en avant un rôle potentiel de la biogenèse mitochondriale dans l'hyperprolifération des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire de patients atteints d'hypertension pulmonaire. En effet, en situation hypoxique, il a été montré une prolifération excessive de ces cellules impliquée dans le remodelage vasculaire (Ma et al., 2011). Il a également été montré par la suite une induction de PGC-1 $\alpha$  et de la biogenèse mitochondriale (Rao et al., 2012).

**Ces travaux montrent qu'en plus de son rôle dans la prolifération des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire, PGC-1 $\alpha$  y est induit en réponse à l'hypoxie.**

### *c. Hypertension artérielle*

Nous montrons pour la première fois dans un modèle expérimental d'hypertension artérielle une augmentation massive et significative de la biogenèse mitochondriale. En effet, dans les aortes des animaux HS-NT présentant une hypertension (+ 30 %), il apparaît une induction d'un facteur 3 de l'expression de PGC-1 $\alpha$  associée à une augmentation de l'expression de ses cibles incluant NRF2, ERR $\alpha$ , Tfam et COXIV. Par ailleurs, l'augmentation de la biogenèse mitochondriale dans ce modèle expérimental d'hypertension semble dépendre essentiellement de PGC-1 $\alpha$  puisque l'expression de PGC-1 $\beta$  ne varie pas.

**Ces premiers résultats démontrent donc une activation de la biogenèse mitochondriale dans la cellule musculaire lisse vasculaire d'animaux hypertendus. De plus, cette activation est liée exclusivement à l'isoforme  $\alpha$  de PGC1.**

### *2) Paradoxe du resvératrol sur le contrôle de la biogenèse mitochondriale vasculaire*

Comme présenté précédemment, le resvératrol possède des effets métaboliques notamment via l'activation de SIRT1. En outre, SIRT1 est capable d'activer PGC-1 $\alpha$  en le désacétylant, et donc de favoriser l'induction de la biogenèse mitochondriale (Lagouge et al., 2006). Ainsi, nous pouvions nous attendre à une suractivation de la biogenèse mitochondriale dans les aortes des rats HS-RSV en comparaison des rats HS-NT.

Or, de manière surprenante, nous n'observons pas de suractivation de la biogenèse mitochondriale. Bien au contraire, ces résultats tendent à montrer globalement une réversion partielle de la biogenèse mitochondriale par le resvératrol. Bien que les résultats ne soient pas significatifs pour tous les gènes, nous observons une diminution nette et significative de l'expression de NRF2 et ERR $\alpha$  corroborant cette hypothèse. D'autre part, concernant PGC-1 $\alpha$  et Tfam, il apparaît une tendance à la diminution par rapport au groupe HS-NT, valeurs par ailleurs significativement non différentes des contrôles (LS).

**Ainsi, contre toute attente, nous montrons également pour la première fois un effet paradoxal du resvératrol à savoir une diminution de l'induction de la biogenèse mitochondriale dans l'hypertension artérielle.**

Ces résultats de prime abord surprenants, nous ont conduit à formuler l'hypothèse d'une implication du stress oxydant dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale. En effet, de nombreuses évidences montrent que le stress oxydant participe au développement de l'hypertension artérielle dans différents modèles expérimentaux d'hypertension incluant les rats SHR (Tanito et al., 2004) et les rats Dahl sensibles au sel (Meng et al., 2003; Kushiro et al., 2005). De plus, le resvératrol agit comme un piègeur de radicaux libres et tend donc à diminuer la production d'EROs (Kao et al., 2010).

**Etant donné l'émergence d'études montrant un lien étroit entre biogenèse mitochondriale et stress oxydant, et le pouvoir anti-oxydant du resvératrol, nous suggérons que les effets observés dépendent au moins en partie de la modulation du stress oxydant.**

### ***3) Stress oxydant et biogenèse mitochondriale***

En plus du rôle de PGC-1 $\alpha$  dans le contrôle du métabolisme énergétique mitochondrial, une étude sur cellule fibroblastiques a permis de montrer que son expression était fortement induite en présence de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et ceci associé à une augmentation de l'expression d'enzymes anti-oxydantes comme SOD2 de localisation mitochondriale. De plus, l'inactivation de PGC-1 $\alpha$  bloque l'induction de l'expression de SOD2 mais aussi d'autres enzymes du stress oxydant telles que la catalase ou GPx1. De plus, une surexpression de PGC-1 $\alpha$  dans des cellules striatales permet une forte induction de l'expression de SOD2 (St-Pierre et al., 2006). Ces résultats sont par ailleurs corrélés à une étude dans le cœur qui montre une diminution de l'expression des enzymes anti-oxydantes, comme SOD2, chez des souris inactivées pour le gène PGC-1 $\alpha$ . Enfin, l'induction d'un stress oxydant par incubation de cellules endothéliales dans un milieu riche en glucose est largement diminuée par la surexpression de PGC-1  $\alpha$ . A l'inverse, son inactivation conduit à une forte diminution de l'expression de SOD2 notamment (Valle et al., 2005).

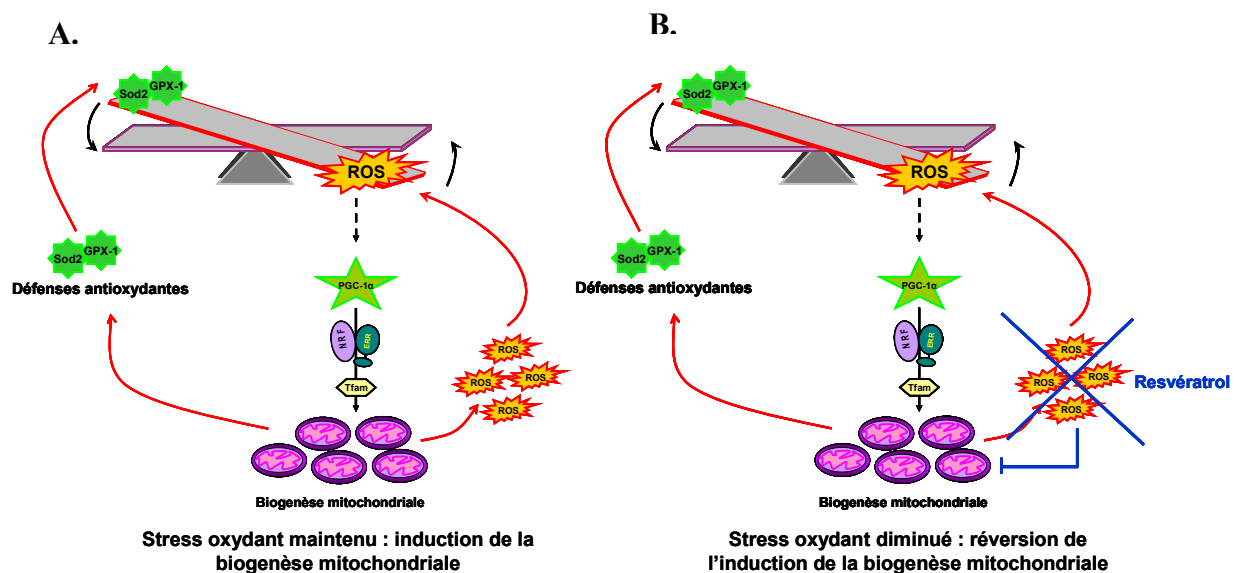
**Ces résultats supportent donc un rôle de PGC-1 $\alpha$  dans la mise en place des défenses anti-oxydantes de la cellule en réponse à une forte production de ROS. Par ailleurs, il est à supposer que cette situation est adaptative de façon à limiter le stress oxydant et ainsi de minimiser les dommages cellulaires induits par les EROs. Ainsi, en situation de stress oxydant, l'induction de la biogenèse mitochondriale permettrait de**

**contrebalancer la production d'EROs en favorisant l'expression d'enzymes anti-oxydantes et notamment SOD2.**

Dans notre modèle, nous montrons également que l'induction de la biogenèse mitochondriale est associée à une induction massive de l'expression de SOD2 mais également à une augmentation du niveau d'oxydation des protéines totales, suggérant ainsi une situation de stress oxydant. Par ailleurs, la diminution de SOD2 et de ce niveau d'oxydation en présence de resvératrol, suit également la diminution de la biogenèse mitochondriale dans les mêmes conditions. Ces données, supposent que lorsque la production d'EROs est importante, telle que décrite dans ce modèle, la nécessité de la cellule de limiter cette production entraîne une réponse adaptative impliquant PGC-1 $\alpha$ . De plus, la diminution de SOD2 en présence de resvératrol, suggère un niveau de stress oxydant acceptable ou physiologique, ne nécessitant plus la mise en place de défenses anti-oxydantes ce qui pourrait expliquer la diminution de la biogenèse mitochondriale dans les aortes d'animaux hypertendus en présence de resvératrol, par son effet anti-oxydant.

Par ailleurs, la reproduction des résultats sur cellules musculaires lisses aortiques confirment cette hypothèse. En effet sous stimulation avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, connu pour induire un stress oxydant et validé par la mesure de l'expression de SOD2 et de GPx1, nous observons à nouveau une induction de la biogenèse mitochondriale, qui est prévenue par le resvératrol.

**Ces données montrent donc que l'hypertension artérielle est associée à une induction de la biogenèse mitochondriale et des défenses anti-oxydantes en situation de stress oxydant (Figure 85). En présence de resvératrol, l'induction de la biogenèse mitochondriale est prévenue grâce à ses propriétés anti-oxydantes (Figure 84).**



**Figure 85. Contrôle de la biogenèse mitochondriale par le stress oxydant dans l'hypertension artérielle.**

A. En situation de stress oxydant prolongé comme dans l'hypertension, l'induction de la biogenèse mitochondriale est nécessaire pour limiter au mieux cette production par la mise en place de défenses anti-oxydantes.

B. La présence d'un piègeur de radicaux libres, comme le resvératrol limite par lui-même le niveau d'EROs, abolissant ainsi la mise en place de systèmes de défenses et donc l'induction de la biogenèse mitochondriale.

#### **4) La CaMKII, senseur moléculaire du stress oxydant**

Très récemment, la CaMKII a été proposée comme un senseur moléculaire du stress oxydant. En effet, l'activité enzymatique de la CaMKII est fortement potentialisée par un traitement avec de l' $H_2O_2$  dans le cœur (Erickson et al., 2008). Par ailleurs, cette induction EROs-dépendante favoriserait la forme oxydée de la CaMKII (Christensen et al., 2009). De plus, il a également été montré une augmentation de sa phosphorylation et donc de son activité par les EROs dans le cardiomyocyte adulte de rat (Song et al., 2011) ou de lapin (Wagner et al., 2011).

D'autre part, celle-ci est impliquée dans certaines réponses cellulaires de la cellule musculaire lisse en réponse aux EROs et notamment, dans la prolifération. En effet, la CaMKII apparait comme une kinase clé de la signalisation de la cellule musculaire lisse et en



particulier la voie des MAPK. La voie des MAPK est aussi activée en présence de radicaux libres. Cependant, l'inhibition de la phosphorylation de la CaMKII par le KN93 inhibe les effets du stress oxydant sur la signalisation des MAPKs (Nguyen et al., 2004), ce qui est par ailleurs aussi le cas lors de l'utilisation d'un siRNA spécifique de la CaMKII (Bouallegue et al., 2009).

**Ces données de la littérature suggèrent donc un rôle clé de la CaMKII dans la réponse au stress oxydant qui se répercute alors sur la signalisation cellulaire. De plus, cette kinase peut être proposée comme un senseur du stress oxydant puisque son activité est augmentée lors d'un stress oxydant. Nous nous sommes donc interrogés sur le rôle éventuel de la CaMKII dans notre modèle.**

Nous montrons une induction significative de la phosphorylation de la CaMKII de manière massive dans l'aorte des rats Dahl sensibles au sel, et ceci est confirmé dans la cellule musculaire lisse après induction d'un stress oxydant. Par ailleurs, en présence de resvératrol la phosphorylation de la CaMKII est totalement bloquée. Nous confirmons donc dans nos modèles expérimentaux que la modulation du stress oxydant influe sur l'activité de la CaMKII confortant ainsi son rôle central dans la médiation des effets liés au stress oxydant.

D'autre part, dans les cellules musculaires lisses vasculaires en culture, bien qu'il n'y ait induction que de la phosphorylation de la CaMKII et pas de son expression protéique par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le resvératrol conduit à la fois à l'inhibition de sa phosphorylation mais également de son expression. Ces résultats mettent en avant un rôle du resvératrol sur l'inhibition de l'activité de la CaMKII par un effet anti-oxydant, mais aussi par inhibition de l'expression de la CaMKII, le mécanisme d'action restant à élucider.

**Au travers de cette étude, nous pouvons avancer un rôle clé de la régulation de la biogenèse mitochondriale dans l'hypertension et ceci dépendant en partie du stress oxydant dans le muscle lisse vasculaire. D'autre part, l'activité de la CaMKII apparait comme étroitement lié à la production d'EROs et se place comme un senseur moléculaire du stress oxydant dans la cellule musculaire lisse vasculaire. Bien que pour le moment nous ne puissions pas démontrer un effet direct de l'activation de la CaMKII sur l'induction de la biogenèse mitochondriale, nous supposons tout de même son implication. En effet, dans cette étude la présence d'un stress oxydant est associé à la fois à une induction de la biogenèse mitochondriale mais également de la phosphorylation de la CaMKII. A l'inverse, l'inhibition du stress oxydant par le resvératrol diminue**

**l'activation de la CaMKII et l'induction de la biogenèse mitochondriale. Par ailleurs, la CaMKII est connue pour activer PGC-1 $\alpha$  dans le muscle squelettique (Wright et al., 2007a) via l'activation de p38.**

**Pour confirmer l'implication de la CamKII dans la régulation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  et de la biogenèse mitochondriale, des expériences sont en cours sur cellules musculaires lisses aortiques avec utilisation d'un inhibiteur spécifique de la phosphorylation de la CaMKII (le KN93). D'autre part, l'inhibition de son expression par le resvératrol reste une zone sombre mais place la CaMKII comme une nouvelle cible, directe ou indirecte, du resvératrol. La construction d'un plasmide luciférase classique ayant en amont le promoteur de la CaMKII serait une stratégie idéale pour valider ce concept.**

### ***5) Conclusion***

Au cours de cette étude, nous montrons que la biogenèse mitochondriale joue aussi un rôle clé dans la fonction vasculaire. De plus, nous démontrons pour la première fois une induction de la biogenèse mitochondriale du muscle lisse vasculaire dans l'hypertension artérielle et ceci associé à un stress oxydant via un mécanisme CaMKII-dépendant. D'autre part, la CaMKII apparaît comme un senseur clé du stress oxydant contrôlant de nombreuses fonctions cellulaires incluant vraisemblablement aussi la biogenèse mitochondriale. Nous savons par ailleurs que la suractivation de la CaMKII est associée à une dysfonction endothéliale et plus généralement vasculaire (Borbiev et al., 2001) et que son blocage pharmacologique conduit à une amélioration nette de cette fonction (Benter et al., 2005). De ce fait, la dysfonction vasculaire observé chez les animaux Dahl sensibles au sel (Rimbaud et al., 2011) pourrait être en partie expliquée par ce mécanisme.

Par ailleurs, nous mettons aussi en avant un paradoxe concernant les effets du resvératrol. En effet, bien qu'il soit capable d'induire la biogenèse mitochondriale, en condition de stress oxydant, ses effets anti-oxydants priment et conduisent à une diminution de la biogenèse mitochondriale. D'autre part, la dysfonction vasculaire observée chez les animaux Dahl sensibles au sel (Rimbaud et al., 2011) est prévenue par le resvératrol, ces effets anti-oxydants pouvant y contribuer.

Ainsi diminuer le stress oxydant ou inhiber directement la CaMKII pourrait être une stratégie intéressante pour prévenir d'une dysfonction vasculaire. Par ailleurs, la CaMKII apparait comme une nouvelle cible du resvératrol jusqu'à présent non identifiée.

## CONCLUSION GENERALE

---

L'ensemble de ces travaux permet d'apporter une vision plus large quant à la régulation de la biogenèse mitochondriale dans le système cardiovasculaire.

La mise en place d'un test cellulaire robotisé pour la recherche de nouveaux activateurs de PGC-1 $\alpha$  a permis l'identification de trois familles de composés capables d'induire son expression et d'avoir un impact sur la biogenèse mitochondriale. Par ailleurs, la transposition des résultats obtenus dans la lignée H9c2 à un modèle de cardiomyocytes de rat adulte, valide la pertinence de ce test pour la recherche de modulateurs de PGC-1 $\alpha$ . Ainsi, ce test offre la perspective à plus long terme d'identifier les mécanismes de régulation de PGC-1 $\alpha$  dans le myocarde et de mettre en place de nouveaux criblages afin d'identifier une molécule pharmacologique pouvant présenter un potentiel thérapeutique dans le cadre de l'insuffisance cardiaque.

A travers la deuxième étude, nous mettons en évidence pour la première fois une induction de la biogenèse mitochondriale dans le muscle lisse vasculaire en réponse à l'hypertension artérielle. Ces résultats suggèrent également un contrôle de la biogenèse mitochondriale dépendant du stress oxydant et de l'activité de la CaMKII. Nous montrons également que le resvératrol, bien que capable d'induire la biogenèse mitochondriale en condition basale dans le muscle lisse vasculaire, limite cette induction en présence d'un stress oxydant grâce à ses propriétés anti-oxydantes. Cette étude ouvre donc de nouvelles perspectives de recherche concernant la régulation de la biogenèse mitochondriale et plus généralement de la fonction mitochondriale dans le muscle lisse lors de l'hypertension artérielle.



## BIBLIOGRAPHIE

---

1. Abozguia, K., Elliott, P., McKenna, W., Phan, T.T., Nallur-Shivu, G., Ahmed, I., Maher, A.R., Kaur, K., Taylor, J., Henning, A., Ashrafian, H., Watkins, H., and Frenneaux, M. (2010). Metabolic modulator perhexiline corrects energy deficiency and improves exercise capacity in symptomatic hypertrophic cardiomyopathy. **Circulation** *122*, 1562-9.
2. Abumrad, N., Coburn, C., and Ibrahimi, A. (1999). Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. **Biochim Biophys Acta** *1441*, 4-13.
3. Abumrad, N., Harmon, C., and Ibrahimi, A. (1998). Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. **J Lipid Res** *39*, 2309-18.
4. Abumrad, N.A., el-Maghrabi, M.R., Amri, E.Z., Lopez, E., and Grimaldi, P.A. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. **J Biol Chem** *268*, 17665-8.
5. Agoston-Coldea, L., Mocan, T., Gatfosse, M., Lupu, S., and Dumitrascu, D.L. (2011). Plasma homocysteine and the severity of heart failure in patients with previous myocardial infarction. **Cardiol J** *18*, 55-62.
6. Agoston-Coldea, L., Mocan, T., Seicean, A., Gatfosse, M., and Rosenstingl, S. (2010). The plasma homocysteine concentrations and prior myocardial infarction. **Rom J Intern Med** *48*, 65-72.
7. Akimoto, T., Li, P., and Yan, Z. (2008). Functional interaction of regulatory factors with the Pgc-1alpha promoter in response to exercise by in vivo imaging. **Am J Physiol Cell Physiol** *295*, C288-92.
8. Akimoto, T., Pohnert, S.C., Li, P., Zhang, M., Gumbs, C., Rosenberg, P.B., Williams, R.S., and Yan, Z. (2005). Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. **J Biol Chem** *280*, 19587-93.
9. Akimoto, T., Sorg, B.S., and Yan, Z. (2004). Real-time imaging of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha promoter activity in skeletal muscles of living mice. **Am J Physiol Cell Physiol** *287*, C790-6.
10. Andersson, U. and Scarpulla, R.C. (2001). Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. **Mol Cell Biol** *21*, 3738-49.
11. Arany, Z. (2008). PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. **Curr Opin Genet Dev** *18*, 426-34.
12. Arany, Z., Foo, S.Y., Ma, Y., Ruas, J.L., Bommi-Reddy, A., Girnun, G., Cooper, M., Laznik, D., Chinsomboon, J., Rangwala, S.M., Baek, K.H., Rosenzweig, A.,

- and Spiegelman, B.M. (2008). HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. **Nature** *451*, 1008-12.
13. Arany, Z., He, H., Lin, J., Hoyer, K., Handschin, C., Toka, O., Ahmad, F., Matsui, T., Chin, S., Wu, P.H., Rybkin, I.I., Shelton, J.M., Manieri, M., Cinti, S., Schoen, F.J., Bassel-Duby, R., Rosenzweig, A., Ingwall, J.S., and Spiegelman, B.M. (2005). Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. **Cell Metab** *1*, 259-71.
  14. Arany, Z., Novikov, M., Chin, S., Ma, Y., Rosenzweig, A., and Spiegelman, B.M. (2006). Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha. **Proc Natl Acad Sci U S A** *103*, 10086-91.
  15. Arany, Z., Wagner, B.K., Ma, Y., Chinsomboon, J., Laznik, D., and Spiegelman, B.M. (2008). Gene expression-based screening identifies microtubule inhibitors as inducers of PGC-1alpha and oxidative phosphorylation. **Proc Natl Acad Sci U S A** *105*, 4721-6.
  16. Asin-Cayuela, J. and Gustafsson, C.M. (2007). Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells. **Trends Biochem Sci** *32*, 111-7.
  17. Atamna, H. (2004). Heme, iron, and the mitochondrial decay of ageing. **Ageing Res Rev** *3*, 303-18.
  18. Austin, R.C., Lentz, S.R., and Werstuck, G.H. (2004). Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. **Cell Death Differ** *11 Suppl 1*, S56-64.
  19. Baar, K., Wende, A.R., Jones, T.E., Marison, M., Nolte, L.A., Chen, M., Kelly, D.P., and Holloszy, J.O. (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. **FASEB J** *16*, 1879-86.
  20. Bagger, J.P., Botker, H.E., Thomassen, A., and Nielsen, T.T. (1997 ). Effects of ranolazine on ischemic threshold, coronary sinus blood flow, and myocardial metabolism in coronary artery disease. **Cardiovasc Drugs Ther** *11*, 479-84.
  21. Baker, M.J., Frazier, A.E., Gulbis, J.M., and Ryan, M.T. (2007). Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. **Trends Cell Biol** *17*, 456-64.
  22. Banerjee, S.K., McGaffin, K.R., Pastor-Soler, N.M., and Ahmad, F. (2009). SGLT1 is a novel cardiac glucose transporter that is perturbed in disease states. **Cardiovasc Res** *84*, 111-8.
  23. Banerjee, S.K., Wang, D.W., Alzamora, R., Huang, X.N., Pastor-Soler, N.M., Hallows, K.R., McGaffin, K.R., and Ahmad, F. (2010). SGLT1, a novel cardiac glucose transporter, mediates increased glucose uptake in PRKAG2 cardiomyopathy. **J Mol Cell Cardiol** *49*, 683-92.
  24. Barger, P.M., Brandt, J.M., Leone, T.C., Weinheimer, C.J., and Kelly, D.P. (2000).

Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth. **J Clin Invest** 105, 1723-30.

25. Barja, G. (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. **J Bioenerg Biomembr** 31, 347-66.
26. Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poosala, S., Becker, K.G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Lakatta, E.G., Le Couteur, D., Shaw, R.J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D.K., de Cabo, R., and Sinclair, D.A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature** 444, 337-42.
27. Bayliss, D.A., Cidlowski, J.A., and Millhorn, D.E. (1990). The stimulation of respiration by progesterone in ovariectomized cat is mediated by an estrogen-dependent hypothalamic mechanism requiring gene expression. **Endocrinology** 126, 519-27.
28. Becker, T., Bottinger, L., and Pfanner, N. (2011). Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. **Trends Biochem Sci**
29. Becker, T., Gebert, M., Pfanner, N., and van der Laan, M. (2009). Biogenesis of mitochondrial membrane proteins. **Curr Opin Cell Biol** 21, 484-93.
30. Beer, M., Seyfarth, T., Sandstede, J., Landschutz, W., Lipke, C., Kostler, H., von Kienlin, M., Harre, K., Hahn, D., and Neubauer, S. (2002). Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with (31)P-SLOOP magnetic resonance spectroscopy. **J Am Coll Cardiol** 40, 1267-74.
31. Benard, G., Faustin, B., Passerieux, E., Galinier, A., Rocher, C., Bellance, N., Delage, J.P., Casteilla, L., Letellier, T., and Rossignol, R. (2006). Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. **Am J Physiol Cell Physiol** 291, C1172-82.
32. Benter, I.F., Yousif, M.H., Canatan, H., and Akhtar, S. (2005). Inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II, RAS-GTPase and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid attenuates the development of diabetes-induced vascular dysfunction in the rat carotid artery. **Pharmacol Res** 52, 252-7.
33. Berk, B.C. (2001). Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. **Physiol Rev** 81, 999-1030.
34. Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature** 415, 198-205.
35. Bhardwaj, A., Sethi, G., Vadhan-Raj, S., Bueso-Ramos, C., Takada, Y., Gaur, U., Nair, A.S., Shishodia, S., and Aggarwal, B.B. (2007). Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. **Blood** 109,



36. Bionaz, M., Thering, B.J., and Loor, J.J. (2012). Fine metabolic regulation in ruminants via nutrient-gene interactions: saturated long-chain fatty acids increase expression of genes involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR-alpha activation. **Br J Nutr** 107, 179-91.
37. Blum, A. (2009). Heart failure--new insights. **Isr Med Assoc J** 11, 105-11.
38. Bonawitz, N.D., Clayton, D.A., and Shadel, G.S. (2006). Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. **Mol Cell** 24, 813-25.
39. Borbiev, T., Verin, A.D., Shi, S., Liu, F., and Garcia, J.G. (2001 ). Regulation of endothelial cell barrier function by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 280, L983-90.
40. Bouallegue, A., Pandey, N.R., and Srivastava, A.K. (2009). CaMKII knockdown attenuates H2O2-induced phosphorylation of ERK1/2, PKB/Akt, and IGF-1R in vascular smooth muscle cells. **Free Radic Biol Med** 47, 858-66.
41. Bourdoncle, A., Labesse, G., Margueron, R., Castet, A., Cavailles, V., and Royer, C.A. ( 2005). The nuclear receptor coactivator PGC-1alpha exhibits modes of interaction with the estrogen receptor distinct from those of SRC-1. **J Mol Biol** 347, 921-34.
42. Brandt, J.M., Djouadi, F., and Kelly, D.P. (1998). Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. **J Biol Chem** 273, 23786-92.
43. Brigadeau, F., Gele, P., Wibaux, M., Marquie, C., Martin-Nizard, F., Torpier, G., Fruchart, J.C., Staels, B., Duriez, P., and Lacroix, D. (2007). The PPARalpha activator fenofibrate slows down the progression of the left ventricular dysfunction in porcine tachycardia-induced cardiomyopathy. **J Cardiovasc Pharmacol** 49, 408-15.
44. Brigelius-Flohe, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radic Biol Med** 27, 951-65.
45. Bristow, M. (2000). Etomoxir: a new approach to treatment of chronic heart failure. **Lancet** 356, 1621-2.
46. Bruni, F., Polosa, P.L., Gadaleta, M.N., Cantatore, P., and Roberti, M. (2010). Nuclear respiratory factor 2 induces the expression of many but not all human proteins acting in mitochondrial DNA transcription and replication. **J Biol Chem** 285, 3939-48.
47. Brusque, A.M., Borba Rosa, R., Schuck, P.F., Dalcin, K.B., Ribeiro, C.A., Silva, C.G., Wannmacher, C.M., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T., Briones, P., and Wajner, M. (2002). Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. **Neurochem Int** 40, 593-601.

48. Bugger, H., Schwarzer, M., Chen, D., Schrepfer, A., Amorim, P.A., Schoepe, M., Nguyen, T.D., Mohr, F.W., Khalimonchuk, O., Weimer, B.C., and Doenst, T. (2010). Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. **Cardiovasc Res** 85, 376-84.
49. Calvo, J.A., Daniels, T.G., Wang, X., Paul, A., Lin, J., Spiegelman, B.M., Stevenson, S.C., and Rangwala, S.M. (2008). Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. **J Appl Physiol** 104, 1304-12.
50. Campbell, F.M., Kozak, R., Wagner, A., Altarejos, J.Y., Dyck, J.R., Belke, D.D., Severson, D.L., Kelly, D.P., and Lopaschuk, G.D. (2002). A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. **J Biol Chem** 277, 4098-103.
51. Canto, C. and Auwerx, J. (2009). PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. **Curr Opin Lipidol** 20, 98-105.
52. Canto, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J.N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J.C., Elliott, P.J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. **Nature** 458, 1056-60.
53. Cao, W., Daniel, K.W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A.V., Bai, X., Floering, L.M., Spiegelman, B.M., and Collins, S. (2004). p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. **Mol Cell Biol** 24, 3057-67.
54. Carroll, J.D., Carroll, E.P., Feldman, T., Ward, D.M., Lang, R.M., McGaughey, D., and Karp, R.B. (1992). Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. **Circulation** 86, 1099-107.
55. Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. **Cell** 138, 628-44.
56. Chandler, M.P., Stanley, W.C., Morita, H., Suzuki, G., Roth, B.A., Blackburn, B., Wolff, A., and Sabbah, H.N. (2002). Short-term treatment with ranolazine improves mechanical efficiency in dogs with chronic heart failure. **Circ Res** 91, 278-80.
57. Chang, J.C., Kou, S.J., Lin, W.T., and Liu, C.S. (2010). Regulatory role of mitochondria in oxidative stress and atherosclerosis. **World J Cardiol** 2, 150-9.
58. Channa, M.L., Somova, L., and Nadar, A. (2004). Facets of the metabolic syndrome in Dahl hypertensive rats. **Cardiovasc J S Afr** 15, 61-3.

59. Chatelain, F., Kohl, C., Esser, V., McGarry, J.D., Girard, J., and Pegorier, J.P. (1996). Cyclic AMP and fatty acids increase carnitine palmitoyltransferase I gene transcription in cultured fetal rat hepatocytes. **Eur J Biochem** 235, 789-98.
60. Chen, J.Q., Cammarata, P.R., Baines, C.P., and Yager, J.D. (2009). Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. **Biochim Biophys Acta** 1793, 1540-70.
61. Chen, J.Q., Russo, P.A., Cooke, C., Russo, I.H., and Russo, J. (2007). ERbeta shifts from mitochondria to nucleus during estrogen-induced neoplastic transformation of human breast epithelial cells and is involved in estrogen-induced synthesis of mitochondrial respiratory chain proteins. **Biochim Biophys Acta** 1773, 1732-46.
62. Chen, J.Q. and Yager, J.D. (2004). Estrogen's effects on mitochondrial gene expression: mechanisms and potential contributions to estrogen carcinogenesis. **Ann N Y Acad Sci** 1028, 258-72.
63. Chen, J.Q., Yager, J.D., and Russo, J. (2005). Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. **Biochim Biophys Acta** 1746, 1-17.
64. Chen, L., Gong, Q., Stice, J.P., and Knowlton, A.A. (2009). Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. **Cardiovasc Res** 84, 91-9.
65. Chen, S.D., Yang, D.I., Lin, T.K., Shaw, F.Z., Liou, C.W., and Chuang, Y.C. (2011). Roles of Oxidative Stress, Apoptosis, PGC-1alpha and Mitochondrial Biogenesis in Cerebral Ischemia. **Int J Mol Sci** 12, 7199-215.
66. Cheng, G., Zhang, X., Gao, D., Jiang, X., and Dong, W. (2009). Resveratrol inhibits MMP-9 expression by up-regulating PPAR alpha expression in an oxygen glucose deprivation-exposed neuron model. **Neurosci Lett** 451, 105-8.
67. Chicco, A.J., Sparagna, G.C., McCune, S.A., Johnson, C.A., Murphy, R.C., Bolden, D.A., Rees, M.L., Gardner, R.T., and Moore, R.L. (2008). Linoleate-rich high-fat diet decreases mortality in hypertensive heart failure rats compared with lard and low-fat diets. **Hypertension** 52, 549-55.
68. Chinsomboon, J., Ruas, J., Gupta, R.K., Thom, R., Shoag, J., Rowe, G.C., Sawada, N., Raghuram, S., and Arany, Z. (2009). The transcriptional coactivator PGC-1alpha mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A** 106, 21401-6.
69. Christensen, M.D., Dun, W., Boyden, P.A., Anderson, M.E., Mohler, P.J., and Hund, T.J. (2009). Oxidized calmodulin kinase II regulates conduction following myocardial infarction: a computational analysis. **PLoS Comput Biol** 5, e1000583
70. Clarke, B., Wyatt, K.M., and McCormack, J.G. (1996). Ranolazine increases active pyruvate dehydrogenase in perfused normoxic rat hearts: evidence for an

indirect mechanism. **J Mol Cell Cardiol** 28, 341-50.

71. Claycomb, W.C., Lanson, N.A. Jr, Stallworth, B.S., Egeland, D.B., Delcarpio, J.B., Bahinski, A., and Izzo, N.J. Jr (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95, 2979-84.
72. Comelli, M., Domenis, R., Bisetto, E., Contin, M., Marchini, M., Ortolani, F., Tomasetig, L., and Mavelli, I. (2011). Cardiac differentiation promotes mitochondria development and ameliorates oxidative capacity in H9c2 cardiomyoblasts. **Mitochondrion** 11, 315-26.
73. DAHL, L.K., HEINE, M., and TASSINARI, L. (1962). Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion. **Nature** 194, 480-2.
74. Davies, K.J., Quintanilha, A.T., Brooks, G.A., and Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochem Biophys Res Commun** 107, 1198-205.
75. Davila-Roman, V.G., Vedala, G., Herrero, P., de las Fuentes, L., Rogers, J.G., Kelly, D.P., and Gropler, R.J. (2002). Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. **J Am Coll Cardiol** 40, 271-7.
76. De Sousa, E., Veksler, V., Minajeva, A., Kaasik, A., Mateo, P., Mayoux, E., Hoerter, J., Bigard, X., Serrurier, B., and Ventura-Clapier, R. (1999). Subcellular creatine kinase alterations. Implications in heart failure. **Circ Res** 85, 68-76.
77. Depeint, F., Bruce, W.R., Shangari, N., Mehta, R., and O'Brien, P.J. (2006). Mitochondrial function and toxicity: role of B vitamins on the one-carbon transfer pathways. **Chem Biol Interact** 163, 113-32.
78. Di Lisa, F., Kaludercic, N., Carpi, A., Menabo, R., and Giorgio, M. (2009). Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66(Shc) and monoamine oxidase. **Basic Res Cardiol** 104, 131-9.
79. Di Napoli, P., Di Giovanni, P., Gaeta, M.A., D'Apolito, G., and Barsotti, A. (2007). Beneficial effects of trimetazidine treatment on exercise tolerance and B-type natriuretic peptide and troponin T plasma levels in patients with stable ischemic cardiomyopathy. **Am Heart J** 154, 602.e1-5
80. Di Napoli, P., Taccardi, A.A., and Barsotti, A. (2005). Long term cardioprotective action of trimetazidine and potential effect on the inflammatory process in patients with ischaemic dilated cardiomyopathy. **Heart** 91, 161-5.
81. Djouadi, F., Brandt, J.M., Weinheimer, C.J., Leone, T.C., Gonzalez, F.J., and Kelly, D.P. (1999). The role of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in the control of cardiac lipid metabolism. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** 60, 339-43.

82. Dobrzyn, P., Pyrkowska, A., Jazurek, M., Szymanski, K., Langfort, J., and Dobrzyn, A. (2010). Endurance training-induced accumulation of muscle triglycerides is coupled to upregulation of stearoyl-CoA desaturase 1. **J Appl Physiol** *109*, 1653-61.
83. Dolinsky, V.W. and Dyck, J.R. (2011). Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease. **Biochim Biophys Acta**
84. Duncan, J.G. and Finck, B.N. (2008). The PPARalpha-PGC-1alpha Axis Controls Cardiac Energy Metabolism in Healthy and Diseased Myocardium. **PPAR Res** *2008*, 253817
85. Dzeja, P. and Terzic, A. (2009). Adenylate kinase and AMP signaling networks: Metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. **Int J Mol Sci** *10*, 1729-72.
86. Dzeja, P.P. and Terzic, A. (2003). Phosphotransfer networks and cellular energetics. **J Exp Biol** *206*, 2039-47.
87. Dzeja, P.P., Vitkevicius, K.T., Redfield, M.M., Burnett, J.C., and Terzic, A. (1999). Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium : increased contribution in heart failure. **Circ Res** *84*, 1137-43.
88. Egan, B., Carson, B.P., Garcia-Roves, P.M., Chibalin, A.V., Sarsfield, F.M., Barron, N., McCaffrey, N., Moyna, N.M., Zierath, J.R., and O'Gorman, D.J. (2010). Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. **J Physiol** *588*, 1779-90.
89. Eichner, L.J. and Giguere, V. (2011). Estrogen related receptors (ERRs): a new dawn in transcriptional control of mitochondrial gene networks. **Mitochondrion** *11*, 544-52.
90. Erickson, J.R., Joiner, M.L., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C.V., Bartlett, R.K., Lowe, J.S., O'Donnell, S.E., Aykin-Burns, N., Zimmerman, M.C., Zimmerman, K., Ham, A.J., Weiss, R.M., Spitz, D.R., Shea, M.A., Colbran, R.J., Mohler, P.J., and Anderson, M.E. (2008). A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. **Cell** *133*, 462-74.
91. Esterbauer, H., Oberkofler, H., Krempler, F., and Patsch, W. (1999 ). Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. **Genomics** *62*, 98-102.
92. Evans, M.J. and Scarpulla, R.C. (1990). NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. **Genes Dev** *4*, 1023-34.
93. Faerber, G., Barreto-Perreia, F., Schoepe, M., Gilsbach, R., Schrepper, A., Schwarzer, M., Mohr, F.W., Hein, L., and Doenst, T. (2011). Induction of heart failure by minimally invasive aortic constriction in mice: reduced peroxisome

proliferator-activated receptor gamma coactivator levels and mitochondrial dysfunction. **J Thorac Cardiovasc Surg** *141*, 492-500, 500.e1.

94. Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N.G., and Gustafsson, C.M. (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. **Nat Genet** *31*, 289-94.
95. Fan, M., Rhee, J., St-Pierre, J., Handschin, C., Puigserver, P., Lin, J., Jaeger, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Spiegelman, B.M. (2004). Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK. **Genes Dev** *18*, 278-89.
96. Fernandez-Marcos, P.J. and Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. **Am J Clin Nutr** *93*, 884S-90.
97. Finck, B.N., Han, X., Courtois, M., Amond, F., Nerbonne, J.M., Kovacs, A., Gross, R.W., and Kelly, D.P. (2003). A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. **Proc Natl Acad Sci U S A** *100*, 1226-31.
98. Finck, B.N. and Kelly, D.P. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. **Circulation** *115*, 2540-8.
99. Flachs, P., Horakova, O., Brauner, P., Rossmeisl, M., Pecina, P., Franssen-van Hal, N., Ruzickova, J., Sponarova, J., Drahota, Z., Vlcek, C., Keijer, J., Houstek, J., and Kopecky, J. (2005). Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. **Diabetologia** *48*, 2365-75.
100. Fragasso, G., Palloshi, A., Puccetti, P., Silipigni, C., Rossodivita, A., Pala, M., Calori, G., Alfieri, O., and Margonato, A. (2006). A randomized clinical trial of trimetazidine, a partial free fatty acid oxidation inhibitor, in patients with heart failure. **J Am Coll Cardiol** *48*, 992-8.
101. Fragasso, G., Salerno, A., Spoladore, R., Bassanelli, G., Arioli, F., and Margonato, A. (2008). Metabolic therapy of heart failure. **Curr Pharm Des** *14*, 2582-91.
102. Frahm, T., Mohamed, S.A., Bruse, P., Gemund, C., Oehmichen, M., and Meissner, C. (2005). Lack of age-related increase of mitochondrial DNA amount in brain, skeletal muscle and human heart. **Mech Ageing Dev** *126*, 1192-200.
103. Franken, D.G., Boers, G.H., Blom, H.J., Trijbels, F.J., and Kloppenborg, P.W. (1994). Treatment of mild hyperhomocysteinemia in vascular disease patients. **Arterioscler Thromb** *14*, 465-70.
104. Frey, T.G. and Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. **Trends Biochem Sci** *25*, 319-24.
105. Garcia, M.M., Gueant-Rodriguez, R.M., Pooya, S., Brachet, P., Alberto, J.M., Jeannesson, E., Maskali, F., Gueguen, N., Marie, P.Y., Lacolley, P., Herrmann,

- M., Juilliere, Y., Malthiery, Y., and Gueant, J.L. (2011). Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1. **J Pathol**
106. Garcia-Roves, P., Huss, J.M., Han, D.H., Hancock, C.R., Iglesias-Gutierrez, E., Chen, M., and Holloszy, J.O. (2007). Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A** *104*, 10709-13.
  107. Garnier, A., Fortin, D., Delomenie, C., Momken, I., Veksler, V., and Ventura-Clapier, R. (2003). Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. **J Physiol** *551*, 491-501.
  108. Garnier, A., Fortin, D., Zoll, J., N'Guessan, B., Mettauer, B., Lampert, E., Veksler, V., and Ventura-Clapier, R. (2005). Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle. **FASEB J** *19*, 43-52.
  109. Garnier, A., Zoll, J., Fortin, D., N'Guessan, B., Lefebvre, F., Geny, B., Mettauer, B., Veksler, V., and Ventura-Clapier, R. (2009). Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II. **Circ Heart Fail** *2*, 342-50.
  110. Gaspari, M., Larsson, N.G., and Gustafsson, C.M. (2004). The transcription machinery in mammalian mitochondria. **Biochim Biophys Acta** *1659*, 148-52.
  111. Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J.T., Bare, O., Lerin, C., Kim, S.H., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., Wu, Z., and Puigserver, P. (2007). Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. **EMBO J** *26*, 1913-23.
  112. Gheorghiade, M., Cody, R.J., Francis, G.S., McKenna, W.J., Young, J.B., and Bonow, R.O. (2000). Current medical therapy for advanced heart failure. **Heart Lung** *29*, 16-32.
  113. Giguere, V. (2008). Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors. **Endocr Rev** *29*, 677-96.
  114. Gilde, A.J., van der Lee, K.A., Willemsen, P.H., Chinetti, G., van der Leij, F.R., van der Vusse, G.J., Staels, B., and van Bilsen, M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. **Circ Res** *92*, 518-24.
  115. Gleyzer, N., Vercauteren, K., and Scarpulla, R.C. (2005). Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. **Mol Cell Biol** *25*, 1354-66.
  116. Goikoetxea, M.J., Beaumont, J., Gonzalez, A., Lopez, B., Querejeta, R., Larman, M., and Diez, J. (2006). Altered cardiac expression of peroxisome proliferator-activated receptor-isoforms in patients with hypertensive heart disease.

**Cardiovasc Res** 69, 899-907.

117. Gomez-Cabrera, M.C., Domenech, E., Romagnoli, M., Arduini, A., Borrás, C., Pallardo, F.V., Sastre, J., and Vina, J. (2008). Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. **Am J Clin Nutr** 87, 142-9.
118. Greenwalt, D.E., Scheck, S.H., and Rhinehart-Jones, T. (1995). Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet. **J Clin Invest** 96, 1382-8.
119. Griffin, E., Re, A., Hamel, N., Fu, C., Bush, H., McCaffrey, T., and Asch, A.S. (2001). A link between diabetes and atherosclerosis: Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. **Nat Med** 7, 840-6.
120. Gueant-Rodriguez, R.M., Juilliere, Y., Nippert, M., Abdelmouttaleb, I., Herbeth, B., Aliot, E., Danchin, N., and Gueant, J.L. (2007). Left ventricular systolic dysfunction is an independent predictor of homocysteine in angiographically documented patients with or without coronary artery lesions. **J Thromb Haemost** 5, 1209-16.
121. Guo, P., Nishiyama, A., Rahman, M., Nagai, Y., Noma, T., Namba, T., Ishizawa, M., Murakami, K., Miyatake, A., Kimura, S., Mizushige, K., Abe, Y., Ohmori, K., and Kohno, M. (2006). Contribution of reactive oxygen species to the pathogenesis of left ventricular failure in Dahl salt-sensitive hypertensive rats: effects of angiotensin II blockade. **J Hypertens** 24, 1097-104.
122. Haemmerle, G., Moustafa, T., Woelkart, G., Buttner, S., Schmidt, A., van de Weijer, T., Hesselink, M., Jaeger, D., Kienesberger, P.C., Zierler, K., Schreiber, R., Eichmann, T., Kolb, D., Kotzbeck, P., Schweiger, M., Kumari, M., Eder, S., Schoiswohl, G., Wongsiriroj, N., Pollak, N.M., Radner, F.P., Preiss-Landl, K., Kolbe, T., Rulicke, T., Pieske, B., Trauner, M., Lass, A., Zimmermann, R., Hoefler, G., Cinti, S., Kershaw, E.E., Schrauwen, P., Madeo, F., Mayer, B., and Zechner, R. (2011). ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR-alpha and PGC-1. **Nat Med** 17, 1076-85.
123. Halbirk, M., Norrelund, H., Moller, N., Schmitz, O., Gotzsche, L., Nielsen, R., Nielsen-Kudsk, J.E., Nielsen, S.S., Nielsen, T.T., Eiskjaer, H., Botker, H.E., and Wiggers, H. (2010). Suppression of circulating free fatty acids with acipimox in chronic heart failure patients changes whole body metabolism but does not affect cardiac function. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 299, H1220-5.
124. Hamanaka, R.B. and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. **Trends Biochem Sci** 35, 505-13.
125. Handschin, C. (2010). Regulation of skeletal muscle cell plasticity by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. **J Recept Signal Transduct Res** 30, 376-84.
126. Handschin, C., Rhee, J., Lin, J., Tarr, P.T., and Spiegelman, B.M. (2003). An



autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A** *100*, 7111-6.

127. Hardie, D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. **Nat Rev Mol Cell Biol** *8*, 774-85.
128. Harmon, C.M. and Abumrad, N.A. (1993). Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids. **J Membr Biol** *133*, 43-9.
129. Heather, L.C., Cole, M.A., Lygate, C.A., Evans, R.D., Stuckey, D.J., Murray, A.J., Neubauer, S., and Clarke, K. (2006). Fatty acid transporter levels and palmitate oxidation rate correlate with ejection fraction in the infarcted rat heart. **Cardiovasc Res** *72*, 430-7.
130. Herrera, V.L., Xie, H.X., Lopez, L.V., Schork, N.J., and Ruiz-Opazo, N. (1998). The alpha1 Na,K-ATPase gene is a susceptibility hypertension gene in the Dahl salt-sensitiveHSD rat. **J Clin Invest** *102*, 1102-11.
131. Herrmann, M., Kindermann, I., Muller, S., Georg, T., Kindermann, M., Bohm, M., and Herrmann, W. (2005). Relationship of plasma homocysteine with the severity of chronic heart failure. **Clin Chem** *51*, 1512-5.
132. Herrmann, W. and Obeid, R. (2012). Cobalamin deficiency. **Subcell Biochem** *56*, 301-22.
133. Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., Spiegelman, B., and Montminy, M. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. **Nature** *413*, 179-83.
134. Hillman, R.S., Adamson, J., and Burka, E. (1968). Characteristics of vitamin B12 correction of the abnormal erythropoiesis of pernicious anemia. **Blood** *31*, 419-32.
135. Hirsch, D., Stahl, A., and Lodish, H.F. (1998). A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. **Proc Natl Acad Sci U S A** *95*, 8625-9.
136. Hjalmarson, A., Goldstein, S., Fagerberg, B., Wedel, H., Waagstein, F., Kjekshus, J., Wikstrand, J., El Allaf, D., Vitovec, J., Aldershvile, J., Halinen, M., Dietz, R., Neuhaus, K.L., Janosi, A., Thorgeirsson, G., Dunselman, P.H., Gullestad, L., Kuch, J., Herlitz, J., Rickenbacher, P., Ball, S., Gottlieb, S., and Deedwania, P. (2000). Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). MERIT-HF Study Group. **JAMA** *283*, 1295-302.
137. Holloszy, J.O. (1967). Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal

muscle. **J Biol Chem** 242, 2278-82.

138. Holubarsch, C.J., Rohrbach, M., Karrasch, M., Boehm, E., Polonski, L., Ponikowski, P., and Rhein, S. (2007). A double-blind randomized multicentre clinical trial to evaluate the efficacy and safety of two doses of etomoxir in comparison with placebo in patients with moderate congestive heart failure: the ERGO (etomoxir for the recovery of glucose oxidation) study. **Clin Sci (Lond)** 113, 205-12.
139. Hood, D.A. and Joseph, A.M. (2004). Mitochondrial assembly: protein import. **Proc Nutr Soc** 63, 293-300.
140. Horowitz, J.F. (2003). Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. **Trends Endocrinol Metab** 14, 386-92.
141. Houtkooper, R.H., Canto, C., Wanders, R.J., and Auwerx, J. (2010). The secret life of NAD<sup>+</sup>: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. **Endocr Rev** 31, 194-223.
142. Hsieh, Y.C., Choudhry, M.A., Yu, H.P., Shimizu, T., Yang, S., Suzuki, T., Chen, J., Bland, K.I., and Chaudry, I.H. (2006). Inhibition of cardiac PGC-1alpha expression abolishes ERbeta agonist-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage. **FASEB J** 20, 1109-17.
143. Hsieh, Y.C., Yang, S., Choudhry, M.A., Yu, H.P., Rue, L.W. 3rd, Bland, K.I., and Chaudry, I.H. (2005). PGC-1 upregulation via estrogen receptors: a common mechanism of salutary effects of estrogen and flutamide on heart function after trauma-hemorrhage. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 289, H2665-72.
144. Huss, J.M. and Kelly, D.P. (2005). Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. **J Clin Invest** 115, 547-55.
145. Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., Nakamura, K., Utsumi, H., Hamasaki, N., and Takeshita, A. (2001). Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. **Circ Res** 88, 529-35.
146. Iemitsu, M., Shimojo, N., Maeda, S., Irukayama-Tomobe, Y., Sakai, S., Ohkubo, T., Tanaka, Y., and Miyauchi, T. (2008). The benefit of medium-chain triglyceride therapy on the cardiac function of SHRs is associated with a reversal of metabolic and signaling alterations. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 295, H136-44.
147. Igura, K., Ohta, T., Kuroda, Y., and Kaji, K. (2001). Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. **Cancer Lett** 171, 11-6.
148. Ingwall, J.S. and Weiss, R.G. (2004). Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. **Circ Res** 95, 135-45.
149. Inoue, H., Jiang, X.F., Katayama, T., Osada, S., Umesono, K., and Namura, S. (2003). Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice. **Neurosci Lett** 352,

150. Irrcher, I., Ljubcic, V., and Hood, D.A. (2009). Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1alpha transcription in skeletal muscle cells. **Am J Physiol Cell Physiol** 296, C116-23.
151. Irrcher, I., Ljubcic, V., Kirwan, A.F., and Hood, D.A. (2008). AMP-activated protein kinase-regulated activation of the PGC-1alpha promoter in skeletal muscle cells. **PLoS One** 3, e3614
152. Irwin, R.W., Yao, J., Hamilton, R.T., Cadenas, E., Brinton, R.D., and Nilsen, J. (2008). Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. **Endocrinology** 149, 3167-75.
153. Izumo, S., Lompre, A.M., Matsuoka, R., Koren, G., Schwartz, K., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V. (1987). Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. **J Clin Invest** 79, 970-7.
154. Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J., and Spiegelman, B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104, 12017-22.
155. Jaswal, J.S., Keung, W., Wang, W., Ussher, J.R., and Lopaschuk, G.D. (2011). Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation--a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. **Biochim Biophys Acta** 1813, 1333-50.
156. Jeng, J.Y., Yeh, T.S., Chiu, Y.H., Lee, Y.C., Cheng, H.H., and Hsieh, R.H. (2009). Linoleic acid promotes mitochondrial biogenesis and maintains mitochondrial structure for prevention of streptozotocin damage in RIN-m5F cells. **Biosci Biotechnol Biochem** 73, 1262-7.
157. Jia, H., Liu, Z., Li, X., Feng, Z., Hao, J., Li, X., Shen, W., Zhang, H., and Liu, J. (2010). Synergistic anti-Parkinsonism activity of high doses of B vitamins in a chronic cellular model. **Neurobiol Aging** 31, 636-46.
158. Joubert, F., Wilding, J.R., Fortin, D., Domergue-Dupont, V., Novotova, M., Ventura-Clapier, R., and Veksler, V. (2008). Local energetic regulation of sarcoplasmic and myosin ATPase is differently impaired in rats with heart failure. **J Physiol** 586, 5181-92.
159. Jullig, M., Hickey, A.J., Chai, C.C., Skea, G.L., Middleditch, M.J., Costa, S., Choong, S.Y., Philips, A.R., and Cooper, G.J. (2008). Is the failing heart out of fuel or a worn engine running rich? A study of mitochondria in old spontaneously hypertensive rats. **Proteomics** 8, 2556-72.
160. Kaasik, A., Veksler, V., Boehm, E., Novotova, M., Minajeva, A., and Ventura-Clapier, R. (2001). Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. **Circ Res** 89, 153-9.
161. Kao, C.L., Chen, L.K., Chang, Y.L., Yung, M.C., Hsu, C.C., Chen, Y.C., Lo, W.L.,

Chen, S.J., Ku, H.H., and Hwang, S.J. (2010). Resveratrol Protects Human Endothelium from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress and Senescence via SirT1 Activation. **J Atheroscler Thromb**

162. Karamanlidis, G., Nascimben, L., Couper, G.S., Shekar, P.S., del Monte, F., and Tian, R. (2010). Defective DNA replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts. **Circ Res** 106, 1541-8.
163. Karamitri, A., Shore, A.M., Docherty, K., Speakman, J.R., and Lomax, M.A. (2009). Combinatorial transcription factor regulation of the cyclic AMP-response element on the Pgc-1alpha promoter in white 3T3-L1 and brown HIB-1B preadipocytes. **J Biol Chem** 284, 20738-52.
164. Kato, T., Niizuma, S., Inuzuka, Y., Kawashima, T., Okuda, J., Tamaki, Y., Iwanaga, Y., Narazaki, M., Matsuda, T., Soga, T., Kita, T., Kimura, T., and Shioi, T. (2010). Analysis of metabolic remodeling in compensated left ventricular hypertrophy and heart failure. **Circ Heart Fail** 3, 420-30.
165. Katunuma, N., Okada, M., and Nishii, Y. (1966). Regulation of the urea cycle and TCA cycle by ammonia. **Adv Enzyme Regul** 4, 317-36.
166. Kavazis, A.N., Smuder, A.J., Min, K., Tumer, N., and Powers, S.K. (2010). Short-term exercise training protects against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial damage independent of HSP72. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 299, H1515-24.
167. Keith, M.E., Walsh, N.A., Darling, P.B., Hanninen, S.A., Thirugnanam, S., Leong-Poi, H., Barr, A., and Sole, M.J. (2009). B-vitamin deficiency in hospitalized patients with heart failure. **J Am Diet Assoc** 109, 1406-10.
168. Kelly, D.P. and Scarpulla, R.C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. **Genes Dev** 18, 357-68.
169. Kemi, O.J., Hoydal, M.A., Haram, P.M., Garnier, A., Fortin, D., Ventura-Clapier, R., and Ellingsen, O. (2007). Exercise training restores aerobic capacity and energy transfer systems in heart failure treated with losartan. **Cardiovasc Res** 76, 91-9.
170. Kerner, J. and Hoppel, C. (2000). Fatty acid import into mitochondria. **Biochim Biophys Acta** 1486, 1-17.
171. Kiens, B., Kristiansen, S., Jensen, P., Richter, E.A., and Turcotte, L.P. (1997). Membrane associated fatty acid binding protein (FABPpm) in human skeletal muscle is increased by endurance training. **Biochem Biophys Res Commun** 231, 463-5.
172. Kim, H.J., Ham, S.A., Paek, K.S., Hwang, J.S., Jung, S.Y., Kim, M.Y., Jin, H., Kang, E.S., Woo, I.S., Kim, H.J., Lee, J.H., Chang, K.C., Han, C.W., and Seo, H.G. (2011). Transcriptional up-regulation of antioxidant genes by PPARdelta inhibits angiotensin II-induced premature senescence in vascular smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun** 406, 564-9.

173. Kimes, B.W. and Brandt, B.L. (1976). Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. **Exp Cell Res** 98, 367-81.
174. Klein, L., O'Connor, C.M., Gattis, W.A., Zampino, M., de Luca, L., Vitarelli, A., Fedele, F., and Gheorghide, M. (2003). Pharmacologic therapy for patients with chronic heart failure and reduced systolic function: review of trials and practical considerations. **Am J Cardiol** 91, 18F-40F.
175. Kleinfeld, A.M. (2000). Lipid phase fatty acid flip-flop, is it fast enough for cellular transport? **J Membr Biol** 175, 79-86.
176. Klinge, C.M. (2008). Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. **J Cell Biochem** 105, 1342-51.
177. Klotz, S., Hay, I., Zhang, G., Maurer, M., Wang, J., and Burkhoff, D. (2006). Development of heart failure in chronic hypertensive Dahl rats: focus on heart failure with preserved ejection fraction. **Hypertension** 47, 901-11.
178. Knutti, D. and Kralli, A. (2001). PGC-1, a versatile coactivator. **Trends Endocrinol Metab** 12, 360-5.
179. Konstam, M.A., Rousseau, M.F., Kronenberg, M.W., Udelson, J.E., Melin, J., Stewart, D., Dolan, N., Edens, T.R., Ahn, S., Kinan, D., and et, a.l. (1992). Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dysfunction in patients with heart failure. SOLVD Investigators. **Circulation** 86, 431-8.
180. Kramer, D.K., Ahlsen, M., Norrbom, J., Jansson, E., Hjeltnes, N., Gustafsson, T., and Krook, A. (2006). Human skeletal muscle fibre type variations correlate with PPAR alpha, PPAR delta and PGC-1 alpha mRNA. **Acta Physiol (Oxf)** 188, 207-16.
181. Kramer, H.F. and Goodyear, L.J. (2007). Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. **J Appl Physiol** 103, 388-95.
182. Kressler, D., Schreiber, S.N., Knutti, D., and Kralli, A. (2002a). The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. **J Biol Chem** 277, 13918-25.
183. Kressler, D., Schreiber, S.N., Knutti, D., and Kralli, A. (2002b). The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. **J Biol Chem** 277, 13918-25.
184. Kurland, C.G. and Andersson, S.G. (2000). Origin and evolution of the mitochondrial proteome. **Microbiol Mol Biol Rev** 64, 786-820.
185. Kushiro, T., Fujita, H., Hisaki, R., Asai, T., Ichiyama, I., Kitahara, Y., Koike, M., Sugiura, H., Saito, F., Otsuka, Y., and Kanmatsuse, K. (2005). Oxidative stress in the Dahl salt-sensitive hypertensive rat. **Clin Exp Hypertens** 27, 9-15.
186. Labarthe, F., Khairallah, M., Bouchard, B., Stanley, W.C., and Des Rosiers, C. (2005). Fatty acid oxidation and its impact on response of spontaneously hypertensive

rat hearts to an adrenergic stress: benefits of a medium-chain fatty acid. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 288, H1425-36.

187. Labinskyy, V., Bellomo, M., Chandler, M.P., Young, M.E., Lionetti, V., Qanud, K., Bigazzi, F., Sampietro, T., Stanley, W.C., and Recchia, F.A. (2007). Chronic activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha with fenofibrate prevents alterations in cardiac metabolic phenotype without changing the onset of decompensation in pacing-induced heart failure. **J Pharmacol Exp Ther** 321, 165-71.
188. Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. **Cell** 127, 1109-22.
189. Lai, L., Leone, T.C., Zechner, C., Schaeffer, P.J., Kelly, S.M., Flanagan, D.P., Medeiros, D.M., Kovacs, A., and Kelly, D.P. (2008). Transcriptional coactivators PGC-1alpha and PGC-1beta control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. **Genes Dev** 22, 1948-61.
190. Lanner, J.T., Bruton, J.D., Katz, A., and Westerblad, H. (2008). Ca(2+) and insulin-mediated glucose uptake. **Curr Opin Pharmacol** 8, 339-45.
191. Lassegue, B. and Griendling, K.K. (2004). Reactive oxygen species in hypertension; An update. **Am J Hypertens** 17, 852-60.
192. Lau, S.L., Yuen, M.L., Kou, C.Y., Au, K.W., Zhou, J., and Tsui, S.K. (2012). Interferons induce the expression of IFITM1 and IFITM3 and suppress the proliferation of rat neonatal cardiomyocytes. **J Cell Biochem** 113, 841-7.
193. Lawrence, M.C., Jivan, A., Shao, C., Duan, L., Goad, D., Zaganjor, E., Osborne, J., McGlynn, K., Stippec, S., Earnest, S., Chen, W., and Cobb, M.H. (2008). The roles of MAPKs in disease. **Cell Res** 18, 436-42.
194. Lee, L., Campbell, R., Scheuermann-Freestone, M., Taylor, R., Gunaruwan, P., Williams, L., Ashrafian, H., Horowitz, J., Fraser, A.G., Clarke, K., and Frenneaux, M. (2005). Metabolic modulation with perhexiline in chronic heart failure: a randomized, controlled trial of short-term use of a novel treatment. **Circulation** 112, 3280-8.
195. Leeds, F.S. and Brass, E.P. (1994). Hepatic cobalamin deficiency induced by hydroxycobalamin[c-lactam] treatment in rats is associated with decreased mitochondrial mRNA contents and accumulation of polycistronic mitochondrial RNAs. **J Biol Chem** 269, 3947-51.
196. Lehman, J.J., Barger, P.M., Kovacs, A., Saffitz, J.E., Medeiros, D.M., and Kelly, D.P. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. **J Clin Invest** 106, 847-56.
197. Lehman, J.J., Boudina, S., Banke, N.H., Sambandam, N., Han, X., Young, D.M., Leone, T.C., Gross, R.W., Lewandowski, E.D., Abel, E.D., and Kelly, D.P.

- (2008). The transcriptional coactivator PGC-1alpha is essential for maximal and efficient cardiac mitochondrial fatty acid oxidation and lipid homeostasis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 295, H185-96.
198. Lei, B., Lionetti, V., Young, M.E., Chandler, M.P., d'Agostino, C., Kang, E., Altarejos, M., Matsuo, K., Hintze, T.H., Stanley, W.C., and Recchia, F.A. (2004). Paradoxical downregulation of the glucose oxidation pathway despite enhanced flux in severe heart failure. **J Mol Cell Cardiol** 36, 567-76.
  199. Leinwand, L.A. (2003). Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. **J Clin Invest** 112, 302-7.
  200. Leitman, D.C., Paruthiyil, S., Vivar, O.I., Saunier, E.F., Herber, C.B., Cohen, I., Tagliaferri, M., and Speed, T.P. (2010). Regulation of specific target genes and biological responses by estrogen receptor subtype agonists. **Curr Opin Pharmacol** 10, 629-36.
  201. Lelliott, C.J., Medina-Gomez, G., Petrovic, N., Kis, A., Feldmann, H.M., Bjursell, M., Parker, N., Curtis, K., Campbell, M., Hu, P., Zhang, D., Litwin, S.E., Zaha, V.G., Fountain, K.T., Boudina, S., Jimenez-Linan, M., Blount, M., Lopez, M., Meirhaeghe, A., Bohlooly-Y, M., Storlien, L., Stromstedt, M., Snaith, M., Oresic, M., Abel, E.D., Cannon, B., and Vidal-Puig, A. (2006). Ablation of PGC-1beta results in defective mitochondrial activity, thermogenesis, hepatic function, and cardiac performance. **PLoS Biol** 4, e369
  202. Leone, T.C., Lehman, J.J., Finck, B.N., Schaeffer, P.J., Wende, A.R., Boudina, S., Courtois, M., Wozniak, D.F., Sambandam, N., Bernal-Mizrachi, C., Chen, Z., Holloszy, J.O., Medeiros, D.M., Schmidt, R.E., Saffitz, J.E., Abel, E.D., Semenkovich, C.F., and Kelly, D.P. (2005). PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. **PLoS Biol** 3, e101
  203. Leone, T.C., Weinheimer, C.J., and Kelly, D.P. (1999). A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96, 7473-8.
  204. Lerin, C., Rodgers, J.T., Kalume, D.E., Kim, S.H., Pandey, A., and Puigserver, P. (2006). GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1alpha. **Cell Metab** 3, 429-38.
  205. Levin, E.R. (2002). Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. **Steroids** 67, 471-5.
  206. Lheureux, P., Penaloza, A., and Gris, M. (2005). Pyridoxine in clinical toxicology: a review. **Eur J Emerg Med** 12, 78-85.
  207. Li, L., Muhlfeld, C., Niemann, B., Pan, R., Li, R., Hilfiker-Kleiner, D., Chen, Y., and Rohrbach, S. (2011a). Mitochondrial biogenesis and PGC-1alpha deacetylation by chronic treadmill exercise: differential response in cardiac and skeletal muscle. **Basic Res Cardiol** 106, 1221-34.

208. Li, L., Pan, R., Li, R., Niemann, B., Aurich, A.C., Chen, Y., and Rohrbach, S. (2011b). Mitochondrial biogenesis and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) deacetylation by physical activity: intact adipocytokine signaling is required. **Diabetes** 60, 157-67.
209. Li, Y., Levesque, L.O., and Anand-Srivastava, M.B. (2010). Epidermal growth factor receptor transactivation by endogenous vasoactive peptides contributes to hyperproliferation of vascular smooth muscle cells of SHR. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 299, H1959-67.
210. Lichtstein, H.C., Gunsalus, I.C., and Umbreit, W.W. (1945). Function of the vitamin B6 group; pyridoxal phosphate (codecarboxylase) in transamination. **J Biol Chem** 161, 311-20.
211. Lin, J., Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metab** 1, 361-70.
212. Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P., and Spiegelman, B.M. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. **J Biol Chem** 277, 1645-8.
213. Lin, J., Wu, P.H., Tarr, P.T., Lindenberg, K.S., St-Pierre, J., Zhang, C.Y., Mootha, V.K., Jager, S., Vianna, C.R., Reznick, R.M., Cui, L., Manieri, M., Donovan, M.X., Wu, Z., Cooper, M.P., Fan, M.C., Rohas, L.M., Zavacki, A.M., Cinti, S., Shulman, G.I., Lowell, B.B., Krainc, D., and Spiegelman, B.M. (2004). Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. **Cell** 119, 121-35.
214. Ling, C., Poulsen, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Almgren, P., Wojtaszewski, J., Beck-Nielsen, H., Groop, L., and Vaag, A. (2004). Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1alpha and PGC-1beta gene expression in twins. **J Clin Invest** 114, 1518-26.
215. Lionetti, V., Stanley, W.C., and Recchia, F.A. (2011). Modulating fatty acid oxidation in heart failure. **Cardiovasc Res** 90, 202-9.
216. Livingstone, C., Patel, G., and Jones, N. (1995). ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. **EMBO J** 14, 1785-97.
217. Luptak, I., Balschi, J.A., Xing, Y., Leone, T.C., Kelly, D.P., and Tian, R. (2005). Decreased contractile and metabolic reserve in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null hearts can be rescued by increasing glucose transport and utilization. **Circulation** 112, 2339-46.
218. Ma, C., Li, Y., Ma, J., Liu, Y., Li, Q., Niu, S., Shen, Z., Zhang, L., Pan, Z., and Zhu, D. (2011). Key role of 15-lipoxygenase/15-hydroxyeicosatetraenoic acid in pulmonary vascular remodeling and vascular angiogenesis associated with hypoxic pulmonary hypertension. **Hypertension** 58, 679-88.
219. Maack, C. and O'Rourke, B. (2007). Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. **Basic Res Cardiol** 102, 369-92.



220. Marchisio, M., Malvano, R., and Massaglia, A. (1979). Creatine kinase forms in human skeletal and cardiac muscle. **Clin Chim Acta** 92, 45-52.
221. Marin-Garcia, J., Goldenthal, M.J., and Moe, G.W. (2001). Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure. **Cardiovasc Res** 52, 103-10.
222. Mattingly, K.A., Ivanova, M.M., Riggs, K.A., Wickramasinghe, N.S., Barch, M.J., and Klinge, C.M. (2008). Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis. **Mol Endocrinol** 22, 609-22.
223. Maurer, M., Burri, S., de Marchi, S., Hullin, R., Martinelli, M., Mohacsi, P., and Hess, O.M. (2010). Plasma homocysteine and cardiovascular risk in heart failure with and without cardiorenal syndrome. **Int J Cardiol** 141, 32-8.
224. McCulloch, V. and Shadel, G.S. (2003). Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity. **Mol Cell Biol** 23, 5816-24.
225. McMartin, K.E. and Wallace, K.B. (2005). Calcium oxalate monohydrate, a metabolite of ethylene glycol, is toxic for rat renal mitochondrial function. **Toxicol Sci** 84, 195-200.
226. Memon, R.A., Feingold, K.R., Moser, A.H., Fuller, J., and Grunfeld, C. (1998). Regulation of fatty acid transport protein and fatty acid translocase mRNA levels by endotoxin and cytokines. **Am J Physiol** 274, E210-7.
227. Menard, C., Pupier, S., Mornet, D., Kitzmann, M., Nargeot, J., and Lory, P. (1999). Modulation of L-type calcium channel expression during retinoic acid-induced differentiation of H9C2 cardiac cells. **J Biol Chem** 274, 29063-70.
228. Meng, S., Cason, G.W., Gannon, A.W., Racusen, L.C., and Manning, R.D. Jr (2003). Oxidative stress in Dahl salt-sensitive hypertension. **Hypertension** 41, 1346-52.
229. Michael, L.F., Wu, Z., Cheatham, R.B., Puigserver, P., Adelmant, G., Lehman, J.J., Kelly, D.P., and Spiegelman, B.M. (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98, 3820-5.
230. Miller, F.J., Rosenfeldt, F.L., Zhang, C., Linnane, A.W., and Nagley, P. (2003). Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. **Nucleic Acids Res** 31, e61
231. Monsalve, M., Wu, Z., Adelmant, G., Puigserver, P., Fan, M., and Spiegelman, B.M. (2000). Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. **Mol Cell** 6, 307-16.
232. Mootha, V.K., Handschin, C., Arlow, D., Xie, X., St Pierr, J., Sihag, S., Yang, W.,

- Altshuler, D., Puigserver, P., Patterson, N., Willy, P.J., Schulman, I.G., Heyman, R.A., Lander, E.S., and Spiegelman, B.M. (2004). Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A** *101*, 6570-5.
233. Mounolou, J.C. and Lacroute, F. (2005). Mitochondrial DNA: an advance in eukaryotic cell biology in the 1960s. **Biol Cell** *97*, 743-8.
234. Narkar, V.A., Downes, M., Yu, R.T., Embler, E., Wang, Y.X., Banayo, E., Mihaylova, M.M., Nelson, M.C., Zou, Y., Juguilon, H., Kang, H., Shaw, R.J., and Evans, R.M. (2008). AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. **Cell** *134*, 405-15.
235. Nascimben, L., Ingwall, J.S., Pauletto, P., Friedrich, J., Gwathmey, J.K., Saks, V., Pessina, A.C., and Allen, P.D. (1996). Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. **Circulation** *94*, 1894-901.
236. Nass, M.M. and Nass, S. (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. **J Cell Biol** *19*, 593-611.
237. Neglia, D., De Caterina, A., Marraccini, P., Natali, A., Ciardetti, M., Vecoli, C., Gastaldelli, A., Ciociaro, D., Pellegrini, P., Testa, R., Menichetti, L., L'Abbate, A., Stanley, W.C., and Recchia, F.A. (2007). Impaired myocardial metabolic reserve and substrate selection flexibility during stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** *293*, H3270-8.
238. Neubauer, S. (2007). The failing heart--an engine out of fuel. **N Engl J Med** *356*, 1140-51.
239. Neubauer, S., Horn, M., Cramer, M., Harre, K., Newell, J.B., Peters, W., Pabst, T., Ertl, G., Hahn, D., Ingwall, J.S., and Kochsiek, K. (1997). Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. **Circulation** *96*, 2190-6.
240. Nguyen, A., Chen, P., and Cai, H. (2004). Role of CaMKII in hydrogen peroxide activation of ERK1/2, p38 MAPK, HSP27 and actin reorganization in endothelial cells. **FEBS Lett** *572*, 307-13.
241. Nilsen, J., Irwin, R.W., Gallaher, T.K., and Brinton, R.D. (2007). Estradiol in vivo regulation of brain mitochondrial proteome. **J Neurosci** *27*, 14069-77.
242. Nisoli, E., Tonello, C., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Falcone, S., Valerio, A., Cantoni, O., Clementi, E., Moncada, S., and Carruba, M.O. (2005). Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. **Science** *310*, 314-7.
243. Noma, T. (2005). Dynamics of nucleotide metabolism as a supporter of life phenomena. **J Med Invest** *52*, 127-36.
244. Norrbom, J., Sundberg, C.J., Ameln, H., Kraus, W.E., Jansson, E., and Gustafsson, T.

- (2004). PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. **J Appl Physiol** 96, 189-94.
245. Okere, I.C., Chess, D.J., McElfresh, T.A., Johnson, J., Rennison, J., Ernsberger, P., Hoit, B.D., Chandler, M.P., and Stanley, W.C. (2005). High-fat diet prevents cardiac hypertrophy and improves contractile function in the hypertensive dahl salt-sensitive rat. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 32, 825-31.
246. Okere, I.C., Young, M.E., McElfresh, T.A., Chess, D.J., Sharov, V.G., Sabbah, H.N., Hoit, B.D., Ernsberger, P., Chandler, M.P., and Stanley, W.C. (2006). Low carbohydrate/high-fat diet attenuates cardiac hypertrophy, remodeling, and altered gene expression in hypertension. **Hypertension** 48, 1116-23.
247. Okun, J.G., Horster, F., Farkas, L.M., Feyh, P., Hinz, A., Sauer, S., Hoffmann, G.F., Unsicker, K., Mayatepek, E., and Kolker, S. (2002). Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. **J Biol Chem** 277, 14674-80.
248. Olson, E.R., Naugle, J.E., Zhang, X., Bomser, J.A., and Meszaros, J.G. (2005). Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 288, H1131-8.
249. Opie, L.H. and Lecour, S. (2007). The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. **Eur Heart J** 28, 1683-93.
250. Orosz, D.E. and Hopfer, U. (1996). Pathophysiological consequences of changes in the coupling ratio of Na,K-ATPase for renal sodium reabsorption and its implications for hypertension. **Hypertension** 27, 219-27.
251. Osorio, J.C., Stanley, W.C., Linke, A., Castellari, M., Diep, Q.N., Panchal, A.R., Hintze, T.H., Lopaschuk, G.D., and Recchia, F.A. (2002). Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor-alpha in pacing-induced heart failure. **Circulation** 106, 606-12.
252. Packer, L., Cadenas, E., and Davies, K.J. (2008). Free radicals and exercise: an introduction. **Free Radic Biol Med** 44, 123-5.
253. Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., and Ruggiero, F.M. (2001). Reactive oxygen species generated by the mitochondrial respiratory chain affect the complex III activity via cardiolipin peroxidation in beef-heart submitochondrial particles. **Mitochondrion** 1, 151-9.
254. Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., and Ruggiero, F.M. (2002). Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. **Gene** 286, 135-41.
255. Park, S.Y., Cho, Y.R., Finck, B.N., Kim, H.J., Higashimori, T., Hong, E.G., Lee, M.K., Danton, C., Deshmukh, S., Cline, G.W., Wu, J.J., Bennett, A.M., Rothermel, B., Kalinowski, A., Russell, K.S., Kim, Y.B., Kelly, D.P., and Kim, J.K. (2005). Cardiac-specific overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha causes insulin resistance in heart and liver. **Diabetes**

256. Patten, I.S. and Arany, Z. (2011). PGC-1 coactivators in the cardiovascular system. **Trends Endocrinol Metab**
257. Patterson, J.H., Adams, K.F. Jr, Applefeld, M.M., Corder, C.N., and Masse, B.R. (1994). Oral torsemide in patients with chronic congestive heart failure: effects on body weight, edema, and electrolyte excretion. Torsemide Investigators Group. **Pharmacotherapy** 14, 514-21.
258. Paulus, W.J., Tschope, C., Sanderson, J.E., Rusconi, C., Flachskampf, F.A., Rademakers, F.E., Marino, P., Smiseth, O.A., De Keulenaer, G., Leite-Moreira, A.F., Borbely, A., Edes, I., Handoko, M.L., Heymans, S., Pezzali, N., Pieske, B., Dickstein, K., Fraser, A.G., and Brutsaert, D.L. (2007). How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. **Eur Heart J** 28, 2539-50.
259. Pfanner, N. and Meijer, M. (1997). The Tom and Tim machine. **Curr Biol** 7, R100-3.
260. Pitkanen, S. and Robinson, B.H. (1996). Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. **J Clin Invest** 98, 345-51.
261. Pitt, B. (2004). Effect of aldosterone blockade in patients with systolic left ventricular dysfunction: implications of the RALES and EPHESUS studies. **Mol Cell Endocrinol** 217, 53-8.
262. Planavila, A., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. (2011). Sirt1 acts in association with PPARalpha to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. **Cardiovasc Res** 90, 276-84.
263. Ponsot, E., Zoll, J., N'guessan, B., Ribera, F., Lampert, E., Richard, R., Veksler, V., Ventura-Clapier, R., and Mettauer, B. (2005). Mitochondrial tissue specificity of substrates utilization in rat cardiac and skeletal muscles. **J Cell Physiol** 203, 479-86.
264. Powers, S.K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L.L., Martin, D., Herb, R.A., and Dudley, G. (1994). Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **Am J Physiol** 266, R375-80.
265. Powers, S.K., Duarte, J., Kavazis, A.N., and Talbert, E.E. (2010). Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. **Exp Physiol** 95, 1-9.
266. Powers, S.K. and Jackson, M.J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Rev** 88, 1243-76.
267. Price, N.L., Gomes, A.P., Ling, A.J., Duarte, F.V., Martin-Montalvo, A., North, B.J.,

- Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J.S., Hubbard, B.P., Varela, A.T., Davis, J.G., Varamini, B., Hafner, A., Moaddel, R., Rolo, A.P., Coppari, R., Palmeira, C.M., de Cabo, R., Baur, J.A., and Sinclair, D.A. (2012). SIRT1 Is Required for AMPK Activation and the Beneficial Effects of Resveratrol on Mitochondrial Function. **Cell Metab** 15, 675-90.
268. Puddu, P., Puddu, G.M., Cravero, E., Rosati, M., and Muscari, A. (2008). The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. **Blood Press** 17, 70-7.
269. Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B., and Spiegelman, B.M. (1999). Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. **Science** 286, 1368-71.
270. Puigserver, P., Rhee, J., Lin, J., Wu, Z., Yoon, J.C., Zhang, C.Y., Krauss, S., Mootha, V.K., Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. (2001). Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. **Mol Cell** 8, 971-82.
271. Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell** 92, 829-39.
272. Quigley, A.F., Kapsa, R.M., Esmore, D., Hale, G., and Byrne, E. (2000). Mitochondrial respiratory chain activity in idiopathic dilated cardiomyopathy. **J Card Fail** 6, 47-55.
273. Rabinowitz, M., Sinclair, J., DeSalle, L., Haselkorn, R., and Swift, H.H. (1965). Isolation of deoxyribonucleic acid from mitochondria of chick embryo heart and liver. **Proc Natl Acad Sci U S A** 53, 1126-33.
274. Rahal, K., Schmiechlin-Ren, P., Adler, J., Dhanani, M., Sultani, V., Rittershaus, A.C., Reingold, L., Zhu, J., McKenna, B.J., Christman, G.M., and Zimmermann, E.M. (2012). Resveratrol has antiinflammatory and antifibrotic effects in the peptidoglycan-polysaccharide rat model of Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis** 18, 613-23.
275. Rao, J., Li, J., Liu, Y., Lu, P., Sun, X., Sugumar, P.K., and Zhu, D. (2012). The key role of PGC-1alpha in mitochondrial biogenesis and the proliferation of pulmonary artery vascular smooth muscle cells at an early stage of hypoxic exposure. **Mol Cell Biochem**
276. Razeghi, P., Young, M.E., Alcorn, J.L., Moravec, C.S., Frazier, O.H., and Taegtmeier, H. (2001). Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. **Circulation** 104, 2923-31.
277. Regitz-Zagrosek, V. (2006). Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. **Nat Rev Drug Discov** 5, 425-38.
278. Regitz-Zagrosek, V., Oertelt-Prigione, S., Seeland, U., and Hetzer, R. (2010). Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. **Circ J** 74, 1265-73.

279. Reiser, P.J., Portman, M.A., Ning, X.H., and Schomisch Moravec, C. (2001). Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 280, H1814-20.
280. Ren, J.M., Semenkovich, C.F., Gulve, E.A., Gao, J., and Holloszy, J.O. (1994). Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. **J Biol Chem** 269, 14396-401.
281. Rennison, J.H., McElfresh, T.A., Chen, X., Anand, V.R., Hoit, B.D., Hoppel, C.L., and Chandler, M.P. (2009). Prolonged exposure to high dietary lipids is not associated with lipotoxicity in heart failure. **J Mol Cell Cardiol** 46, 883-90.
282. Rennison, J.H., McElfresh, T.A., Okere, I.C., Vazquez, E.J., Patel, H.V., Foster, A.B., Patel, K.K., Chen, Q., Hoit, B.D., Tserng, K.Y., Hassan, M.O., Hoppel, C.L., and Chandler, M.P. (2007). High-fat diet postinfarction enhances mitochondrial function and does not exacerbate left ventricular dysfunction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 292, H1498-506.
283. Rimbaud, S., Ruiz, M., Piquereau, J., Mateo, P., Fortin, D., Veksler, V., Garnier, A., and Ventura-Clapier, R. (2011). Resveratrol improves survival, hemodynamics and energetics in a rat model of hypertension leading to heart failure. **PLoS One** 6, e26391
284. Rimbaud, S., Sanchez, H., Garnier, A., Fortin, D., Bigard, X., Veksler, V., and Ventura-Clapier, R. (2009). Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. **J Mol Cell Cardiol** 46, 952-9.
285. Rivard, A. and Andres, V. (2000). Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases. **Histol Histopathol** 15, 557-71.
286. Robinson, K., Mayer, E.L., Miller, D.P., Green, R., van Lente, F., Gupta, A., Kottke-Marchant, K., Savon, S.R., Selhub, J., Nissen, S.E., and et, a.l. (1995). Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. **Circulation** 92, 2825-30.
287. Rocher, C., Taanman, J.W., Pierron, D., Faustin, B., Benard, G., Rossignol, R., Malgat, M., Pedespan, L., and Letellier, T. (2008). Influence of mitochondrial DNA level on cellular energy metabolism: implications for mitochondrial diseases. **J Bioenerg Biomembr** 40, 59-67.
288. Rodgers, J.T., Lerin, C., Gerhart-Hines, Z., and Puigserver, P. (2008). Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. **FEBS Lett** 582, 46-53.
289. Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. **Nature** 434, 113-8.
290. Rodriguez-Cuenca, S., Monjo, M., Gianotti, M., Proenza, A.M., and Roca, P. (2007).

Expression of mitochondrial biogenesis-signaling factors in brown adipocytes is influenced specifically by 17beta-estradiol, testosterone, and progesterone. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 292, E340-6.

291. Roeder, R.G. (2005). Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. **FEBS Lett** 579, 909-15.
292. Rolfe, D.F. and Brown, G.C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. **Physiol Rev** 77, 731-58.
293. Rossignol, R., Malgat, M., Mazat, J.P., and Letellier, T. (1999). Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies. **J Biol Chem** 274, 33426-32.
294. Rowe, G.C., Jiang, A., and Arany, Z. (2010). PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. **Circ Res** 107, 825-38.
295. Ruiz-Opazo, N., Barany, F., Hirayama, K., and Herrera, V.L. (1994). Confirmation of mutant alpha 1 Na,K-ATPase gene and transcript in Dahl salt-sensitive/JR rats. **Hypertension** 24, 260-70.
296. Russell, L.K., Mansfield, C.M., Lehman, J.J., Kovacs, A., Courtois, M., Saffitz, J.E., Medeiros, D.M., Valencik, M.L., McDonald, J.A., and Kelly, D.P. (2004). Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. **Circ Res** 94, 525-33.
297. Rytinki, M.M. and Palvimo, J.J. (2009). SUMOylation attenuates the function of PGC-1alpha. **J Biol Chem** 284, 26184-93.
298. Sabbah, H.N., Chandler, M.P., Mishima, T., Suzuki, G., Chaudhry, P., Nass, O., Biesiadecki, B.J., Blackburn, B., Wolff, A., and Stanley, W.C. (2002). Ranolazine, a partial fatty acid oxidation (pFOX) inhibitor, improves left ventricular function in dogs with chronic heart failure. **J Card Fail** 8, 416-22.
299. Sabbah, H.N., Sharov, V., Riddle, J.M., Kono, T., Lesch, M., and Goldstein, S. (1992). Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure. **J Mol Cell Cardiol** 24, 1333-47.
300. Sack, M.N., Rader, T.A., Park, S., Bastin, J., McCune, S.A., and Kelly, D.P. (1996). Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. **Circulation** 94, 2837-42.
301. Safdar, A., Little, J.P., Stokl, A.J., Hettinga, B.P., Akhtar, M., and Tarnopolsky, M.A. (2011). Exercise increases mitochondrial PGC-1alpha content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. **J Biol Chem** 286, 10605-17.
302. Saks, V., Dzeja, P., Schlattner, U., Vendelin, M., Terzic, A., and Wallimann, T. (2006). Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. **J Physiol** 571, 253-73.

303. Sano, M., Tokudome, S., Shimizu, N., Yoshikawa, N., Ogawa, C., Shirakawa, K., Endo, J., Katayama, T., Yuasa, S., Ieda, M., Makino, S., Hattori, F., Tanaka, H., and Fukuda, K. (2007). Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. **J Biol Chem** 282, 25970-80.
304. Sauve, A.A., Wolberger, C., Schramm, V.L., and Boeke, J.D. (2006). The biochemistry of sirtuins. **Annu Rev Biochem** 75, 435-65.
305. Scarpulla, R.C. (2006). Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. **J Cell Biochem** 97, 673-83.
306. Scarpulla, R.C. (2008). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. **Physiol Rev** 88, 611-38.
307. Scarpulla, R.C. (2010). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. **Biochim Biophys Acta**
308. Schaffer, J.E. and Lodish, H.F. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. **Cell** 79, 427-36.
309. Schaper, J., Froede, R., Hein, S., Buck, A., Hashizume, H., Speiser, B., Friedl, A., and Bleese, N. (1991). Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. **Circulation** 83, 504-14.
310. Schilling, J. and Kelly, D.P. (2010). The PGC-1 cascade as a therapeutic target for heart failure. **J Mol Cell Cardiol**
311. Schilling, J., Lai, L., Sambandam, N., Dey, C.E., Leone, T.C., and Kelly, D.P. (2011). Toll-like Receptor-mediated Inflammatory Signaling Reprograms Cardiac Energy Metabolism by Repressing Peroxisome Proliferator-activated Receptor {gamma} Coactivator-1 (PGC-1) Signaling. **Circ Heart Fail**
312. Schmidt, O., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. **Nat Rev Mol Cell Biol** 11, 655-67.
313. Schreiber, S.N., Emter, R., Hock, M.B., Knutti, D., Cardenas, J., Podvinec, M., Oakeley, E.J., and Kralli, A. (2004). The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101, 6472-7.
314. Schwartz, M. and Vissing, J. (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. **N Engl J Med** 347, 576-80.
315. Schwenk, R.W., Luiken, J.J., Bonen, A., and Glatz, J.F. (2008). Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease. **Cardiovasc Res** 79, 249-58.
316. Scolletta, S. and Biagioli, B. (2010). Energetic myocardial metabolism and oxidative stress: let's make them our friends in the fight against heart failure. **Biomed**



317. Sebastiani, M., Giordano, C., Nediani, C., Travaglini, C., Borchi, E., Zani, M., Feccia, M., Mancini, M., Petrozza, V., Cossarizza, A., Gallo, P., Taylor, R.W., and d'Amati, G. (2007). Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. **J Am Coll Cardiol** 50, 1362-9.
318. Seymour, E.M., Parikh, R.V., Singer, A.A., and Bolling, S.F. (2006). Moderate calorie restriction improves cardiac remodeling and diastolic dysfunction in the Dahl-SS rat. **J Mol Cell Cardiol** 41, 661-8.
319. Shadel, G.S. and Clayton, D.A. (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. **Annu Rev Biochem** 66, 409-35.
320. Shane, B. and Stokstad, E.L. (1985). Vitamin B12-folate interrelationships. **Annu Rev Nutr** 5, 115-41.
321. Sharma, S., Adroge, J.V., Golfman, L., Uray, I., Lemm, J., Youker, K., Noon, G.P., Frazier, O.H., and Taegtmeyer, H. (2004). Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. **FASEB J** 18, 1692-700.
322. Sharov, V.G., Goussev, A., Lesch, M., Goldstein, S., and Sabbah, H.N. (1998). Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. **J Mol Cell Cardiol** 30, 1757-62.
323. Sharov, V.G., Todor, A.V., Silverman, N., Goldstein, S., and Sabbah, H.N. (2000). Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. **J Mol Cell Cardiol** 32, 2361-7.
324. Shen, W., Asai, K., Uechi, M., Mathier, M.A., Shannon, R.P., Vatner, S.F., and Ingwall, J.S. (1999). Progressive loss of myocardial ATP due to a loss of total purines during the development of heart failure in dogs: a compensatory role for the parallel loss of creatine. **Circulation** 100, 2113-8.
325. Shimojo, N., Miyauchi, T., Iemitsu, M., Irukayama-Tomobe, Y., Maeda, S., Ohkubo, T., Tanaka, Y., Goto, K., and Yamaguchi, I. (2004). Effects of medium-chain triglyceride (MCT) application to SHR on cardiac function, hypertrophy and expression of endothelin-1 mRNA and other genes. **J Cardiovasc Pharmacol** 44 Suppl 1, S181-5.
326. Sihag, S., Cresci, S., Li, A.Y., Sucharov, C.C., and Lehman, J.J. (2009). PGC-1alpha and ERRalpha target gene downregulation is a signature of the failing human heart. **J Mol Cell Cardiol** 46, 201-12.
327. Silveira, L.R., Pilegaard, H., Kusuhara, K., Curi, R., and Hellsten, Y. (2006). The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species. **Biochim Biophys Acta** 1763, 969-76.

328. Simon, T., Mary-Krause, M., Funck-Brentano, C., and Jaillon, P. (2001). Sex differences in the prognosis of congestive heart failure: results from the Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS II). **Circulation** *103*, 375-80.
329. Skavdahl, M., Steenbergen, C., Clark, J., Myers, P., Demianenko, T., Mao, L., Rockman, H.A., Korach, K.S., and Murphy, E. (2005). Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** *288*, H469-76.
330. Song, Y.H., Choi, E., Park, S.H., Lee, S.H., Cho, H., Ho, W.K., and Ryu, S.Y. (2011). Sustained CaMKII activity mediates transient oxidative stress-induced long-term facilitation of L-type Ca(2+) current in cardiomyocytes. **Free Radic Biol Med** *51*, 1708-16.
331. Sonoda, J., Mehl, I.R., Chong, L.W., Nofsinger, R.R., and Evans, R.M. (2007). PGC-1beta controls mitochondrial metabolism to modulate circadian activity, adaptive thermogenesis, and hepatic steatosis. **Proc Natl Acad Sci U S A** *104*, 5223-8.
332. Spiegelman, B.M. and Heinrich, R. (2004). Biological control through regulated transcriptional coactivators. **Cell** *119*, 157-67.
333. St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jager, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D.K., Bachoo, R., and Spiegelman, B.M. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. **Cell** *127*, 397-408.
334. Staiger, H., Staiger, K., Haas, C., Weisser, M., Machicao, F., and Haring, H.U. (2005). Fatty acid-induced differential regulation of the genes encoding peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha and -1beta in human skeletal muscle cells that have been differentiated in vitro. **Diabetologia** *48*, 2115-8.
335. Stanley, W.C. and Hoppel, C.L. (2000). Mitochondrial dysfunction in heart failure: potential for therapeutic interventions? **Cardiovasc Res** *45*, 805-6.
336. Stanley, W.C. and Marzilli, M. (2003). Metabolic therapy in the treatment of ischaemic heart disease: the pharmacology of trimetazidine. **Fundam Clin Pharmacol** *17*, 133-45.
337. Stanley, W.C., Recchia, F.A., and Lopaschuk, G.D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. **Physiol Rev** *85*, 1093-129.
338. Steiner, J.L., Murphy, E.A., McClellan, J.L., Carmichael, M.D., and Davis, J.M. (2011). Exercise Training Increases Mitochondrial Biogenesis in the Brain. **J Appl Physiol**
339. Stirone, C., Duckles, S.P., Krause, D.N., and Procaccio, V. (2005). Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. **Mol Pharmacol** *68*, 959-65.
340. Strehlow, K., Rotter, S., Wassmann, S., Adam, O., Grohe, C., Laufs, K., Bohm, M.,

- and Nickenig, G. (2003). Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. **Circ Res** 93, 170-7.
341. Sun, C.K., Chang, L.T., Sheu, J.J., Wang, C.Y., Youssef, A.A., Wu, C.J., Chua, S., and Yip, H.K. (2007). Losartan preserves integrity of cardiac gap junctions and PGC-1 alpha gene expression and prevents cellular apoptosis in remote area of left ventricular myocardium following acute myocardial infarction. **Int Heart J** 48, 533-46.
342. Suwa, M., Nakano, H., and Kumagai, S. (2003). Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles. **J Appl Physiol** 95, 960-8.
343. Suwa, M., Nakano, H., Radak, Z., and Kumagai, S. (2008). Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle. **Metabolism** 57, 986-98.
344. Taanman, J.W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. **Biochim Biophys Acta** 1410, 103-23.
345. Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., Watanabe, M., Magoori, K., Ioka, R.X., Tachibana, K., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Sumi, K., Iguchi, H., Ito, S., Doi, T., Hamakubo, T., Naito, M., Auwerx, J., Yanagisawa, M., Kodama, T., and Sakai, J. (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100, 15924-9.
346. Tanito, M., Nakamura, H., Kwon, Y.W., Teratani, A., Masutani, H., Shioji, K., Kishimoto, C., Ohira, A., Horie, R., and Yodoi, J. (2004). Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats. **Antioxid Redox Signal** 6, 89-97.
347. Taniyama, Y. and Griendling, K.K. (2003). Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension** 42, 1075-81.
348. Tannous, B.A., Kim, D.E., Fernandez, J.L., Weissleder, R., and Breakefield, X.O. (2005). Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. **Mol Ther** 11, 435-43.
349. Tanpaiboon, P. (2005). Methylmalonic acidemia (MMA). **Mol Genet Metab** 85, 2-6.
350. Terada, S., Goto, M., Kato, M., Kawanaka, K., Shimokawa, T., and Tabata, I. (2002). Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. **Biochem Biophys Res Commun** 296, 350-4.
351. Teyssier, C., Ma, H., Emter, R., Kralli, A., and Stallcup, M.R. (2005). Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation. **Genes Dev** 19, 1466-73.
352. Thumelin, S., Esser, V., Charvy, D., Kolodziej, M., Zammit, V.A., McGarry, D.,

- Girard, J., and Pegorier, J.P. (1994). Expression of liver carnitine palmitoyltransferase I and II genes during development in the rat. **Biochem J** 300 ( Pt 2), 583-7.
353. Tillu, D.V., Melemedjian, O.K., Asiedu, M.N., Qu, N., De Felice, M., Dussor, G., and Price, T.J. (2012). Resveratrol engages AMPK to attenuate ERK and mTOR signaling in sensory neurons and inhibits incision-induced acute and chronic pain. **Mol Pain** 8, 5
354. Tiranti, V., Savoia, A., Forti, F., D'Apolito, M.F., Centra, M., Rocchi, M., and Zeviani, M. (1997). Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. **Hum Mol Genet** 6, 615-25.
355. Trian, T., Benard, G., Begueret, H., Rossignol, R., Girodet, P.O., Ghosh, D., Ousova, O., Vernejoux, J.M., Marthan, R., Tunon-de-Lara, J.M., and Berger, P. (2007). Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. **J Exp Med** 204, 3173-81.
356. Troilo, A., Mecili, M., Ciobanu, E., Boddi, V., D'Elios, M.M., and Andres, E. (2010). [Oral vitamin B12: Efficacy and safety data in 31 patients with pernicious anemia and food-cobalamin malabsorption]. **Presse Med** 39, e273-9.
357. Tsutsui, H., Kinugawa, S., and Matsushima, S. (2008). Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure. **Circ J** 72 Suppl A, A31-7.
358. Turcotte, L.P., Srivastava, A.K., and Chiasson, J.L. (1997). Fasting increases plasma membrane fatty acid-binding protein (FABP(PM)) in red skeletal muscle. **Mol Cell Biochem** 166, 153-8.
359. Tuunanen, H., Engblom, E., Naum, A., Nagren, K., Hesse, B., Airaksinen, K.E., Nuutila, P., Iozzo, P., Ukkonen, H., Opie, L.H., and Knuuti, J. (2006). Free fatty acid depletion acutely decreases cardiac work and efficiency in cardiomyopathic heart failure. **Circulation** 114, 2130-7.
360. Ulrich, S., Loitsch, S.M., Rau, O., von Knethen, A., Brune, B., Schubert-Zsilavecz, M., and Stein, J.M. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a molecular target of resveratrol-induced modulation of polyamine metabolism. **Cancer Res** 66, 7348-54.
361. Um, J.H., Park, S.J., Kang, H., Yang, S., Foretz, M., McBurney, M.W., Kim, M.K., Viollet, B., and Chung, J.H. (2010). AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. **Diabetes** 59, 554-63.
362. Valle, I., Alvarez-Barrientos, A., Arza, E., Lamas, S., and Monsalve, M. (2005). PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. **Cardiovasc Res** 66, 562-73.
363. Vallot, O., Combettes, L., Jourdon, P., Inamo, J., Marty, I., Claret, M., and Lompre, A.M. (2000). Intracellular Ca(2+) handling in vascular smooth muscle cells is affected by proliferation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 20, 1225-35.

364. van Bilsen, M. (2004). "Energenetics" of heart failure. **Ann N Y Acad Sci** 1015, 238-49.
365. van der Lee, K.A., Vork, M.M., De Vries, J.E., Willemsen, P.H., Glatz, J.F., Reneman, R.S., Van der Vusse, G.J., and Van Bilsen, M. (2000). Long-chain fatty acid-induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes. **J Lipid Res** 41, 41-7.
366. Van Nieuwenhoven, F.A., Verstijnen, C.P., Abumrad, N.A., Willemsen, P.H., Van Eys, G.J., Van der Vusse, G.J., and Glatz, J.F. (1995). Putative membrane fatty acid translocase and cytoplasmic fatty acid-binding protein are co-expressed in rat heart and skeletal muscles. **Biochem Biophys Res Commun** 207, 747-52.
367. Van Remmen, H. and Richardson, A. (2001). Oxidative damage to mitochondria and aging. **Exp Gerontol** 36, 957-68.
368. Vannier, C., Veksler, V., Mekhfi, H., Mateo, P., and Ventura-Clapier, R. (1996). Functional tissue and developmental specificities of myofibrils and mitochondria in cardiac muscle. **Can J Physiol Pharmacol** 74, 23-31.
369. Vasan, R.S., Beiser, A., D'Agostino, R.B., Levy, D., Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., and Wilson, P.W. (2003). Plasma homocysteine and risk for congestive heart failure in adults without prior myocardial infarction. **JAMA** 289, 1251-7.
370. Vega, R.B., Huss, J.M., and Kelly, D.P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. **Mol Cell Biol** 20, 1868-76.
371. Ventura-Clapier, R., Garnier, A., and Veksler, V. (2004). Energy metabolism in heart failure. **J Physiol** 555, 1-13.
372. Ventura-Clapier, R., Garnier, A., and Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. **Cardiovasc Res** 79, 208-17.
373. Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Veksler, V., and Joubert, F. (2011). Bioenergetics of the failing heart. **Biochim Biophys Acta** 1813, 1360-72.
374. Ventura-Clapier, R., Kuznetsov, A., Veksler, V., Boehm, E., and Anflous, K. (1998). Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity. **Mol Cell Biochem** 184, 231-47.
375. Villari, B., Campbell, S.E., Schneider, J., Vassalli, G., Chiariello, M., and Hess, O.M. (1995). Sex-dependent differences in left ventricular function and structure in chronic pressure overload. **Eur Heart J** 16, 1410-9.
376. Virbasius, J.V. and Scarpulla, R.C. (1994). Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 91, 1309-13.

377. Wagner, S., Ruff, H.M., Weber, S.L., Bellmann, S., Sowa, T., Schulte, T., Anderson, M.E., Grandi, E., Bers, D.M., Backs, J., Belardinelli, L., and Maier, L.S. (2011). Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase IIdelta is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. **Circ Res** 108, 555-65.
378. Wallberg, A.E., Yamamura, S., Malik, S., Spiegelman, B.M., and Roeder, R.G. (2003). Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1alpha. **Mol Cell** 12, 1137-49.
379. Wang, P., Liu, J., Li, Y., Wu, S., Luo, J., Yang, H., Subbiah, R., Chatham, J., Zhelyabovska, O., and Yang, Q. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor {delta} is an essential transcriptional regulator for mitochondrial protection and biogenesis in adult heart. **Circ Res** 106, 911-9.
380. Wang, Y.X., Zhang, C.L., Yu, R.T., Cho, H.K., Nelson, M.C., Bayuga-Ocampo, C.R., Ham, J., Kang, H., and Evans, R.M. (2004). Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. **PLoS Biol** 2, e294
381. Washio, T., Nomoto, K., Watanabe, I., Tani, S., Nagao, K., and Hirayama, A. (2011). Relationship between plasma homocysteine levels and congestive heart failure in patients with acute myocardial infarction. Homocysteine and congestive heart failure. **Int Heart J** 52, 224-8.
382. Watson, P.A., Reusch, J.E., McCune, S.A., Leinwand, L.A., Luckey, S.W., Konhilas, J.P., Brown, D.A., Chicco, A.J., Sparagna, G.C., Long, C.S., and Moore, R.L. (2007). Restoration of CREB function is linked to completion and stabilization of adaptive cardiac hypertrophy in response to exercise. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 293, H246-59.
383. Wei, Y.H., Lu, C.Y., Lee, H.C., Pang, C.Y., and Ma, Y.S. (1998). Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. **Ann N Y Acad Sci** 854, 155-70.
384. Wende, A.R., Huss, J.M., Schaeffer, P.J., Giguere, V., and Kelly, D.P. (2005). PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. **Mol Cell Biol** 25, 10684-94.
385. Wende, A.R., Schaeffer, P.J., Parker, G.J., Zechner, C., Han, D.H., Chen, M.M., Hancock, C.R., Lehman, J.J., Huss, J.M., McClain, D.A., Holloszy, J.O., and Kelly, D.P. (2007). A role for the transcriptional coactivator PGC-1alpha in muscle refueling. **J Biol Chem** 282, 36642-51.
386. Wisneski, J.A., Gertz, E.W., Neese, R.A., and Mayr, M. (1987). Myocardial metabolism of free fatty acids. Studies with 14C-labeled substrates in humans. **J Clin Invest** 79, 359-66.
387. Witt, H., Schubert, C., Jaekel, J., Fliegner, D., Penkalla, A., Tiemann, K., Stypmann, J., Roepcke, S., Brokat, S., Mahmoodzadeh, S., Brozova, E., Davidson, M.M., Ruiz Noppinger, P., Grohe, C., and Regitz-Zagrosek, V. (2008). Sex-specific

pathways in early cardiac response to pressure overload in mice. **J Mol Med (Berl)** 86, 1013-24.

388. Wright, D.C., Geiger, P.C., Han, D.H., Jones, T.E., and Holloszy, J.O. (2007a). Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. **J Biol Chem** 282, 18793-9.
389. Wright, D.C., Han, D.H., Garcia-Roves, P.M., Geiger, P.C., Jones, T.E., and Holloszy, J.O. (2007b). Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. **J Biol Chem** 282, 194-9.
390. Wu, H., Kanatous, S.B., Thurmond, F.A., Gallardo, T., Isotani, E., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (2002). Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. **Science** 296, 349-52.
391. Wu, H., Rothermel, B., Kanatous, S., Rosenberg, P., Naya, F.J., Shelton, J.M., Hutcheson, K.A., DiMaio, J.M., Olson, E.N., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (2001). Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. **EMBO J** 20, 6414-23.
392. Wu, Y., Chin, W.W., Wang, Y., and Burris, T.P. (2003). Ligand and coactivator identity determines the requirement of the charge clamp for coactivation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **J Biol Chem** 278, 8637-44.
393. Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., and Spiegelman, B.M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. **Cell** 98, 115-24.
394. Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Parks, D.J., Blanchard, S.G., Brown, P.J., Sternbach, D.D., Lehmann, J.M., Wisely, G.B., Willson, T.M., Kliewer, S.A., and Milburn, M.V. (1999). Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. **Mol Cell** 3, 397-403.
395. Yang, S.H., Liu, R., Perez, E.J., Wen, Y., Stevens, S.M. Jr, Valencia, T., Brun-Zinkernagel, A.M., Prokai, L., Will, Y., Dykens, J., Koulen, P., and Simpkins, J.W. (2004). Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101, 4130-5.
396. Zhang, Y., Luo, Z., Ma, L., Xu, Q., Yang, Q., and Si, L. (2010). Resveratrol prevents the impairment of advanced glycosylation end products (AGE) on macrophage lipid homeostasis by suppressing the receptor for AGE via peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. **Int J Mol Med** 25, 729-34.
397. Zhao, M., New, L., Kravchenko, V.V., Kato, Y., Gram, H., di Padova, F., Olson, E.N., Ulevitch, R.J., and Han, J. (1999). Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. **Mol Cell Biol** 19, 21-30.
398. Zoll, J., Monassier, L., Garnier, A., N'Guessan, B., Mettauer, B., Veksler, V., Piquard,

F., Ventura-Clapier, R., and Geny, B. (2006). ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. **J Appl Physiol** *101*, 385-91.

399. Zorzano, A., Sevilla, L., Camps, M., Becker, C., Meyer, J., Kammermeier, H., Munoz, P., Guma, A., Testar, X., Palacin, M., Blasi, J., and Fischer, Y. (1997). Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes. **Am J Cardiol** *80*, 65A-76A.



## RESUME

---

L'insuffisance cardiaque (IC) reste la cause majeure de morbidité dans les pays industrialisés justifiant ainsi la recherche de traitements plus ciblés. Caractérisée par des désordres métaboliques importants qui impliquent notamment une dysfonction mitochondriale, le métabolisme énergétique apparaît comme une composante majeure du développement de l'IC. Ces dernières années, le co-activateur transcriptionnel PGC-1 $\alpha$  a été proposé comme un acteur central du contrôle de la fonction mitochondriale et constitue ainsi une cible thérapeutique d'intérêt.

Ainsi, l'objectif principal de ce travail est de développer un test cellulaire robotisé permettant la recherche d'activateurs de PGC-1 $\alpha$  dans un contexte cardiaque.

La mise en place de ce test cellulaire de criblage dans des cellules H9c2 différenciées en cellules pseudo-cardiaques a permis l'identification de trois familles majeures : les hormones stéroïdiennes, les vitamines B et les acides gras, capables d'activer l'expression de PGC-1 $\alpha$  et par ce biais d'induire une biogenèse mitochondriale ainsi qu'une augmentation de la respiration mitochondriale. La validation de ces effets dans des cardiomyocytes de rat adulte a permis d'une part de valider la pertinence du test et du choix du modèle cellulaire et d'autre part de vérifier qu'une induction de l'expression de PGC-1 $\alpha$  se répercute bien sur la cascade transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale. Ce test constitue donc un atout majeur dans la recherche de nouveaux activateurs de PGC-1 $\alpha$  pour mieux comprendre ses mécanismes de régulation dans le cœur, mais offre aussi des perspectives intéressantes pour la recherche de composés pharmacologiques à visée thérapeutique.

Par ailleurs, peu de connaissances sont disponibles dans la littérature concernant le contrôle de la biogenèse mitochondriale dans le muscle lisse vasculaire et plus particulièrement dans l'hypertension artérielle. Ainsi, la deuxième partie de ce travail a été de caractériser la biogenèse mitochondriale dans un contexte d'hypertension. A travers l'utilisation d'un modèle expérimental d'hypertension et après confirmation dans des cellules musculaires lisses en culture, nous avons montré une induction importante de la biogenèse mitochondriale dans l'hypertension par un mécanisme stress oxydant-dépendant. De plus, cette induction est corrélée à une forte activation de la CaMKII, totalement bloquée par la présence d'un anti-oxydant : le resvératrol. Ces résultats suggèrent donc un contrôle de la biogenèse mitochondriale dépendante de la balance pro/anti-oxydante via l'activation de la CaMKII dans le muscle lisse vasculaire.

**Mots clés :** insuffisance cardiaque, mitochondrie, métabolisme énergétique, biogenèse mitochondriale, PGC-1 $\alpha$ , hypertension artérielle, CaMKII, stress oxydant, resvératrol, cardiomyocytes, cellules musculaires lisses vasculaires, hormones stéroïdiennes, vitamines B, acides gras.

Laboratoire de Signalisation et Physiopathologie cardiaque, UMR-S 769  
Pôle : Physiopathologie moléculaire et cellulaire

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11  
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »  
5, rue Jean Baptiste Clément  
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cédex